

RÉSUMÉ

La modification des surfaces des électrodes à pâte de carbone par des molécules biologiques naturelles est largement utilisée pour la détermination électrochimique d'une gamme assez large de substances à de faibles concentrations. Cette modification d'électrodes est réalisée dans le but d'améliorer les performances analytiques des biocapteurs électrochimiques. Il en résulte une augmentation de la sensibilité, un abaissement des limites de détection, une extension du domaine de linéarité. L'objectif de ce travail consiste tout d'abord, à l'élaboration des électrodes à pâte de carbone sur lesquelles est déposé un film d'ADN, par auto-assemblage. Ces électrodes ainsi préparées ont été utilisées pour l'élimination et la détection électrochimique de différents métaux lourds tels que le mercure (II) et le plomb (II). Une autre génération d'électrodes modifiées a attiré notre curiosité, il s'agit des immunocapteurs destinés à la détection des anticorps spécifiquement dirigés contre le virus *West Nile* et la détection des bactéries de type *Escherichia coli* dans des échantillons de sérum de caille et des échantillons de l'eau de robinet. Les méthodes électrochimiques utilisées, voltammétries cyclique et à ondes carrée ont montré une bonne cohérence. Enfin, nous avons proposé une méthode électrochimique rapide, sensible et efficace pour l'identification et la quantification de l'adénosine extracellulaire en utilisant une pâte électrochimique à base de carbone modifiée avec un matériau poreux, tel que le phosphate naturel.

Mots clés : capteur électrochimique, Electrodes modifiées, immunocapteur , phosphate naturel, pâte de carbone , métaux lourds , amoxicilline, bactéries (*Escherichia coli*), virus West Nile, Adénosine, Voltammétrie cyclique, Voltammétrie à ondes carrées, Voltammétrie linéaire, spectroscopie d'impédance électrochimique.



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



Centre d'Études Doctorales : Sciences et Techniques

Formation Doctorale : **Ressources Naturelles, Environnement ET Santé**

THÈSE

Présentée par

SMAINI MOHAMED AMINE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : **Chimie des Matériaux**

Option : **Electrochimie-Analytique**

Elaboration de Biocapteurs Electrochimiques Applications à la détection des Métaux lourds, d'Adénosine et l'Immunodétection des Bactéries Escherichia et des Anticorps du Virus West Nile

Soutenue le Samedi 29/06/2019 à 09h devant la commission d'examen:

HAFID ABDERRAFIA	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Président
Abdessamad TOUNSI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.P. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Amine MOUBARIK	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.P. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Abdellatif MAKAYSSI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Rachidia, Maroc	Rapporteur
Pr Abdelilah CHTAINI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Encadrant

Introduction générale

Récemment, les laboratoires d'analyse ont concentré leurs recherches scientifiques sur les méthodes d'analyses fiables et peu coûteuses, en raison, des progrès considérables des techniques mises en jeu dans des domaines aussi variés que la médecine et la biologie clinique, l'agro-alimentaire ou le contrôle de la qualité de notre environnement (surveillance des rejets industriels ou domestiques), sachant que les méthodes d'analyses classiques utilisées ont recours à des instruments complexes, coûteux, volumineux et requérant un savoir-faire pointu. De plus, les phases de préparation des échantillons, d'incubation et d'exploitation des résultats augmentent la durée totale d'analyse.

La nouvelle génération des capteurs et des biocapteurs peut constituer une alternative attractive pour proposer des systèmes simples, fiables, rapides, sélectifs et permettant de détecter une multitude de molécules. Actuellement, on les retrouve dans les domaines de la santé, l'agro-alimentaire, la protection de l'environnement, la prévention contre le bioterrorisme. Dans ce type d'outil, un élément sensible de nature biologique (anticorps, enzyme, microorganisme, ADN...) doté d'un pouvoir de reconnaissance pour un analyte ou un groupe d'analytes est associé à un transducteur pouvant être de type électrochimique, optique ou thermique.

La pénétration du vecteur électricité dans les procédés d'analyse a permis l'apparition de nouveaux domaines de recherche, en particulier, les biocapteurs à transducteur électrochimique. Le matériel de base permettant le transfert de charges est l'électrode (par exemple d'or ou de carbone vitreux). À l'électrode peut venir s'ajouter des matériaux qui améliorent le transfert de charges et/ou conférant des propriétés particulières à la surface (les électrodes modifiées). La recherche sur les électrodes modifiées a connu un essor remarquable durant les dernières décennies si l'on considère le rôle primordial qu'elles jouent dans différents aspects d'application à la fois en analyse et en synthèse. L'actualité de ces études peut s'analyser en examinant les publications majeures qui ont jalonné ces dernières années, ce qui permet d'observer la situation des thèmes récurrents et de détecter les thèmes émergents. La préoccupation commune et relativement nouvelle, qui sous-tend la plupart des travaux qu'ils proviennent des groupes industriels ou des équipes universitaires, est la prise en compte des problèmes écologiques et environnementaux.

Les électrodes modifiées peuvent être des solides (graphite, carbone vitreux, silicium, diamant dopé, etc.), des métaux solides (or, platine, palladium, etc.) ou liquide (mercure, aluminium fondu, etc.).

Actuellement la découverte des bioélectrodes a connu un essor très important, en raison de leur sensibilité élevée, et possèdent une bonne conductivité électrique, une meilleure stabilité et une grande surface spécifique. C'est dans cette démarche que s'inscrit notre étude, qui a pour objectif global le développement des électrodes modifiées économique avec une grande stabilité. Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif de développer des électrodes modifiées et des méthodes électrochimiques pour la chélation, la détection des métaux lourds et des biocapteurs permettant de détecter des petites molécules biologiques, telles que l'adénosine et aussi des immunodétecteurs électrochimiques permettant la détection sensible et sélectif des anticorps et des bactéries dans l'eau et dans le sérum. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de précédentes études réalisées au sein de l'Equipe de Recherche : Electrochimie Moléculaire et Matériaux Inorganiques (EMMI), accréditée à l'Université Sultan Moulay Slimane. Il s'agit d'électrodes à pâte de carbone modifiées par des substances chimique et biologique ainsi que L'activité électrochimique intrinsèque des électrodes et leurs performances ont été évalués principalement par les méthodes voltammétriques, la structure et la morphologie des couches ont été examinées par Microscopies optique. Cette thèse s'articule autour de six chapitres :

Le premier chapitre est une étude bibliographique, consacrée aux biocapteurs (principe de fonctionnement, différents constituants, modes de transduction, techniques d'immobilisation des bio-récepteurs) et le principe modes de modifications des électrodes.

Le second chapitre présente les principes et les méthodes électrochimiques utilisées au cours de la réalisation de ce travail, pour l'élaboration, la caractérisation et l'étude électrochimique de nos électrodes modifiées.

Le troisième chapitre décrit d'une part le protocole de la préparation d'électrode modifiée : CPE modifiée par l'ADN (CPE-ADN) d'autre part évaluer leurs activités de chélation et détection des métaux lourds du Plomb et mercure à l'état de traces. Cette étude sera enchaînée par une application analytique, les échantillons choisis sont des eaux de robinets.

Dans le quatrième chapitre, nous présentons un immunocapteur sensible et sélectif permettant une détermination rapide et précise des anticorps dirigés contre le virus *West Nile* en utilisant une électrode en pâte de carbone mélangée à du phosphate modifiée par des anticorps secondaires obtenus par adsorption. Elle repose sur les modifications électriques induites par les espèces biologiques. Les paramètres physiques susceptibles d'influencer les densités de courant ont été étudiés et optimisés. L'électrode préparée a montré une bonne réponse linéaire aux anticorps du virus *West Nile* à différentes concentrations, évaluée

principalement par voltamétrie cyclique (VC) et voltamétrie à ondes carrée (SQW) et spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), en présence de NaCl en tant que milieu électrolytique. Enfin, l'immunocapteur a été utilisé pour la détection d'anticorps virus *West Nile* dans le sérum de vache.

Dans le cinquième chapitre, nous présentons un capteur électrochimique sensible et sélectif pour la détection et l'analyse de l'adénosine (AD) extracellulaire en utilisant une pâte électrochimique à base de carbone (CPE) modifiée par le phosphate naturel (NP), la caractérisation et l'étude électrochimique évaluée par voltampérométrie cyclique (CV) et voltampérométrie à ondes carrée (SWV). L'électrode élaborée a ensuite été utilisée pour une application analytique dans des échantillons de sérum.

Le sixième chapitre est consacré à la fonctionnalisation des électrodes à pâte de carbone, modifiée par l'antibiotique (amoxicilline) destinées à la détection électrochimique d'*Escherichia coli*. Pour tester leur efficacité, ces électrodes ont été toutes utilisées pour une application analytique dans des échantillons d'eau de robinet.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les biocapteurs

Depuis une trentaine d'années, on assiste à l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs (Figure I-1). Il s'agit de dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio) chimique en un signal facilement exploitable. Les biocapteurs ont de nombreuses applications potentielles dans des domaines divers et variés tels que la biologie, la biochimie, la médecine (diagnostic médical) [1], l'agroalimentaire (évaluation de la qualité des produits alimentaires) [2,3] et l'environnement (contrôle de la qualité de l'air et détection de polluants organiques dans l'eau) [4,5]. L'intérêt considérable suscité par les biocapteurs auprès des chercheurs a permis de réaliser aujourd'hui des dispositifs simples, miniaturisés et interfaçables à l'électronique moderne permettant des analyses fiables, rapides et peu coûteuses.

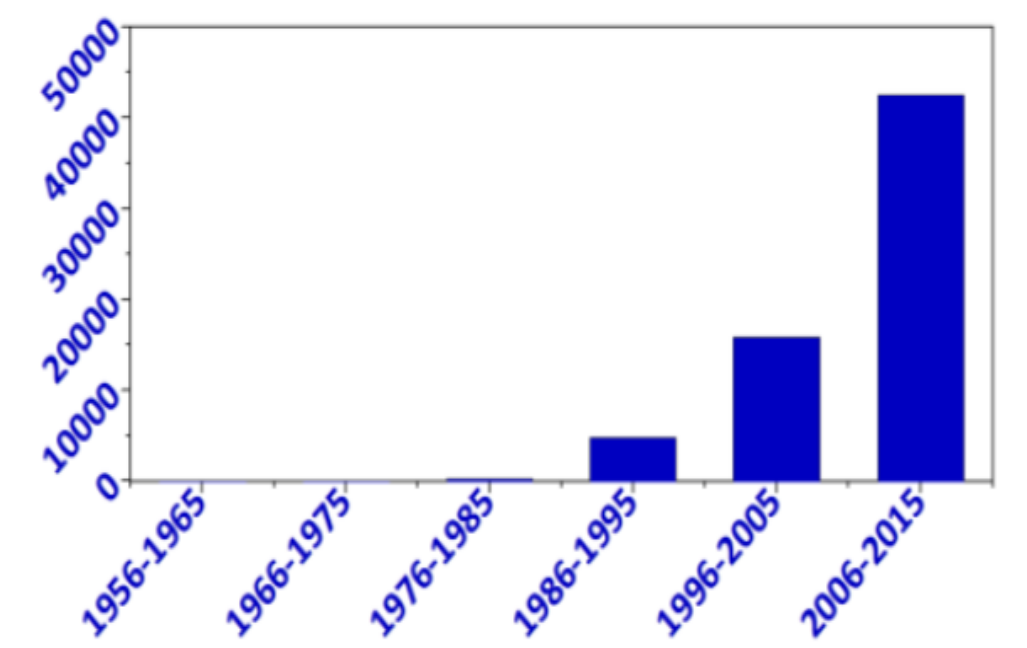


Figure I-1 : Nombre de travaux concernant les biocapteurs à partir de 1956. [150]

I.2. Historique

Le terme « biocapteurs » représente la fusion de deux des plus importantes technologies de ce siècle : l'électronique et les biotechnologies. Leur association permet des dosages rapides, sensibles et spécifiques. Les premiers biocapteurs, développés au début des années 1960, sont des électrodes enzymatique permettant le dosage du glucose dans une solution biologique [6]. Depuis, les biocapteurs ont connu un développement considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles. Même si les enzymes restent fréquemment employées, de nouveaux biorécepteurs sont aujourd'hui étudiés, comme l'ADN, les anticorps-antigènes, les cellules entières voire les organites. Ils peuvent ainsi devenir des outils

complémentaires et apporter des avantages, comme la mesure in situ et continue, par rapport aux techniques classiques d'analyses disponibles en laboratoire [7].

I.3. Définition

Selon l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un biocapteur est un dispositif intégré capable de fournir des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives grâce à un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction. Le terme biocapteur regroupe ainsi tout dispositif de mesure défini par un couple de ligand biologique connecté à un dispositif de transduction conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable.

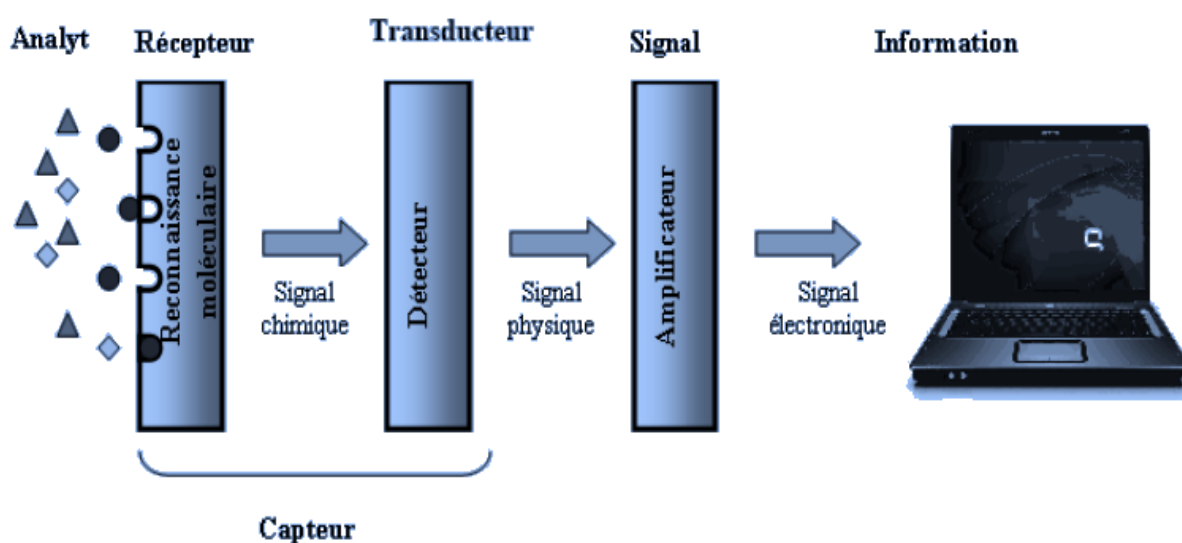


Figure I-2 : principe de fonctionnement d'un biocapteur

Le principe de fonctionnement d'un biocapteur est résumé dans la Figure I-2. Un biocapteur consiste à obtenir à partir de l'espèce à détecter toute information utile à son évaluation. Cette donnée va ensuite être traitée, enregistrée et stockée. Le biorécepteur (enzymes, anticorps, ADN, cellules, organites cellulaires, tissus...) catalyse des réactions biochimiques ou interagit avec des structures complémentaires conduisant à des changements de propriétés physiques ou chimiques convertis en signaux électriques mesurables grâce aux transducteurs (électrode seule ou électrode + polymères, électrode + nanotubes de carbone, électrode + nanoparticules métalliques...). Ces signaux seront ensuite amplifiés et traités.

Les activités des biocapteurs sont nombreuses et variées, comme la santé [8,9], l'environnement [10], l'industrie agroalimentaire [11,12], l'espace [13] ou encore le bioterrorisme [14].

I.4. Transducteurs

Le transducteur permet de générer un signal qui est amplifié et converti en un signal de sortie interprétable. La modification du signal du système avant et après la reconnaissance biologique est directement dépendante de la concentration détectée d'analyte en solution. Typiquement ce signal peut être électrochimique [15], optique [16], piézoélectrique [17], spectrophotométrique [18] ou encore calorimétrique [19] (Tableau I-1).

Tableau I-1: Principaux modes de détection appliqués dans l'élaboration de biocapteurs.

biocapteurs	Sensibles aux variations
Electrochimique	De courant (ampérométrique), de potentiel (potentiométrique), de conductivité (conductimétrique), d'impédance
Optique	D'absorbance, de chimiluminescence, de fluorescence, de la résonance plasmonique de surface, de l'onde évanescente
piézoélectrique	La masse
calorimétrique	De température

Dans ce manuscrit, en relation avec le travail de thèse présenté, nous nous focaliserons sur les biocapteurs électrochimiques.

I.4.1. Transducteurs électrochimiques

La méthode de détection électrochimique a pris de l'ampleur en dépassant même la transduction optique, en particulier dans le domaine des biocapteurs et c'est celle que nous avons choisie d'exploiter dans notre travail. Son principe repose sur la détection de changements électrochimiques lors de l'événement de bio-reconnaissance [20].

La transduction électrochimique possède plusieurs avantages à savoir sa sensibilité, sa simplicité, son faible coût, et éventuellement sa miniaturisation et son intégration dans des dispositifs automatisés. Les biocapteurs électrochimiques s'avèrent, alors, très prometteurs et font actuellement l'objet d'intenses recherches [21] [152] [153]. Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques qui sont classés selon leur mode de détection [22] :

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

Différents types de transducteurs électrochimiques ont été développés. La nature du matériau qui constitue l'électrode, sa taille et sa géométrie ou encore sa technique de fabrication les rendent spécifiques [23,24].

I.5. Différents types des biorecepteurs

L'armature la plus importante dans un biocapteur, est le biorécepteur, composé d'un système biologique permet d'apporter au biocapteur une grande spécificité. Les biomolécules les plus souvent employées sont les enzymes et les anticorps. Mais les cellules entières, les organites cellulaires, les acides nucléiques, les antigènes peuvent aussi être utilisés. Il est en fait possible d'utiliser toute molécule biologique permettant l'analyse spécifique de l'analyte recherché. Les composés biologiques fixés peuvent être séparés en deux catégories (figure I-3) : ceux ayant une activité catalytique et ceux fixant l'analyte par interaction affine [25].

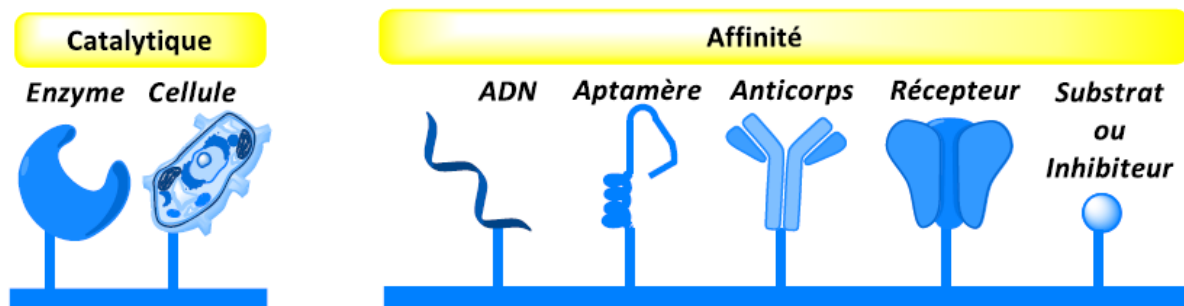


Figure I-3 : Représentation schématique de quelques biorécepteurs.

L'étape de reconnaissance peut donc révéler soit un événement dynamique, soit un événement statique. La reconnaissance dynamique est principalement employée pour les biocapteurs enzymatiques, où une réaction va avoir lieu en plus de l'étape de reconnaissance. La reconnaissance statique est surtout utilisée pour les biocapteurs étudiant la réaction d'hybridation de l'ADN et la formation d'un complexe antigène-anticorps.

I.5.1. Biorécepteurs métaboliques

A la différence des biorécepteurs d'affinité, les biorécepteurs métaboliques catalysent une réaction dans laquelle est consommé l'analyte cible. Ce type de biorécepteur est caractérisé par sa capacité de reconnaissance et sa forte activité à des faibles concentrations.

a-Enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires qui jouent le rôle de catalyseurs biologiques, c'est-à-dire qu'elles règlent et accélèrent la vitesse des réactions biochimiques sans toutefois être modifiées ou détruites au cours de ces réactions. Les enzymes accélèrent 10⁸ à 10¹³ fois la réaction correspondante qui se déroulerait avec un catalyseur non-biologique [26].

L'enzyme permet d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction qu'elle catalyse, et par la suite abaisse le niveau énergétique de l'état de transition et accélère ainsi la réaction. Grâce à leur stéréospécificité élevée, les enzymes peuvent effectuer des réactions qui leur permettent de choisir parmi différents énantiomères ou de discriminer d'autres groupes pratiquement identiques entre eux [27].

La vitesse des réactions enzymatiques est fonction de paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, la salinité ou encore la présence d'ions activateurs ou inhibiteurs.

Plusieurs familles d'enzymes ont été utilisées pour la conception de biocapteurs mais les plus représentées sont :

- Les oxydoréductases : oxydases, réductases, hydrogénases...
- Les hydrolases : phosphatases alcalines, estérases, lipases...
- Les transférases : Kinases, transaminases, mutases...

Les enzymes pures restent à ce jour les biorécepteurs les plus largement utilisées pour la mise au point de biocapteurs [28,29]. Néanmoins elles sont relativement coûteuses et pour la plupart, souffrent d'un manque de stabilité au cours du temps [30].

b- Microorganismes

Un biocapteur peut aussi être constitué microorganismes ou de cellules entières. Pour remédier aux problèmes posés par les enzymes isolées, on d'utilise directement le tissu ou le microorganisme contenant l'enzyme dans un environnement déjà optimisé par la nature. La stabilité et l'activité de ces enzymes dans la cellule sont plus grandes que celle des enzymes purifiées [31].

I.5.2. Biorécepteurs d'affinité

Les biorécepteurs d'affinité ont l'avantage de fixer l'analyte sans provoquer de réaction chimique. Il est caractérisé par sa haute sélectivité et sa forte affinité vis-à-vis de l'analyte. La liaison mise en jeu lors de l'interaction n'est pas covalente, seules des liaisons hydrogènes, ioniques, de Van der Waals et/ou hydrophobes sont formées. Cette liaison est cependant extrêmement forte du fait de l'existence de nombreuses interactions moléculaires.

a- Anticorps (Immunocapteurs)

• Principe

Les immunocapteurs [32] sont des systèmes d'analyse capables de détecter l'interaction entre un antigène et son anticorps spécifique. Les anticorps ou immunoglobulines sont des protéines complexes utilisées par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries et les virus. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes, et reconnaissent des antigènes de manière spécifique. La structure générale d'un anticorps est donnée sur la Figure I-4.

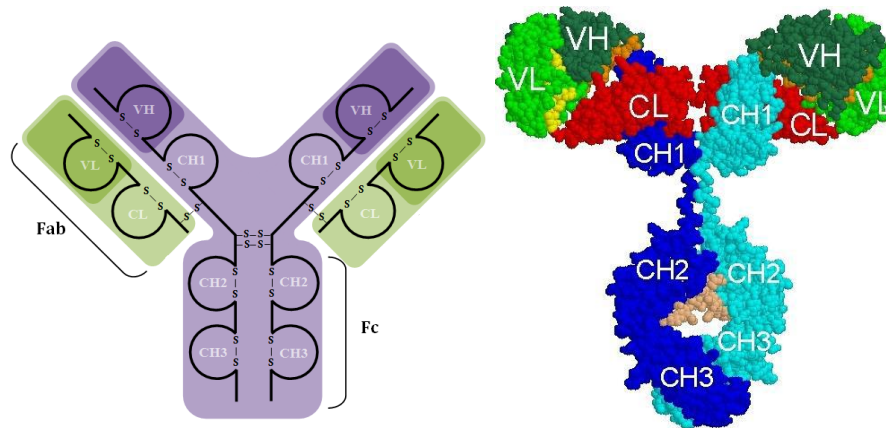


Figure I-4 : Structures d'un anticorps.

La structure de base des anticorps est la même, ils sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L), associées par des ponts disulfures. Les chaînes légères sont constituées de deux domaines : un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL). Tandis que les chaînes lourdes se composent généralement d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3). Les immunoglobulines peuvent ainsi être divisées en trois fragments : deux fragments servant à la liaison avec l'antigène (Fab pour Fragment Antigen Binding) et un fragment constant (Fc pour Fragment Constant).

Pour l'élaboration d'un biocapteur immunologique, les parties les plus importantes des anticorps sont les fragments variables notés (Fab) où l'interaction antigène-anticorps est optimale. Il existe de multiples exemples d'applications de ces biorécepteurs et certains dans le domaine de la détection de biomarqueurs cancéreux. Des exemples seront présentés ci-après.

b- Exemples pour la détection d'une toxine et d'une protéine

J'ai choisi de développer deux exemples de biocapteurs immunologiques existant dans la littérature dont l'un a été élaboré au laboratoire [33].

- La détection de l'Aflatoxine B1 (AFB1). AFB1 est une mycotoxine produite par les champignons *Aspergillus*. Un biocapteur a été développé en immobilisant un anticorps spécifique à cette molécule, modifié au niveau de son fragment constant par une chaîne thiolée et immobilisé par chimisorption sur des nanoparticules d'or [34].
- La détection de la protéine PB1-F2 du virus influenza Figure I-5. PB1-F2 est une petite protéine non-structurale impliquée dans la virulence des souches de virus. Un biocapteur a été développé en immobilisant un anticorps spécifique pour la protéine,

modifié au niveau de son fragment constant par une biotine et immobilisé par l'affinité avidine–biotine [33].

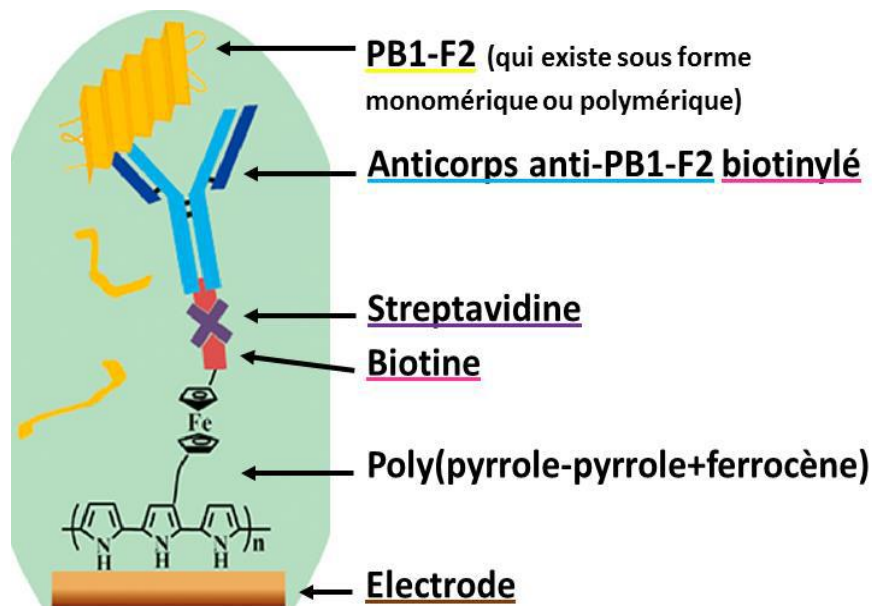


Figure I-5 : Biocapteur élaboré au laboratoire pour la détection de PB1-F2.

c- acides nucléiques L'ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est une macromolécule biologique constituant les bases génétiques et d'informations nécessaires au développement et au fonctionnement de toutes les cellules vivantes. Dans les cellules eucaryotes, l'ADN se trouve non seulement dans le noyau mais également dans les mitochondries et les chloroplastes. Dans les cellules plus simples des procaryotes, l'ADN est localisé dans le cytoplasme.

Les macromolécules d'ADN sont constituées d'une double hélice droite dont les deux brins sont complémentaires. Chaque brin est un enchaînement de nucléotides constitués d'un groupement phosphate, d'un sucre (le désoxyribose) et d'une base azotée assurant la diversité des molécules d'ADN ainsi que la liaison entre les deux brins de l'hélice (Figure I-6).

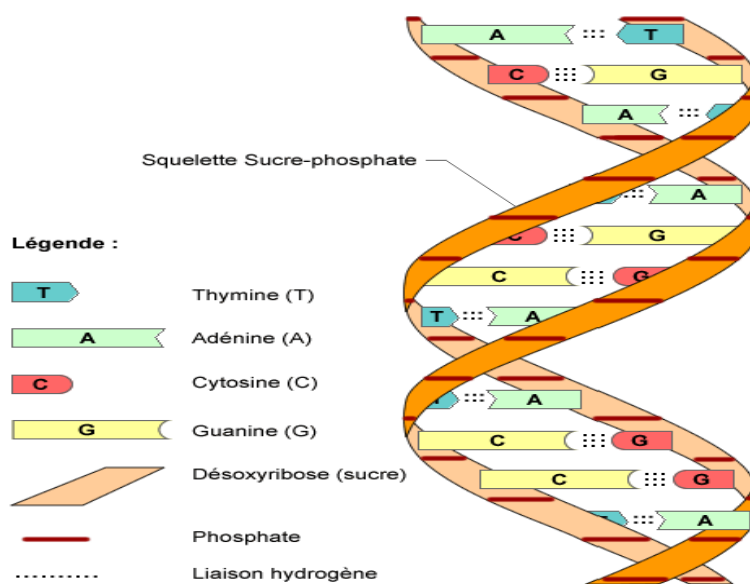


Figure I-6: Structure schématique et composition de l'ADN

Les biocapteurs à base d'ADN sont obtenus en immobilisant un ou deux brins d'acide nucléique sur la surface des transducteurs. Des biocapteurs utilisant de l'ADN simple brin ont été développés pour la détection de cancers [35,36], de pathogènes bactériens [37,38] ou pour la mise en évidence des détériorations des molécules d'ADN par certains polluants [39,40]. L'utilisation des molécules d'ADN double brin a également permis d'énormes progrès dans le domaine de la détection rapide des toxines, des substances organiques carcinogènes [41,42] ou encore dans l'identification de nouveaux principes actifs anti-tumoraux [43,44].

Depuis les premiers travaux sur les biocapteurs amorcés en 1962, le nombre de biocapteurs électrochimiques à ADN élaboré n'a cessé d'augmenter, comme en témoigne la Figure I-7 recensant le nombre de publications traitant de ce type de biocapteurs.

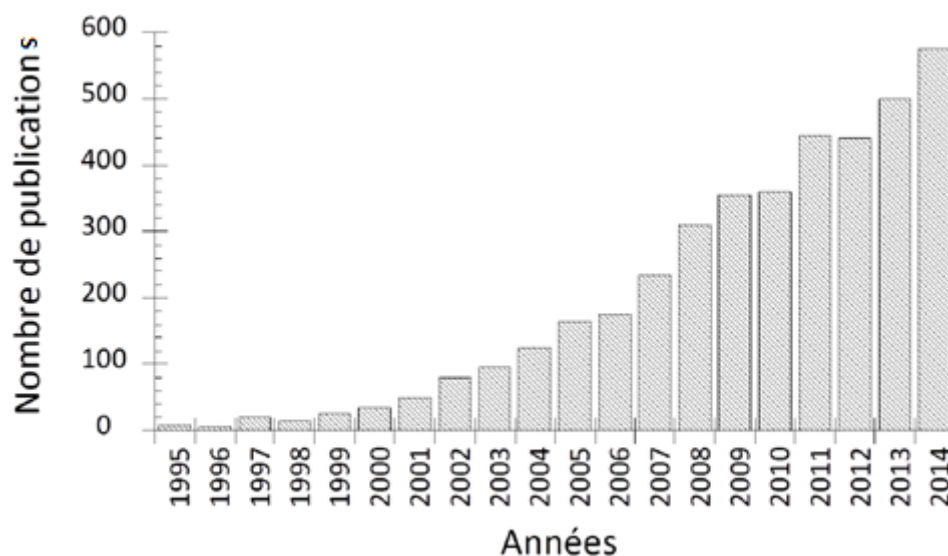


Figure I-7. Évolution du nombre de publication d'articles entre 1995 et 2015 traitant des biocapteurs électrochimiques à ADN. Recherche effectuée avec les mots clés « DNA electrochemical biosens* ». Source : Web of Knowledge, édité en Octobre 2015.

I.6. Techniques d'immobilisation du biorécepteur

Les méthodes décrites dans la littérature sont variées, consistent à attacher les biomolécules à la surface du transducteur. Les quatre méthodes principalement utilisées sont l'adsorption, l'inclusion, la réticulation et le couplage covalent. Elles sont présentées sur la Figure I-8.

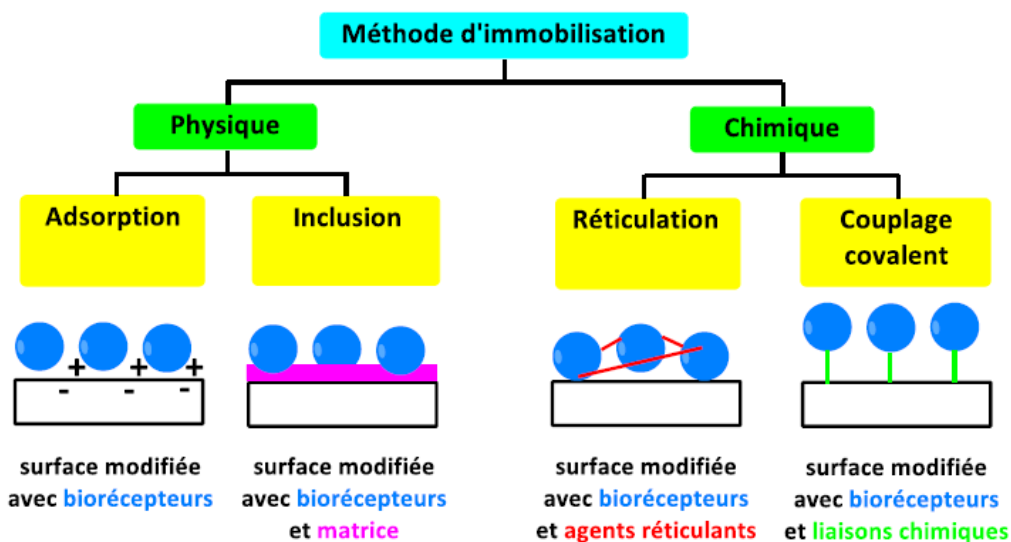


Figure I-8 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation du biorécepteur.

I.6.1. Adsorption

L'adsorption est basée sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface. L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, liaisons ioniques ou encore interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). C'est une méthode simple, réversible et économique mais qui présente le fort inconvénient d'être peu stable [45].

I.6.2. Inclusion

La méthode d'inclusion permet d'incorporer le biorécepteur dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymères) ou inorganique (gels de silice). La matrice doit permettre la diffusion uniquement des petites molécules afin que les biorécepteurs ne puissent pas s'en échapper. Cette technique est facile à mettre en oeuvre et économique, mais elle est difficilement applicable avec un certains nombres de biorécepteurs [48].

I.6.3. Réticulation

La réticulation est basée sur l'utilisation d'agents dits réticulants qui vont permettre de lier les biorécepteurs entre eux par des liaisons chimiques, soit de manière directe, soit avec l'aide d'une protéine inerte qui facilite la réticulation, on parle alors de co-réticulation. Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez simple à mettre en oeuvre et offre une bonne stabilité au système de par les liaisons chimiques [47].

I.6.4. Couplage covalent

Le couplage covalent de molécules biologiques sur un transducteur nécessite la présence d'un groupement fonctionnel à la fois sur la biomolécule et sur la surface du transducteur, ce qui demande une fonctionnalisation préalable. En général, les groupements fonctionnels présents à la surface sont des fonctions carboxyliques, des thiols, des alcools ou encore des amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec le biorécepteur. La liaison du biorécepteur à la surface par une fonction chimique n'intervenant pas dans la reconnaissance moléculaire avec l'analyte que l'on souhaite doser est un paramètre important à prendre en compte. Cette ligation doit par ailleurs se dérouler dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule. Cette méthode d'immobilisation présente principalement l'avantage de fixer le biorécepteur de façon permanente et augmente la stabilité du système [46].

I.7. Qualité d'un capteur

L'efficacité des biocapteurs est généralement évaluée expérimentalement par leur sensibilité, leur limite de détection, leur gamme linéaire, leur reproductibilité et leur sélectivité. D'autres paramètres incluant le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et la stabilité de stockage du capteur s'avèrent aussi indispensables. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable. Dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut toutefois être plus adapté.

Les qualités d'un capteur par rapport à la nature à mesurer et aux conditions de mesure sont appréciées en déterminant leur résolution, leur fidélité, leur sensibilité et leur sélectivité (Figure I-9).

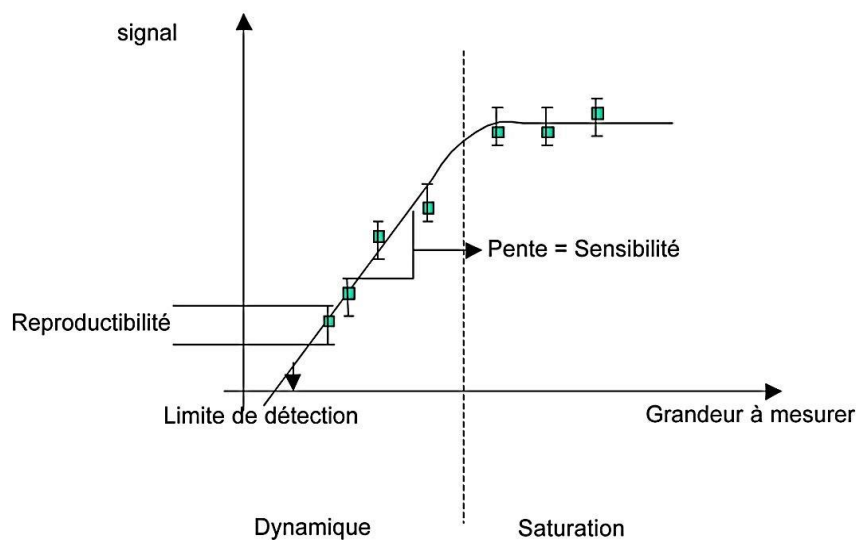


Figure I-9 : Schéma idéal de la réponse d'un capteur

Les termes sont définis dans le paragraphe suivant [48].

➤ **Résolution :**

Plus petit incrément de la valeur mesurée qui puisse être significativement mesuré par le capteur.

➤ **Reproductibilité :**

Ce paramètre est probablement le plus important, tant pour les capteurs physiques que chimiques. C'est l'aptitude d'un capteur à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines lors de l'application répétée d'un même signal d'entrée.

➤ **Sensibilité :**

Ce paramètre caractérise l'aptitude du capteur à détecter la plus petite variation de la grandeur à mesurer. Il est calculé par le quotient de l'accroissement de la réponse d'un instrument de mesure par l'accroissement correspondant du signal d'entrée.

➤ **Sélectivité :**

C'est la capacité du capteur à ne mesurer qu'une seule grandeur dans le milieu où il est utilisé ou en d'autres termes, d'être le plus insensible aux grandeurs d'influence, grandeurs qui ne font pas l'objet de la mesure, mais influent sur la sortie du capteur.

➤ **Limite de détection :**

C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, et qui sort significativement du bruit de fond.

➤ **Réponse du capteur ou dynamique :**

C'est la zone qui représente le domaine de réponse du capteur avant saturation.

I.8. Grandeurs d'influence

Les grandeurs d'influence sont des grandeurs étrangères qui, selon leur nature et leur importance, peuvent provoquer des perturbations sur le capteur. C'est donc une cause d'erreurs agissant sur le signal de sortie. Les principales grandeurs d'influence sont :

- la température qui modifie les caractéristiques électriques, mécaniques et dimensionnelles des composants du capteur ;
- La pression, l'accélération et les vibrations susceptibles de créer dans certains éléments constitutifs du capteur des déformations et des contraintes qui altèrent la réponse ;
- L'humidité à laquelle certaines propriétés électriques comme la constante diélectrique ou la résistivité peuvent être sensibles et qui risque de dégrader l'isolation électrique entre composants du capteur ou entre le capteur et son environnement ;
- Les champs magnétiques variables ou statiques ; les premiers créent des f.é.m. d'induction qui se superposent au signal utile, les seconds peuvent modifier une propriété électrique ;

- La tension d'alimentation

I.9. Conclusion

L'utilisation des capteurs dans le domaine de la chimie analytique et d'industrie agro-alimentaire pour le contrôle ou la fabrication des produits, est accrue. Ces capteurs électrochimiques font actuellement l'objet de nombreuses recherches et développements dans le domaine de la biologie et de la médecine. Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus et le domaine d'utilisation des biocapteurs est très large : mesures de pH, de pression d'oxygène, de taux de glucose, de pénicilline, de certaines enzymes dans les tissus, le sang, la salive ou l'urine et pour des mesures en vivo. Ces capteurs ont pour avantage de permettent une analyse rapide et sélective. On peut aussi effectuer une analyse d'un produit en continue, suivre la cinétique d'une réaction biochimique et l'état physiologique d'un patient. Fonctionnant à très faible courant, ils peuvent dans certains cas être miniaturisés et implantés dans des zones d'accès difficile du corps humain et de nombreux nouveaux capteurs électrobiologiques devraient être commercialisés dans les prochaines années.

II. Electrodes modifiées

II. 1. Généralités sur les électrodes modifiées

Les électrodes modifiées reposent sur la fonctionnalisation de la surface d'une électrode afin de lui conférer des propriétés nouvelles, absentes d'une électrode nue, qui permettent ensuite une application entre autres dans le domaine de l'analyse chimique. Ceci a permis de créer de véritables architectures supramoléculaires à la surface d'une électrode, avec une grande variété de constituants, allant de simples molécules ou particules inorganiques jusqu'à des molécules complexes.

Un des objectifs les plus importants en électrochimie est le contrôle de la réactivité de l'interface électrode-solution. L'application d'un potentiel permet de faire varier le niveau énergétique de l'interface mais généralement sans contrôle de sélectivité. De façon à imposer et à contrôler les propriétés de l'interface, de nombreux chercheurs de plusieurs disciplines ont modifié la surface d'électrodes par toutes sortes de composés organiques ou organométalliques [49,50]. Depuis l'électropolymérisation du pyrrole par Diaz et ses collaborateurs [50], les électrodes modifiées ont été essayées dans des domaines d'applications divers : photosensibilisation, électrochromisme, anti-corrosion [51], batterie et

accumulateur de faible poids, et également électrocatalyse [52,53]. Ces recherches permettent l'étude des réactions de transfert de matière aux interfaces solide/solution et le développement de méthodologies électro-analytiques permettant de caractériser et d'exploiter les propriétés des matériaux inorganiques tels que les zéolithes, apatites, les silices, et d'autres solides apparentés.

Les objectifs principaux de ces recherches sont, d'une part, de contribuer à une meilleure compréhension des réactions de transfert de matière dans l'environnement et, d'autre part, de proposer de nouveaux moyens d'investigation, de contrôle, de mesure, et de remédiation des milieux liquides et des interfaces solide/solution faisant intervenir des solutés toxiques (notamment des espèces métalliques). L'accroissement des connaissances dans ce domaine nécessite des efforts de recherche privilégiant à la fois le développement de nouvelles méthodologies permettant l'analyse de ces phénomènes dans des conditions *in situ*, la mise au point de capteurs permettant l'étude de la spéciation et l'analyse de traces, ainsi que l'émergence de nouveaux procédés de dépollution à la surface d'un électrocatalyseur.

Le contrôle des propriétés physico-chimiques de l'interface électrode/électrolyte vise essentiellement à élargir le champ d'application des électrodes à l'étude de molécules peu ou non réactives (électrocatalyse), afin d'améliorer, voire de contrôler la réactivité, d'accroître la sensibilité des mesures et la sélectivité d'une réaction électrochimique. Ce contrôle est en particulier rendu possible par la modification de la surface de l'électrode. L'électrode ainsi modifiée acquiert les propriétés chimiques et électrochimiques du système modifié.

Le terme général d'électrode chimiquement modifiée [54] désigne toute électrode à la surface de laquelle une espèce chimique aux propriétés spécifiques (groupe rédox, catalyseur, complexant, adsorbant,...) a été délibérément fixée. Les premiers dans ce domaine ont été Lane et Hubbard [55] qui, en 1973, ont démontré l'influence importante de la modification d'électrodes de platine, par adsorption de dérivés éthyléniques, sur la cinétique de réaction électrochimiques. A la suite de ces premiers travaux, les méthodes qui ont été d'abord développées pour préparer des électrodes modifiées chimiquement ont fait appel à l'adsorption ou à la fixation covalente (greffage) de molécules simples, conduisant à la modification de la surface de l'électrode par une monocouche de réactif [56,57]. Cependant, la technique de modification d'électrodes qui a été la plus développée est celle basée sur le dépôt de multicouches de réactif, opération généralement réalisée par l'adsorption de film de

polymères à la surface de l'électrode, qui permet d'obtenir de véritables matériaux moléculaires d'électrode de structure tridimensionnelle [58,59].

Un des avantages de ces systèmes est qu'ils nécessitent l'utilisation d'une quantité minimum de réactifs, souvent coûteux, pour réaliser des analyses. Un autre avantage est la sélectivité des électrodes chimiquement modifiées. En effet, par un choix judicieux du réactif immobilisé, il est possible de contrôler la sélectivité de l'analyse. De plus ces électrodes permettent d'augmenter la sensibilité grâce à l'étape de préconcentration. Pendant cette étape d'accumulation, l'espèce cible est préconcentrée dans un petit volume à la surface de l'électrode, ce qui permet de mesurer de très faibles concentrations. L'étape de préconcentration est aussi une étape de séparation, extrayant l'espèce cible du milieu. Elle présente l'avantage d'être réalisée en circuit ouvert.

Il faut toutefois noter que pendant l'analyse voltamétrique l'espèce cible peut ne pas être redissoute dans la solution d'analyse et l'électrode modifiée doit alors être régénérée chimiquement afin d'être de nouveau utilisable ; de cette façon, elle permet de contrôler la sélectivité, d'augmenter la sensibilité et leur méthode de préparation va influencer la stabilité du système.

II.2. Electrode modifiée par un film polymère

La modification de la surface d'une électrode par le dépôt d'un polymère contenant une espèce électroactive peut être réalisée selon deux procédures ;

- à partir d'un polymère préformé portant sur son squelette l'espèce électroactive. Le dépôt est obtenu par immersion de l'électrode dans un solvant solubilisant le polymère électroactif ou par évaporation sur l'électrode d'une goutte de cette solution. Les polymères utilisés dans cette procédure sont pour la plupart non conducteurs électroniques (tels que le polystyrène, par exemple) ;
- à partir de la polymérisation, directement sur l'électrode, d'un monomère polymérisable substitué par des groupes électroactifs [60]. La procédure la plus élégante, et la plus couramment utilisée maintenant, est la polymérisation électrochimique (appelée aussi électropolymérisation).

II.3. Electrode à pâte de carbone modifiée

II.3.1.Noir de carbone

Le carbone est un matériau non métallique existant sous les formes cristallines (graphite, diamant) ou amorphes (charbon, noir de carbone). Les propriétés physiques du

carbone varie considérablement avec sa forme allotropique. Par exemple, le diamant, l'un des matériaux les plus durs, est transparent, et caractérisé par une très forte conductivité thermique et une très faible conductivité électrique. A l'inverse, le graphite est opaque et est très bon conducteur électrique [61]. Chimiquement, le carbone peut se trouver sous forme inorganique, comme dans les calcaires [62], mais il est surtout l'élément de base de près de dix millions de composés organiques [63]. En effet, étant tétravalent, il peut se lier à d'autres atomes via trois types de liaisons différentes selon l'hybridation des orbitales atomiques [61]. Le type de liaison entre les atomes permet d'expliquer un certain nombre de propriétés physico-chimiques des matériaux. Ainsi la double liaison (hybridation sp^2), par la délocalisation des électrons π , est responsable de la couleur noire et surtout de la conductivité électrique du graphène [64,65], une propriété particulièrement recherchée dans les matériaux nanocomposites. Parmi les formes allotropiques amorphes du carbone, on trouve le noir de carbone. Il s'agit d'un terme générique désignant la substance granuleuse réalisée à partir de la combustion d'hydrocarbures (huiles aromatiques) ou leur décomposition (acétylène) [66]. Celles-ci produisent une fumée noire contenant de très fines particules de carbone pouvant être séparées des gaz de combustion pour former une poudre légère et noire (Figure I-10). Le noir de carbone est l'un des produits chimiques les plus stables et est utilisé principalement pour le renforcement du caoutchouc. C'est l'industrie du pneu qui consomme 70% des 10 millions de tonnes de noir de carbone produites par an [67].

La structure amorphe du noir de carbone, dépendant de la manière dont le matériau est synthétisé, permet la coexistence des formes sp^1 , sp^2 et sp^3 mais peut également contenir quelques impuretés [66,68]. La forme sp^2 , la plus stable d'un point de vue thermodynamique (à température ambiante), représente ainsi 80% des liaisons présentes dans le noir de carbone, ce qui le rend électriquement conducteur. C'est pourquoi le noir de carbone est largement utilisé comme charge conductrice pour polymères nanocomposites [69].

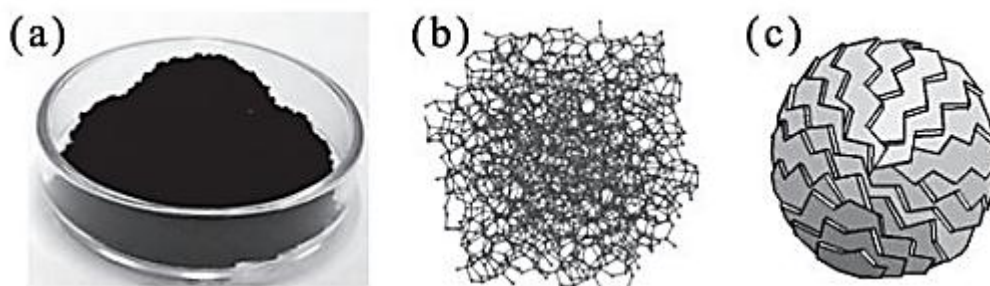


Figure I-10 : Aspect (a), structure chimique (b) et représentation schématisée d'une particule (c) de noir de carbone.

Le noir de carbone est composé de particules nanométriques (10-50nm) formées d'un ensemble de couches de graphène (plan graphitique) désordonnées [61]. Ceci confère aux particules une conductivité électrique particulièrement élevée en dépit de la présence de discontinuités (dus à des atomes de carbone sp^3). Les particules s'assemblent très rapidement en grappes pendant la synthèse, certaines couches de graphène sont étendues sur plusieurs particules adjacentes et assurent ainsi une conductivité élevée entre les particules d'un même ensemble. On parle alors d'agrégats mesurant typiquement de 100 à 500 nm [70]. Le noir de carbone utilisé ici pour la préparation du Vulcan® XC-72R produit par Cabot Corporation. Il est largement utilisé pour le dopage de matériaux polymères [69,71]. L'examen (Figure I-11) du Vulcan® XC-72R au microscope électronique à balayage (MEB) révèle une composition en particules de taille comprise entre 20 nm et 60 nm et d'agrégats supérieurs à 100 nm [70].

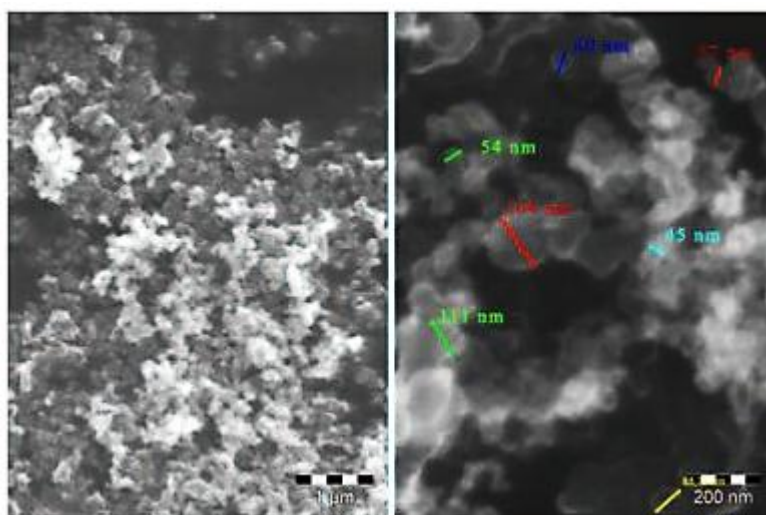


Figure I-11 : Observations MEB du Vulcan XC72 mettant en évidence les dimensions des particules de noir de carbone ainsi que la formation d'agrégats.

II.3.2. Electrode à pâte de carbone à composé électroactif incorporé

Les méthodes électrochimiques sont particulièrement adaptées à l'étude des réactions en solution. Par contre, leur utilisation est délicate lorsque le composé électroactif est insoluble. Habituellement, on dépose sur un conducteur métallique (électrode) la substance à oxyder (ou à réduire), ce qui suppose que celle-ci soit elle-même conductrice, ou bien encore, on disperse le composé dans une solution électrolytique soumis à une agitation intense (lit fluidisé) et, dans ce cas, les échanges d'électrons se font lors des collisions sur l'électrode

métallique [72,73].

Quelques auteurs [74,80] ont proposé d'utiliser sur une électrode à pâte de carbone chargée avec les produits insolubles à étudier, soit pour réaliser des électrodes indicatrices [77,78,80] soit pour la fabrication de piles de haute capacité [79]. Dans la première de ces applications [79,80], le liant servant à préparer la pâte de carbone est un liquide organique visqueux comme l'huile de paraffine (nujol) ou l' α -bromonaphtalène, c'est-à-dire un liquide non conducteur ; selon Kuwana [74,75] et Ruby [76], l'échange d'électrons a lieu à l'interface électrode-solution. Dans la deuxième application, le liant est un électrolyte (acide sulfurique dilué ou solution aqueuse de chlorure d'ammonium) et de grandes quantités d'électricité peuvent être mises en jeu.

II.3.3. Quelques exemples d'électrodes à pâte de carbone modifiées

L'électrode à pâte de carbone a été modifiée selon les axes de recherches que ce sont assignés certains chercheurs. Nous pouvons citer entre autres, sa modification par :

- l'ADN pour la détection électrochimique de métaux lourds. La surface modifiée de l'électrode a montré une affinité aux ions du métal en solution, formant des complexes [81].
- le manganèse (Mn/EPC) a montré une excellente réponse quant à la détection du paracétamol avec une limite de détection de $6,8 \cdot 10^{-10} \text{M}$ [82].
- des molécules organiques pour l'analyse des différents métaux (Pb^{2+} , Cd^{2+} et Cu^{2+}). L'électrode à pâte de carbone (CPE) a été avec succès modifiée par des molécules organiques. Celle-ci a permis la détection de faibles concentrations des métaux lourds avec une très bonne reproductibilité. A la surface de cette électrode modifiée, on enregistre une augmentation de ces métaux due à la formation de complexe entre le métal et le film formé par la molécule organique [83].
- un polymère (eugénol) pour la détection de l'acide ascorbique (vitamine C) qui est un composé organique hydrosoluble participant à de nombreux processus biologiques. L'influence des variables telles la concentration de l'acide ascorbique adsorbé sur le polymère, et le pH de la solution ont été examinés. Il a été montré que l'électrode modifiée a une activité électro catalytique plus élevée lors de l'oxydation de l'acide ascorbique [84].

II.4. Electrode modifiée par le phosphate naturel

II.4.1. Généralités sur le phosphate naturel

Le phosphate naturel désigne le produit issu de l'exploitation et du traitement métallurgique ultérieur des minerais contenant du phosphore. En plus du minéral principal contenant du phosphore, les gisements de PN contiennent également des minéraux accessoires ou des impuretés de gangue.

Les phosphates naturels sédimentaires sont composés principalement d'apatites. Ces apatites montrent une substitution isomorphe étendue dans le réseau cristallin. Ainsi, elles présentent une grande variation dans leur composition chimique et montrent en conséquence un large éventail de propriétés. Dans les dépôts sédimentaires, les principaux minéraux phosphatés sont des francolites (fluoroapatites microcristallines carbonatées), qui sont en association avec une grande variété de minéraux accessoires et d'impuretés.

II.4.2. Quelques exemples d'électrodes modifiées par le phosphate naturel

Exemple 1 : L'électrode de platine a été modifiée par une membrane polymérique, en choisissant le phosphate naturel de Djebel Onk (Algérie) comme ionophore sensible aux ions Cd^{2+} . Cette étude a montré que cette électrode modifiée est un bon capteur électrochimique pour la détection de Cd^{2+} [85].

Exemple 2 : L'électrode à pâte de carbone a été modifiée par le phosphate naturel (CPE/PN) pour la détection électrochimique du mercure (Hg (II)). Ces électrodes de type CPE/PN ont été utilisées pour détecter de faibles concentrations de Hg(II) en utilisant la voltammétrie cyclique [86]

Exemple 3 : L'électrode de pâte de carbone a été modifiée par le phosphate naturel pour la détection d'herbicides (le paraquat). Cette électrode a montré une sensibilité à la formation d'un complexe du moringa oleifera et l'herbicide, permettant ainsi une amélioration de la dépollution de la solution souillée [87].

Exemple 4 : Une électrode à pâte de carbone modifiée avec du phosphate normal (NP) a été évaluée comme capteur électrochimique pour la détection du 4-Chloroaniline (4-CA) dans un milieu aqueux. Elle a été appliquée dans des échantillons naturels d'eau et les résultats indiquent que cette électrode est sensible et efficace pour la détermination du 4-CA [151]

III. Métaux lourds

III.1. Introduction

Les métaux lourds présentent une forte toxicité [88]. En conséquence leur présence dans l'eau, qui est une ressource essentielle pour la vie et pour les activités humaines, nécessite la

réalisation d'un dispositif d'alerte et de contrôle immergé, rapide et efficace. Pour ce faire, les biocapteurs sont considérés comme des instruments avantageux par rapport aux autres moyens existants qui apparaissent lourds et fastidieux. En effet, ils allient facilité et simplicité d'utilisation avec fiabilité et rapidité des mesures. De surcroît ils présentent un faible coût de fabrication.

Dans ce chapitre, nous présentons le contexte de l'étude, notamment les propriétés de quelques métaux lourds, le mécanisme de leurs bioaccumulations et leurs effets, particulièrement sur la santé humaine que nous retiendrons comme un sujet de recherche, Le principe général d'un biocapteur est rappelé, ainsi que les principaux éléments le constituant, en détaillant davantage des électrodes modifiées retenus pour nos travaux... Ces éléments de l'état de l'art s'appuient sur de nombreuses références bibliographiques, dont beaucoup de récentes montre l'intérêt de la communauté scientifique pour l'enjeu de tels systèmes dans le cadre de ce type d'application.

III.2.L'intoxication avec les métaux lourds

III.2.1.Pollution de l'écosystème aquatique par les métaux lourds

Sont considérés comme des métaux lourds, les éléments du tableau périodique qui ont une masse volumique supérieure à $4,5 \text{ g/cm}^3$ d'après le protocole d'Aarhus (Danemark, juin 1998) dans la convention de Genève.

Les métaux lourds les plus souvent considérés comme poisons pour l'homme sont le plomb (Pb), le mercure (Hg), l'arsenic (As), le cadmium (Cd), d'autres comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le chrome (Cr) pourtant nécessaires à l'organisme en petites quantités, mais deviennent toxiques à des doses plus importantes [89,90].

Par le biais du cycle de l'eau (Figure I-12) les écosystèmes aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par les métaux lourds par des voies diverses et variées, d'origines accidentelles ou d'usage, entraînant des effets dommageables pour les êtres vivants.

Les problèmes associés à la contamination par les métaux lourds ont été mis en évidence pour la première fois dans les pays industriellement avancés en raison de leurs déversements industriels plus importants. En effet, pendant des dizaines d'années, les fleuves ont hérité des rejets, des eaux résiduaires et des déchets liquides résultant de l'extraction ou de la transformation de matières premières et de toutes les formes d'activités de production industrielle. A l'heure actuelle, bien que le niveau des activités industrielles soit relativement moins élevé dans des régions sous développées comme l'Afrique, on y observe néanmoins

une prise de conscience croissante de la nécessité de gérer rationnellement les ressources aquatiques et notamment de maîtriser les rejets de déchets dans l'environnement.

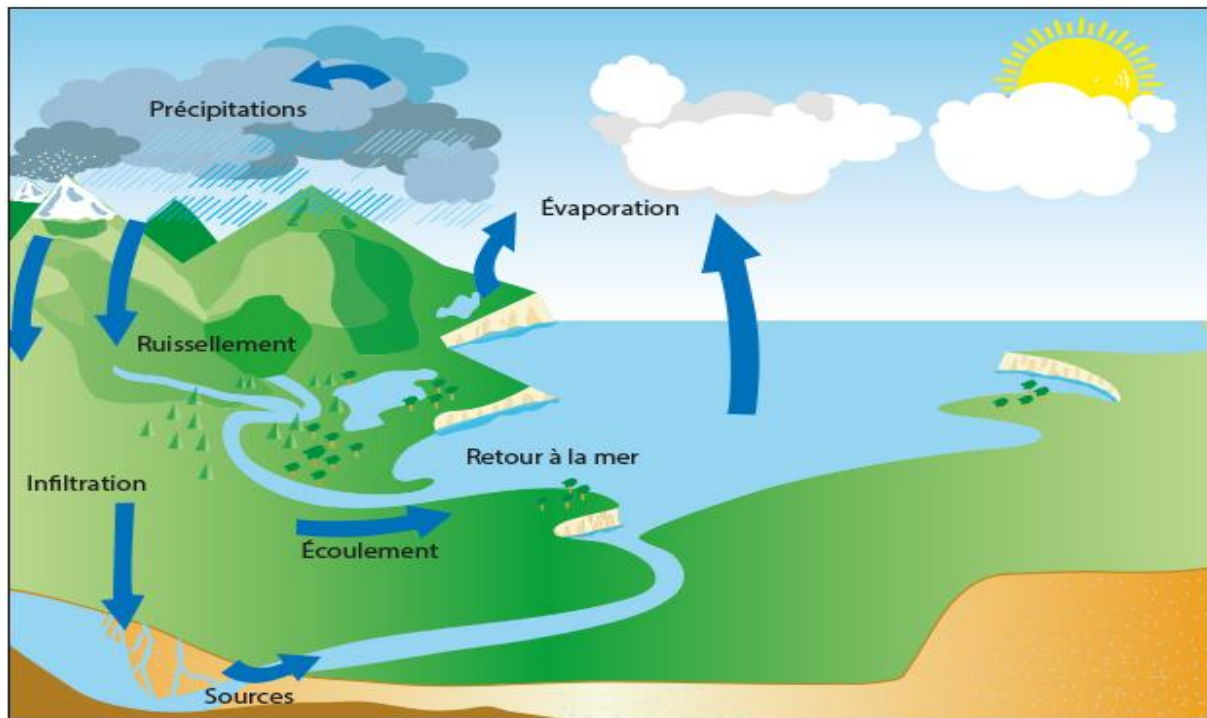


Figure I-12 : Cycle de l'eau

III.2.2. Bioaccumulation des métaux lourds

L'eau est évidemment un élément particulièrement important pour les polluants en général et les métaux lourds en particulier, qui apparaissent comme des micro-polluants susceptibles d'être impliqués dans des réactions chimiques liées à l'acidité, l'alcalinité, la température et l'oxygénation notamment.

Les milieux aquatiques sont très sensibles à ces éléments, même à l'état de traces, par la coexistence de deux phénomènes : la bioaccumulation et la bioamplification qui peuvent entraîner une forte accumulation dans certains organismes vivants. De ce fait les métaux lourds se retrouvent au final dans la chaîne alimentaire. Le processus de bioaccumulation des métaux lourds se développe en trois parties, décrites en suivant.

a-Adsorption et assimilation

Lors de l'exposition, l'adsorption de polluants métalliques concerne la seule fraction soluble et biodisponible, généralement 95%, l'autre fraction, soit 5%, est insoluble et sera éliminée par différentes voies (digestive, urinaire et cutanée). La partie biodisponible et

assimilable se concentre dans certains organes, c'est ce qu'on appelle l'organotropisme. Par exemple le cadmium se concentre presque exclusivement dans le tube digestif, le foie et les reins [4]. Le plomb diffuse également dans la peau, les muscles et la colonne vertébrale. Le mercure, dans sa forme organique, diffuse dans tout le système nerveux et le fœtus [91].

b-Bioconcentration

Les organismes, notamment les espèces aquatiques vivantes concentrent les métaux lourds. Cette bioconcentration des métaux lourds par les organismes vivants présente une hiérarchie entre les espèces, qui sont classées selon leur disposition à les concentrer.

c-Bioamplification

Le polluant, présent dans les algues et les microorganismes, est ingéré par un herbivore, lui-même proie d'un carnivore, qui est à son tour proie d'un supercarnivore, animal ou homme. En fin de chaîne, on trouve ainsi un consommateur final ayant bioaccumulé les formes solubles des métaux.

Il peut arriver que les concentrations augmentent au fur et à mesure que l'on progresse dans la chaîne trophique. C'est le cas du plomb et surtout du mercure sous la forme méthylée. Le mercure s'accumule à chaque étape et se retrouve concentré en bout de chaîne alimentaire, notamment dans les gros poissons piscivores. On nomme ce phénomène la «bioamplification» (ou « biomagnification », du terme anglo-saxon). Un facteur de l'ordre de 10^6 est généralement retenu entre les concentrations relevées au niveau des organes concentrateurs chez l'être humain par rapport aux concentrations dans l'eau.

III.3. Origine et devenir des métaux lourds

III.3.1. Introduction

On appelle métaux lourds les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5g/cm^3 [92]. Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces : mercure, plomb, cadmium, cuivre, arsenic, nickel, zinc, cobalt, manganèse. Les plus toxiques d'entre eux sont le plomb, le cadmium et le mercure. Ceux-ci sont présents dans l'eau, l'air et le sol. Comme tous les minerais, ils sont présents dans les roches. Ces réserves naturelles ne constituent pas en elles-mêmes de danger à proprement parler. L'exploitation des gisements, l'érosion, les prélèvements d'eau ou les éruptions volcaniques, vont répandre des traces de ces éléments dans l'environnement. Ils peuvent alors devenir toxiques s'ils se retrouvent en quantités suffisantes dans les organismes vivants.

La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic) [93]. Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent les appelés « éléments trace ».

III.3.2. Rejets des métaux lourds dans l'eau

Les éléments traces, présents sous une forme particulière dans les sols, apparaissent sous l'effet de l'érosion. Le ruissellement sur les surfaces imperméables ainsi que les sources anthropiques s'ajoutent à ces sources naturelles liées à l'érosion. Outre que les phénomènes naturels, l'activité humaine, même si elle ne crée pas de métaux lourds, participe à leur diffusion dans l'environnement. De fait de leurs propriétés physicochimiques intéressantes (thermiques, électriques, mécaniques, catalytiques, etc...) les métaux lourds sont très largement utilisés. L'industrie métallurgique et minière est la principale source d'émission humaine, le plomb étant présent dans les déchets d'exploitation. On peut citer également la présence de plomb dans les batteries automobiles. Les rejets atmosphériques sont responsables du quasi totalité des métaux, mercure, cadmium, arsenic, chrome, plomb.

III.3.3.Effet sur la santé humaine

Le plomb peut se retrouver dans l'eau et les sols lors de la corrosion des tuyauteries en plomb des systèmes de transport d'eau et lors de l'usure des peintures au plomb. Ainsi les soudures au plomb utilisées dans la fabrication des boîtes de conserve peuvent également contaminer les aliments [94]. Le plomb ne peut être détruit, il peut seulement changer de forme. C'est un élément toxique par inhalation et ingestion: saturnisme, toxique pour les organismes vivants (plantes etc.), perturbe la photosynthèse et d'autres mécanismes du métabolisme. Il a des effets toxiques sur le système nerveux central et périphérique. Les enfants exposés de manière prolongée à de faibles doses de plomb peuvent développer le saturnisme (maladie caractérisée par divers troubles : croissance, développement du système nerveux central, développement intellectuel et comportement). Chez les adultes, à fortes doses, celui-ci peut induire des troubles de la reproduction, des insuffisances rénales, et des encéphalopathies.

Le cadmium est connu depuis les années de la 2^{ème} siècle. Très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques) [95], le cadmium est l'un des rares éléments n'ayant aucune fonction connue dans le corps humain ou chez l'animal. Il faut éviter

son contact avec des aliments. Chez l'homme, il provoque notamment des problèmes rénaux et l'augmentation de la tension.

Une exposition de courte durée à des fortes concentrations de poussières ou de fumées, de composés de cadmium est irritante pour les cellules des systèmes respiratoires et gastro-intestinaux [96]. Une exposition de courte durée à des concentrations de cadmium supérieures aux concentrations maximales recommandées peut causer des nausées, des vomissements, de la diarrhée, des crampes musculaires, de la salivation, des troubles sensoriels, des lésions hépatiques, des convulsions, un état de choc et de l'insuffisance rénale. Lors d'une exposition prolongée à des concentrations supérieures aux limites recommandées, le cadmium peut entraîner de l'emphysème, des dommages aux reins et au foie et le ramollissement des os.

Le mercure présent dans l'eau a diverses origines : l'industrie papetière, l'électronique, les thermomètres, l'extraction aurifère et est également présent dans les amalgames dentaires. On peut donc le retrouver chez les poissons se trouvant dans les parties les plus « hautes » de la chaîne alimentaire comme le thon, les huîtres et les moules qui servent de la nourriture pour l'être humain.

Le mercure est reconnu comme une substance puissamment neurotoxique qu'il soit inhalé ou ingéré (contaminant alimentaire). On peut citer les graves conséquences sur la population de pêcheurs de la baie de Minamata (Japon, années 1950, utilisation de Methyl mercure comme catalyseur) qui a fait plus de 1000 morts [97].

La toxicité du mercure provient de son extrême volatilité, de sa relative solubilité dans l'eau ainsi que de sa capacité à se lier avec d'autres molécules qu'il va modifier ou dont il va transformer les fonctions. Ainsi, dans l'organisme, le mercure peut se lier aux molécules constituant la cellule vivante (protéines, acides nucléiques, etc.) et modifie leur structure ou inhibe leur activité biologique.

Il présente des effets indésirables sur la santé tels que perte de mémoire, dépression, tendances suicidaires, troubles de fonctions cérébrales, asthénie, troubles visuels, paralysie, infections répétées ou cancer [98]. C'est un sujet qui a beaucoup intéressé les chercheurs. Par exemple, des laboratoires de recherche médicale ont établi le fait que l'amalgame dentaire est un contributeur majeur à la charge corporelle en mercure. En 1997, une équipe scientifique a démontré que l'inhalation de vapeurs de mercure par les animaux produisait une lésion moléculaire dans le métabolisme des protéines du cerveau similaire aux lésions observées dans 80% des cerveaux affectés de la maladie d'Alzheimer. Récemment, des expériences effectuées par des scientifiques de la faculté de médecine de l'université de Calgary ont révélé

avec des preuves visuelles directes des cultures de neurones, comment les ions de mercure altèrent la fabrication des cellules neuronales en développement, pour mieux comprendre l'effet du mercure sur le cerveau. En effet, les dérivés organico-métalliques du mercure comme le méthyle mercure, forment un complexe très puissant qui peut provoquer des lésions permanentes dans les neurones, ainsi que la désamination de l'ADN ou sa méthylation.

IV.L'adénosine

IV.1.Généralités sur l'adénosine

L'adénosine (9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine) est un nucléoside purique formé d'une base adénine attachée à un noyau ribose via une liaison β -glycosidique (figure I-13). Présente dans toutes les cellules de l'organisme, elle est synthétisée de façon continue aussi bien dans le milieu intracellulaire qu'extracellulaire.

La production et le relargage de l'adénosine sont habituellement augmentés lorsque les conditions environnementales deviennent hostiles. En effet, si l'on considère des conditions physiologiques normales, la concentration intracellulaire en adénosine est sous contrôle enzymatique et reste faible (~ 200 nM) [99,100]. En cas de stress cellulaire, la synthèse se fait essentiellement par dégradation de l'adénosine tri-phosphate et la concentration en adénosine extracellulaire augmente, pouvant atteindre jusqu'à 100 fois les valeurs initiales [99,100]. De plus, quand la concentration intracellulaire en ATP s'effondre, suite à l'utilisation excessive d'énergie, celle en adénosine croît considérablement. Cette adénosine est ensuite transportée dans l'espace extracellulaire via divers transporteurs [99].

Ainsi, en cas de stress métabolique, il existe une augmentation des concentrations en adénosine extracellulaire, constituant ainsi un marqueur sensible d'un état physiopathologique spécifique [101].

L'adénosine est impliquée dans une multitude de systèmes physiologiques incluant les systèmes nerveux, cardiovasculaire, gastro-intestinal, urogénital, respiratoire et lymphatique. Ses effets biologiques affectent donc plusieurs organes vitaux. Au niveau du système respiratoire, l'adénosine régule la contraction du muscle lisse bronchique, augmente la sécrétion de mucus et module l'activité d'un grand nombre de cellules immuno-inflammatoires associées avec certaines maladies pulmonaires inflammatoires [100, 102, 103]. D'autres effets biologiques importants se manifestent au niveau des vaisseaux (vasodilatation et vasoconstriction), des plaquettes (effet antiagrégant), du rein (inhibition de la libération de rénine), du coeur et du système nerveux autonome (réduction de l'activité des neurones sympathiques et parasympathiques). Dans le système nerveux central, l'adénosine

induit un effet analgésique, anti-convulsant, neuroprotecteur, anxiolytique et inhibe l'activité motrice [100, 102, 103].

A ce titre, le développement de systèmes de détection de l'adénosine pourrait donc être utile au domaine biomédical, notamment à travers un dispositif de type aptacapteur. L'adénosine constitue par ailleurs la molécule modèle par excellence dans le cadre de développement d'aptacapteur ou l'étude fondamentale de l'interaction petite molécule/cible, faisant ainsi l'objet d'un très grand nombre de publications [29] [154] [155].

IV.2. Structure chimique de l'adénosine

L'adénosine (AD) est un nucléoside constitué d'une base nucléosidique, l'adénine, liée de façon covalente au ribose (Figure I-13). L'adénine est une purine (composé hétérocyclique aromatique formé par un noyau pyrimidine accolé à un noyau imidazole). Les nucléosides peuvent subir des phosphorylations intracellulaires pour donner des nucléotides, composés majeurs de l'information génétique (ADN et ARN). Les dérivés puriques sont principalement synthétisés par le foie. Leur source peut avoir 2 origines : une synthèse de novo et une source endogène par recyclage des composés issus du catabolisme nucléotidique ou nucléosidique. L'apport alimentaire reste négligeable du fait d'une dégradation des purines par les enzymes digestives.

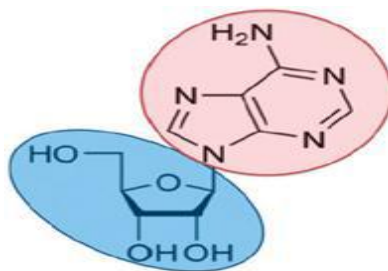


Figure I-13 : Structure chimique de l'adénosine : Base purique (en rouge) liée au ribose (en bleu). (Grenz et al. 2011)

Dans le compartiment intracellulaire, l'AD a un rôle primordial dans le métabolisme énergétique puisqu'elle entre dans la composition de molécules essentielles telles que l'AMP et l'ATP. Les composés dérivés de l'AD comme l'ATP sont aussi impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telle que la phosphorylation de protéines.

Les niveaux intracellulaires d'ATP sont finement contrôlés et relativement élevés (4 à 8 Mm). Lors de conditions défavorables (stress cellulaire, apoptose...), l'ATP ou l'ADP peut augmenter dans le cytosol et aussi libéré dans le milieu extracellulaire. Cela peut se réaliser

par fuite cellulaire lors des phénomènes d'apoptose, ou de nécrose durant une ischémie. Il existe également des phénomènes de relargage vésiculaire lors de l'activation plaquettaire. Dans le milieu extracellulaire, les concentrations sont beaucoup plus faibles (aux alentours de 10 Nm) mais suffisantes pour activer les récepteurs purinergiques dédiés [104].

IV.3. Production de l'adénosine

La production d'adénosine trouve son origine dans diverses voies de synthèse intra- et extracellulaire. Les principales sources intracellulaires d'adénosine sont l'ATP (70% de la production d'adénosine) et le cycle de la méthionine (30%) (Figure I-14). L'ATP intracellulaire subit une cascade de déphosphorylation par l'action de l'apyrase et d'une endo-5'nucléotidase qui aboutit à la formation d'adénosine. Le cycle de la méthionine est quant à lui capable de produire de l'homocystéine et de l'adénosine par l'action réversible de SAH hydrolase sur la S-adényl-homocystéine (SAH) [105].

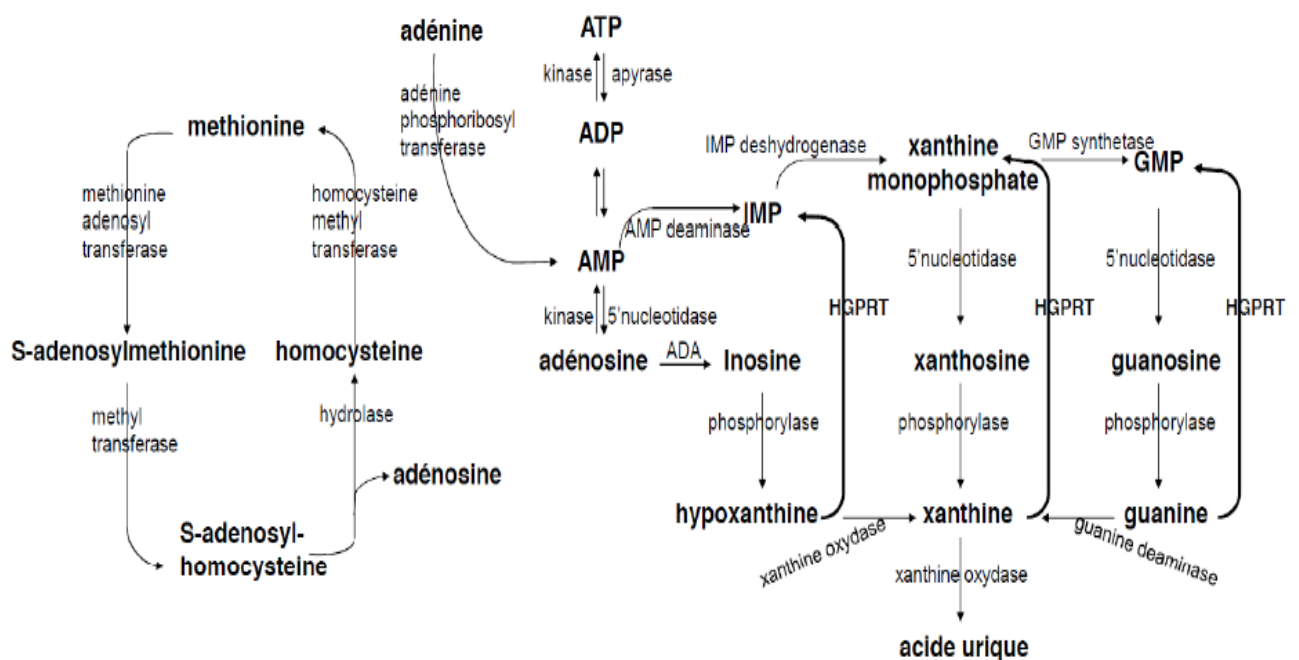


Figure I-14 : Principales sources de l'adénosine.

IV.3. Rôle de l'adénosine extracellulaire

La complexité de la voie de signalisation de l'adénosine rend l'étude du rôle de cette purine extracellulaire difficile. En effet, comme pour toute molécule de signalisation, il faut prendre en considération les récepteurs assurant la transmission du signal extracellulaire. Mais, il faut aussi considérer les différentes enzymes listées dans le paragraphe précédent

impliquées dans la génération et la dégradation de cette purine et donc modulant sa disponibilité dans l'espace extracellulaire. Ainsi, les fonctions de l'adénosine extracellulaire ont été démontrées par différentes études fonctionnelles des membres intervenant dans sa voie de signalisation. Ces études, initialement réalisées chez les mammifères, consistent essentiellement en la perturbation de l'expression de ces acteurs *in vivo* ou *in vitro* par des méthodes génétiques, soit par génération de modèles knock-out ou knock-down, soit par surexpression. Des approches pharmacologiques ont également été utilisées *in vitro*, *ex vivo* sur des coupes de cerveau ou *in vivo*, notamment chez le rat. Ces approches sont plus rapides et simples, mais reposent sur la spécificité des agonistes et antagonistes utilisés.

IV.4.1.A L'âge adulte

Comme détaillé dans le paragraphe précédent, les différents acteurs de cette voie de signalisation sont exprimés dans tous les tissus et organes, souvent de manière chevauchante, chez le vertébré adulte. Ainsi, il n'est pas surprenant que l'adénosine extracellulaire soit impliquée dans la régulation des fonctions physiologiques de nombreux organes et types cellulaires. Son rôle chez l'adulte a été largement étudié et démontré dans le système nerveux [106], l'immunité et l'inflammation [107, 108], le foie [109], le système urinaire [110], la différenciation cellulaire, la régénération tissulaire [111], etc. De plus, il est maintenant admis que l'adénosine extracellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies, telles que les maladies neuronales [114], les cancers [112, 113], le diabète [115], etc. Cette liste n'est pas exhaustive et pour cette raison, seulement quelques-unes des nombreuses fonctions de l'adénosine extracellulaire seront présentées ici :

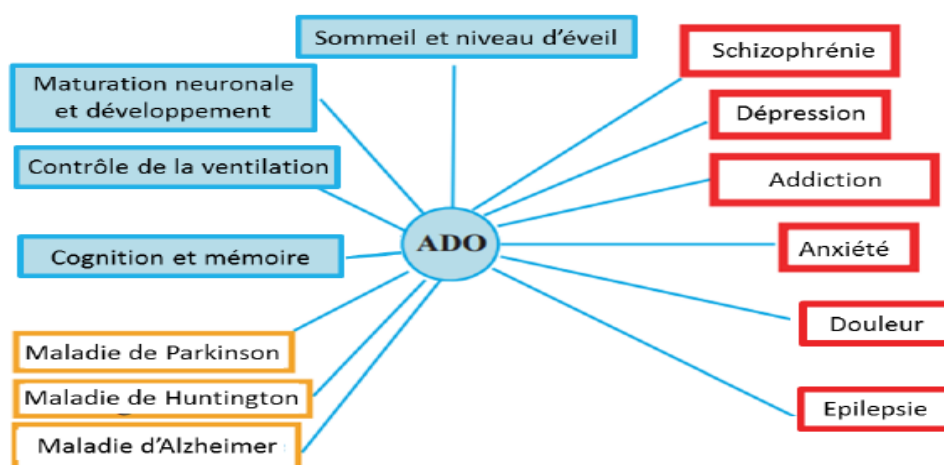


Figure I-15 : Rôle de l'adénosine dans le système nerveux central. Les fonctions cérébrales sont en bleu, les dysfonctionnements en rouge et les maladies en orange. AD : adénosine. D'après [116].

V. West Nile

V.1. Généralités

La Fièvre West Nile (FWN) est une maladie commune à plusieurs espèces, c'est une arbovirose émergente, le plus souvent asymptomatique, transmise à l'homme et à l'animal par les moustiques. Elle peut néanmoins se manifester par un syndrome de type pseudo-grippal. Après 3 à 15 jours d'incubation des complications peuvent survenir et l'infection peut évoluer, dans moins de 15% des cas symptomatiques, vers une méningite aseptique et une encéphalite. La mortalité dépend de la virulence de la souche, du statut immunitaire et de l'âge des patients [117]. Les oiseaux, qu'ils soient sauvages ou domestiques, constituent le réservoir principal du virus et les oiseaux migrateurs jouent un rôle essentiel dans sa dissémination, en permettant notamment son passage de l'Afrique vers les zones tempérées de l'Europe. Les moustiques s'infectent auprès des oiseaux, amplifient le virus et peuvent contaminer l'homme et les équidés lors de leur repas sanguin. Ce virus a émergé, il y a quelques années, dans les régions tempérées d'Europe et d'Amérique du Nord. Cette arbovirose présente des risques sérieux aussi bien pour la santé publique que pour la santé animale particulièrement pour les équidés et, depuis 1998, pour les oiseaux [118].

V.2. Historique

Le virus West Nile (VWN) fut l'un des premiers virus responsables des arboviroses à être documenté. Il fut isolé pour la première fois en 1937 par Smithburn et Burke à partir du sérum d'une femme adulte atteinte d'un syndrome fébrile bénin, habitant le district du West Nile en Ouganda. Ce n'est que dans les années cinquante que l'écologie de cette arbovirose a été mise en évidence en Egypte. Puis le VWN a été reconnu responsable de sévères méningo-encéphalomyélites humaines chez des personnes âgées en Israël en 1951-54 puis 1957. Ensuite, des cas de maladie chez des chevaux ont été observés en Egypte (Taylor, 1956) et d'autres pays au début des années soixante. Le virus a été détecté chez des oiseaux et des moustiques puis, il a été retrouvé chez l'Homme et l'animal dans de divers pays (Roumanie et Maroc en 1996, Tunisie en 1997, Italie en 1998). L'apparition du VWN en Amérique du Nord en 1999, avec des cas d'encéphalites humaines et équine, semble représenter une étape importante dans l'histoire de l'évolution de ce virus [119]. Plusieurs pays tels qu'Israël, la France, le Portugal et le Mexique ont rapporté des cas humains de l'infection par le VWN en

2003 ou 2004. En octobre 2003, un cas de méningo-encéphalite due au VWN est rapporté dans le département du Var dans le Sud-Est de la France. Il s'agit du premier cas humain depuis 1964 [120]. Le total des cas en France en 2003 s'établit à six cas confirmés et un cas probable. En juillet 2004, deux Irlandais développent des symptômes, une encéphalite et une fièvre, après un séjour au Portugal. Des investigations menées dans ce pays confirment la présence des moustiques infectés par le VWN (CDC, 2004).

Au Mexique, 6 personnes ont présenté une atteinte neurologique [121]. En juillet 2004, un cas a été rapporté dans l'état de Sonora à la frontière du Texas.

V.3. Structure et génome

En microscopie électronique, le VWN apparaît comme un virus à la surface irrégulière. C'est un virus enveloppé, d'environ 40-45 nm de diamètre, de forme sphérique (Figure I-16). Tout comme les autres flavivirus Le génome consiste en un ARN⁺ monocaténaire qui se situe dans une 8 nucléocapside (protéine C) à symétrie icosaédrique. Deux protéines de surface sont enchâssées dans la bicouche lipidique de l'enveloppe : la protéine d'enveloppe virale E et la protéine de membrane M.

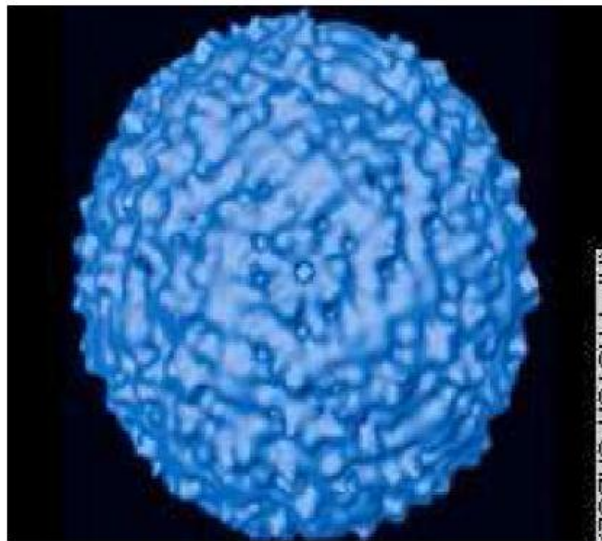


Figure I-16 : Apparence du virus West Nile en microscopie électronique (Source : Site internet Bioquest: Community Resources for problem solving in biology)

V.4. Classification

Le VWN est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité positive, appartenant au genre *Flavivirus* et à la famille des *Flaviviridae*. Ce genre regroupe de nombreux agents pathogènes importants pour l'homme et transmis par des arthropodes, tels que les virus de l'encéphalite japonaise, de la dengue, de la fièvre jaune ou de l'encéphalite à tiques. Pour les

Flavivirus transmis par les moustiques, 7 sérogroupes ont été identifiés sur la base des réactions croisées observées au cours des tests d'inhibition de l'hémagglutination. Le VWN appartient au séro-complexe de l'encéphalite japonaise, comprenant également le virus de l'Encéphalite Japonaise (JE), le virus de l'Encéphalite de la Murray Valley (MVE), le virus de l'Encéphalite de Saint Louis (SLE), les virus Usutu (USU), Koutango (KOU), Cacipacore (CPC) et Yaounde (YAO)

V.5. Cycle de transmission

Le virus est maintenu dans un cycle enzootique «oiseau-moustique-oiseau». Cependant il existe des infections dites «cul de sac» ou accidentelles chez le cheval et l'homme. Chez ces derniers la virémie est insuffisante pour permettre par la suite l'infection du moustique [122]. D'autres cycles de transmission ont été toutefois décrits impliquant certains amphibiens ou reptiles comme hôtes amplificateurs [123]. L'infection humaine résulte le plus souvent des piqûres de moustiques infectés mais le virus peut aussi se transmettre par contact avec d'autres animaux infectés, avec leur sang ou d'autres tissus. Une très faible proportion d'infections humaines s'est produite lors de transplantations d'organes, de transfusions sanguines ou de l'allaitement au sein. On a signalé un cas de transmission transplacentaire du VWN. Jusqu'à présent, on n'a signalé aucune transmission interhumaine du VWN par les contacts de la vie courante, ni de transmission à des agents de santé en milieu médical toutefois des cas de transmission du VWN à des personnels de laboratoire ont été signalés.

V.5.Traitement

Il n'existe pas de traitement spécifique contre les flavivirus, seul un traitement symptomatique de soutien reposant sur une fluidothérapie associée à des anti-inflammatoires non stéroïdiens (phénylbutazone, flunixin méglumine) et du DMSO (diméthylsulfoxyde) permet d'atténuer les symptômes. La flunixin méglumine administrée à une dose de 1,1 mg/kg toutes les 12 heures, par voie intraveineuse, rapidement après l'installation de la maladie, semble diminuer la sévérité des tremblements musculaires et des fasciculations en quelques heures [124]. L'utilisation des corticostéroïdes est controversée. La thérapie lors de la présence d'un cheval couché est généralement plus agressive et peut inclure l'administration de dexaméthasone (0,05-0,1 mg/kg chaque 24 heures par voie intraveineuse) et du mannitol (0,25-2,0 g/kg chaque 24 heures par voie intraveineuse). La Détomidine (0,02-0,04 mg/kg par voie intraveineuse ou intramusculaire) est efficace pour une tranquillisation

prolongée. De même, de faibles doses d'acépromazine (0,02 mg/kg par voie intraveineuse ou 0,05 mg/kg par voie intramusculaire) fournissent un excellent soulagement à l'anxiété chez les chevaux couchés ou debout. Une antibioprofylaxie sera mise en place uniquement en cas de corticothérapie afin d'éviter des complications bactériennes. De même, lors d'infections qui surviennent souvent chez les chevaux couchés (blessures, pneumonie), on administre des antibiotiques. L'intérêt d'administrer des interférons, en particulier l'interféron α , est encore discuté. Son utilisation se base sur des rapports peu nombreux dans la littérature médicale humaine et vétérinaire et il n'y a que peu d'informations sur son efficacité chez le cheval (en particulier pas d'étude cas/témoin). Une thérapie basée sur l'administration intraveineuse d'immunoglobulines dirigées contre le VWN a été également recommandée aux Etats-Unis. Cependant ce traitement plasmatique ne change pas la donne quant au pronostic et à la sévérité de la maladie [124]. Il faut isoler les chevaux atteints dans un local calme, semi éclairé, désinsectisé. Le cheval atteint par le virus West-Nile n'est pas contagieux ni pour l'homme ni pour ses congénères [125].

VI. Bactérie Escherichia Coli

VI.1. Introduction

Escherichia coli (E. coli) est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches d'E. Coli sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches d'E. Coli dites entérohémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec ces souches peuvent être également à risque.

VI.2. Définition

La bactérie à Gram-négatif Escherichia coli (E. coli) est un bacille, anaérobie facultatif. Elle a été isolée pour la première fois en 1885 par Theodor Escherich. Elle est définie selon la classification suivante : Bacteria – Proteobacteria – Gammaproteobacteria – Enterobacteriales – Enterobacteriaceae – Escherichia – Escherichia coli. Certaines souches sont des souches commensales retrouvées dans le microbiote) [126]. D'autres sont des souches pathogènes à l'origine de différentes pathologies intra ou extra-intestinales [127]. Une analyse phylogénétique effectuée sur les différentes souches d'E. Coli isolées de l'Homme a

déterminé quatre groupes principaux (A, B1, B2 et D1) et deux groupes secondaires (D2 et E) (Figure I-17).

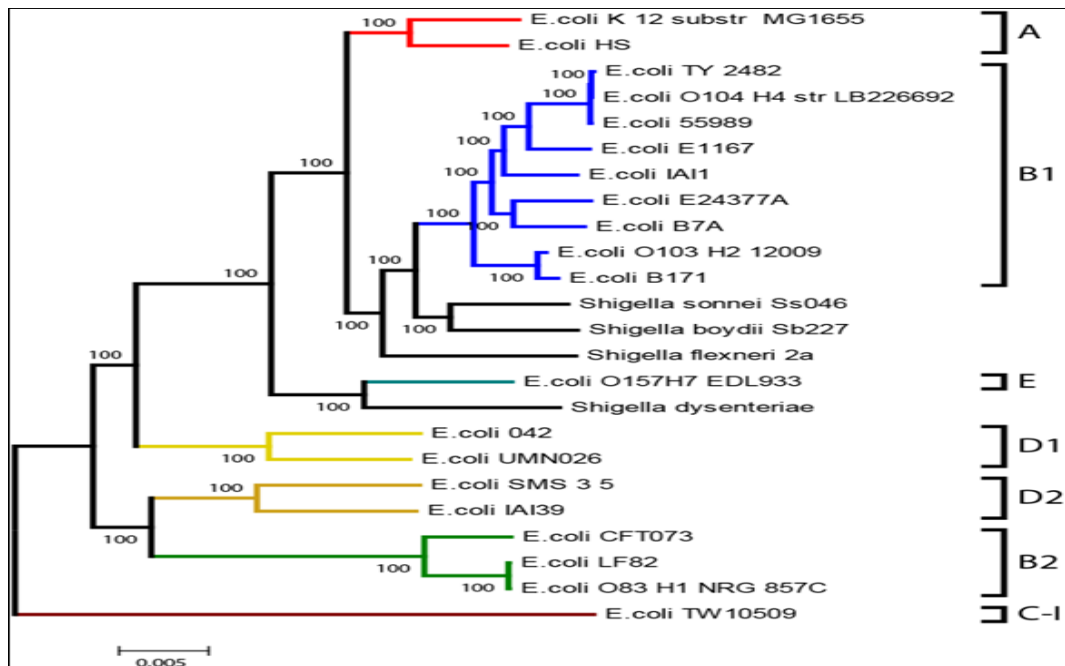


Figure I-17 : Phylogénies des différentes souches d'*Escherichia coli* déterminée à partir des génomes disponibles des souches d'*E. coli* présentes dans le microbiote humain

VI.3. Sources et mode de transmission d'*Escherichia coli*

La principale voie de transmission est indirecte par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eau de boisson contaminés par un environnement souillé le plus souvent par les matières fécales d'animaux infectés. Aux États-Unis, les études épidémiologiques montrent que, quand la source de contamination peut être identifiée, la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec les animaux (notamment les bovins) représentent respectivement 66 %, 20 %, 12 % et 2 % des modes de contamination.

D'autres sources non animales ont été identifiées comme étant à l'origine de cas d'infection à STEC chez l'homme tel que le cidre et les jus de fruits (jus de pomme non pasteurisé), ainsi que les légumes consommés crus ou peu cuits: laitue, jeunes pousses (radis) et graines germées (luzerne, fenugrec, ...).

La contamination des réseaux de distribution d'eau potable a été évoquée lors de plusieurs investigations d'épidémie ou de cas isolés. Suite à une épidémie de diarrhée hémorragique à *E. coli* O157 survenue au Swaziland en 1982, Effler et ses collaborateurs [128], se sont penchés sur les facteurs de risque et les circonstances d'apparition de

l'épidémie. Il apparaît, dans cette étude rétrospective, que le pic de cas de diarrhée hémorragique est survenu concomitamment à une période de fortes pluies. Ces pluies faisaient suite à une sécheresse prolongée pendant laquelle les zones de pâtures des troupeaux de bovins porteurs d'*E. coli* s'étaient rapprochées des points d'eau. Ainsi, La sécheresse, le portage animal d'*E. coli* et la contamination de la ressource en eau par des fèces de bovins après de fortes pluies ont selon toute vraisemblance provoquée l'épidémie. [129]...[132].

VI.4. Détection d'*Escherichia coli*

Les méthodes traditionnelles standardisées de détection des bactéries pathogènes (et d'altération) reposent sur des protocoles compliqués. Ces méthodes présentent l'avantage d'avoir des taux de détection très bas et de pouvoir être utilisées sur des matrices complexes. Cependant leurs applications sont longues et fastidieuses. Des protocoles plus rapides remplaçant les étapes d'isolement et parfois d'indentification de la bactérie sur gélose ont vu 22 le jour. Ces nouvelles méthodes reposent sur des techniques dites A l'heure actuelle, il existe deux grandes familles de tests immunologiques. Ils sont soit basés sur des systèmes immuno-chromatiques ou sur des systèmes dits ELISA ou ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Ces tests ont lieu après une phase d'enrichissement (le plus souvent d'une durée de 24 heures) ou Les tests génétiques sont composés d'une étape supplémentaire par rapport aux tests immunologiques. En effet, ces tests sont basés sur l'amplification de l'ADN ou de l'ARN bactérien. En conséquence, avant amplification, une étape de préparation des acides nucléiques est essentielle. Actuellement, il existe un grand nombre de méthodes validés par différentes autorités pour la recherche d'*E. coli* O157: H7. Au cours de ce rapport, les méthodes validées AFNOR seront plus particulièrement étudiées. [133]

VII. AMOXICILLINE

VII.1. Découverte des β -lactamines et développement de l'amoxicilline

C'est à Alexander Flemming que l'on attribue la découverte des antibiotiques de la famille des β -lactamines en 1928. Ce dernier fut le premier à rapporter l'activité antibactérienne de la moisissure *Penicillium* sur des colonies de staphylocoque. Il nomma la substance responsable de cette activité, pénicilline [134]. Devant l'impossibilité de purifier cette molécule, l'intérêt la pénicilline comme agent antibactérien fut mitigé jusqu'en 1940, année où un groupe de recherche anglais dirigé par Florey et Chain observèrent l'efficacité de la pénicilline contre les infections à streptocoque chez les souris suite à une injection sous-cutanée de l'antibiotique [135]. À cette époque, il était difficile de produire, à partir de la

souche de *Penicillium notatum* initialement utilisée, des quantités suffisantes de pénicilline pour effectuer des essais cliniques. Les conditions de recherche étant difficiles à cause de la seconde guerre, Florey et Chain se rendirent aux États-Unis où le développement accéléré de l'antibiotique fut considéré comme une priorité stratégique. Grâce une meilleure sélection de la souche de moisissure et à des améliorations du milieu de culture, le rendement fut augmenté de 100 fois en seulement 2 ans [136]. Durant cette période, il devint évident que différentes molécules pouvaient être obtenues selon la composition du milieu de culture, la souche et les conditions de fermentation [137.138]. Vers la fin des années cinquante, Bachelor et son équipe démontrèrent que la structure fournissant à la pénicilline son activité antibactérienne était l'acide 6-aminopénicillamique (6-APA) et que ce dernier pouvait être obtenu par fermentation en l'absence de précurseurs de la chaîne latérale spécifique à la pénicilline G [139]. Cette découverte a ainsi ouvert la voie à la création de nouvelles β -lactamines de semi-synthèse, dont la chaîne latérale rattachée au 6-APA est modifiée [140]. Cette découverte a permis d'élargir le spectre d'activité des pénicillines : d'une part, on développa des molécules résistantes aux β -lactamases comme la méthicilline et d'autre part on développa des β -lactamines à spectre élargi comme l'ampicilline, qui est active à la fois sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces premières molécules étaient toutefois peu propices à l'administration orale et c'est en 1970 fut que découverte l'amoxicilline ce qui remédia à ce problème. Outre un spectre d'activité très similaire à celui de l'ampicilline, l'amoxicilline a une biodisponibilité orale élevée ce qui permet d'obtenir des concentrations sanguines deux fois plus élevées suite à une administration per os [141].

VII.2. Structure et propriétés physico-chimiques

VII.2.1. Structure

L'amoxicilline appartient au groupe des médicaments appelés antibiotiques, et plus particulièrement à la famille des pénicillines. C'est une molécule dont la masse moléculaire est de 365,4 daltons. Tel qu'illustré à la Figure I-18 ci-dessous, elle possède trois groupements ionisables : le groupement acide carboxylique COOH sur le cycle thiazolidine, le groupement hydroxyle OH du cycle para-hydroxyphényle et le groupement amine primaire sur la chaîne latérale du cycle β -lactame.

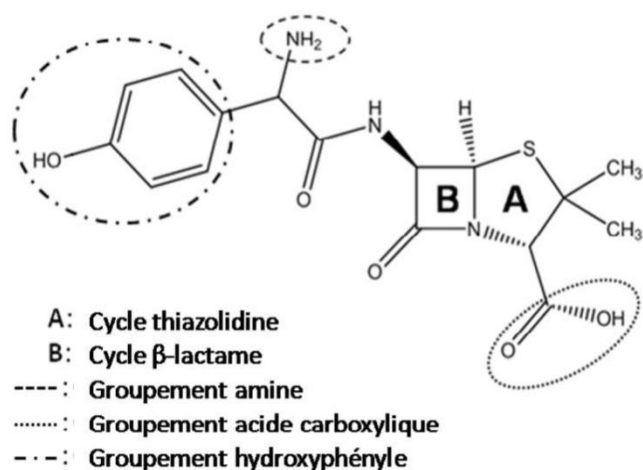


Figure I-18 : Structure semi-développée de l'amoxicilline identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau β -lactamine

La structure commune à toutes les pénicillines est le cycle β -lactame fusionné à un cycle thiazolidine (Figure I-19). Le cycle β -lactame des pénicillines porte une chaîne latérale qui est spécifique à chaque antibiotique et influence son action ainsi que son absorption systémique. Pour l'amoxicilline, cette chaîne comporte une amine primaire et un groupement parahydroxyphényle.

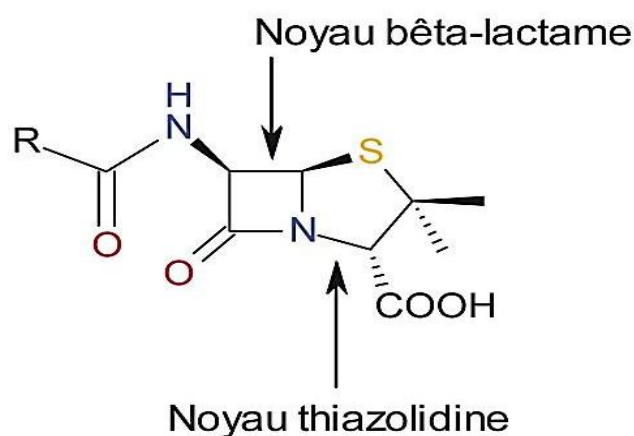


Figure I-19 : Structure des pénicillines

VII.2.2. Ionisation

Un des préalables à l'activité biologique d'une molécule est qu'elle doit pouvoir traverser les membranes cytoplasmiques de différentes cellules qui s'interposent entre son site d'administration et son site d'action. Cette membrane est composée d'une bicouche lipidique

dans laquelle sont dispersés des hydrates de carbone et des protéines. Une propriété physico-chimique qui favorise ce passage transmembranaire est une charge ionique nulle. L'amoxicilline est une molécule amphotère : les valeurs de pKa de ces groupes donneurs de protons respectivement (-COOH et -OH) et celui de son groupe receveur de protons (-NH₂) sont respectivement de 2,4 et 7,4 et 9,6 [142]. Le point isoélectrique (pI) est la valeur de pH à laquelle la charge nette de la molécule est nulle : tel que calculé à l'aide de l'équation 1 ci-dessous [143], sa valeur pour l'amoxicilline est égale à 6,0 car la valeur de pKa du groupement hydroxyle n'est pas prise en compte étant donné sa proximité avec la valeur du pH sanguin.

Formule de calcul du point isoélectrique et valeur obtenue pour l'amoxicilline .

$$pI = 1/2 (pK1 + pK2) = 1/2 (2,4 + 9,6) = 6,0$$

VII.2.3.Hydrosolubilité et liposolubilité

Une deuxième propriété physico-chimique favorisant l'absorption est la capacité de la molécule à se solubiliser dans l'eau et les lipides. Il est établi que les molécules liposolubles traversent plus facilement la membrane cytoplasmique que les molécules polaires [144]. Le coefficient de partage octanol/eau (P), qui est habituellement présenté après avoir été transformé logarithmiquement (log P), est un indicateur du caractère lipophile d'une substance. Il est calculé à partir du rapport des concentrations d'antibiotique soluble dans l'octanol et dans l'eau (Équation I-45). Il est à noter que la concentration d'antibiotique dans l'octanol n'est pas mesurée mais déduite à partir de la diminution de sa concentration dans l'eau, après l'ajout de la phase d'octanol.

Équation : Calcul de la valeur du log-P

$$\log - P = \frac{\log[\text{octanol}]}{[\text{eau}]}$$

Plus sa valeur est négative, plus la molécule est hydrophile, alors qu'à l'inverse plus sa valeur est élevée et positive, plus la molécule est lipophile. Celle de l'amoxicilline est de 0,87 [145]. Cette valeur supérieure à 0 indique que ce composé est légèrement plus soluble dans les lipides que dans l'eau, ce qui favorisera son passage transmembranaire.

VII.2.4.Stabilité en milieu acide

Une des propriétés physico-chimiques qui favorisent l'usage thérapeutique de l'amoxicilline est que sa structure permet de conférer une stabilité au noyau β- lactame en milieu acide, ce qui était un obstacle majeur à l'utilisation orale des pénicillines. Cette

stabilité est obtenue grâce à la présence d'une chaîne latérale suffisamment longue pour que son noyau hydroxyphényl protège le lien amide du cycle β -lactame. Cette caractéristique favorise d'ailleurs son utilisation par rapport à celle de l'ampicilline, dont la biodisponibilité orale est moins élevée [146].

VII.3. Propriétés biologiques de l'amoxicilline

VII.3.1. Structure et polymérisation du peptidoglycane

La paroi cellulaire bactérienne, composante essentielle au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse, est composée en partie de peptidoglycane. La structure de ce polymère consiste en une série de chaînes où s'alternent l'acide N-acétylmuramique (NAM) et l'acide N-acétylglucosamique (NAG), sur lesquels est greffée une chaîne de polypeptides. Ces structures sont reliées entre elles par un pont inter-peptidique (Figure I-20).

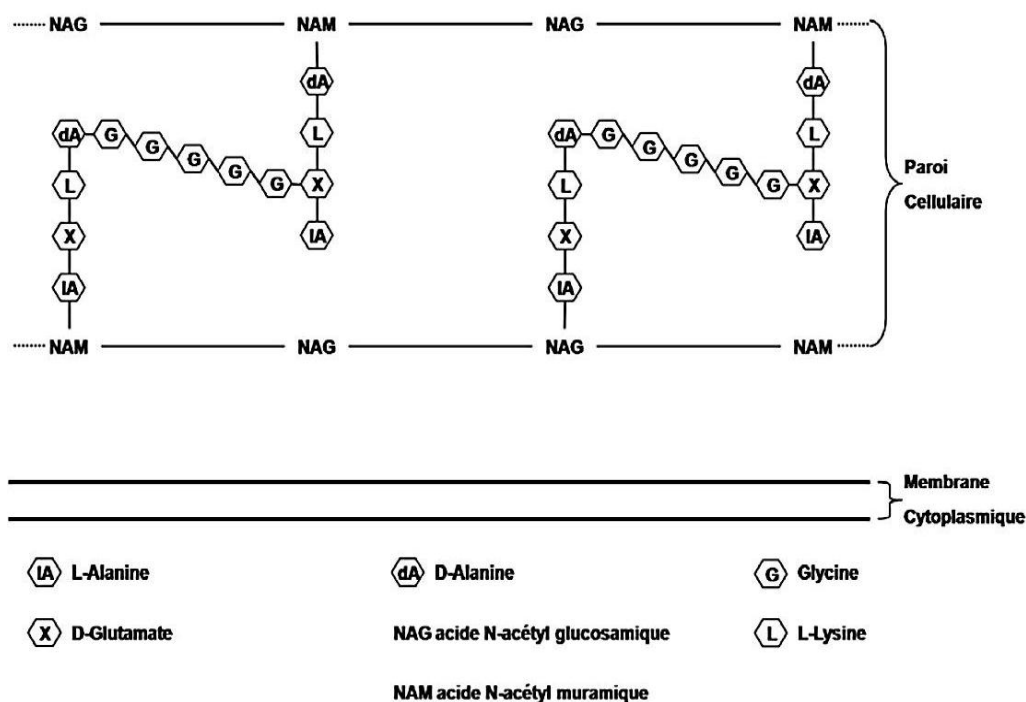


Figure I-20 : Structure du peptidoglycane [147]

Ces ponts inter-peptidiques sont établis grâce à l'action d'enzymes situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les transpeptidases ou PLP (Protéines Liant les Pénicillines), qui catalysent la réaction permettant la réticulation du peptidoglycane [147]. Au cours de cette réaction, une pentaglycine est ajoutée et la D-alanine du groupement D-alanyl-D-alanine de la chaîne peptidique subséquente est libérée.

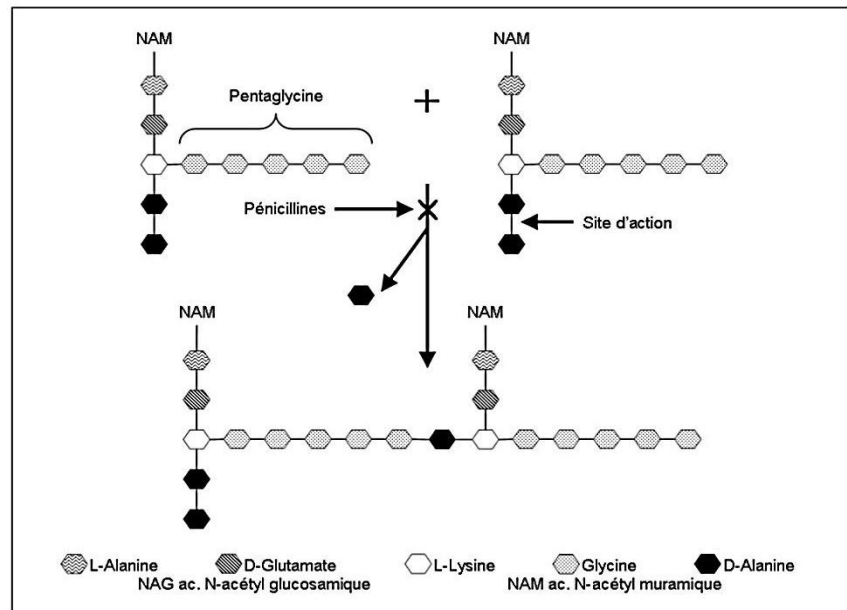


Figure I-21 : Réaction de polymérisation du peptidoglycane

VII.3.2. Mécanisme d'action des antibiotiques de type bêta-lactamine

L'amoxicilline, comme les autres pénicillines, possède une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine du précurseur du peptidoglycane (Figure I-22) [148]. Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP.

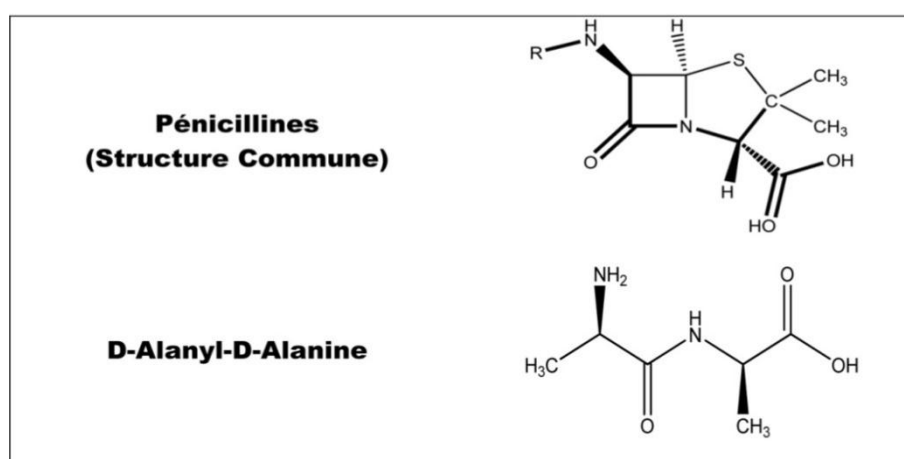


Figure I-22 : Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine

Les β -lactamines sont des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne, que ce soit des Gram positif ou négatif. Ces composés n'exercent de ce fait leur action bactéricide que si les bactéries sont en phase de croissance active et en cours de synthèse de leur paroi. Ces antibiotiques possèdent une activité temps-dépendant ce qui signifie que leur action bactéricide dépend de la durée pendant laquelle les concentrations en médicament demeurent supérieures à la concentration minimale bactéricide ou Concentration Minimale Inhibitrice.

VII.3.1.1.Principe

Le mécanisme d'action des β -lactamines est fondé sur la liaison de l'antibiotique aux enzymes participant à la synthèse de la paroi bactérienne, les PLP (Protéines Liant la Pénicilline) encore appelées PBP (Penicillin Binding Proteins). La conséquence de cette interaction moléculaire est l'inhibition de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Ainsi, les transpeptidases bactériennes, PLP intervenant dans la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, vont reconnaître le cycle bêta-lactame du fait de son analogie structurale avec leur substrat naturel. En effet, les β -lactamines sont des analogues structuraux du substrat naturel dipeptidique D-alanyl D-alanine qui termine les chaînes polypeptidiques des précurseurs du peptidoglycane et vont donc se lier avec les enzymes responsables de la réticulation du peptidoglycane : les transpeptidases intervenant au moment de l'élongation (assemblage des chaînes peptidiques par formation de ponts interpeptidiques). Notons dès à présent que la liaison à une PLP se fait de façon covalente et irréversible. Les bêta-lactamines sont donc des « substrats suicide ». Ainsi, après que l'antibiotique s'est fixé à la PLP, la réaction de transpeptidation est inhibée, la synthèse du peptidoglycane bloquée et la cellule meurt rapidement. Toutefois, l'activité bactéricide des pénicillines n'est pas liée à la rupture de la paroi fragilisée sous l'effet de la pression osmotique car pour qu'il y ait mort cellulaire, il faut la coopération active de la bactérie qui utilise sa propre machinerie enzymatique suicide : les peptidoglycanes-hydrolases (autolysines).

VII.3.1.2. Principe de déroulement

VII.3.1.2.1. Pénétration dans la bactérie

Les β -lactames ne doivent pas pénétrer à proprement parler dans la bactérie, mais rejoindre leur cible au niveau de la face interne de la paroi (espace périplasmique). Cet accès est direct et facile pour les bactéries à Gram positif dont le peptidoglycane est relativement perméable aux bêta-lactamines (sauf celui d'*E. faecalis*). Par contre, concernant les Gram(-

), les β -lactames doivent emprunter les passages ménagés par les porines au niveau de la membrane externe pour rejoindre l'espace périplasmique. Ainsi, chez les bactéries à Gram négatif, ces propriétés de perméabilité vont contribuer à définir le phénotype naturel de résistance propre à chaque espèce bactérienne.

VII.3.1.2.2. Activité antibactérienne

Comme nous l'avons vu, elle résulte de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane par fixation covalente aux protéines liant la pénicilline. Ces dernières sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane et sont des transpeptidases et des carboxypeptidases. Elles sont ancrées dans la membrane cytoplasmique par leur extrémité carboxylique, et émergent sur la face externe de cette membrane dans l'espace périplasmique par leur extrémité NH_2 porteuse du site actif enzymatique.

❖ Arrêt de la croissance bactérienne :

En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Alanyl-D-Alanine, les bêta-lactames se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase. En présence d'antibiotique, cette enzyme, qui agit comme une acyl-transférase à sérine active, exerce son action hydrolytique sur la molécule antibiotique, conduisant à la formation d'un complexe enzyme-produit qui ne se dissocie pas car l'enzyme est liée de façon covalente au produit. Ce mécanisme est appelé inhibition-suicide (l'enzyme elle-même catalyse la transformation de l'antibiotique en un composé hautement réactif qui se lie à l'enzyme de façon irréversible).

Les résultats qui seront ici présentés mettront en évidence le fait que la fixation de la bêtalactamine sur la PLP peut se faire sur d'autres types d'acides aminés que la sérine, et notamment la lysine.

Les schémas suivants exposent l'action de la transpeptidase et le principe antibactérien des β -lactamines.

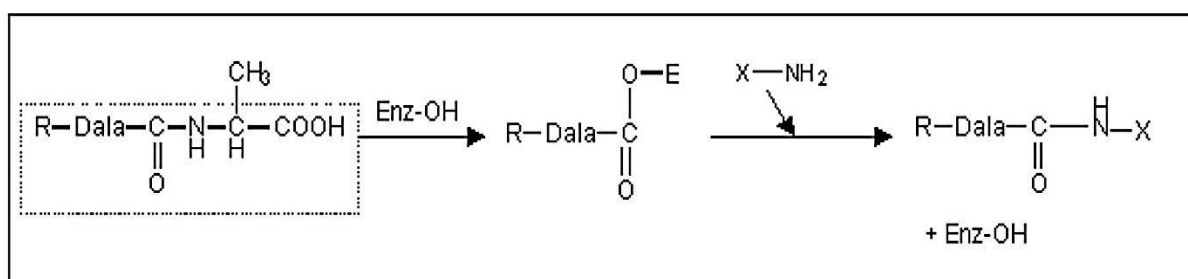


Figure I-23 : Réaction de transpeptidation

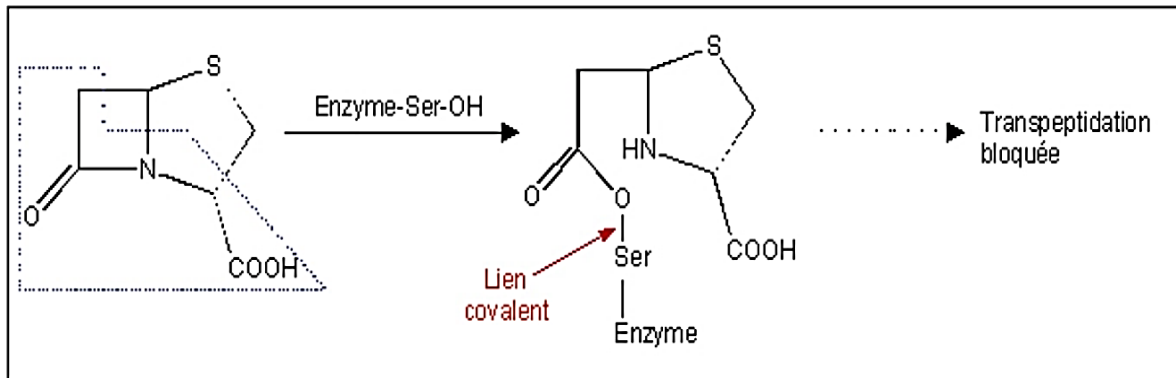


Figure I-24 : Inhibition de la transpeptidation par la bêta-lactame

Notons en pointillé l'analogie structurale entre la séquence D-Ala-D-Ala et la β -lactamine. L'inhibition des PLP essentielles entraîne un arrêt de croissance (effet bactériostatique). Trois effets morphologiques différents peuvent être observés selon les fixations préférentielles d'une bêta-lactamine sur la PLP : la filamentation, la formation de sphéroplastés suivie d'une lyse bactérienne, et la formation d'éléments ovoïdes.

Concernant les inhibiteurs de bêta-lactamases, elles n'ont pas de rôle contre les bactéries mais servent de substrats pour les bêta-lactamases qui ne pourront plus exercer leur effet sur les antibiotiques.

❖ Effet bactéricide :

Il fait suite à l'arrêt de la croissance de la paroi bactérienne et met en jeu le système des autolysines, qui dégradent le peptidoglycane des bactéries en phase de croissance. Ainsi la rupture de l'équilibre dynamique entre la construction du peptidoglycane et son réarrangement par les autolysines va se faire en faveur des autolysines entraînant la mort de la bactérie.

Une autre hypothèse a été avancée pour expliquer l'action antibactérienne des pénicillines : une fois lié à la PLP, ce type d'antibiotiques activerait des protéines bactériennes, les holines, ayant pour effet de causer des lésions dans la membrane plasmique. Ces altérations causeraient des fuites du contenu cellulaire, entraînant des hydrolases qui briseraient le peptidoglycane et lyseraient la cellule [149].

REFERENCE

- [1] D. Case, A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; C.; Simmerling, Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* 2005, 26 (16), 1668–1688.
- [2] B. Brooks, R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* 2009, 30 (10), 1545–1614.
- [3] C. Oostenbrink, Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. *J. Comput. Chem.* 2004, 25 (13), 1656–1676.
- [4] J. Jones. *R. Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Eng. Sci.* 1924, 106, 463–477.
- [5] J. Wu, C.; Piquemal, J.-P.; Chaudret, R.; Reinhardt, P.; Ren, P. *J. Chem. Theory Comput.* 2010, 6, 2059–2070.
- [6] E. Maillart, Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. Paris, Paris-Sud XI Orsay, 2004. 288.
- [7] F. Chauveau, C. Pestourie, and B. Tavitian, Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications. *Pathologie Biologie*, 2006. 54(4): p. 251-258.
- [8] E. Burcu Bahadır, M. Kemal Sezginürk, Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*. 132 (2015) 162–174.
- [9] M.L.Y. Sin, K.E. Mach, P.K. Wong, J.C. Liao, Advances and challenges in biosensorbased diagnosis of infectious diseases, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 14 (2014) 225–244.
- [10] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1025–1041.
- [11] L. Barthelmebs, C. Calas-Blanchard, G. Istamboulie, J.-L. Marty, T. Noguer, Biosensors as analytical tools in food fermentation industry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 698 (2010) 293–307.
- [12] N.A. Mungroo, S. Neethirajan, Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-a review, *Biosensors*. 4 (2014) 472–493.
- [13] A.M. Skelley, J.R. Scherer, A.D. Aubrey, W.H. Grover, R.H.C. Ivester, P. Ehrenfreund, FJ Grunthaner, JL Bada, RA Mathies, Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1041–1046.
- [14] T.B. Tims, D.V. Lim, Rapid detection of Bacillus anthracis spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor, *J. Microbiol. Methods*. 59 (2004) 127–130.
- [15] A. Heller, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996, 7 (1), 50–54.
- [16] P. Daniels, B.; Deacon, J. K.; Eddowes, M. J.; Pedley, D. G. *Sens. Actuators* 1988, 15 (1), 11–18.
- [17] K. Davis, A.; Leary, T. R. *Anal. Chem.* 1989, 61 (18), 1227–1230.
- [18] A. Azevedo, M.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21 (2), 235–247.

- [19] Y. Zhang Tadigadapa, S. Biosens. Bioelectron. 2004, 19 (12), 1733–1743.
- [20] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 1747–1763.
- [21] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, S. Hernández, J.R. Bertolín, C. Cubel, JR Castillo, Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review, Biosens. Bioelectron. 49 (2013) 146–158.
- [22] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical Biosensors Sensor Principles and Architectures, Sensors. 8 (2008) 1400–1458.
- [23] A. Hierlemann, O. Brand, C. Hagleitner, H. Baltes, Microfabrication techniques for chemical/biosensors, Proc. IEEE. 91 (2003) 839–863.
- [24] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, Materials and techniques for electrochemical biosensordesign and construction, Biosens. Bioelectron. 15 (2000) 273–282.
- [25] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, Curr. Issues Mol. Biol. 10 (2008) 1–12.
- [26] M. Madou, and M.J. Tierney, Required technology breakthroughs to assume widely accepted biosensors. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1993. 41: p. 109-128.
- [27] M., Marrakchi, Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et micro-organismes sur microélectrodes interdigitées. 2006, Ecole centrale de Lyon: Lyon. p. 157.
- [28] C. Malitesta, and M.R. Guascito, Heavy metal determination by biosensors based on enzyme immobilised by electropolymerisation. Biosensors and Bioelectronics, 2005. 20(8): p. 1643-1647.
- [29] B.Kim, et al., Immobilization of enzymes within hydrogel microparticles to create optical biosensors for the detection of organophosphorus compounds. Current Applied Physics. In Press, Accepted Manuscript.
- [30] C.Chouteau, Développement d'un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales. 2004, INSA de Lyon: Lyon. p. 178.
- [31] I. Giouroudi, F. Keplinger, Microfluidic biosensing systems using magnetic nanoparticles, Int. J. Mol. Sci. 14 (2013) 18535–18556.
- [32] A. Killard, Antibodies: production, functions and applications in biosensors, TrAC Trends Anal. Chem. 14 (1995) 257–266.
- [33] Miodek, A.; Vidic, J.; Sauriat-Dorizon, H.; Richard, C.-A.; Le Goffic, R.; Korri-Youssoufi, H.; Chevalier, C. Anal. Chem. 2014, 86 (18), 9098–9105.
- [34] A. Sharma; Matharu, Z.; Sumana, G.; Solanki, P. R.; Kim, C. G.; Malhotra, B. D. Thin Solid Films 2010, 519 (3), 1213–1218.
- [35] S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci, P. Martini, M. Ross, M. SantaAna, Danley D, West T, Lanfranchi G, Overview of Electrochemical DNA Biosensors: New Approaches to Detect the Expression of Life, Sensors. 9 (2009) 3122–3148.
- [36] A.A. Ensafi, M. Taei, H.R. Rahmani, T. Khayamian, Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode, Electrochimica Acta. 56 (2011) 8176–8183.

- [37] M. Tichoniuk, D. Gwiazdowska, M. Ligaj, M. Filipiak, Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1618–1623.
- [38] M.D. Carlo, M.D. Marcello, M. Perugini, V. Ponzielli, M. Sergi, M. Mascini, Dario Compagnone, Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbon detection, *Microchim. Acta.* 163 (2008) 163–169.
- [39] A.M. Nowicka, A. Kowalczyk, Z. Stojek, M. Hepel, Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants, *Biophys. Chem.* 146 (2010) 42–53.
- [40] A. Mulchandani, null Rajesh, Microbial biosensors for organophosphate pesticides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (2011) 687–699.
- [41] L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei, Microbial biosensors: a review, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1788–1799. d
- [42] W. Zhou, P.-J.J. Huang, J. Ding, J. Liu, Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics, *The Analyst.* 139 (2014) 2627–2640.
- [43] A. Rhouati, C. Yang, A. Hayat, J.-L. Marty, Aptamers: a promising tool for ochratoxin A detection in food analysis, *Toxins.* 5 (2013) 1988–2008.
- [44] S. Amaya-González, N. de-los-Santos-Alvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo- Castañón, Aptamer-based analysis: a promising alternative for food safety control, *Sensors.* 13 (2013) 16292–16311.
- [45] A.Sadana, Protein adsorption and inactivation on surfaces. Influence of heterogeneities. *Chemical Reviews*, 2002. 92(8): p. 1799-1818. for thyroglobulin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. 25(1): p. 118-123.
- [46] H.Barhoumi, et al., Urease immobilization on biotinylated polypyrrole coated ChemFEC devices for urea biosensor development. *IRBM.* 29(2-3): p. 192-201.
- [47] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques.* 37 (2004) 790–802.
- [48] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511
- [49] J. Schreurs, E. Barendrecht, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 103 (1984) 205.
- [50] A.F. Diaz, K.K. Knazawa, G.P. Gardini, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 635 (1975).
- [51] A. El Mhammedi, A. Chtaini, A. El Bouadili, *Bull. Electrochem.*, 20 (12) (2004) 533-537.
- [52] M.A. El Mhammedi, M. Bakasse, A. Chtaini, *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, 10 (2007) 1-12
- [53] M.A. El Mhammedi, M. Bakasse, A. Chtaini, *J. Hazard. Mater.*, 145 (2007) 1–7.
- [54] J.L. Anderson, L.A. Coury, Jr. et J. Leddy, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 519-89.

- [55] R.F. Lane, A.T. Hubbard, *J. Phys. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents Chem.*, 77(1973) 1401-10.
- [56] H.O. Finklea, Introduction of functional groups onto carbon electrodes via treatment with radio-frequency plasmas. *Electroanal. Chem.*, 19(1996) 109-335.
- [57] A.J. Downard, Electrochemically Assisted Covalent Modification of Carbon Electrodes *Electroanalysis*, 12(2000) 1085-96.
- [58] R.W. Murray, Electrocatalytic determination of hydroquinone with M^{n+} modified gold-5-amino-2-mercaptobenzimidazole self-assembled monolayer electrodes *Electroanal. Chem.*, 13 (1984) 191-386.
- [59] M. Kaneko, D. Woehrle, *Adv. Polym. Sci.*, Charge transport in solid polymer matrixes with redox centers 84 (1998) 141-228.
- [60] Fethi BEDIQUI, Sophie GRIVEAU « Voltampérométrie sur électrode solide - Diverses géométries d'électrode - Voltampérométrie sur électrodes dites modifiées » *Technique de l'ingénieur*, réf P2129 (2009)
- [61] H. Pierson, *Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes*. 1994.
- [62] G. L. Miessler and D. A. Tarr, *Inorganic Chemistry (3rd Edition)*. Prentice Hall, 2003, p.720.
- [63] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, *Organic Chemistry*. OUP Oxford, 2001.
- [64] R.L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry.," *Chemical reviews*, vol. 108, no. 7, pp. 2646-87, Jul. 2008.
- [65] S. Stankovich et al., "Graphene-based composite materials.," *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 282-6, Jul. 2006.
- [66] "Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc," in *International Agency for research on Cancer*, 2010.
- [67] E. L. Crump, "Economic Impact Analysis For the Proposed Carbon Black Manufacturing NESHAP Prepared by:" U.S. Environmental Protection Agency, no. May, 2000.
- [68] D. Pantea, "Electrical conductivity of thermal carbon blacks Influence of surface chemistry," *Carbon*, vol. 39, no. 8, pp. 1147-1158, 2001.
- [69] J.-C. Huang, "Carbon black filled conducting polymers and polymer blends," *Advances in Polymer Technology*, vol. 21, no. 4, pp. 299-313, 2002.
- [70] J. Liang and Q. Yang, "Aggregate structure and percolation behavior in polymer/carbon black conductive composites," *Journal of Applied Physics*, vol. 102, no. 8, p. 083508, Oct. 2007.
- [70] G. Y. Yu, W. X. Chen, Y. F. Zheng, J. Zhao, X. Li, and Z. D. Xu, "Synthesis of Ru/carbon nanocomposites by polyol process for electrochemical supercapacitor electrodes," *Materials Letters*, vol. 60, no. 20, pp. 2453-2456, 2006.
- [72] M. R. Dausheva et O. A. Songina, *Russ. Electrode Behaviour of a Suspension of Insoluble Material* *Chem. Rev* 42, 136 (1973)
- [73] P. le Goff, F. Vergnes, F. Coeuret et J. Bordet, *APPLICATIONS OF FLUIDIZED BEDS IN ELECTROCHEMISTRY*. *Ind. Engng Chem*. 61. 8 (1969)

- [74] T. Kuwana . et W. G. French, Electrochemical studies of organic compounds dissolved in carbon-paste electrodes *Analyt. Chem.* 36, 241 (1964)
- [75] F. A. Schultz et T. Kuwana, Evaluation of a range of electrode materials for solid electrode voltammétrie *J. electroanal. Chem.* 10, 95 (1968)
- [76] W. R. Ruby et C. G. Tremmel, Insertion électrochimique de nickel et de manganèse dans les chalcogénures Mo_6S_8 et Mo_6Se_8 *J. electroanal. Chem* 18, 231 (1968)
- [77] J. M. Lecuire, Etude du comportement de la pâte de carbone à composé électroactif incorporé *Analysis* 2, 489 (1973)
- [78] S. Mesaric et E. A. M. F. Dahmen, Ion-selective carbon-paste electrodes for halides and silver(I) ions *Analyt. Chim. Acta* 64, 431 (1973)
- [79] H. Alt, H. Binder, A. Kohling et G. Sandstede, Étude, par chronoampérométrie, de l'électrode à pâte de carbone à liant électrolytique et solide électroactif incorporé *Electrochim. Acta* 17, 873 (1972)
- [80] P. Gaillochet et D. Bauer, C.r. hebdomadaire. Etude du comportement de la pâte de carbone à composé électroactif incorporé *Séanc. Acad. Sci., Paris* 277. 199 (1973)
- [81] S. Touzara, R. Najihand, A. Chtaini. Electrochemical Chelation of Lead by NDA Modified Carbon Paste Electrode. *J Biosens Bioelectron* 2015,6:3
- [82] El Qouatli, Najih, Hambate V, and Chtaini A; Electrochemical Studies and Square Wave Voltammetry of Paracetamol at Manganese Modified Carbon Paste Electrode ; *Pharmaceut Anal Acta* 2013, 4:2
- [83] H. Gomdje Valery, T R. Ngono , H. Saâdane , M. Ennachete, M. Khouili , A. Hafid , L. Benoît and A. Chtaini, *Pharmaceut.* "Evaluation of Carbon Paste Electrodes Modified with Organic Molecules for the analysis of Heavy Metals by Square Wave Voltammetry" *Anal Acta*, 4, 271 (2013)
- [84] A. Sadiki LAMARI, A. El FATTOUH, S. El QOUATLI, R. NAJIH, A. CHTAINI, *Acta Technica Corviniensis*, "electrochemical detection of ascorbic acid using a polymer modified carbon paste electrode" Tome VI, fascicule 2 (2013)
- [85] A. Hamel , K. Morakchi , K. Guerfi , A. Louhi and R. Kherrat. Characterisation of platinum electrode modified with phosphate rock for Cd^{2+} ions detection. *Revue des Energies Renouvelables* Vol. 12 N°1 (2009) 69 – 75
- [86] T. EL Ouafy, A. Chtaini, H. Oulfajrite, R. Najih, Electroanalytical method for determination of mercury (II) by natural phosphate modified carbon paste electrode: analytical application in juice apple ; *ICAIJ*, 10, 123-129 (2015)
- [87] A. Zaroual · S. El Qouatli · A. Bellouchou · H.G. Hambate · R. Najih · A. Chtaini. Electrochemical study of the capacity of *Moringa oleifera* to chelate paraquat and diquat ; *Research and Reviews In Electrochemistry*, 6(2), 2015 [042-048]
- [88] Y. Yi, Z. Yang, S. Zhang, *Environmental Pollution* 159 (2011) 2575-2585.
- [89] S-R. Lim, Julie M. Schoenung, *Journal of Hazardous Materials* 177 (2010) 251–259.
- [90] M. Stewart, N. R. Phillips, G. Olsen, C. W. Hickey, G. Tipa, *Science of the Total Environment* 409 (2011) 2029–2039.
- [91] J. Burger, Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Science of the total environment* 389 (2008) 37–45.
- [92] R. Pamphlett, S. Kum-Jew, Mercury vapor uptake into the nervous system of developing mice. *Neurotoxicology and Teratology* 23 (2001) 191-196.

- [93] C. Baird, Synthesis and Characterization of Organic Bio-Absorbents Coming from Sugarcane Bagasse Environmental Chemistry, W.H. Freeman and company, New York, (1995).
- [94] S.E. Manahan, Environmental Chemistry, 6^{ème} édition, Lewis Publishers, (1994).
- [95] J.S. Meyer, The utility of terms 'bioavailability' and 'bioavailable fraction' for metals, Marine Environ. Res, 53 (2002) 423.
- [96] N. Ghosh, Thyrotoxicity of the chlorides of cadmium and mercury in rabbit. Biomed Environ. Sci., 5(3) (1992) 236.
- [97] D. Purves, Fundamental Aspects of pollution Control and Environmental Science, 1, ed. Wakeman, Elsevier.
- [98] Evaluation mondiale de mercure, programme des nations unies pour l'environnement, substances chimiques
- [99] B.B Fredholm, et al., Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Biochemical Pharmacology, 2001. 61(4): p. 443-448.
- [100] V. Ralevic, and G. Burnstock, Receptors for Purines and Pyrimidines. Pharmacological Reviews, 1998. 50(3): p. 413-492.
- [101] V. Sollevi, V., Cardiovascular effects of adenosine in man; possible clinical implications. Progress in Neurobiology, 1986. 27(4): p. 319-349.
- [102] R. Yaar, et al., Animal models for the study of adenosine receptor function. Journal of Cellular Physiology, 2005. 202(1): p. 9-20.
- [103] S. Holgate, Airway inflammation and remodeling in asthma: Current concepts. Molecular Biotechnology, 2002. 22(2): p. 179-189.
- [104] A. Grenz, D. Homann, and Holger K. Eltzschig, Extracellular Adenosine: A Safety Signal That Dampens Hypoxia-Induced Inflammation During Ischemia, Antioxidants & redox signaling 2011, 15(8).
- [105] J.L. Palmer, R.H. Abeles, The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase, J Biol Chem. 1976, 25; 254(4):1217-26.51
- [106] G. Burnstock, et al., Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. Prog Neurobiol, 2011. 95(2): p. 229-74.
- [107] W.G. Junger, Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. Nat Rev Immunol, 2011. 11(3): p. 201-12.
- [108] L. Antonioli, et al., CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med, 2013. 19(6): p. 355-67.
- [109] J.A. Ribeiro, and A.M. Sebastiao, Caffeine and adenosine. J Alzheimers Dis, 2010. 20 Suppl1: p. S3-15.
- [110] G. Burnstock, B. Vaughn, and S.C. Robson, Purinergic signalling in the liver in health and disease. Purinergic Signal, 2013.
- [111] G. Burnstock, L.C. Evans, and M.A. Bailey, Purinergic signalling in the kidney in health and disease. Purinergic Signal, 2013.

- [112] T.Glaser, et al., Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissuereneration. *Purinergic Signal*, 2012. 8(3): p. 523-37.
- [113] J.Spychala, Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*, 2000. 87(2-3): p. 161-73.
- [114] G Burnstock. and I. Novak, Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal*, 2013. 9(3):p. 307-24.58. White, N. and G. Burnstock, P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(4): p.211-7.
- [115] G.Burnstock , B.B. Fredholm, and A. Verkhratsky, Adenosine and ATP receptors in the brain.*Curr Top Med Chem*, 2011. 11(8): p. 973-1011.
- [116] Di Virgilio, F., Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*, 2012. 72(21): p. 5441-7.
- [117] J. Allan, P Komar,. (2000). Are ocean wave heights increasing in the eastern North Pacific. *Eos, Transactions American Geophysical Union* 81.1029 (01). P: 0096-3941.
- [118] M. Bunning and R. A Bowen Experimental Infection of Horses with West Nile virus April 2002 8(4):380-6.
- [119] J.H. Rappole Z. Hubálek Migratory birds and West Nile virus 08 April 2003 10.1365-2672-94
- [120] G.Dauphin, S Zientara Infections par le virus du Nil occidental : synthèse et actualités épidémiologique 2005 395-408
- [121] A.José antibodies to west nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the yucatan peninsula of mexico 2006 74-908
- [122] R. M. Taylor, T. H. Work, H. S. Hurlbut, Farag Rizk A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt 1 Jul 1956 P: 4269 (10) . 56-579
- [123] C . Mansoury De l'identification des vecteurs du virus West Nile à l'identification du risque d'infection dans le sud de la France 2004 76-809
- [124] L.Caveney, B Jones, *Veterinary Infection Prevention and Control* 2006 15-51
- [125] M.Walter. B Winston Vickers, A Scott. T Morrison . S Sillett, L Caldwell, Surveillance for West Nile Virus and Vaccination of Free-Ranging Island Scrub-Jays (*Aphelocoma insularis*) on Santa Cruz Island, California 2011 11(8): 1063–1068
- [126] L.Claire , M.Gordon effect of diet and gut dynamics on the establishment and persistence of escherichia coli 2011 10-1099
- [127] M.Croxen , B. Brett Finlay Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity 2010 26–38
- [128] E. Effler, , M. Isaacson, L. Arntzen, R. Heenan, P. Canter, T. Barrett, L. Lee, C. Mambo, W. Levine, A. Zaidi, and P. M. Griffin. 2001. Factors contributing to the emergence of Escherichia coli O157 in Africa. *Emerg Infect Dis* 7:812-9.
- [129] J. A Crump, A. C. Sulka, A. J. Langer, C. Schaben, A. S. Crielly, R. Gage, M.Baysinger, M. Moll, G. Withers, D. M. Toney, S. B. Hunter, R. M. Hoekstra, S. K. Wong, P. M. Griffin, and T.J. Van

Gilder. 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* 347:555-60.

[130] D. L. Swerdlow, B. A. Woodruff, R. C. Brady, P. M. Griffin, S. Tippen, H. D. Donnell, Jr., E. Geldreich, B. J. Payne, A. Meyer, Jr., J. G. Wells, and et al. 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* 117:812-9.

[131] J. Grant, A. M. Wendelboe, A. Wendel, B. Jepson, P. Torres, C. Smelser, and R. T. Rolfs. 2008. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis* 14:1633-6.

[132] J. K. Varma, K. D. Greene, M. E. Reller, S. M. DeLong, J. Trottier, S. F. Nowicki, M. DiOrio, E. M. Koch, T. L. Bannerman, S. T. York, M. A. Lambert-Fair, J. G. Wells, and P. S. Mead. 2003. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* 290:2709-12.

[133] B. Marion, Mise au point de méthodes de détection des souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC) le 27 juillet 2011

[134] R. Bud, (2007) *Penicillin: Triumph and tragedy*. Norfolk, Angleterre, Oxford University Press. 340 p

[135] E. Chain, Florey, H.W., Gardner, A.D. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, 236: 226-228.

[136] A.L. Demain, Elander, R.P., (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75: 5-19.

[137] A.M. Geddes, Klugman K.P., Rolinson, G.N. (2007) Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30: Supp 2. 109-112.

[138] F.R. Batchelor, Doyle, F.P., Nayler, J.H., Rolinson, G.N. (1959). Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* 183: 257

[139] G.N. Rolinson. (1998) Forty years of beta-lactam research. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 41: 589-603.

[140] H. Oka, Nakazawa, H., Harada, K.-I., MacNeil, J.D. (1995). Chemical Analysis of Antibiotics Used in Agriculture. *AOAC International*, 452p.

[141] D.L. Nelson, Cox, M.M. (2005). Amino acids, peptides, and proteins *Lehninger Principles of biochemistry* 4th edition. Ch.3: pp. 75-115. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Company.

[142] L. Shargel, Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2004) *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* 5th edition. États-Unis, McGraw-Hill Medical.

- [143] L.Y Galichet , Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, D. (2004) Clarke's analysis of drugs and poisons 3rd edition, Pharmaceutical Press, Londres, Angleterre, 2101 p.
- [144] E. L. Miller, (2002). The penicillins: a review and update. *Midwifery and Women's Health*. 47: 426-434.
- [145] Jr.Petri. (2004) Antimicrobial agents: Penicillins, Cephalosporins and other β -lactam Antibiotics. Ch.47: pp. 1189-1218. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. Hardmand, J.G., Limbird, L.E., H., Goodman Gilman, A. (Eds). McGraw-Hill Professionnal.
- [146] D.L.Nelson, Cox, M.M. (2008).Enzymes Lehninger Principles of biochemistry 5th edition. Ch.4:pp. 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.
- [147] L.M.Prescott, Harley, J.P., Klein, Klein, D. (2003).Microbiologie. Paris, France, Édition de Boek.
- [148] D.L.Nelson ,M.M Cox,. (2008) .Enzymes Lehninger Principles of biochemistry 5 th edition. Ch.4:pp. 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.
- [149] L.M Prescott, J.P Harley, D.Klein,. (2003).Microbiologie. Paris, France, Édition de Boek.
- [150] M, Deville (2016) Conception, évaluation et modélisation de biocapteurs pour la détection électrochimique du facteur de motilité autocrine : biomarqueur potentiel de cancers métastatiques 18-2016
- [151] A Chtaini · T El ouafy · H Oulfajrite · R Najih Cyclic voltammetric determination of 4-chloroaniline using natural phosphate modified carbon paste electrode *Analytical Chemistry* 2015; 15(5).
- [152] Z Mazouz, N Fourati, R Lucas, A Othmane, R Kalfat , (2012) Biocapteurs d'ADN à ondes acoustiques de surface 10.3199
- [153] C Soullignac – (2018) Modification de l'Isatine pour la fabrication de biocapteurs
- [154] Y. Zhu, X.C. Hu, S. Shi, R.R. Gao, H.L. Huang, Y.Y. Zhu, X.Y. Lv, T.M. Yao, Ultrasensitive and universal fluorescent aptasensor for the detection of biomolecules (ATP, adenosine and thrombin) based on DNA/Ag nanoclusters fluorescence light-up system, *Biosens. Bioelectron*, 79 (2016) 205.
- [155] Y,Xiluan, C Zhijuan, K Masaaki, L Jianzhong, Label-free aptamer-based chemiluminescence detection of adenosine, *Talanta* 79 (2009) 383.

Chapitre II

Techniques expérimentales

Dans le présent chapitre nous décrivons les fondements théoriques et pratiques sur lesquels s'appuient les techniques expérimentales utilisées pour la réalisation de ce travail.

I. La voltamétrie

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

I.1. Composants et principes des techniques voltamétrique

Les unités de base d'un analyseur voltamétrique sont illustrées par la Figure II-1. Elles sont composées par :

- Une cellule électrochimique de mesure comportant trois électrodes immergées dans la solution à analyser. Les trois électrodes sont:
 - i) une électrode de travail (parfois appelée électrode indicatrice), constituée par l'électrode modifiée utilisée ;
 - ii) une électrode de référence (calomel saturée) reliée à un capillaire de Luggin ;
 - iii) une contre électrode constituée par une plaque de platine.
- Un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant.

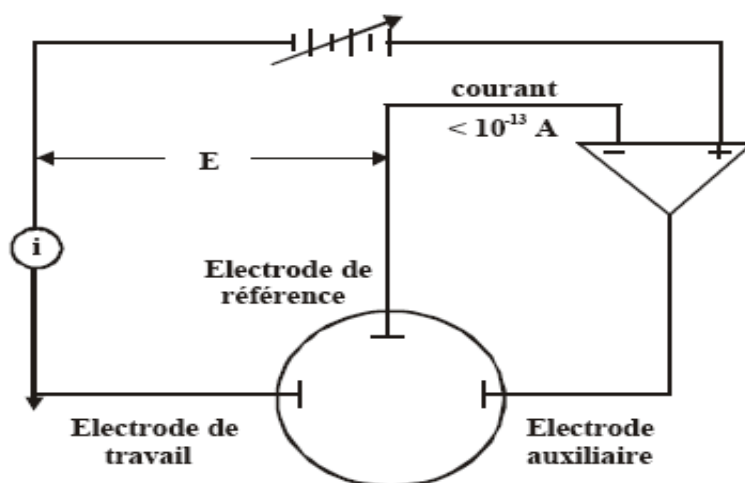


Figure II-1 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat.

I.2. Analyses voltamétriques

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

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

En voltamétrie, le potentiel E appliqué à l'électrode de travail varie en fonction du temps selon la relation [1]:

$$E = E_i \pm vt$$

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

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

Les techniques voltamétriques utilisées dans ce travail sont :

- La voltamétrie cyclique,
- La voltamétrie à onde carré.

I.2.1. La voltamétrie cyclique

Le principe de la voltamétrie cyclique est comparable à la voltamétrie linéaire, mais le balayage des potentiels s'effectue de façon cyclique. Par exemple, après avoir balayé vers les valeurs de potentiel anodiques et réalisé une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel effectué pour une exploration vers les potentiels cathodiques. On enregistre donc sur le voltamogramme les courbes de polarisations anodiques et cathodiques du système. Cette méthode consiste à analyser le comportement électrochimique d'un système en appliquant à

une électrode un balayage de potentiel variant avec le temps et enregistré $I(E)$, ceci revient à construire une surface tridimensionnelle $[I, E, t(E(t))]$ Figure II-2.

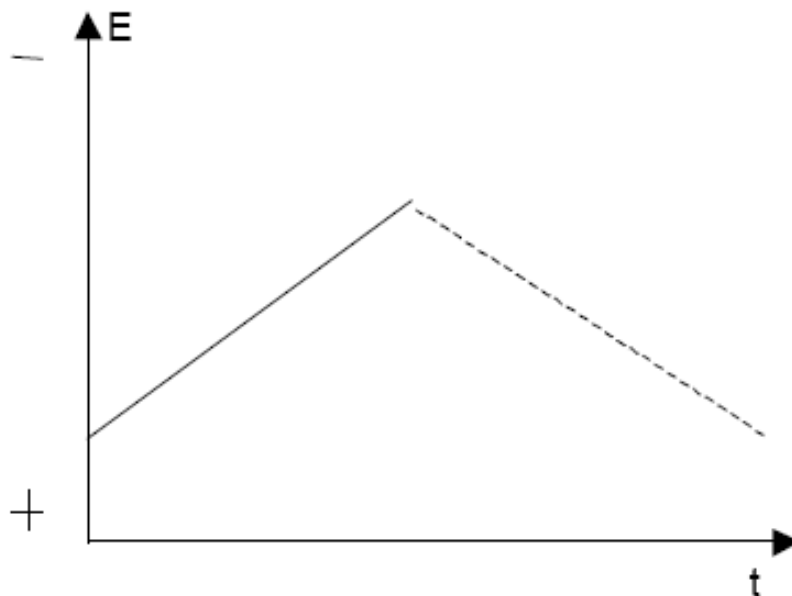


Figure II-2 : Fonction imposée.

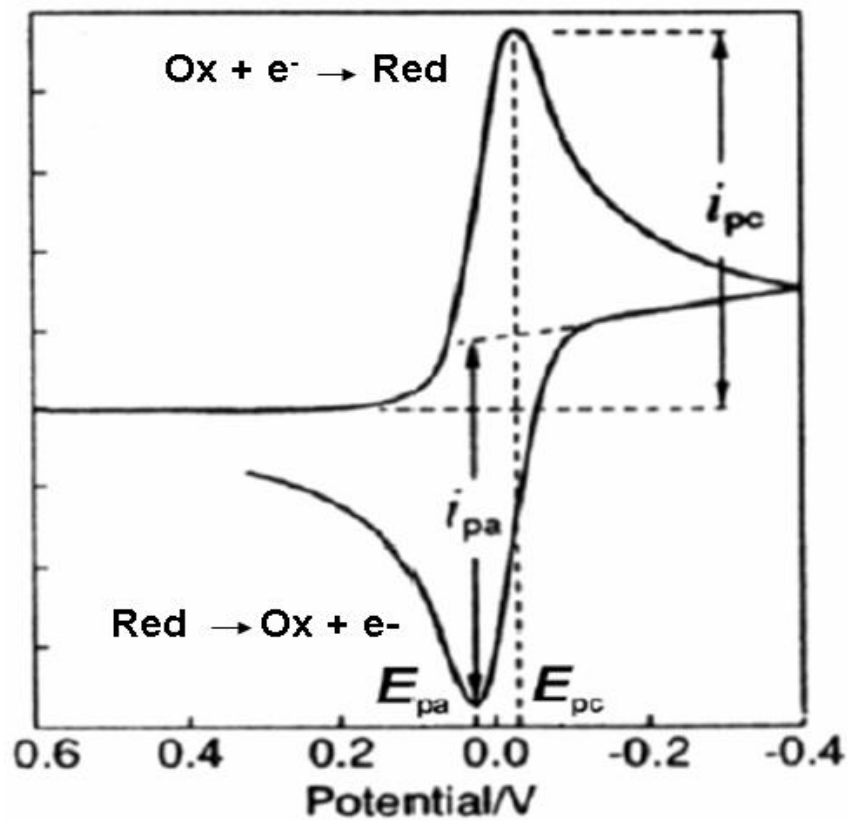


Figure II-3 : Voltammogramme cyclique enregistré pour une espèce Red seule en solution.

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

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

Au milieu des années 1960, divers développements nouveaux ont amélioré significativement la sensibilité et la sélectivité des méthodes voltamétriques, c'est à cette époque que sont apparus les amplificateurs opérationnels, dispositifs peu coûteux, qui ont permis l'essor commercial d'une nouvelle génération d'appareils très performants qui ont attiré l'attention de plusieurs auteurs [2-6].

La voltamétrie cyclique, s'est surtout développée en tant que moyen d'étude des mécanismes des réactions d'oxydo-réduction. Ses applications en analyse quantitative étant limitées, en raison de la faible sensibilité de la méthode.

La principale fonction d'un potentiostat est de contrôler le potentiel et de mesurer le courant. Le potentiostat à trois électrodes est relié aux électrodes de travail, de référence, et contre électrode, ces électrodes sont immergées dans la solution à étudier.

La voltamétrie cyclique est la méthode de choix pour l'étude de la réversibilité d'un transfert électronique puisque l'on trace, sur le même voltamogramme, les courbes d'oxydation et de réduction.

En électrochimie, on utilise souvent l'équation de Nernst (1):

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (1)$$

Avec E° : le potentiel standard du couple Ox/Red,

R : la constante des gaz parfaits,

T : la température en Kelvin

n : le nombre d'électrons mis en jeu

F : la constante de Faraday.

Cette loi relie le potentiel E de l'électrode à la concentration des espèces qui participent à la réaction électrochimique :



Si le potentiel de l'électrode peut être calculé à l'aide de la relation de Nernst ou d'une équation qui en dérive, la réaction d'électrode est appelée réversible. On dit aussi que l'électrode a un comportement nernstien.

Les deux caractéristiques d'un voltamogramme sont le courant de pic (i_p) et le potentiel de pic (E_p). Le courant de pic est donné par l'équation de Randles Sevcik- [7]:

$$I_p = KA n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} C \quad (3)$$

avec K : coefficient numérique,

A : surface de l'électrode (cm^2),

D : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

v : vitesse de balayage ($\text{v} \cdot \text{s}^{-1}$),

C : concentration de l'espèce étudiée ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Le courant i_p étant proportionnel à la concentration de C de l'espèce analysée, remarquons que la grandeur $i_p/Cv^{1/2}$ est constante. Ce critère est souvent utilisé (à C variable) pour vérifier qu'il n'y a pas de réaction chimique couplée à la réaction électrochimique.

Pour ce système, l'écart entre les potentiels de pics d'oxydation E_{pa} et de réduction E_{pc} est indépendant de la vitesse de balayage :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0,06/n \quad (4)$$

avec n nombre d'électrons mis en jeu.

Le potentiel standard pour un système réversible est donné par :

$$E^\circ = (E_{p,a} + E_{p,c})/2 \quad (5)$$

Dans le cas d'un système irréversible, la loi de Nernst ne s'applique plus à l'électrode et ΔE_p est plus grand et varie avec la vitesse de balayage.

I.2.2. La voltammétrie à onde carrée (SWV : square wave voltammetry)

La voltamétrie à onde carrée est basée sur la combinaison d'une modulation d'onde carrée d'amplitude $\Delta E = 50$ mV et de période $1/f$ (typiquement la fréquence $f = 50$ à 200 Hz) avec une rampe en escalier (Figure II-4). Le signal mesuré est la différence ΔI entre les courants mesurés, à la fin de chaque pulse montant et descendant de l'onde carrée, (Figure II-5). Le pas de potentiel ΔE_p , la durée et l'amplitude sont des paramètres susceptibles d'influencer la largeur et la hauteur de pic, c'est-à-dire, le pouvoir de résolution et la sensibilité de la méthode. Le principal avantage de la SWV, est qu'elle permet de varier le potentiel à des vitesses beaucoup plus élevées, typiquement $v = 400$ à 1600 mV s⁻¹, et ainsi permettent d'augmenter le rapport i_f/i_c et par la suite la sensibilité, en prenant avantage des réponses temporelles différentes du i_f et i_c . En effet, après un changement instantané de potentiel, la décroissance du courant capacitif a lieu plus rapidement que la décroissance du courant faradique. En voltamétrie à onde carrée, deux courants sont mesurés : celui mesuré à la fin de pulse haut et celui mesuré à la fin du pulse bas. Ces deux courants sont ensuite automatiquement soustraits pour donner le courant (visualisé). Le signal est sous forme de pics et la variation de potentiel peut être rapide. Cette méthode autorise des vitesses de balayage de plus de 1 V s⁻¹.

II. Mesure d'impédance électrochimique

L'application des mesures d'impédance électrique aux systèmes électrochimiques a introduit une méthodologie d'analyse différente pour étudier le comportement d'un système électrochimique à une électrode indicatrice donnée, faisant appel à une excitation de type alternatif (sinusoïdale) et de faible amplitude [$E(t) = E_0 + \Delta E(t) = E_0 + \Delta E_0 \sin(\omega t)$], cette différence de potentiel étant imposée entre l'électrode de travail et une électrode de référence (potentiel supposé fixe), la contrainte revient à surimposer une variation sinusoïdale $\Delta E(t)$ du potentiel de l'électrode de travail à une valeur fixe E^0 (généralement E^0 est choisie de façon à avoir un courant nul dans la cellule électrochimique, (le potentiel d'abandon)).

L'obtention des caractéristiques des systèmes étant basée sur l'analyse de la réponse (courant alternatif de faible amplitude) [$I = I^0 + \Delta I(t) = I^0 + \Delta I^0 \sin(\omega t + \varphi)$], non plus en fonction du

potentiel d'électrode, mais en fonction de la fréquence du signal alternatif d'excitation ce qui a conduit à désigner la méthode par le terme de spectroscopie d'impédance.

La réponse du système est un courant d'intensité $I(t)$, composante continue I^0 (le courant correspondant au potentiel E^0 , courant évidemment nul dans le cas où E^0 est le potentiel d'abandon) et une composante alternative $\Delta I(t)$. Si I^0 n'est pas nul, on opère dans les conditions où ce courant est stationnaire ($I^0 = \text{constante}$).

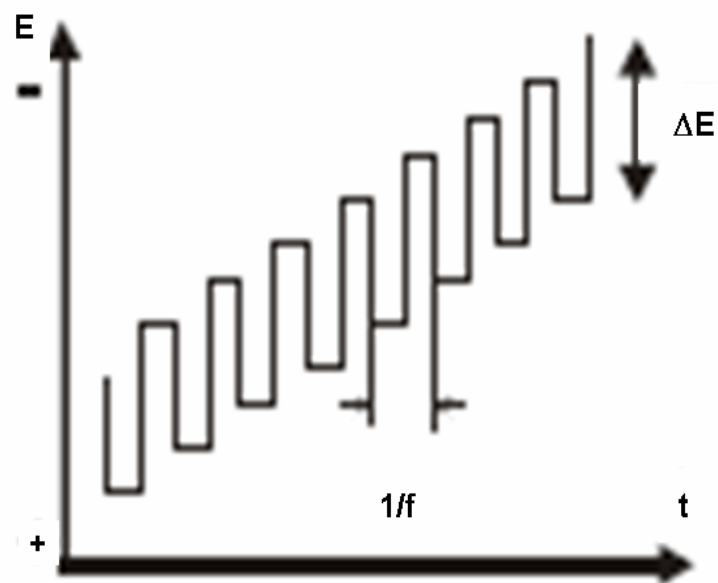


Figure II-4 : Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps.

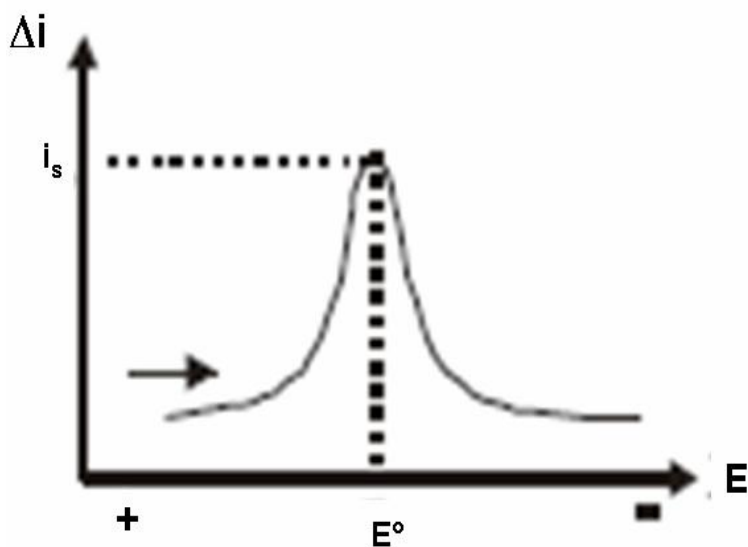


Figure II-5 : Voltamogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.

L'impédance électrochimique autorise souvent l'accès aux mécanismes mis en jeu. En effet, par un balayage en fréquences du signal sinusoïdal perturbateur, les mécanismes sont découplés et apparaissent séparément en fonction de leur constante de temps.

Lors de l'étude des systèmes électrochimiques par impédance, les diagrammes sont souvent plus complexes. Ils font apparaître de la sortie, d'une manière générale, deux types de boucles de variations d'impédance (Figure II-6) :

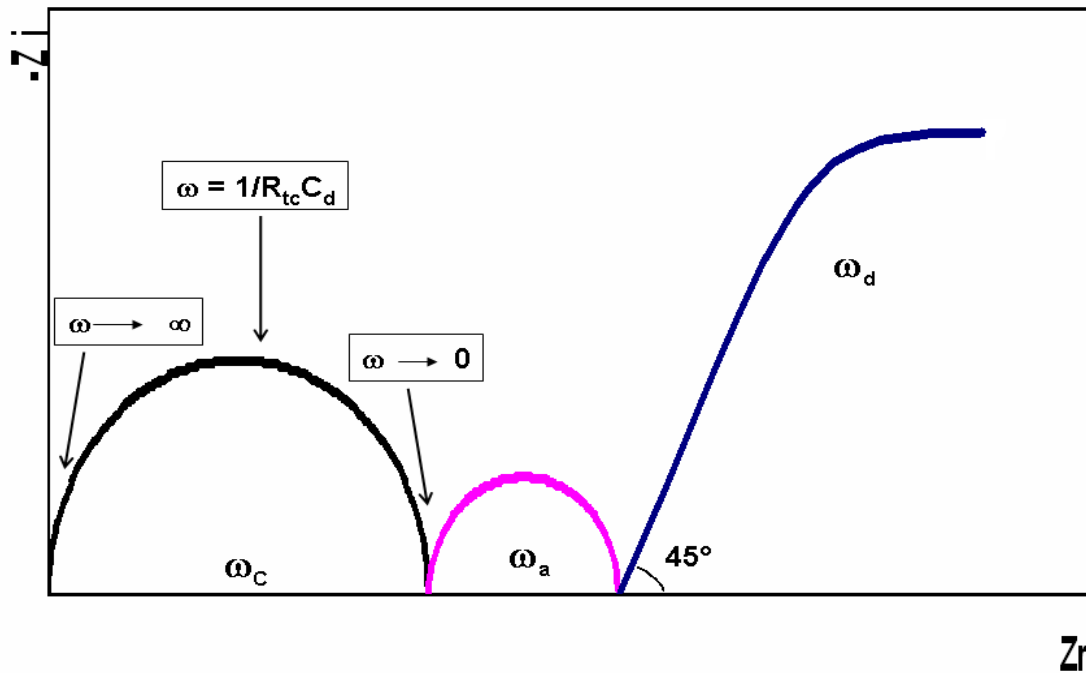


Figure II.6. : Représentation de la variation de l'impédance d'un système électrochimique en fonction de la pulsation ω . Cas idéal où les pulsations ω_c , ω_a , ω_d sont suffisamment différentes les unes des autres.

Une boucle (circulaire) à haute fréquence, correspondant au couplage capacité interfaciale-résistance de transfert de charge (au potentiel E° imposé), caractérisée par la fréquence f_c (fréquence du sommet de la boucle) : cette boucle est désignée par le terme de « boucle capacitive » ; elle permet (en principe) d'atteindre les valeurs de la résistance de transfert de charge (R_{tc}) (détermination du rayon de l'arc de cercle), de la capacité de la double couche (C_d) (à partir des valeurs de f_c et de R_{tc}) et de la résistance de cellule R_c (par extrapolation de l'arc de cercle jusqu'à l'axe des réels, à fréquence infinie),

Des boucles à basse fréquence, attribuées aux phénomènes de surface, adsorption d'intermédiaires réactionnels ou processus de diffusion de surface. Cette dernière correspondant à l'intervention prédominante du processus faradique (transfert de charge à

l'interface d'électrode et processus diffusionnels), le passage de courant alternatif par le processus capacitif interfacial se trouvant alors bloqué. Cette boucle que l'on désigne par le terme de « boucle de diffusion », peut être caractérisée par la fréquence de diffusion. Son amplitude mesurée sur l'axe des réels est fonction à la fois de R_{tc} et des caractéristiques du processus diffusionnel mis en jeu, notamment de l'épaisseur de la couche de diffusion.

III. Chronoampérométrie

La Chronoampérométrie consiste à mesurer la variation de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à trois électrodes en imposant un potentiel qui permet le transfert électrochimique d'une espèce donnée.

La Figure 7 montre une courbe chronoampérométrique typique caractérisée par la diminution de courant avec le temps. On définit le temps t_s , comme l'intersection de la tangente de cette courbe et l'axe du temps.

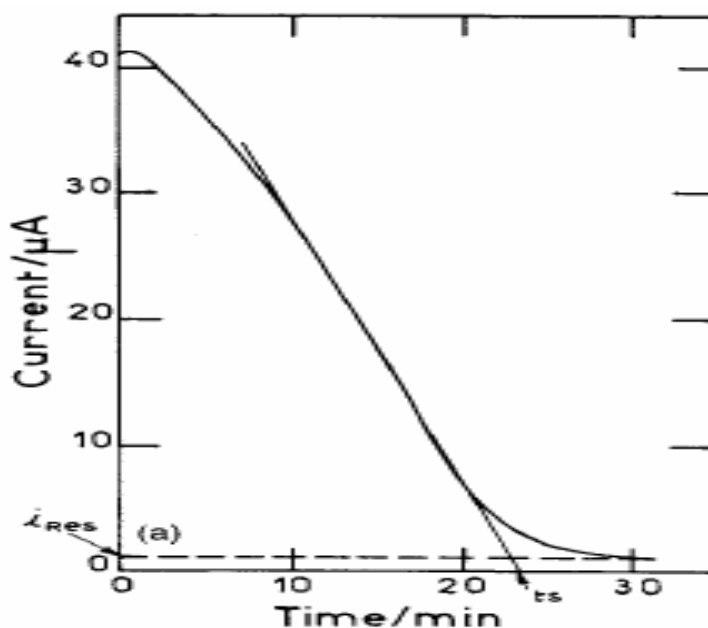


Figure II-7: Chronoampérogramme typique ; le courant résiduel [8].

Les analyses ampérométriques se réfèrent à une droite d'étalonnage, en vérifiant expérimentalement le coefficient de proportionnalité entre le courant limite de diffusion et la concentration de l'analyte électroactive :

$$i = K C (D/t)^{1/2} \quad (6)$$

Avec K : coefficient numérique,

D : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

C : concentration de l'espèce étudiée ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$).

La sensibilité de l'analyse est influencée par la présence des impuretés électro-actives dans l'électrolyte, ceci donne un courant appelé résiduel, ce dernier dépend également de la nature de l'électrode et des traitements chimiques et électrochimiques qui lui ont été imposés [9,10]. La mise sous tension d'électrode de travail crée un courant capacitif qui s'annule rapidement.

IV. Chronopotentiométrie

Les techniques électroanalytiques font intervenir essentiellement trois grandeurs (ou une fonction qui en dérive, par exemple l'impédance électrochimique) qui sont le courant i , le potentiel E et le temps t . Etymologiquement, la chronopotentiométrie est une mesure du potentiel E en fonction du temps t . En pratique, on impose à l'aide d'un ampérostatis (générateur à courant contrôlé) l'intensité de courant qui circule entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire, et on mesure la différence de potentiel existant entre l'électrode indicatrice et une électrode de référence. L'électrochimie à courant imposé peut revêtir diverses formes selon le signal d'excitation imposé i , constant ou variable avec le temps. Généralement on se limite au signal non nul (ce qui implique au moins une réaction électrochimique) et constant (figure 8).

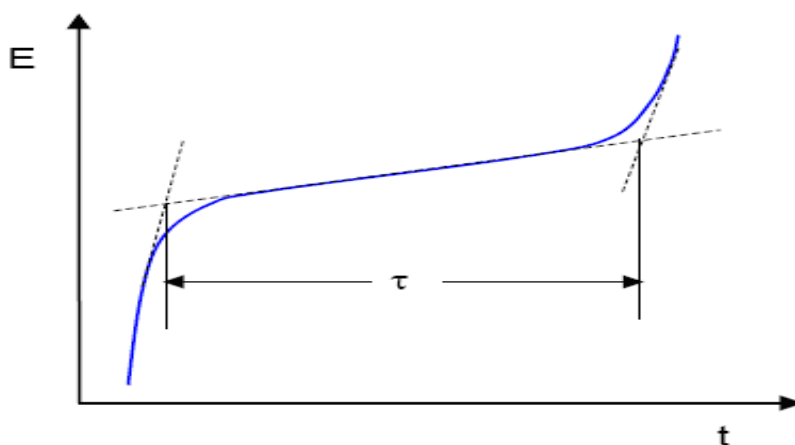


Figure II.8.: Chronopotentiogramme typique d'un système électrochimique réversible.

Dans le cas considéré, c'est-à-dire dans celui de l'existence d'une réaction électrochimique en régime de diffusion pure, la modification transitoire des espèces électroactives qui en résultent entraîne une variation temporelle de la réponse à toute excitation électrique appliquée à l'électrode indicatrice. Le potentiel de l'électrode change alors rapidement de telle sorte que la réaction électrochimique d'une seconde espèce électroactive puisse produire. Le temps qui s'écoule entre l'instant où l'on impose le courant i et celui où le potentiel varie brusquement est noté τ , on l'appelle temps de transition. Le temps τ est relié à la concentration et au coefficient de diffusion de l'espèce électroactive considérée par l'équation de Sand [11] :

$$i \tau^{1/2} = 85500 n D^{1/2} A C \quad (7)$$

avec D : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

A : surface de l'électrode (cm^2),

C : concentration de l'espèce étudiée ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$).

La forme de la courbe $E=f(t)$ dépend de la réversibilité de la réaction électrochimique.

V. Spectrométrie infrarouge

La spectroscopie infrarouge constitue une méthode puissante d'étude des apatites. Elle fournit souvent des données structurales qui ne peuvent pas être atteintes par d'autres techniques.

Le rayonnement électromagnétique interagit avec la matière en donnant des effets différents selon l'énergie ou la fréquence qui lui est caractéristique. Les radiations infrarouges ont des nombres d'ondes comprises entre 15400 cm^{-1} et 10 cm^{-1} . Les absorptions dans le domaine de l'infrarouge sont utilisées pour l'analyse d'échantillons divers.

Le domaine infrarouge peut être divisé en trois régions :

- l'infrarouge lointain de 10 à 400 cm^{-1}
- l'infrarouge moyen de 400 à 5000 cm^{-1}
- le proche infrarouge de 5000 à 12500 cm^{-1}

L'infrarouge moyen est le plus utilisé car la plupart des fréquences caractéristiques des groupements fonctionnels y sont situées. L'énergie de vibration des liaisons interatomiques correspond à l'énergie de rayonnements infrarouge.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé un appareil infrarouge à transformée de Fourier (4000-400 cm^{-1}).

Des pastilles sont préparées par ajout du bromure de potassium à la poudre du produit (environ 2mg de poudre pour 300mg de KBr) et le mélange est homogénéisé par broyage puis comprimé.

VI. Diffraction des rayons X

Les phases que nous avons obtenues sont identifiées par leurs diffractogrammes de poudre de diffraction des rayons X. Les enregistrements sont effectués à température ambiante, sur un diffractomètre Philips PW 1710, utilisant la radiation K_{α} du cuivre ($\lambda_{\text{Cu}} = 1,5418 \text{ \AA}$).

Les enregistrements des diffractogrammes de poudre sont effectués de manière systématique, pour chaque produit synthétisé, sur l'intervalle de valeurs d'angle 2θ variant de 10 à 70 degrés, par pas de 0,02 degré, avec un temps de comptage de 1 seconde par pas.

L'identification des raies obtenues se fait par comparaison avec celles des fichiers de référence établis par Joint Committee for Powder Diffraction File (J.C.P.D.F).

En diffraction, seule la diffusion cohérente est exploitée. Un échantillon cristallin réfléchit les rayons X mais seulement pour les angles qui vérifient la relation de Bragg :

$$2d \cdot \sin\theta = k\lambda \quad (8)$$

Connaissant la longueur d'onde du rayonnement X incident, la mesure de l'angle de réflexion permet de déterminer les distances interréticulaires caractéristiques du ou des composés cristallins.

VII. Microscopie électronique à balayage

Les poudres ont été examinées par microscopie électronique à balayage. Les poudres dispersées et collées sur le porte échantillon sont métallisées sous vide afin de les rendre conductrices.

L'examen des micrographies renseigne sur la forme des cristallites, la distribution des formes et des tailles, l'état d'agglomération, et sur la porosité.

VIII. Surfaces spécifiques d'échanges (méthode BET)

La méthode de la mesure de surfaces spécifiques présente l'avantage de fournir deux paramètres concernant la connaissance de la structure du solide : l'étendue de l'interface solide gaz et une estimation de l'énergie d'adsorption. Nous pouvons obtenir également une estimation de la microporosité et de la mésoporosité. La surface spécifique se détermine à partir de la mesure de la pression relative qui permet de calculer le nombre de molécules de gaz adsorbées. L'étude du graphique permet de déterminer le nombre de molécules de gaz adsorbées lorsque celles-ci forment une couche mono moléculaire, en connaissant l'aire d'encombrement d'une molécule de ce gaz, il est possible de déterminer la surface spécifique de la poudre du solide. Une calibration est toutefois nécessaire pour mesurer le volume de gaz adsorbé, car la surface spécifique dépend de la masse du solide considéré.

La surface totale de l'échantillon est donnée par l'équation :

$$S_t = 3,98 [1-P/P_0] [A_{des}/A_{cal}] V_{cal} \quad (9)$$

$P/P_0 = 0,3$ pression partielle d'azote

A_{des} : aire du pic de désorption

A_{cal} : aire du pic de calibration

V_{cal} : volume de la cellule de calibration

La surface spécifique est donnée par la formule :

$$S = S_t/M \quad (10)$$

M : masse de l'échantillon

Pour quelques échantillons obtenus par de nouvelles synthèses, nous avons fait une mesure BET sur un appareil Micromeritics ASAP 2010 (Micromeritics, France).

Références

- [1] H.H. Girault, Electrochimie : physique et analytique, Presses polytechnique et universitaires romandes, 2001.
- [2] W. Kemula, Z. Kublik, Observation of Transient Intermediates in Redox Processes by Variable Voltage Oscillo-polarography and Cyclic Voltammetry. *Nature*, 182 (1958) 793.
- [3] R.S. Nicholson, Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Anal. Chem.* 37 (1965) 667.
- [4] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochimie, Principes, Méthodes et applications, Masson, Paris, 1983.
- [5] R.N. Adams, Electrochemistry at solid electrodes, M. Dekker, New York, 1969.
- [6] R.S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 706.
- [7] P. Skladal, *Electroanalysis*, 9 (1997) 745.
- [8] C. Gabrielli, M. Keddad, H. Perrot, A. Khalil, R. Rosset, M. Zidoune, *J. Appl. Electrochem.*, 26 (1996) 1125-1132.
- [9] B.D. Epstein, E. Dalle-Molle, J.S. Mattson, *Carbon*, 9 (1971) 609.
- [10] V.L. Snoeyink, W.J. Weber, *Progr. Surface Membrane Sci.*, 5 (1972) 63.
- [11] H.J.S. Sand, *Phil. Mag.*, 1 (1901) 45.

Chapitre III

Electrodes à pâte de carbone modifiée par l'ADN pour la détection et l'élimination du mercure (II) et du plomb(II)

Introduction

Les métaux lourds sont naturellement présents mais en quantités très faibles dans les sols, l'eau et l'air et ne sont pas biodégradables. Ils s'introduisent dans l'environnement de diverses façons: extraction minière, utilisation de combustibles fossiles, comme le charbon, combustion de déchets, feux de forêt, fumée de cigarette. Certains métaux sont indispensables aux organismes vivants, d'autres, par contre, ne sont pas essentiels. La toxicité de certains de ces métaux non essentiels, dont, le plomb (Pb), et le mercure (Hg), est reconnue, même à de très faibles concentrations. Cette toxicité est renforcée par un phénomène de concentration dans l'organisme qu'on appelle bioaccumulation. Donc La détermination des métaux lourds est d'importance primordiale dans le contrôle environnemental en raison de leur effet négatif sur la santé des personnes [1].

Plusieurs techniques analytiques sont disponibles actuellement pour le contrôle des éléments métalliques à l'état de traces. Les spectrométries d'absorption atomique (SAA), d'émission atomique (SEA) et d'émission plasma (ICP) sont en particulier deux méthodes très utilisées dans ce domaine. La spectroscopie d'adsorption atomique qui a permis d'atteindre des seuils de détection très bas, [2,3]. Plusieurs travaux de spéciation ou de détermination des métaux lourds ont été réalisés, en utilisant la spectrométrie d'adsorption atomique en phase vapeur à froid (CVAAS) [4,5]. Les méthodes électrochimiques se sont révélées très efficaces dans la détection du mercure, avec de nombreux avantages, tels que la simplicité de mise en œuvre et le faible coût.

Le biocapteur à base d'ADN est un système qui incorpore l'ADN, immobilisé en tant qu'élément de reconnaissance moléculaire, à la surface d'un substrat, et mesure des processus de liaisons spécifiques entre la molécule active et l'ADN, principalement en utilisant des transducteurs électrochimiques, optiques et piézoélectriques. Le fait que les séquences d'ADN soient uniques à chaque organisme, signifie que tout organisme biologique auto-répliquable peut être distingué. Le biocapteur à base d'ADN est également un outil complémentaire pour l'étude des mécanismes d'interaction biomoléculaire des composés avec l'ADN, permettant le criblage et l'évaluation de l'effet causé à l'ADN par les composés dangereux pour la santé et les substances oxydantes. Il existe des centaines de composés qui se lient et interagissent avec l'ADN, comme les molécules organiques toxiques ou les métaux lourds. L'exposition de l'homme à des produits chimiques toxiques est la cause de nombreux cancers humains; Ces substances cancérogènes agissent en endommageant chimiquement l'ADN. Il est donc très

important d'expliquer les facteurs qui déterminent l'affinité et la sélectivité dans les molécules de liaison à l'ADN, d'identifier ces produits chimiques et de planifier à minimiser l'impact de l'exposition humaine à ces produits.

Les techniques électrochimiques sont les plus qualifiées pour étudier les phénomènes de la reconnaissance moléculaire de plusieurs molécules actives par l'ADN, en raison des avantages suivants : un temps de réponse rapide, quantitatif, sensible, approprié pour l'automatisation, rentable, permettant la génération, in situ, d'intermédiaires réactifs, détection des dommages à l'ADN, la résolution de problèmes analytiques dans une large gamme des contextes afin d'être commercialement viables.

Dans cette étude, nous avons préparé une électrode en pâte de carbone sur laquelle nous avons déposé par auto-assemblage un film d'ADN. Cette électrode préparée a été utilisée, conjointement avec des méthodes électrochimiques, en tant que CV et SWV, pour l'élimination et la détection chimique de différents métaux lourds à l'état de traces (le mercure (II) et plomb). L'ADN-CPE exploite successivement les propriétés mécaniques et électrochimiques favorables de l'électrode en pâte de carbone et la grande flexibilité de la structure de l'ADN pour chélater le mercure et le plomb. L'électrode à pâte de carbone modifiée par l'ADN (ADN-CPE) peut préconcentrer les métaux lourds de la solution aqueuse à la surface du CPE modifiée en formant des complexes avec ces ions et en augmentant considérablement la sensibilité de sa détermination. Les données expérimentales montrent que les électrodes préparées, de type ADN-CPE ont une sensibilité élevée, une sélectivité et une reproductibilité adéquates et permettent de couvrir une large plage de concentrations, linéaires opératoires pour la détermination de métaux lourds dans des échantillons, tel que l'eau. Les électrodes ADN-CPE sont facilement préparées et ne sont pas très solubles dans l'eau.

Pour compléter le travail nous avons évalué les performances de la méthodologie analytique, par la détermination simultanée de plusieurs ions métalliques et les électrodes préparées, ont été testées dans des échantillons, tels que, l'eau de robinet.

I. Partie Expérimentale

I.1. Réactifs et produits chimiques

Tous les produits chimiques utilisés dans ce travail sont de haute qualité. Le graphite de carbone a été acheté chez Aldrich et utilisé dans son état sans modification. HgCl_2 a été obtenu à partir de produits chimiques Merck. De l'eau désionisée a été utilisée pour préparer toute la solution. L'ADN utilisé dans ce travail provient du sang de caille, selon le protocole ci-dessous:

- 5 μl de sang prélevé dans la veine axillaire sont versés dans un Eppendorf contenant 500 μl de Dnazol.
- La solution est agitée pendant 5 min au vortex et centrifugée à 6000 tr / min
- Le surnageant est éliminé puis 400 μl d'isopropanol sont ajoutés au résidu restant dans l'Eppendorf.
- Le mélange a été agité par tourbillonnement et centrifugé à 6000 tpm / min pendant 5 min.
- Le surnageant a été retiré et 500 μl d'eau pure ont été ajoutés pour suspendre l'ADN.

I.2. Appareil

Les mesures électrochimiques ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat voltalab (modèle PGSTAT 100, Eco Chemie B. V., Utrecht, Pays-Bas) piloté par le logiciel de traitement des données électrochimiques de service général (voltalab master 4).

Toutes les expériences électrochimiques ont été réalisées dans une cellule à trois électrodes standard à un seul compartiment. L'électrode au calomel saturé (SCE) a été utilisée comme référence, la contre-électrode est une plaque de platine de dimensions 0,5 cm x 0,5 cm x 0,1 mm. Tous les potentiels d'électrodes ont été référés à l'électrode de référence. L'électrode de travail, où se dérouleront toutes les réactions étudiées, est l'électrode élaborée, en l'occurrence ADN-CPE.

I. 3. Préparation des électrodes

La pâte de carbone a été préparée en mélangeant la poudre de carbone graphite à l'huile de paraffine utilisée comme liant. Par la suite, la pâte est insérée manuellement dans la cavité cylindrique du corps de l'électrode (surface géométrique d'environ 0,1256 cm^2). Le contact électrique est établi avec une barre de carbone. L'électrode à pâte de carbone, modifiée par

l'ADN (DNA-CPE) a été préparée en immobilisant le système d'ADN par trempage de l'électrode à pâte de carbone préformée dans une solution contenant la solution d'ADN. L'effet du temps de contact de l'électrode CPE avec la solution d'ADN a été étudié.

I. 4. Procédure

La surface d'électrode obtenue a été lavée à l'eau bidistillée, et séchée à la température du laboratoire. En fin, l'électrode est transférée dans la cellule électrochimique, de 100 ml de capacité, contenant 0,1 mol.l⁻¹ de NaCl. L'ensemble est barboté avec l'azote pur pendant 10 min. L'électrode de travail a été préconcentrée dans la solution contenant l'analyte à un circuit ouvert.

Le comportement électrochimique de l'électrode préparée a été étudié par voltamétrie cyclique (CV) et voltamétrie à onde carrée (SWV).

II. Résultats et discussion

II.1. Optimisation des conditions expérimentales

II.1.1. Caractérisation de l'électrode modifiée par ADN

Au début, nous avons enregistré les voltammogrammes cycliques (CV), relatifs aux électrodes, CPE (électrode mère avant modification) et l'électrode modifiée (ADN-CPE), en milieu électrolytique à pH 7. En comparant les voltammogrammes des deux électrodes (Figure III-1), nous pouvons constater que l'allure des VC est différente dans les deux électrodes, ce qui correspond à un changement de la morphologie de la surface et confirme la modification de cette dernière par l'ADN.

Le voltammogramme enregistré pour l'électrode élaborée (ADN-CPE) présente deux pics redox, le premier dans le sens de balayage cathodique, vers environ de 0,3 V et le second dans la direction anodique à 1,25 V. Ces pics sont attribués à la réponse électrochimique du film biologique, ce qui prouve que l'ADN accroché à la surface de l'électrode possède des propriétés oxydo réductrices.

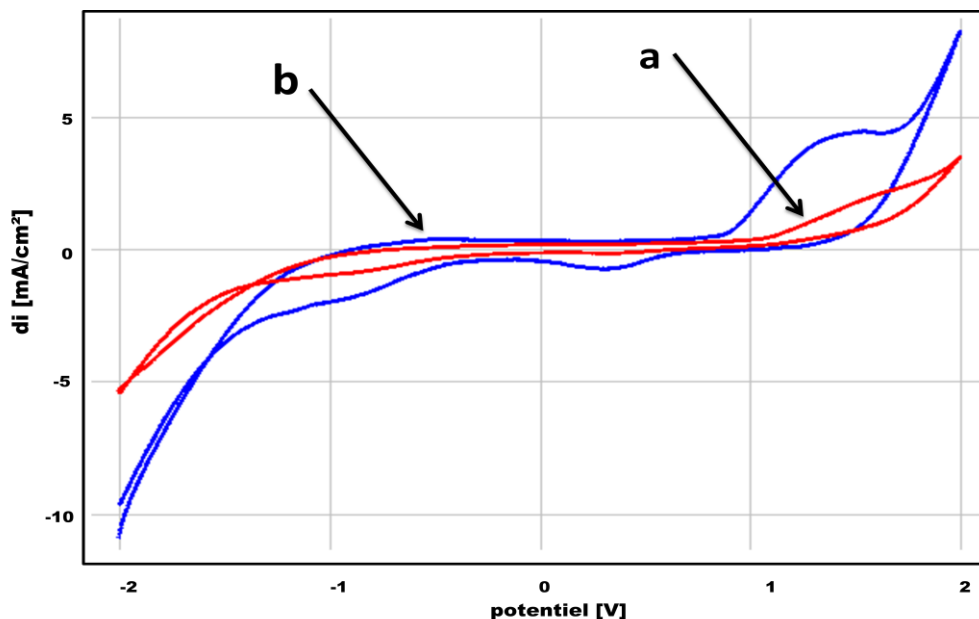


Figure III-2 : Les voltammogrammes cycliques enregistrés dans une solution tampon (pH 7), à CPE (a) et ADN-CPE (b), vitesse de balayage 100 mV / s T (24h).

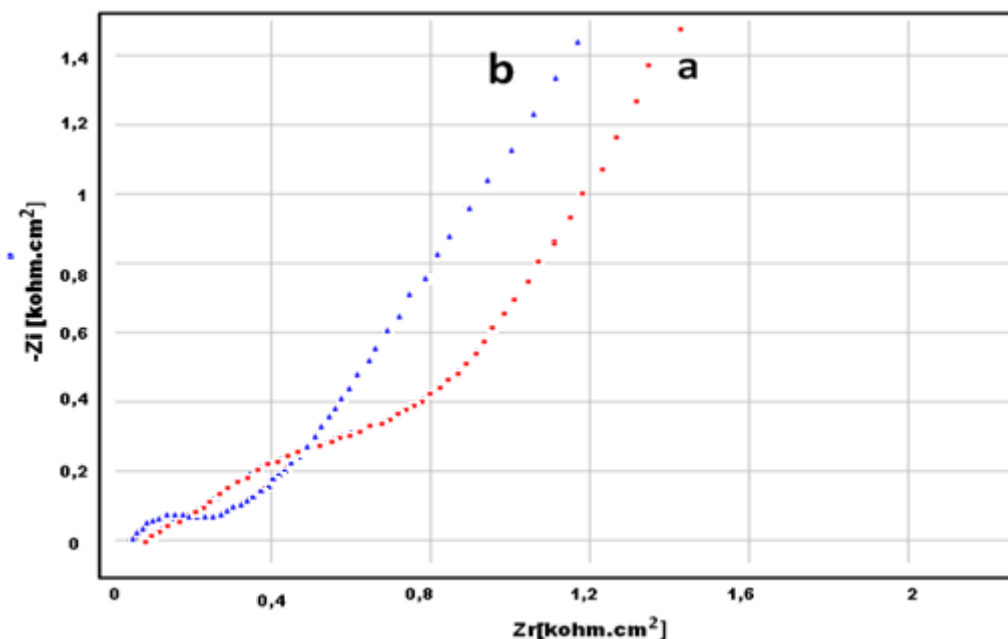


Figure III-2 : Spectres EIS de CPE (courbe a) et DNA-CPE (courbe b), la plage de fréquences a été réglée sur 1 Hz jusqu'à 1 MHz.

Les diagrammes d'impédance électrochimique (EIS) enregistrés pour les électrodes CPE et ADN-CPE, sont illustrés sur la Figure III-2. Nous constatons que dans le cas de l'électrode biologique (courbe b), le diagramme (EIS) présente deux constantes de temps, la première à haute fréquence, a la forme d'une demi-boucle, attribuée aux réactions

électrochimiques qui ont lieu à l'interface film d'ADN/Solution, il s'agit des réactions d'oxydation et de réduction que subit le film biologique dans le milieu électrolytique. La deuxième constante de temps est une droite de Warburg, elle correspond aux phénomènes de diffusion qui ont lieu dans la matrice biologique.

II.1.2. Préparation de l'électrode ADN-CPE : Influence du temps de séjours

Les VC's enregistrés par l'électrode ADN-CPE, en milieu électrolytique, à court temps de séjours ne présentent aucun pic redox, ce qui laisse penser que l'établissement de la liaison ADN-carbone dépend fortement du temps. Le dépôt de l'ADN à la surface du CPE nécessite environ 24 heures (Fig. III-3). Après 24 heures de dépôt, le VC enregistré présente deux pics, un anodique vers 1,25 V et l'autre de nature cathodique vers environ, 0,2 V. La structure de l'ADN comporte plusieurs fonctions susceptibles à se réduire ou à s'oxyder. Par la suite le temps de séjour retenu pour le dépôt du film d'ADN est 24 heures.

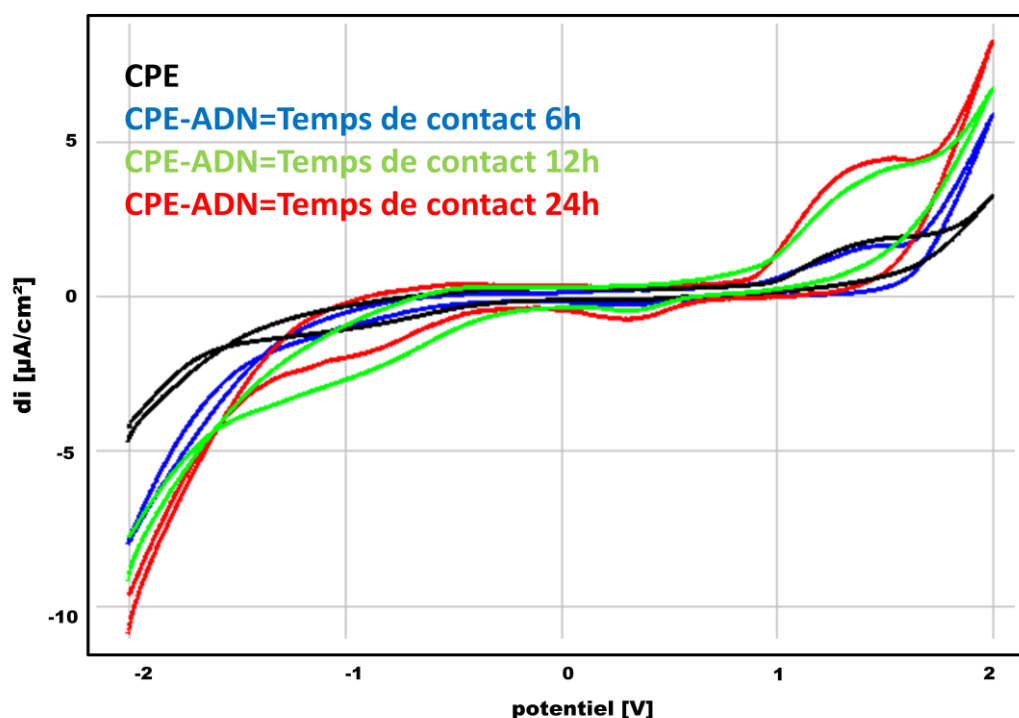


Figure III-3 : Superposition des voltammogrammes cycliques CPE modifiée par ADN aux différents temps de dépôt, dans Na_2SO_4 à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, $\text{pH} = 7,42$

II.2. Performances analytiques de l'électrode biologique

II.2.1. Détection du mercure

II.2.1.1. Comportement électrochimique de l'Hg (II) à la surface de CPE-ADN

Après imprégnation dans une solution contenant les ions de mercure, l'électrode ADN-CPE est caractérisée en milieu électrolytique (0,1 M NaCl), par l'enregistrement du voltammogramme cyclique (Fig III-4). Le VC présente deux pics, le premier dans le sens de balayage anodique à 0,25V, et le second dans le sens cathodique apparaît à -0,25V, qui correspondent respectivement à l'oxydation du mercure, adsorbé lors du séjour de l'électrode dans la solution de mercure, et le deuxième est attribué à la réduction des ions de mercure, selon le mécanisme proposé :

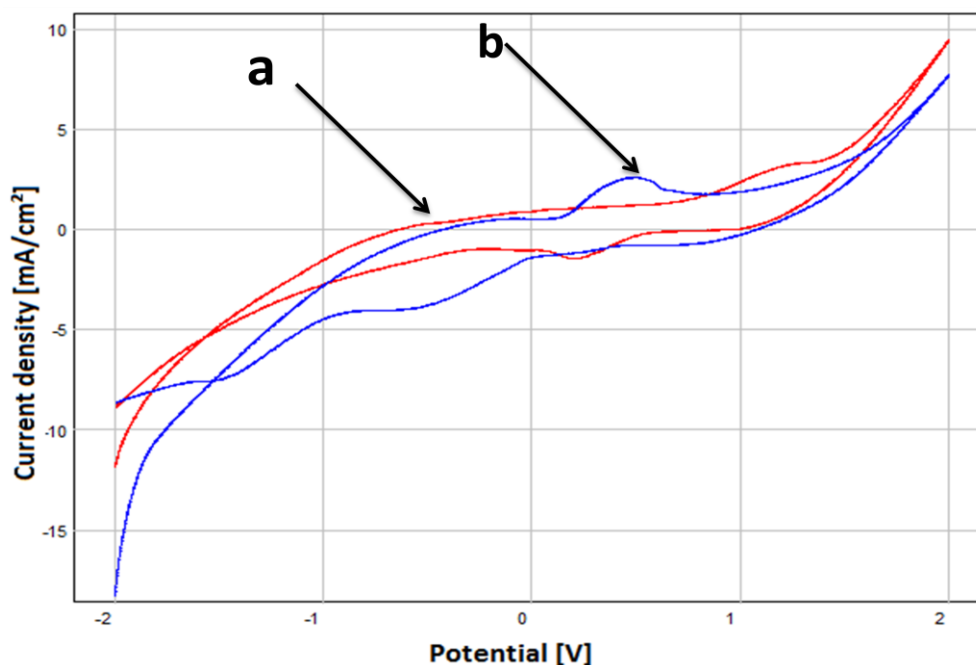
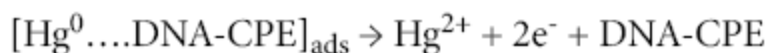
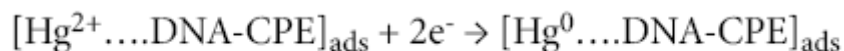


Figure III-4 : Les voltammogrammes cycliques enregistrés dans une solution tampon (pH 7), à ADN-CPE (a) et ADN-CPE (b) Hg^{2+} , vitesse de balayage 100 mV / s.



II.2.1.2. Influence du temps de préconcentration

L'influence du temps de préconcentration sur l'intensité de courant de pic anodique du mercure a été étudiée (Fig III-5.). Cette intensité augmente avec le temps de préconcentration en particulier, entre 0 et 10 min. Au-delà de 10 minutes, elle devient presque constante en raison de la saturation probable de la surface de l'électrode, pour la suite des manipulations, le temps de pré concentration qui sera adopté est 10 minutes.

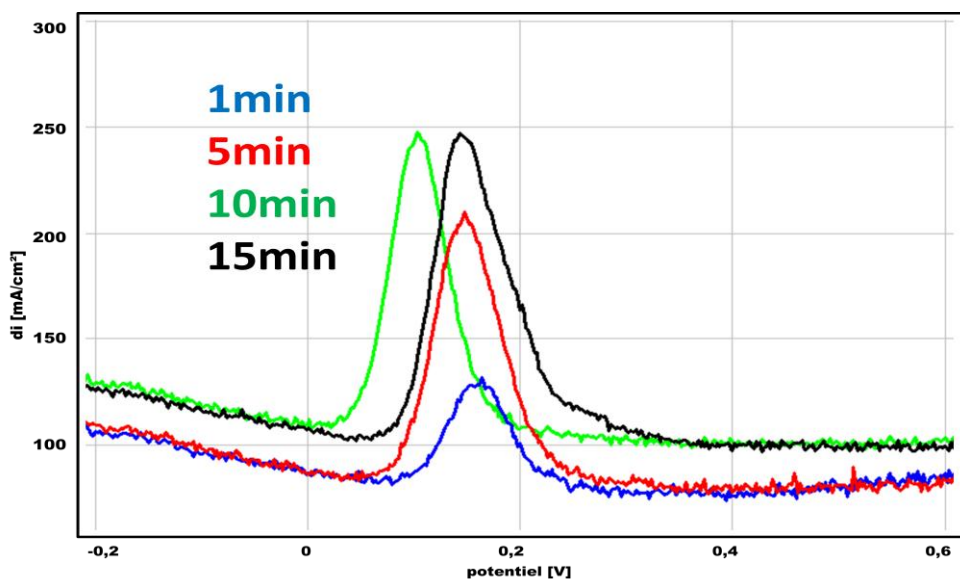


Figure III-5 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés sur CPE-ADN, dans Na_2SO_4 0,1 M contenant 3 mmol/l de Hg^{2+} à différents temps de préconcentration, vitesse de balayage 100 mV/S, pH = 7.

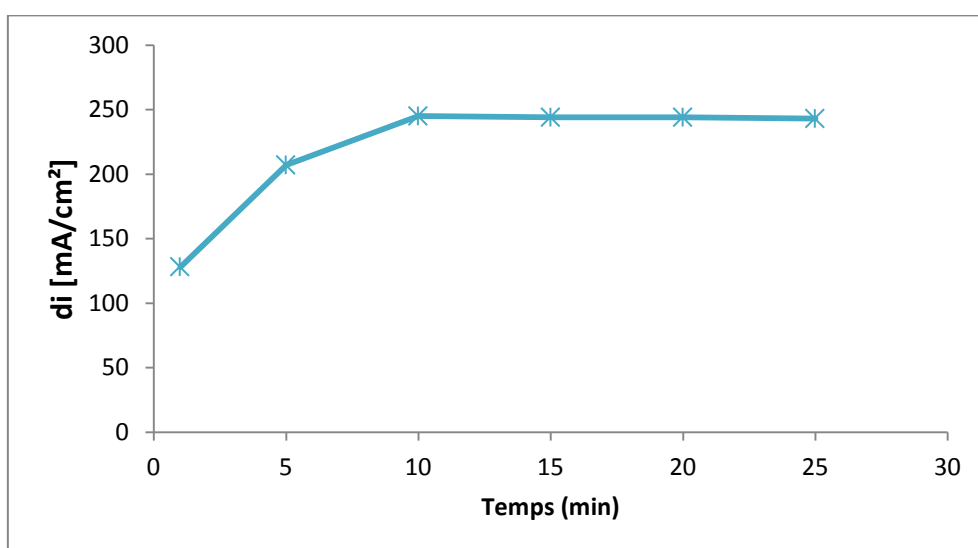


Figure III-6 : Effet du temps de préconcentration sur l'intensité du pic redox de 3 mmol.l⁻¹ du mercure sur CPE-ADN, électrolyte support 0,1 mol l⁻¹ Na_2SO_4 .

II.2.1.3. Influence de la vitesse de balayage

L'influence de la vitesse de balayage sur le potentiel et les densités de courant des pics d'oxydation et de réduction du mercure, est étudiée dans la Figure III-7.

On constate que les densités de courant des pics anodiques et cathodique augmentent linéairement avec la vitesse de balayage (Fig III-8), suggérant que les réactions qui ont lieu à la surface de l'électrode DNA-CPE suivent un mécanisme d'adsorption contrôlé par diffusion.

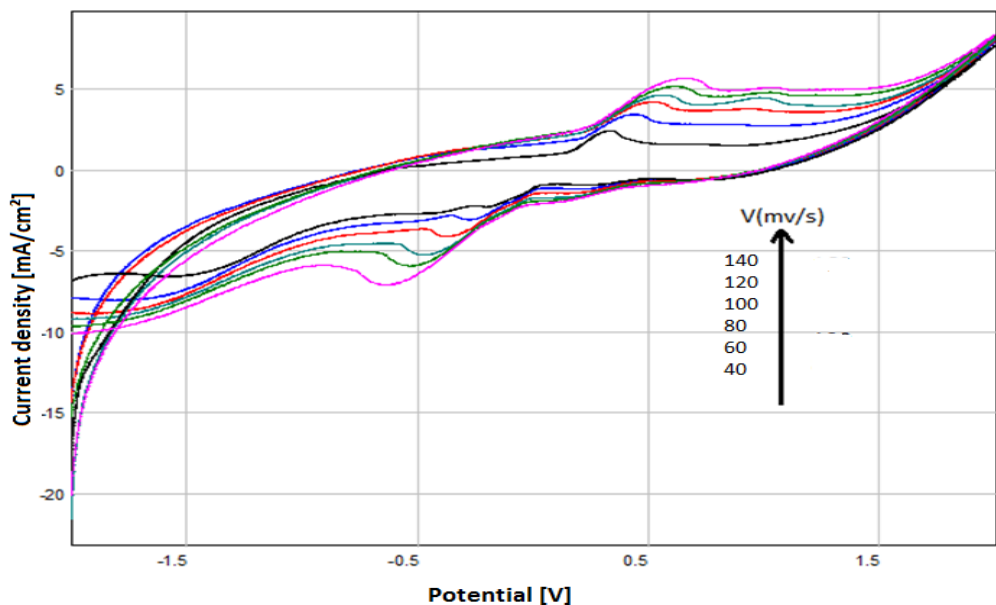


Figure III-7 : Voltammogramme cyclique, enregistré, dans une solution NaCl 0.1 M après l'accumulation de Hg^{2+} , à différentes vitesses de balayage, pour l'électrode CPE-ADN.

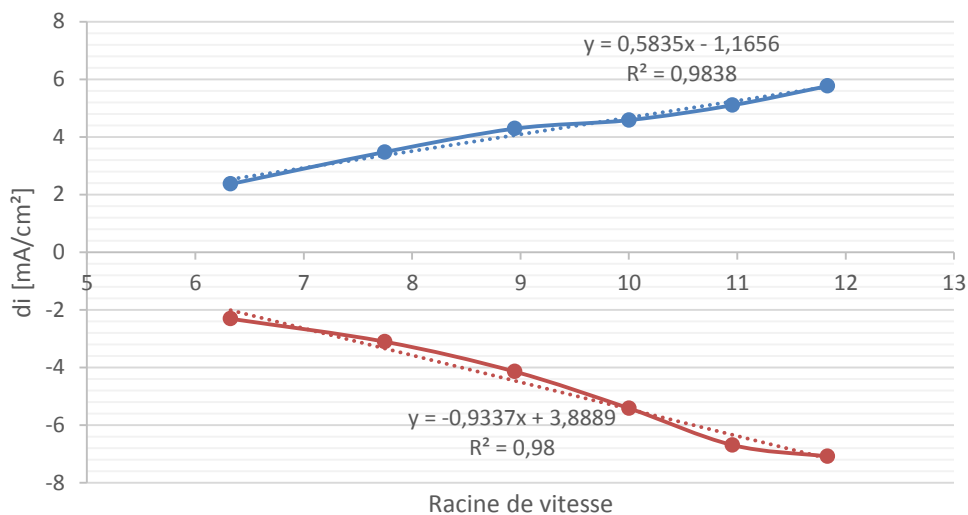


Figure III-8 : Influence de la vitesse de balayage sur l'intensité des pics redox du mercure (3 mmol l^{-1}) pour CPE-ADN.

II.2.1.4. Influence du pH du milieu

L'effet du pH sur la réponse voltamétrique de l'électrode, à pâte de carbone modifiée par l'ADN, a été étudié dans l'intervalle de pH compris entre 6 et 7,5, dans une solution de pré concentration contenant $3,81 \text{ mmol l}^{-1}$ de mercure. Les maximums des intensités de courant anodique et cathodique ont été observés à $\text{pH}=7$ (Fig. III-9). Pour des pH acides, les densités de courant baissent en raison d'une dénaturation de l'ADN.

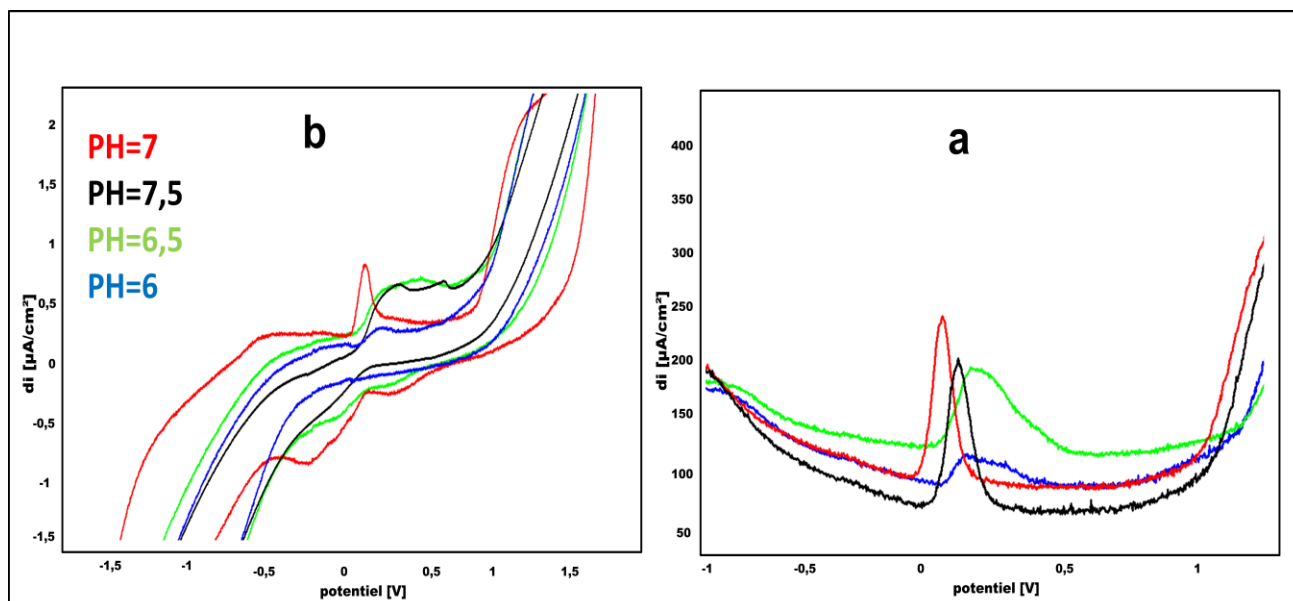


Figure III-9: Voltammogrammes cyclique (b) et à onde carrée (a) enregistrés sur CPE-ADN, dans $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ contenant 3 mmol/l de Hg^{2+} à différents pH, vitesse de balayage 100 mV / S

II.2.1.5. Influence de la concentration de mercure

Sur la Figure III-10 nous illustrons l'effet de la concentration en mercure, de la solution à pré concentration, sur l'allure des voltammogrammes à ondes carrée (SWV), enregistrés à la surface de l'électrode ADN-CPE. Il paraît clairement que la densité de courant du pic dépend linéairement de la concentration en mercure.

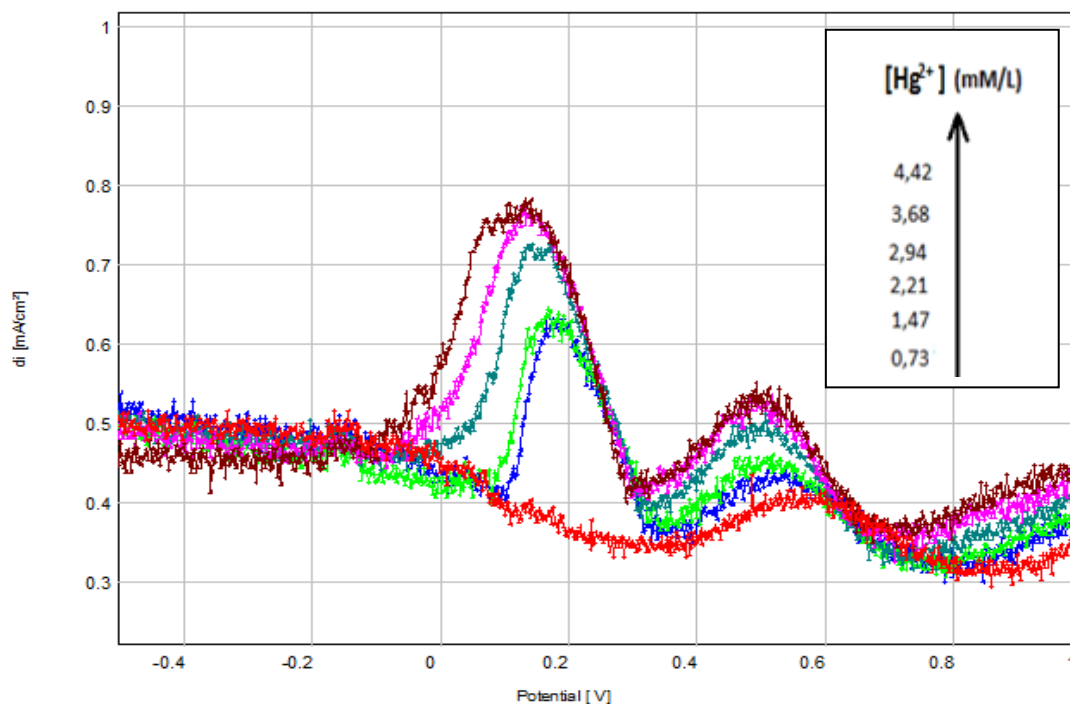


Figure III-10: Voltammogrammes à ondes carrées de différentes concentrations en Hg^{2+} dans $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, vitesse de balayage 100 mV / S , $\text{pH} = 7$.

II.2.1.6. Courbe de calibration

La courbe de calibration a été tracée à partir des voltammogrammes cycliques obtenus (Fig. III-11). Les intensités de courant des pics anodiques et cathodiques déduites des SQW's enregistrés à la surface de l'électrode CPE-ADN sont proportionnelles à la concentration des ions Hg^{2+} en solution, dans une gamme de concentrations comprises entre $0,73 \text{ mmol l}^{-1}$ et $5,15 \text{ mmol l}^{-1}$ (Fig. III-12).

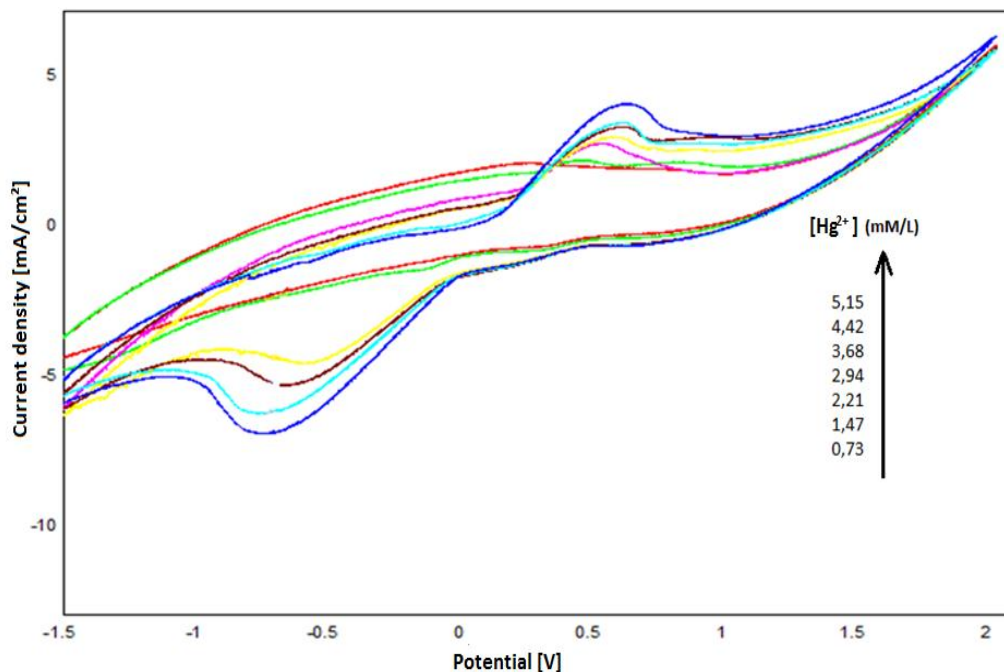


Figure III-11: Voltammogrammes cyclique de différentes concentrations en Hg^{2+} dans $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, vitesse de balayage 100 mV / S , $\text{pH} = 7$

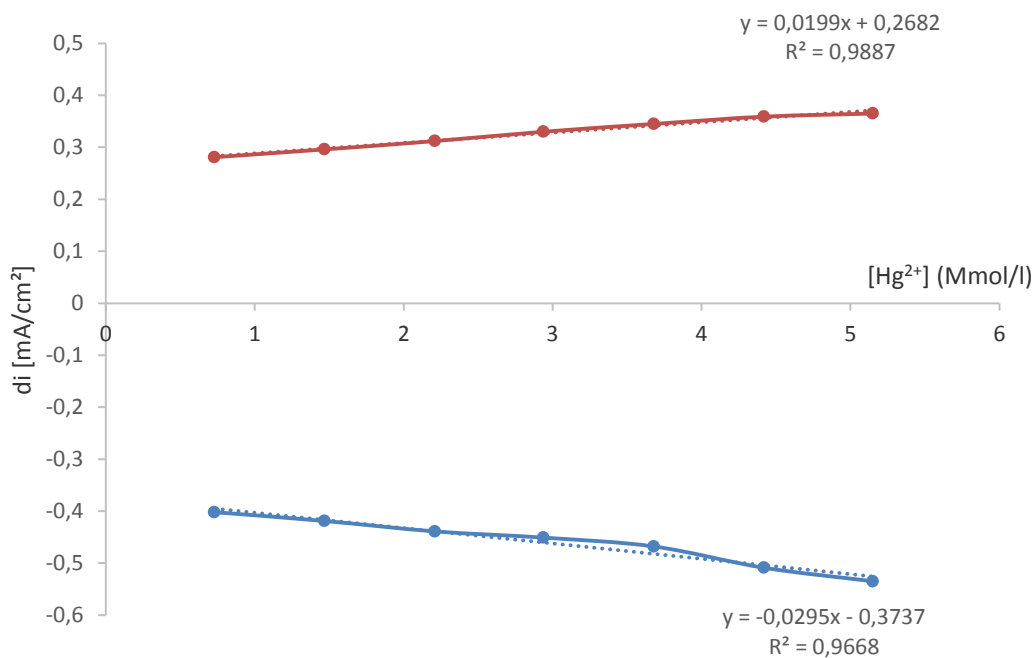


Figure III-12 : Influence de la concentration de Hg^{2+} sur l'intensité des pics redox obtenus par VC pour CPE-ADN.

Les équations linéaires de calibration correspondantes, respectivement au pic d'oxydation et au pic de réduction sont comme suit:

$$I_{p1} = 0,019 [Hg^{2+}] + 0,268 \quad R^2 = 0,988$$

$$I_{p2} = -0,029 [Hg^{2+}] - 0,373 \quad R^2 = 0,966$$

- **Calcul de la limite de détection (DL) et la quantification limite (QL) :**

$$SD = \frac{1}{(n-2)} \sum_{j=0}^n (i_j - I_j)^2 ; \quad DL = (3 \times S.D) / \text{pente} ; \quad QL = (10 \times S.D) / \text{pente}$$

i_j : est la valeur expérimentale du courant calculé à la manipulation j .

I_j : est la valeur correspondante recalculée à la même concentration en utilisant l'équation de calibration.

$n = 7$: nombre d'expériences.

Les limites de détection sont respectivement, $4,4 \cdot 10^{-6}$ mol/l et $1,4 \cdot 10^{-5}$ pour le pic d'oxydation et le pic de réduction.

Les limites de quantification sont respectivement, $2,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l et $4,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l pour le pic d'oxydation et le pic de réduction.

La morphologie des surfaces d'électrodes préparées, CPE (a), DNA CPE (b) et DNA-CPE après accumulation dans la solution de mercure (c), a été étudiée par microscopie optique (Fig. III-3). Le film d'ADN forme une couche mince qui couvre toute la surface de carbone. Le mercure adsorbé dans le film d'ADN forme une structure poreuse [7].

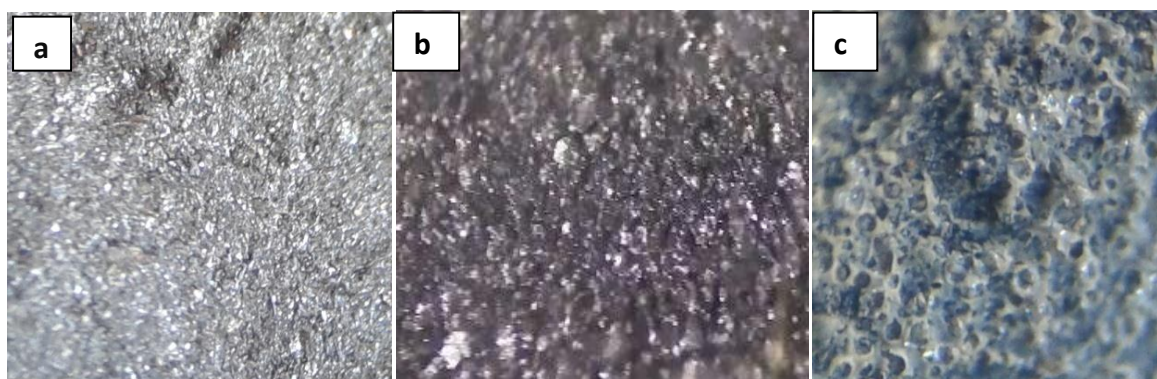


Figure III-13 : Microscopie optique correspondant à a-CPE, b-ADN-CPE et c-CPE-ADN/Hg (II).

II.2.2. Détection du Pb(II)

II.2.2.1. Comportement électrochimique du Pb (II) à la surface de CPE-ADN

L'électrode à pâte de carbone modifiée par l'ADN (ADN-CPE) a été d'abord trempée, dans une solution contenant une concentration du plomb, Pb^{2+} , de concentration égale à 0,2 g/L puis transférée dans la cellule électrochimique de mesure après rinçage. La Figure III-14 montre les CVs enregistrés respectivement, à la surface de l'électrode ADN-CPE en absence et en présence des ions Pb^{2+} . La présence des ions de plomb à la surface de l'électrode se manifeste par l'apparition de deux pics, le premier dans le sens de balayage cathodique, vers environ -0,7 V, qui correspond à la réduction des ions Pb^{2+} à la surface de l'électrode, le deuxième pic de nature anodique apparaît à -0,5 V et pourra être attribué à l'oxydation et relargage du plomb métallique.

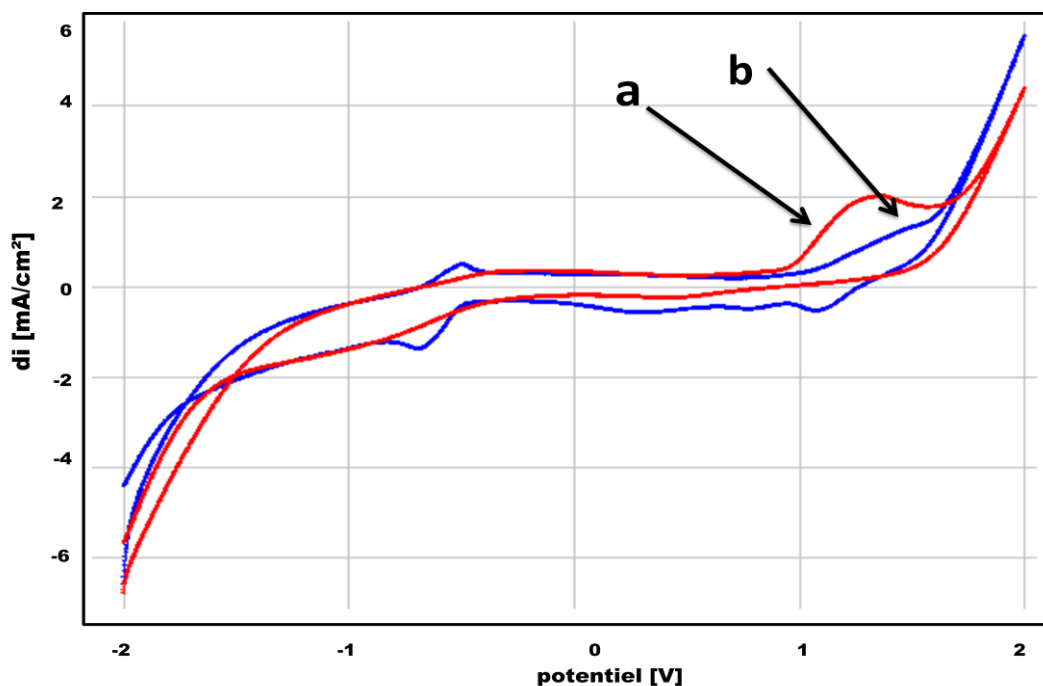


Figure III-14 : Voltammogrammes cycliques enregistrés dans une solution 0.1 mol l^{-1} de NaCl Pour CPE-ADN (a), et CPE-ADN / Pb^{2+} (b), $t_p=10 \text{ min}$, $V= 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

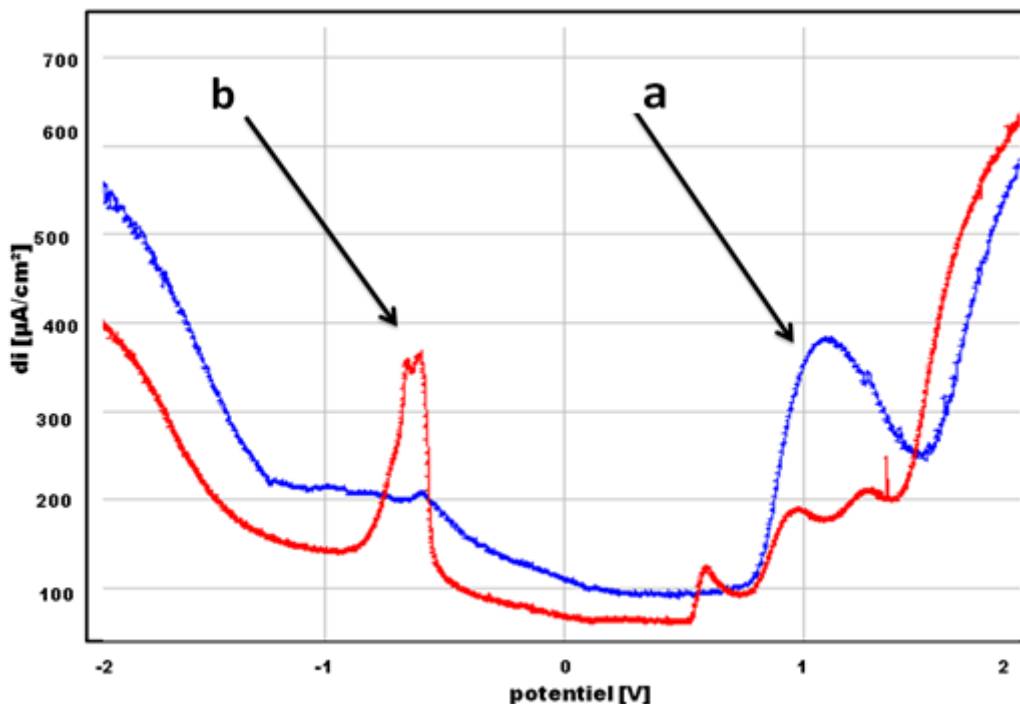
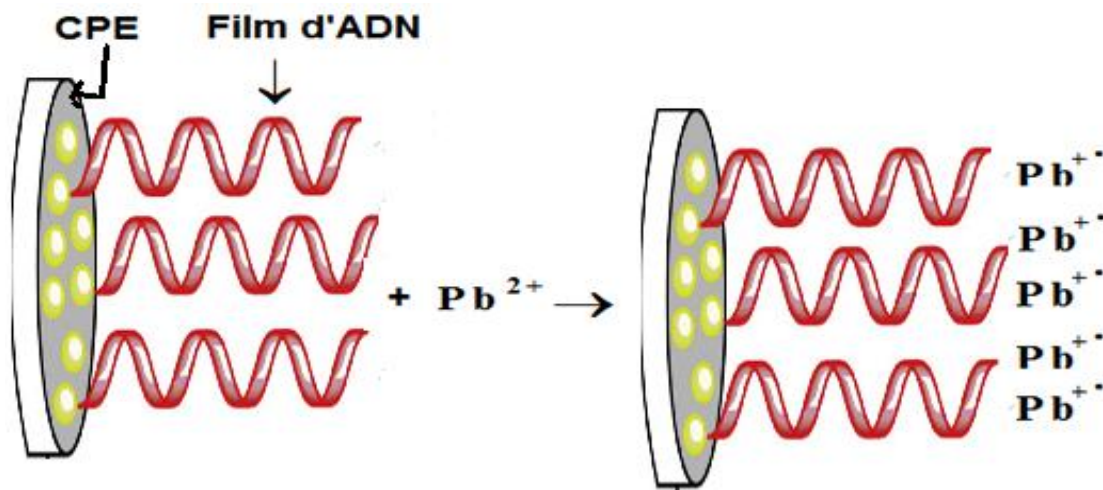


Figure III-15 : Voltammogrammes SQW enregistrés dans une solution $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ Pour CPE-ADN (a), et CPE-ADN / Pb^{2+} (b), $t_p=10 \text{ min}$, $V=100 \text{ mV.s}^{-1}$.

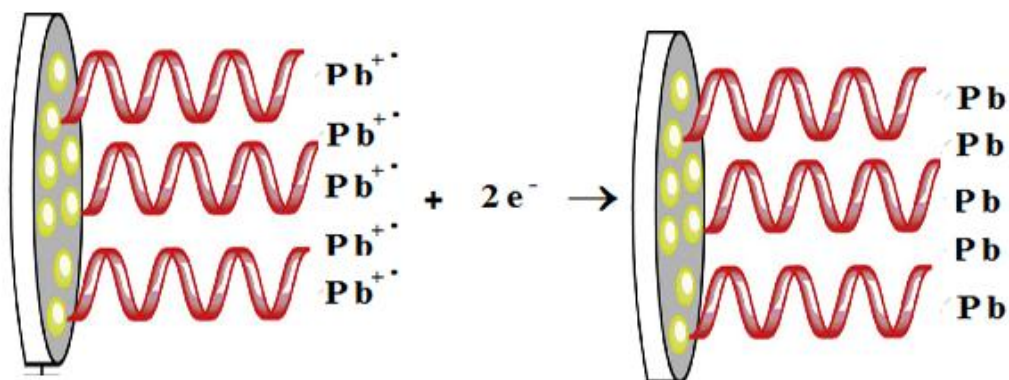
Les résultats obtenus par la voltammétrie cyclique ont été confirmés par voltammétrie à ondes carrées (SWV) (Fig. III-15). La SWV présente l'avantage d'augmenter la sensibilité d'une électrode par l'annulation du terme capacitif de la valeur globale de la densité de courant.

Le mécanisme proposé pour ce processus est schématisé comme suit :

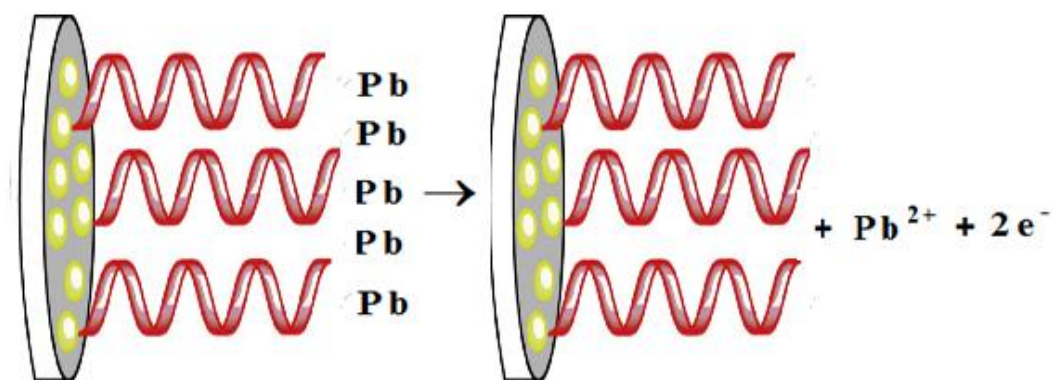
Étape 1 : Accumulation des ions Pb^{2+} à la surface du film d'ADN, dans cette étape les ions du plomb sont insérés à la surface et forment un complexe.



Étape 2 : Réduction électrochimique des ions Pb^{2+} accumulés à la surface de l'électrode



Étape 3 : Oxydation électrochimique du plomb accumulé à la surface de l'électrode



II. 2.2.2. Influence du temps de préconcentration des ions Pb^{2+}

La Figure III-4 représente l'influence du temps d'accumulation sur la densité de courant du pic d'oxydation du plomb (I_{pic}). Les densités de courant du pic d'oxydation atteignent leur valeur maximale à 20 minutes d'accumulation du plomb. Ce temps est retenu pour la suite de ce travail.

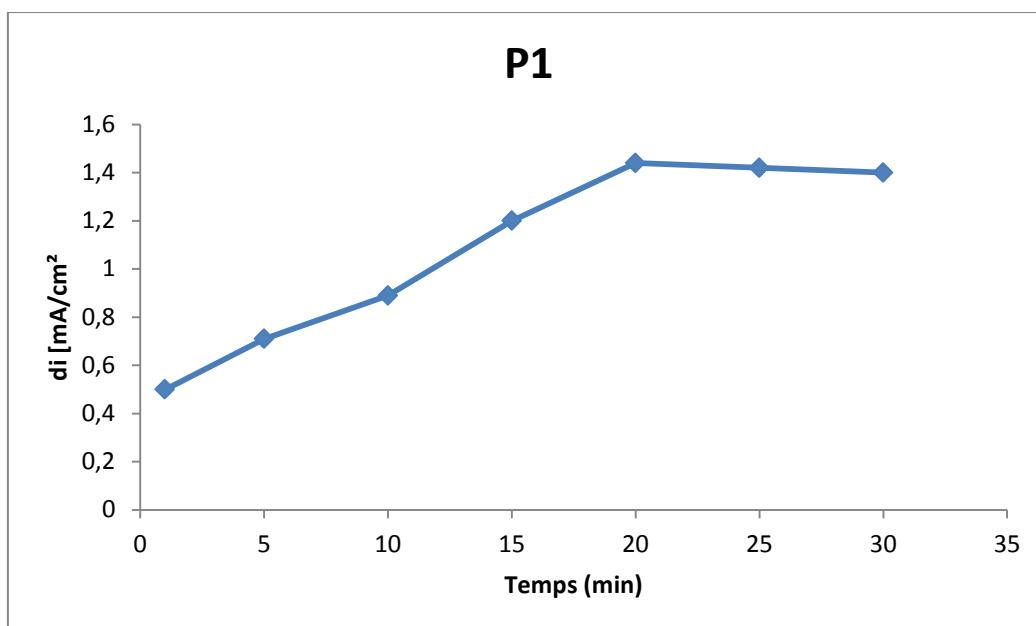


Figure III-5 : Influence du temps de préconcentration sur l'intensité du pic d'oxydation, pH=7 pour CPE-ADN.

II. 2.2.3. Effet de la vitesse de balayage

Sur la Figure III-17 nous représentons les voltammogrammes cycliques, enregistrés après accumulation du plomb, pendant 20 min à la surface de l'électrode ADN-CPE, en milieu électrolytique. A des vitesses de balayage variables de 60 à 160 mV/S, nous pouvons constater que la densité du pic d'oxydation du plomb, augmente avec la vitesse de balayage. La Figure III-18 représente la relation linéaire entre les densités de courants anodiques et la vitesse de balayage, ce qui laisse suggérer que le processus et la cinétique de la réaction sont contrôlés par la diffusion.

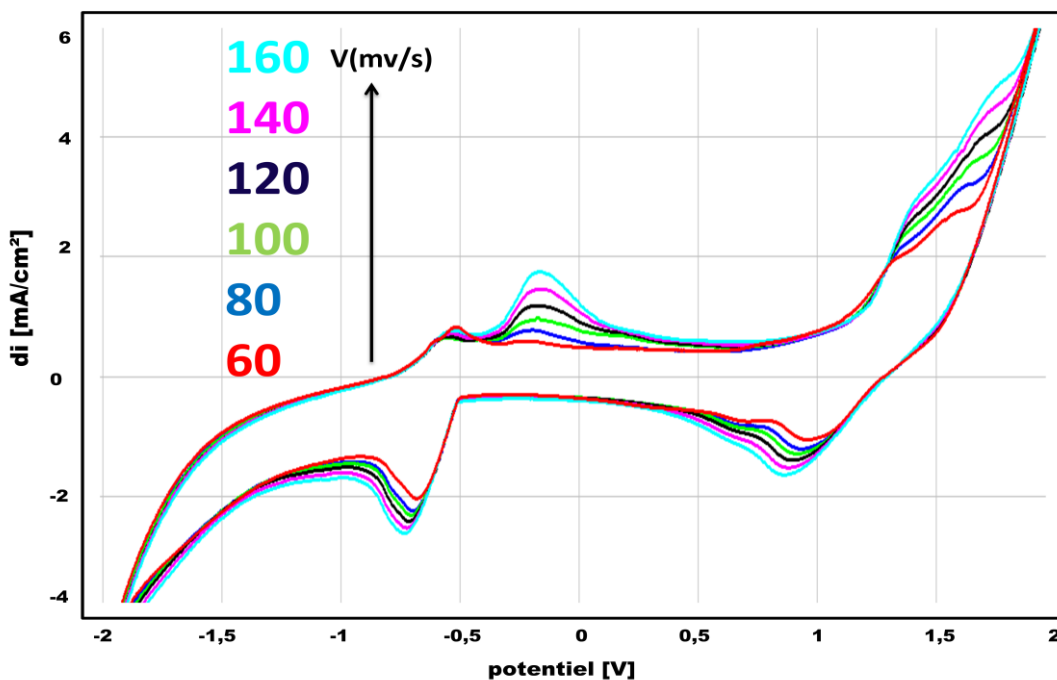


Figure III-17: Voltammogramme cyclique, enregistré, dans une solution $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ après l'accumulation de Pb^{2+} , à différentes vitesses de balayage, pour l'électrode CPE-ADN.

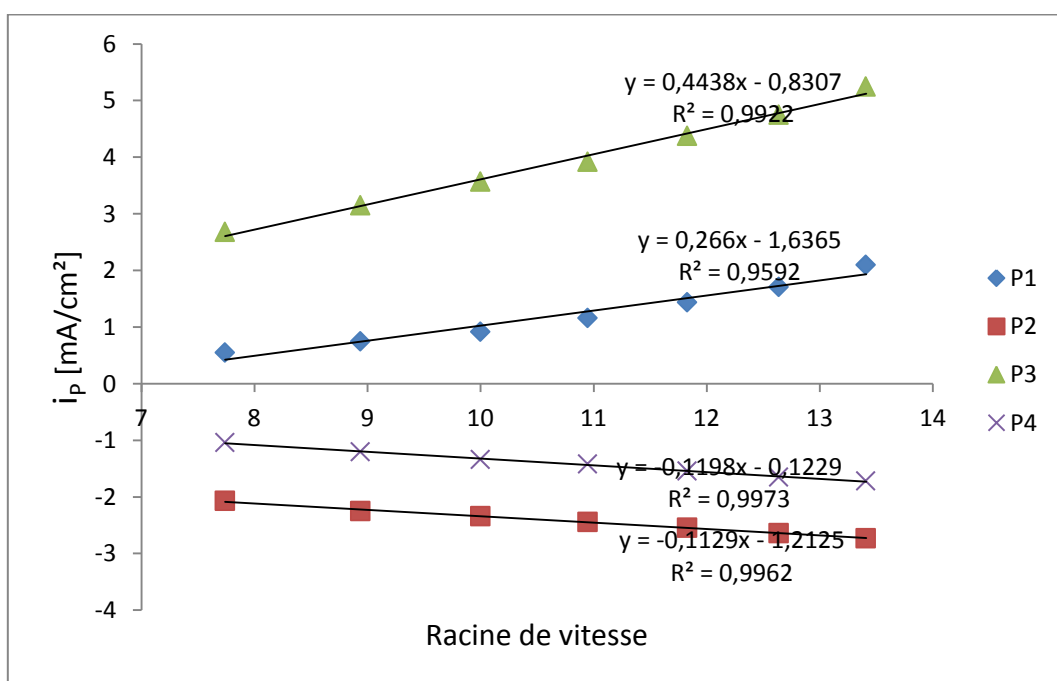


Figure III-18 : Influence de la vitesse de balayage sur les intensités de pics d'oxydation dans une solution de $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ après l'accumulation de Pb^{2+} pH=7

II. 2.2.4. Influence du pH du milieu

L'effet du pH sur la réponse voltamétrique d'ADN-CPE a été étudié dans la gamme de pH comprise entre 6.0 et 7.5. La Figure III-19 montre les voltammogrammes enregistrés, pour l'électrode ADN-CPE, à différentes valeurs de pH, en milieu électrolytique contenant 3 mmol /l du plomb.

Nous constatons que le pH de la solution a une influence significative sur l'intensité du pic d'oxydation du plomb. Une augmentation du pH entraîne le déplacement du potentiel du pic anodique vers les valeurs de potentiels positives.

Les densités de courant d'oxydation et de réduction atteignent leurs valeurs maximales à pH 7.

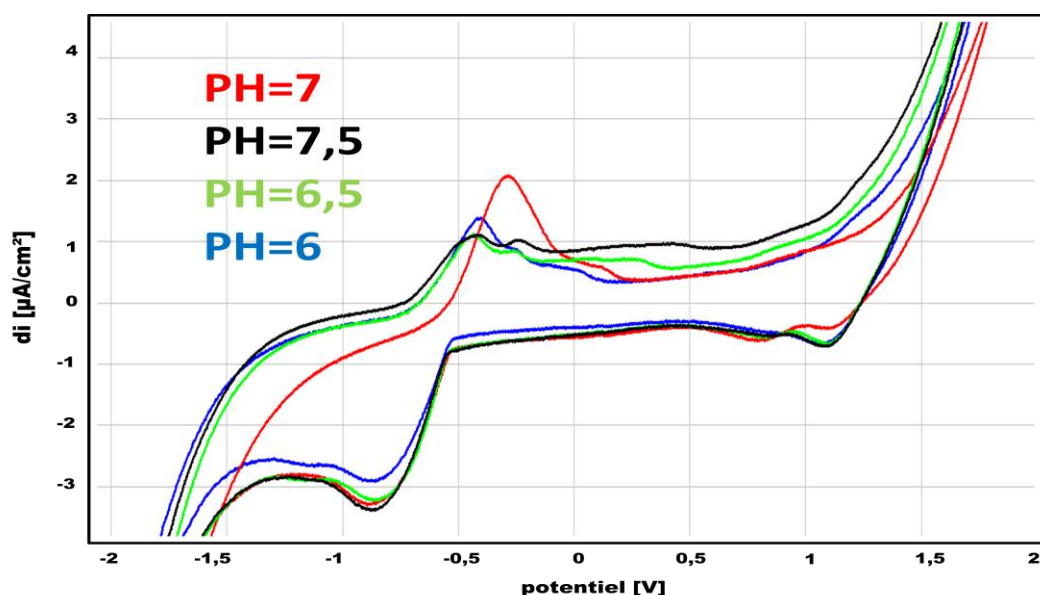


Figure III-19: Voltammogrammes cycliques enregistrés sur CPE-ADN, dans $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ contenant 3 mM /l de pb^{2+} à différents pH, vitesse de balayage 100 mV / S ,

II. 2.2.5. Influence de la concentration de Pb^{2+}

II. 2.2.5.1 Paramètres des spectres d'impédances électrochimiques

L'effet de la concentration des ions de plomb a été étudié par spectroscopie d'impédances électrochimiques (EIS). Les diagrammes EIS enregistrés à la surface de l'électrode biologique (Fig-20), gardent la même allure à toutes concentrations, ce qui suggère que le mécanisme réactionnel n'est pas affecté par la concentration. Ces diagrammes présentent deux constantes de temps bien séparées, à haute fréquence les diagrammes ont la forme d'un demi-cercle attribué à l'échange électronique correspondant aux réactions

d'oxydo-réductions. Le diamètre du cercle correspond à la résistance du transfert d'électron, on constate que la résistance augmente avec la concentration des ions Pb^{2+} .

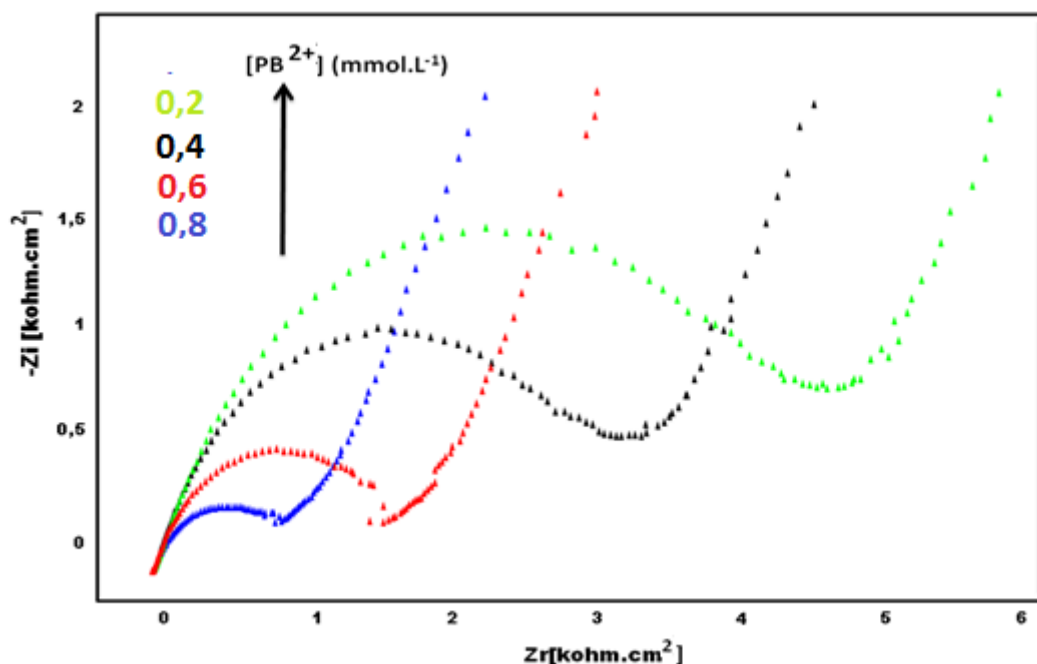


Figure III-20 : Superposition des spectres d'impédance enregistrés à l'ADN-CPE, après la préconcentration à différentes concentrations de plomb, dans $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ de 100 mHz à 100 kHz , $\text{pH} = 7$

II. 2.2.5.2. La courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage (Fig. III-22) a été tracée dans les conditions optimisées précédemment décrites à l'aide de la voltamétrie à onde carrée (Fig. III-21). Pour l'électrode ADN-CPE, après 20 min du temps d'accumulation, sur des solutions contenant des concentrations de plomb comprises entre $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ et $1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Les intensités des pics d'oxydation et de réduction du plomb augmentent linéairement avec la concentration de Pb^{2+} . L'oxydation est donc limitée par l'adsorption du plomb sur la matrice de l'ADN.

L'équation linéaire de calibration est comme suit:

$$\begin{aligned} \mathbf{Ip1} \text{ (mA)} &= 0,245 [Pb^{2+}] + 0,221 & \mathbf{R^2} &= 0,988 \\ \mathbf{Ip2} \text{ (mA)} &= 0,095 [Pb^{2+}] + 0,165 & \mathbf{R^2} &= 0,952 \\ \mathbf{Ip3} \text{ (mA)} &= 0,086 [Pb^{2+}] + 0,139 & \mathbf{R^2} &= 0,905 \\ \mathbf{Ip4} \text{ (mA)} &= 0,18 [Pb^{2+}] + 0,127 & \mathbf{R^2} &= 0,968 \end{aligned}$$

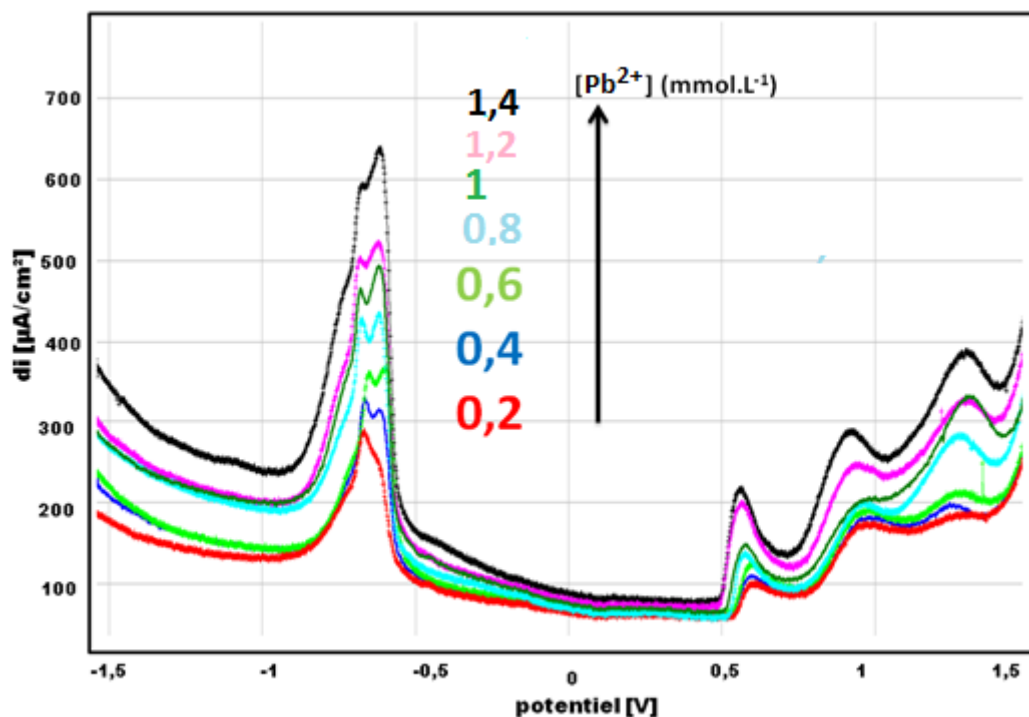


Figure III-21 : Voltammogrammes SQW enregistrés à l'ADN-CPE, dans une solution tampon après la préconcentration à différentes concentrations de plomb.

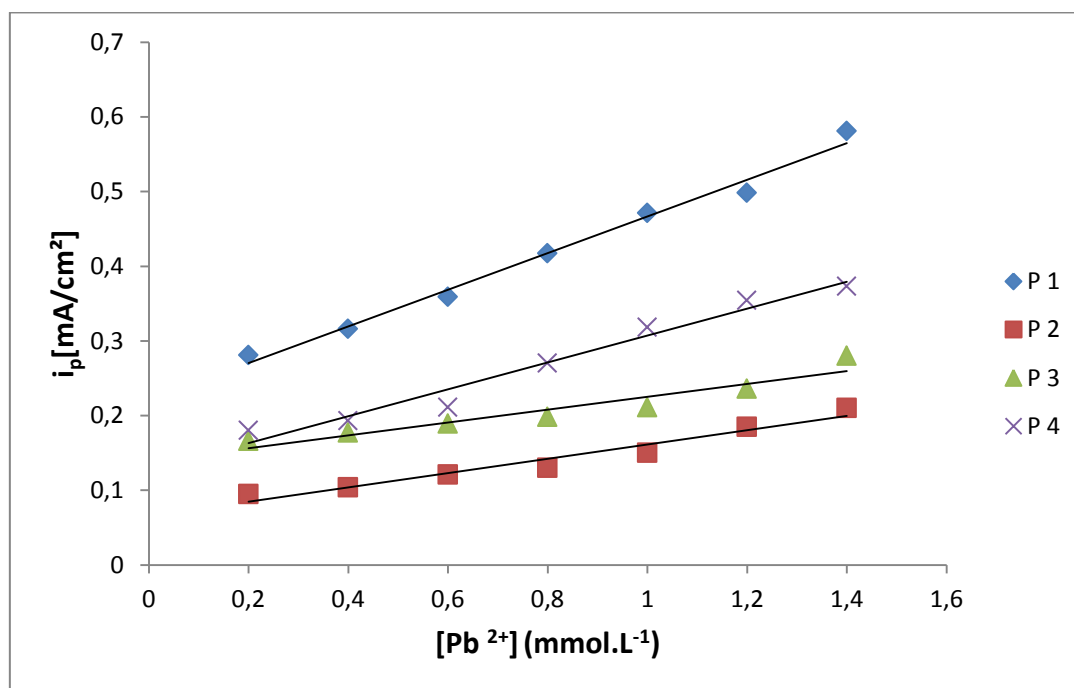


Figure III-22. Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration de Pb (II).

Les limites de détection et de quantification déduites sont :

	SD mA/cm ²	LM (mol.L ⁻¹)	QM (mol.L ⁻¹)
P1	1,2.10 ⁻³	14,69.10 ⁻⁶	48,67.10 ⁻⁶
P2	0,184.10 ⁻³	5,8.10 ⁻⁶	19,3.10 ⁻⁶
P3	1,64.10 ⁻³	27,33.10 ⁻⁶	91,1.10 ⁻⁶
P4	0,2.10 ⁻³	6,31.10 ⁻⁶	21,05.10 ⁻⁶

La figure III-6 illustre les images prises par microscopie optique, enregistrées respectivement, pour les électrodes CPE (c) et ADN-CPE (b). Nous notons qu'après accumulation des électrodes étudiées dans la solution contenant les ions Pb²⁺, les clichés montrent des agglomérats de plomb adsorbés à la surface, la densité du plomb est plus importante sur l'électrode modifiée par l'ADN, ce qui confirme l'activité de cette électrode, vis-à-vis de la détermination des ions Pb²⁺.

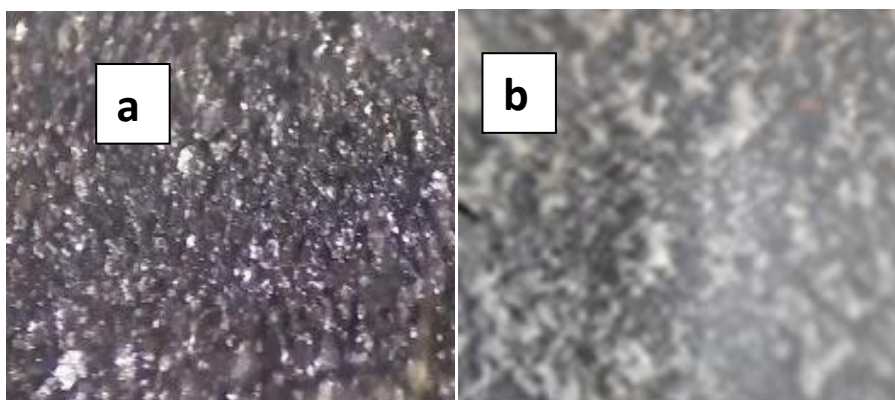


Figure III-23 : Microscopie optique correspondant à (a) CPE/Pb(II) et (b) CPE-ADN/Pb(II) grossissement 100

II.3. Interférence des ions Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ et Cu²⁺

Nous avons testé des éléments qui peuvent présenter une certaine compétition au niveau des sites sur ADN-CPE. Ces tests ont été utilisés dans les conditions optimisées.

L'oxydation anodique du plomb se produit au potentiel -0,2 V/ECS, supérieur à celle de cadmium à -0,5 V/ECS. Le pic d'oxydation du cuivre métallique se manifeste, à environ + 0,2 V/ECS, inférieur à celui d'oxydation du mercure 0,4 V/ECS. La séparation nette des quatre pics nous offre la possibilité de doser les quatre métaux simultanément Figure III-24.

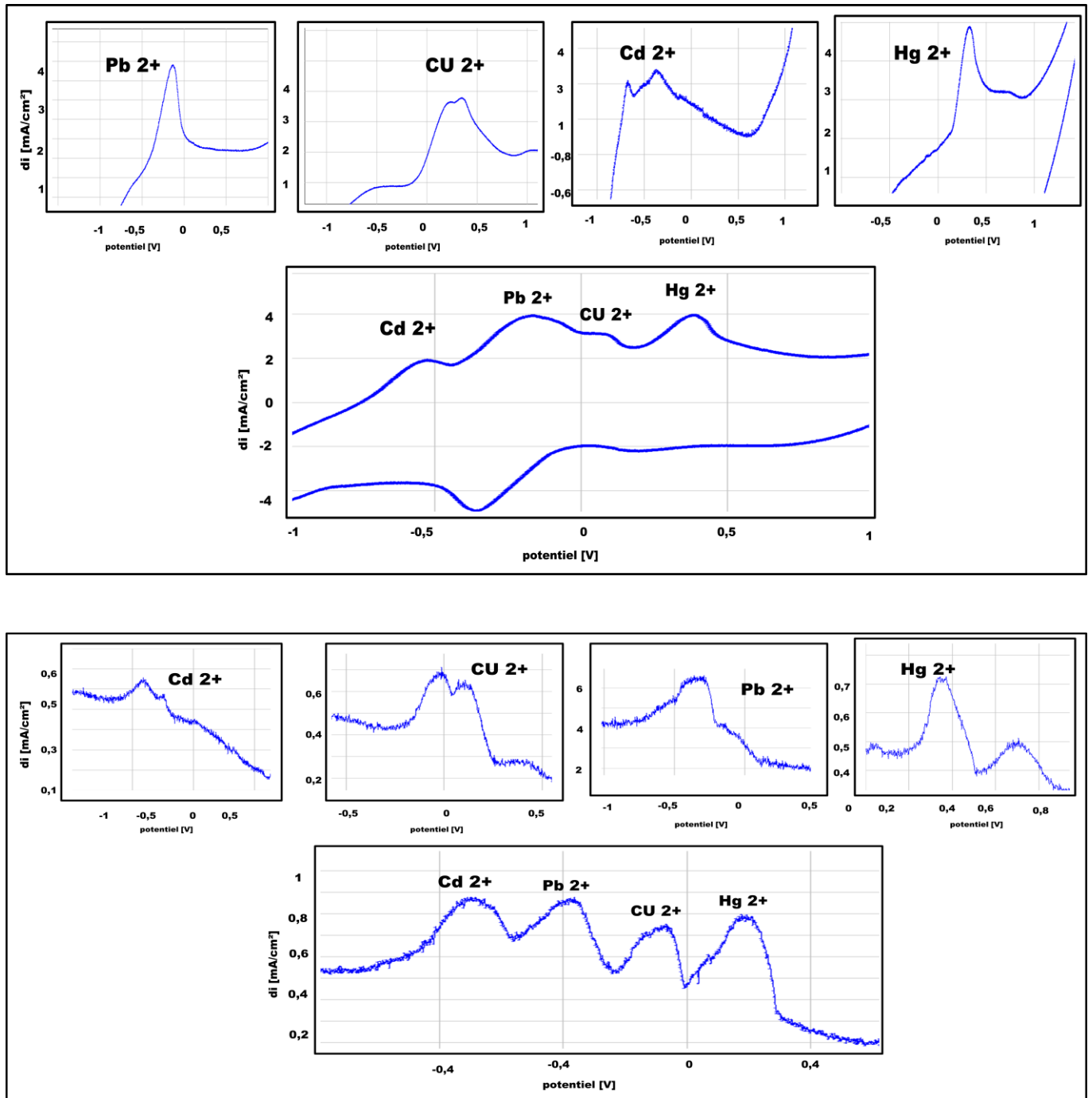


Figure III-24 : Effet des interférences des trois cations étudiés en solution tampon.

Nous constatons une diminution des densités de courant des pics d'oxydation des 4 ions étudiés. Ceci est expliqué par la capacité de l'ADN à adsorber ces ions. A l'issue de cette étude, il apparaît que le domaine de potentiel d'application d'électrode à pâte de carbone modifiée est large. Il nous permettra de détecter simultanément des ions métalliques ce qui n'est pas le cas avec d'autres électrodes.

II.4. Application analytique : eau du robinet

La présence de ces métaux lourds est souvent associée à d'autres espèces (nitrates, zinc, etc...), ce qui rend l'analyse parfois difficile. Pour cet effet la performance et la sensibilité de l'électrode élaborée (ADN-CPE) ont été évaluées dans des échantillons réels dans les conditions optimales, tel que, l'eau destinée à la boisson (eau du robinet). Pour chaque échantillon 7 solutions ont été préparées en ajoutant du Pb^{2+} et du Hg^{2+} dans l'eau de robinet et ensuite analysées sans aucun traitement préalable.

II.4.1. Caractérisation par voltmmétrie cyclique

La présence du plomb (II) dans le milieu, se manifeste en voltmmétrie cyclique par l'apparition de deux pics redox, le premier cathodique vers environ -0,8 V ce pic est attribué à la réduction des ions Pb^{2+} , le second dans le sens de balayage anodique vers -0,2 V, qui correspond à l'oxydation du plomb (Figure III-7 ; **A**). Et La présence du mercure (II) se manifeste par deux pics redox le premier cathodique vers environ 0,1 V le deuxième anodique vers environ, +0,4 V (Figure III-25 ; **B**).

La présence d'interférences est évidemment possible à cause de la complexité de la matrice.

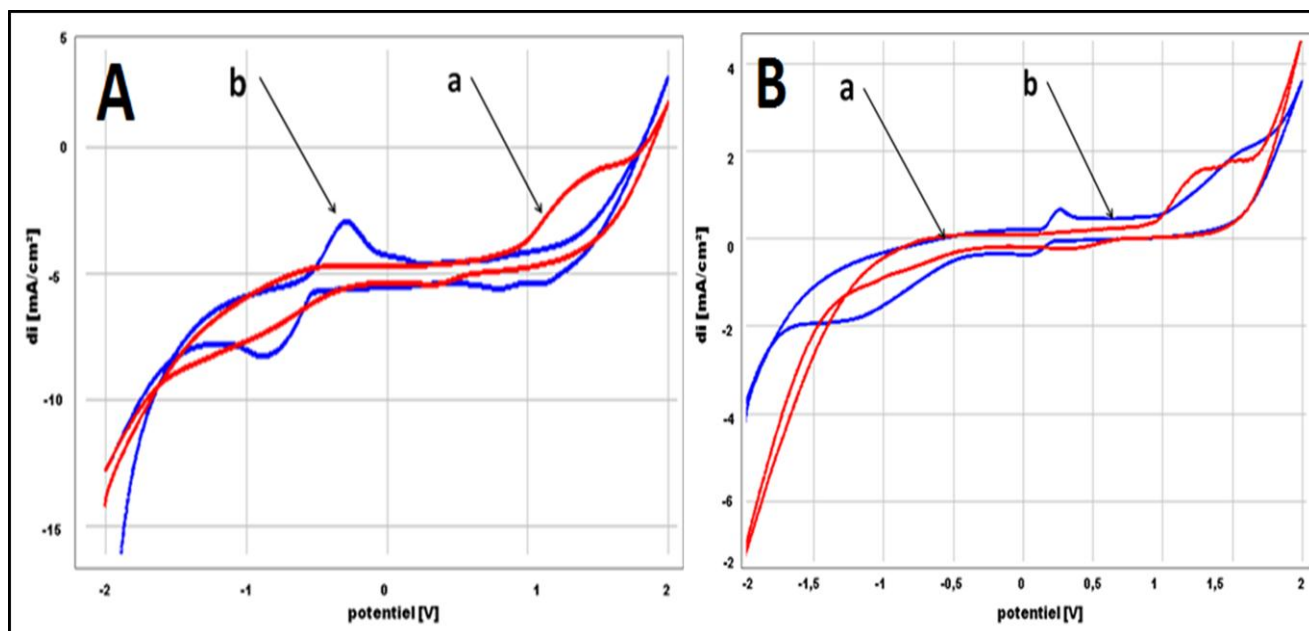


Figure III-25 : Voltammogrammes enregistrés dans l'eau de robinet de l'électrode CPE-ADN en présence (b) et en absence (a) de plomb (II) A et de mercure (II) B

II.4.2. La courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été tracée dans les conditions optimisées précédemment décrites à l'aide de la voltamétrie à onde carrée. Nous constatons que le courant des pics augmente linéairement en fonction de la concentration de plomb Figure III-26 et le mercure Figure III-27. Ajoutée, ce qui explique que la méthodologie proposée est convenable pour la détection de plomb et de mercure dans cette eau. L'équation de régression est :

$$i_P \text{ (mA)} = 0,164 [\text{Hg}^{2+}] \text{ (mmol l}^{-1}\text{)} + 0,054, \quad R^2 = 0,989$$

$$i_{P1} \text{ (mA)} = 0,233 [\text{Pb}^{2+}] \text{ (mmol l}^{-1}\text{)} + 0,093, \quad R^2 = 0,989$$

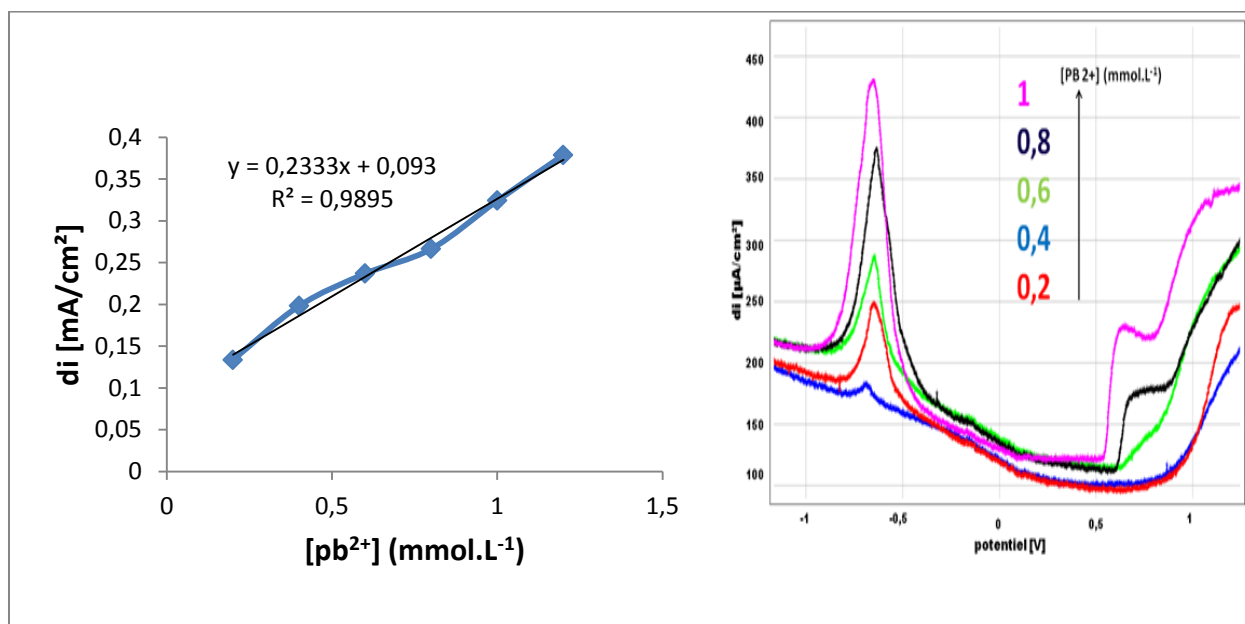


Figure III-26 : Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration de Pb (II) dans l'eau de robinet

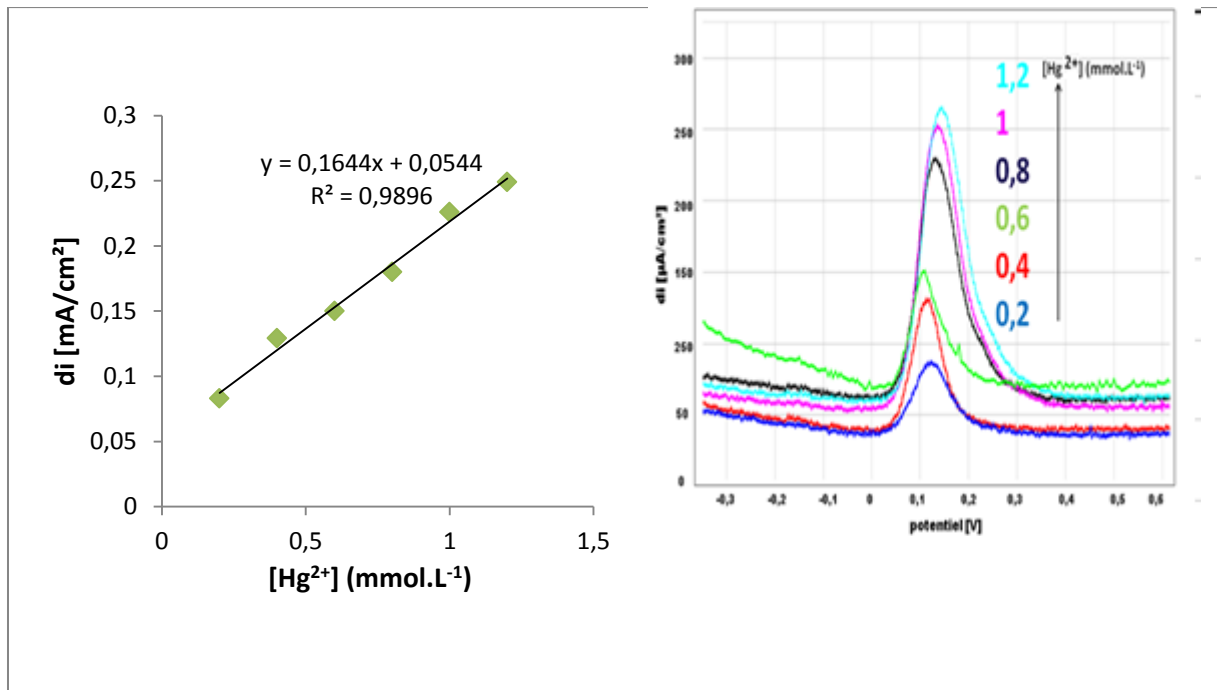


Figure III-27 : Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration d'Hg (II) dans l'eau de robinet.

SD et la limite de détection et la limite de quantification pour d'Hg (II) respectivement $2,77 \cdot 10^{-4}$; $8,14 \cdot 10^{-6}$ mol/l et $2,71 \cdot 10^{-5}$ mol/l

SD et la limite de détection et la limite de quantification pour l'oxydation d' Pb^{2+} respectivement sont $9,8 \cdot 10^{-5}$; LD $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l et $4,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l

SD et la limite de détection et la limite de quantification pour la réduction d' Pb^{2+} respectivement $1,18 \cdot 10^{-4}$; $2,6 \cdot 10^{-6}$ mol/l et $8,8 \cdot 10^{-6}$ mol/l

Les résultats obtenus pour les 7 solutions de Pb^{2+} et du Hg^{2+} sont regroupés dans le Tableau III-2

Tableau III-2: Résultat de l'analyse du Pb^{2+} et d' Hg^{2+} dans des échantillons d'eau de robinet.

Eléments	Ajoutée (Mmol l^{-1})	Trouvée (Mmol l^{-1})	Taux de recouvrement (%)
Pb^{2+}	0,5	0,47	94
	1,1	1,259	114,45
	1,3	1,268	97,53

Hg ²⁺	0,5	0,536	107,2
	0,8	0,737	92,1
	1,4	1,286	91,85

Conclusion

Une méthode, simple, mise en œuvre et efficace pour la détection des métaux lourds, a été développée dans ce chapitre. Les mesures de ces polluants ont été effectuées à l'aide d'une électrode de carbone modifiée par l'ADN, en utilisant principalement les voltamétries cycliques et à onde carrée. Les conditions expérimentales optimisées ont été déterminées par la variation du temps de préconcentration, le pH de la solution de préconcentration. L'intensité du pic correspondant à l'électroactivité de l'élément analysé augmente avec la durée d'accumulation jusqu'à atteindre une limite à partir de laquelle le profil du pic change. Il devient plus large et l'intensité de son maximum diminue ou reste constante, probablement, en raison de la saturation de la surface de l'électrode. Un état d'échange d'équilibre d'ions entre la solution analysée et le liant est atteint.

De même, pour un temps de préconcentration, inférieur à celui nécessaire pour atteindre l'équilibre, l'augmentation de la concentration de la solution analysée a été suivie d'un accroissement du pic correspondant à l'électroactivité de l'élément analysé. Les résultats obtenus indiquent que les électrodes préparées à base de pâte de carbone modifiées par l'ADN peuvent être considérées comme de véritables capteurs électrochimiques avec une grande sensibilité et reproductibilité pour la détermination de différents polluants chimiques en solution aqueuse. Une analyse pratique fût effectuée sur l'eau de robinet. Le modificateur n'est pas soluble dans l'eau, non toxique, et non polluante.

En plus, nous avons pu déterminer par une approche statistique les limites de détection et de quantification pour chaque polluant. Cette étude nous a en particulier, permis de mieux comprendre la sensibilité obtenue.

Référence

- [1] L el idrissi cytotoxicité du cadmium, du plomb et du mercure et caractérisation du transport membranaire de cadmium dans les cellules alvéolaires (a549) et bronchiolaires (h441) juin 2009
- [2] Norme française NFT 90-131 septembre 1986.
- [3] J. I. Hallem, W.L. Zielinski, Jr. Anal. Chem., 46 (11) (1974) 1436.
- [4] Y. Madrid, C. Cabera, T. Perez-Corona, C. Camara, Anal. Chem., 67 (1995) 750.
- [5] L.R. Bravo-Sanchez, B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereio, A. Sanz-Medel, Talanta, 55(2001)1071.
- [6] T.Elouafi, A.Chtaini, H.Oulfajrite, R.Najih (2015) Electrochemical detection of p-chloroaniline at clay modified carbon paste electrode: Application in tap water. J Drug Metab 5: 6
- [7] NL.Mirsaleh, L.Sauche, AD.Bass (2011) Effect of morphology of thin DNA films on the electron stimulated desorption of anions. J Chem Phys 134: 7.

Chapitre IV

Immunocepteur électrochimique pour dosage immunologique des anticorps du virus West Nile

Introduction

Au cours des dernières années, une grande attention a été accordée à la virologie et le développement de méthodes abordables et adéquates pour la détection des virus entiers ou leurs fragments. Les méthodes conventionnelles fréquemment utilisées pour la détection des anticorps contre les virus sont les tests immuno-enzymatiques (ELISA), inhibition de l'hémagglutination (HI) et Western blot assay (WB)... Néanmoins, elles sont souvent **laborieuses** ou elles ont besoin d'instruments coûteux et ils ne sont disponibles que dans des laboratoires spécialisés. En outre, en cas d'urgence nous avons besoin des systèmes de détection portables rapides.

Par conséquent, il existe encore un besoin important de créer de simples méthodes de diagnostic sensibles et peu coûteuses pour la détection d'anticorps contre différents types de virus. Les immunocapteurs incorporants des antigènes spécifiques sont des systèmes alternatifs prometteurs pour la détection directe de biomolécules telles que les immunospécies. La faible consommation d'échantillon, le coût raisonnable des instruments et la bonne possibilité pour la miniaturisation et la minimisation de la durée d'analyse en immunoanalyse sont les principales raisons du développement étendus des immunocapteurs électrochimiques pour dosage immunologique.

De différents types d'immunocapteurs ont été développés avec succès pour la détection de plusieurs types d'anticorps [3], les protéines his-tagged [4] ou des antigènes. Ici, nous présentons un immunocapteur sensible et sélectif pour la détection des anticorps contre le virus West Nile. En se basant sur les modifications électriques induites par les molécules biologiques, en particulier l'interaction spécifique entre le conjugué peroxydase-anticorps secondaire et les anticorps spécifiques du virus West Nile (la liaison anticorps / anticorps secondaires) évalués principalement par voltamétrie cyclique (VC) et voltamétrie à onde carrée (SQW) et la spectroscopie d'impédance électrochimique en présence de NaCl comme un milieu électrolyte. Enfin, l'immunocapteur a été utilisé pour la détection des anticorps spécifiques du virus West Nile dans des échantillons de sérum de caille et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec ELISA.

Ce chapitre, s'articulera autour de deux points :

Nous identifierons dans un premier temps les matériaux, les produits et le dispositif expérimental ayant servis dans ce travail et dans un deuxième temps, nous relaterons tout en développant, le protocole qui a guidé nos activités de recherche.

Nous donnerons les résultats de nos différentes manipulations relatives à l'électrode de pâte de carbone mélangé au phosphate modifiés par un conjugué peroxydase-anticorps secondaire obtenue par adsorption et apporterons des interprétations.

I. Partie expérimentale

I.1. Appareillages

Les expériences électrochimiques ont été menées en utilisant un potentiostat voltalab (PGSTAT 100 modèle, Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) contrôlé par le logiciel voltalab master 4. L'électrode à pâte du carbone modifiée par le phosphate naturel a été utilisée comme électrode de travail (ET) ; l'électrode au calomel saturé (ECS) comme électrode de référence (ER) et une plaque de platine a été utilisée comme contre électrode (EC). Le pH mètre (Copenhagen, PHM210, Tacussel, French) a été utilisé pour ajuster les valeurs du pH.

I.2. Réactifs

I.2.1. Phosphate naturel et le carbone graphite

Le phosphate naturel utilisé dans ce travail provient de la région de Khouribga (Maroc) [1]. La poudre commerciale de graphite a été fournie à partir de la France (Carbone, Lorraine, référence 9900). Cette poudre a été utilisée à l'état brut, elle n'a pas subi de purification ou prétraitements au préalable.

I.2.2. Conjugué peroxydase-anticorps secondaire (HRP-conjugate)

La peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) est une enzyme couplée à l'anticorps secondaire, dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. Cet anticorps est connu comme anticorps « secondaire », et tend à être référé, du fait de ses propriétés de ciblage, comme « anti-souris », « anti-chèvre », « anti-lapin », etc. Les anticorps sont de source animale (généralement d'espèces différentes), ou de cultures d'hybridomes d'origine animale, Pratiquement un anticorps anti-souris se liera à tout anticorps primaire d'origine murine, ce qui permet de réaliser des économies en laissant le laboratoire partager une seule source d'anticorps secondaire, et permet d'obtenir des résultats plus reproductibles. L'anticorps secondaire est généralement lié à la biotine ou à une enzyme qui permet l'identification visuelle de la protéine étudiée, comme une phosphatase alcaline ou

la peroxydase de raifort. Cette étape confère un avantage, du fait que plusieurs anticorps secondaires se lieront à un anticorps primaire, permettant d'améliorer le signal.

Le conjugué choisi est un anticorps polyclonal lié à HRP et couramment utilisé dans le kit de test ELLISA. Il est destiné à la détection des anticorps anti-pr-E du virus West Nile dans les sérums de chevaux et d'oiseaux [2].

I.2.3. le sérum positif contient des anticorps contre virus West Nile

Le sérum positif contient les anticorps du virus West Nile utilisé dans le kit de test Elisa [2].

I.3. Procédure

I.3.1. Elaboration de l'électrode de pâte de carbone phosphate CPE-NP

Le phosphate naturel traité est mélangé avec la poudre carbone graphite, la pâte obtenue est insérée dans la cavité de l'électrode (support creux qui porte la tige de carbone ; de surface $0,1256 \text{ cm}^2$). Cette tige de carbone assure le contact électrique avec la pâte. Une fois l'électrode est préparée, elle est séchée à température ambiante pendant 24 heures. Après déshydraté de l'électrode, un polissage mécanique de la surface de l'électrode est réalisé sur un papier lisse avant son utilisation pour éliminer toutes les irrégularités et obtenir une surface régulière et plus reproductible.

I.3.2. Modification des électrodes mères par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (HRP-conjugate)

I.3.2.1. Trempage des électrodes de travail dans la solution de conjugué peroxydase-anticorps secondaire en fonction du temps.

Une solution de conjugué peroxydase-anticorps secondaire a été préparée par dilution du conjugué concentré (conjugué peroxydase-anticorps secondaire $100 \mu\text{l}$), dans 2 ml d'eau distillée ou desionisée.

L'électrode élaborée est plongée dans la solution de conjugué peroxydase-anticorps secondaire, pendant 10, 20, 30 et 60 mn Successivement, sous agitation à vitesse constante tout en permettant la réhomogénéisation du liquide.

L'électrode élaborée a été caractérisée en milieu électrolytique par voltammétrie cyclique et à ondes carrée. La surface de l'électrode a été observée au microscope optique à réflexion.

I.3.2.2. Etude de l'effet de facteur de dilution du conjugué peroxydase-anticorps secondaire

Pour l'étude du comportement électrochimique de l'électrode en fonction de la concentration du conjugué peroxydase-anticorps secondaire, nous avons utilisé les mêmes méthodes (VC, VL, SWV, EIS). L'électrode a été trempée dans les solutions du conjugué peroxydase-anticorps secondaire à différentes dilutions (0,5 ; 1, 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 mg/mL) pendant 30 mn (temps de dépôt optimal), puis l'électrode est transférée dans la cellule de mesure contenant l'électrolyte support, NaCl (1 mol / L).

I.3.3. Caractérisation des électrodes modifiées en présence des anticorps (*de West Nile*)

I.3.3.1. Etude de l'effet du temps de contact avec les anticorps.

En vue d'étudier le comportement électrochimique de l'électrode élaborée en fonction du temps de contact avec les anticorps. L'électrode modifiée a été immergée dans une cellule contenant la solution des anticorps de concentration bien définie. Après le rinçage avec de l'eau distillée, l'électrode chargée d'anticorps est transférée dans la cellule de mesure contenant l'électrolyte support, NaCl (1 mol / L) et ensuite caractérisée par la voltammétrie cyclique, linéaire, à ondes carrées et par la spectroscopie d'impédance électrochimique. A différents temps de contact, après chaque passage de l'électrode, la solution d'anticorps est analysée par densité optique.

A la fin l'électrode utilisée est analysée morphologiquement par microscopie optique à réflexion.

I.3.3.2. Etude de l'effet de facteur de dilution des anticorps contre West Nile (l'effet de concentration)

Si on désire effectuer un dosage de l'anticorps dans un sérum, il convient de réaliser au préalable une gamme de dilutions de la solution d'anticorps initiale de façon à construire une série des solutions de différentes concentrations. La solution mère d'anticorps, obtenue en diluant 2 ml de sérum positifs dans 8 mL de l'eau distillé, On l'appellera C1.

La gamme est réalisée par des dilutions en série au 1/2 selon les indications du tableau **IV 3** ci-dessous :

Tableau IV 3 : Gamme de dilutions

Volume d'anticorps à prélever (mL)	Volume de l'eau à ajouter (mL)	Nom
5 de C1	5	C2
5 de C2	5	C3
5 de C3	5	C4
5 de C4	5	C5
5 de C5	5	C6
5 de C6	5	C7

I.3.4. Caractérisation des anticorps par teste Elisa

I.3.4.1. Principe de test ELISA

Le principe du teste l'ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

- D'un antigène connu spécifique à l'anticorps recherché.
- D'un échantillon à analyser.
- D'un anticorps secondaire anti IgG couplé à une peroxydase (cet anticorps va reconnaître spécifiquement les anticorps (IgG)).
- Du substrat spécifique à l'enzyme.

Le test comporte quatre étapes principales :

- **Fixation de l'antigène :** L'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.
- **Fixation de l'anticorps à doser :** On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d'anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.
- **Fixation de l'anticorps de détection :** On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anti IgG qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.

- **Révélation** : On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnel à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

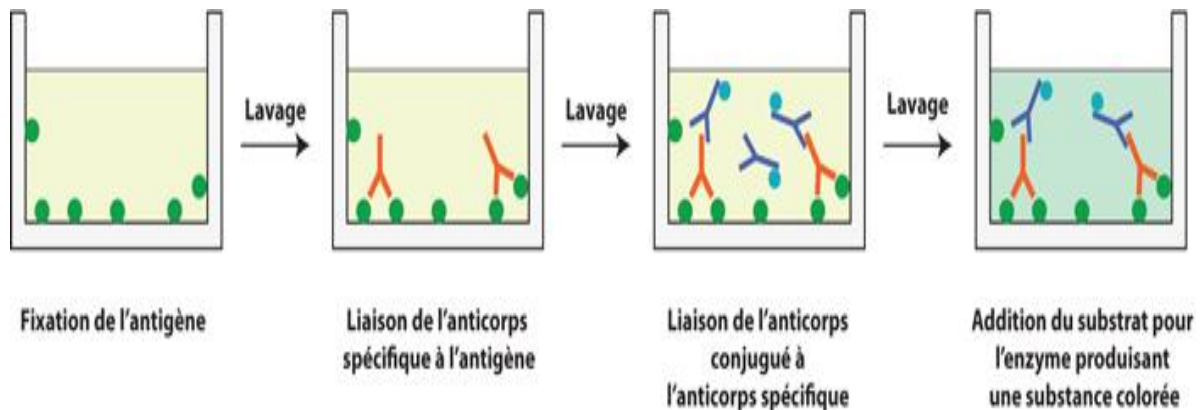


Figure IV-1 : Le principe du test ELISA

I.3.4.2. Mode opératoire

Ramener tous les réactifs à température ambiante ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}^{\circ}$) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

1- Distribuer :

- 50 μl de Tampon de dilution 2 dans chaque puits.
- 50 μl de Contrôle Positif dans les cupules A1 et B1
- 50 μl de contrôle Négatifs dans les cupules C1 et D1.
- 50 μl de chaque échantillon à tester dans des cupules restantes.

2- Incuber : 90 min \pm 6 min à 21°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).

3- laver : 3 fois chaque cupule avec environ 300 μl de solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.

4- Préparer : le Conjugué 1X en diluant le Conjugué 10X au 1/10 Tampon de dilution

5- Distribuer : 100 μl de Conjugué 1X dans chaque cupule.

6- Incuber : 30 min à 21°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}^{\circ}$)

7-Laver : 3 fois chaque cupules avec environ 300 μl de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.

8- Distribuer : 100 μl de Solution de révélation dans chaque cupule.

9- Incuber : 1S min : t 2 min a 21.(:tS.C) a I^c obscurité.

10-Distribuer : 100 ~I de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction. Mesurer et enregistrer les densités optiques.

Validation: Le test est valide si :

- ✓ La valeur moyenne de densité optique des Contrôles Négatifs (DO CN) est supérieure a 0,700.
- ✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles positifs (DO CP) est inférieure à 30 % de la DO CN **DO CP/DO CN < 0,3**

Interprétation: Pour chaque échantillon; calculer le pourcentage S/N (% S/N) :

$$S/N = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO}_{CN}} \times 100$$

- CN Les échantillons présentant un S/N inférieur ou égal à 40% sont considérés comme positifs
- Les échantillons présentant un S/N inférieur ou égal à 50% sont considérés comme négatifs
- Les échantillons présentant un S/N supérieur à 50% sont considérés comme négatifs

II. Résultats et discussion

II.1.Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de carbone phosphate avant et après modification par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire.

II.1.2.Caractérisations électrochimiques de CPE-NP / PAS.

II.1.2.1.Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

Au début, nous avons enregistré les voltammogrammes à ondes carrées, relatifs aux électrodes, CPE-NP (électrode mère avant modification) et l'électrode modifiée (CPE-NP-peroxydase-anticorps secondaire), en milieu électrolytique à pH 7. En comparant les voltammogrammes des deux électrodes (Figure IV-2), nous pouvons constater que l'allure des SQWs est différente pour les deux électrodes, ce qui correspond à un changement de la morphologie de surface et confirme la modification de cette dernière par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire.

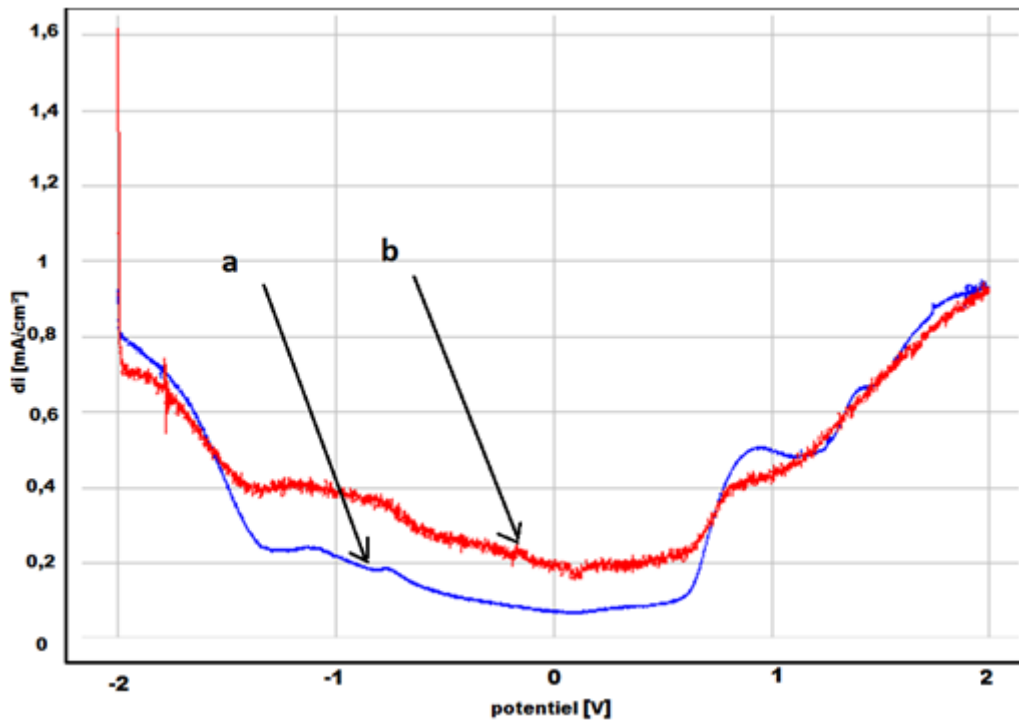


Figure IV-2 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE-NP non modifiée (a) et CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

II.1.2.2. Caractérisation par la voltammétrie cyclique et par l'EIS

La comparaison des voltammogrammes (Fig. IV-3) montre que l'électrode (CPE-NP) mère a été bien modifiée. Cette modification se caractérise par une augmentation de l'électroactivité de l'électrode due à la présence d'un film formé par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire à sa surface. Le balayage anodique des potentiels fait apparaître un pic, centré à + 0,6 V et le balayage cathodique, un pic centré à 0,4 V. Les diagrammes d'impédance enregistrés à la surface des électrodes étudiées, CPE-NP et CPE-NP modifiées par les anticorps, ont la forme d'un demi-cercle qui a du mal à se fermer dans le cas de l'électrode mère, ce qui montre que la présence des anticorps à la surface de l'électrode baisse la résistance de transfert des électrons (Fig. IV-4).

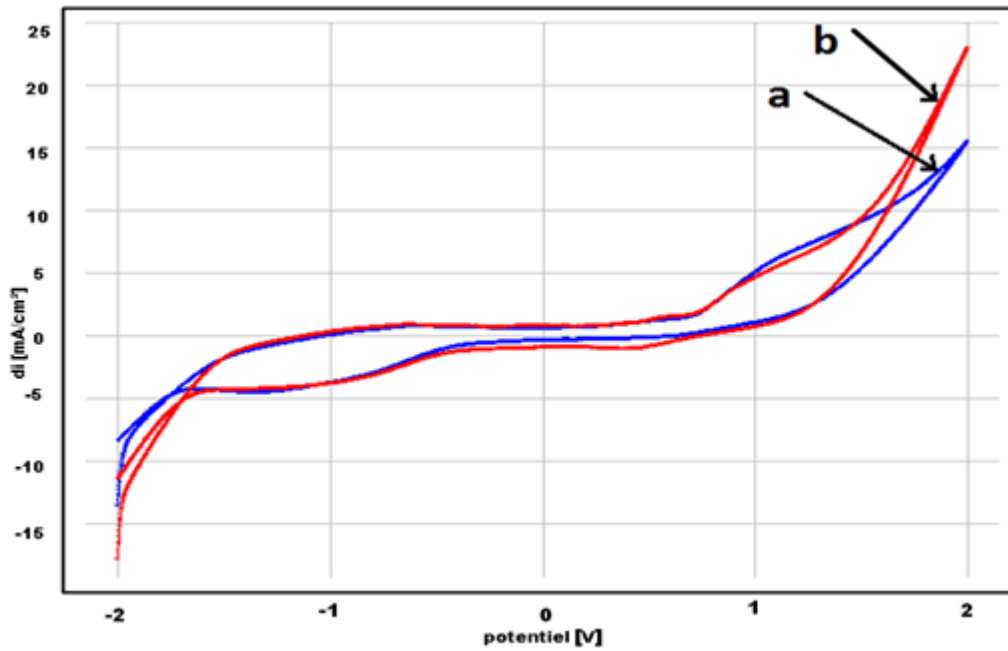


Figure IV-3 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP (a) non modifiée et CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; $\text{pH} = 7$

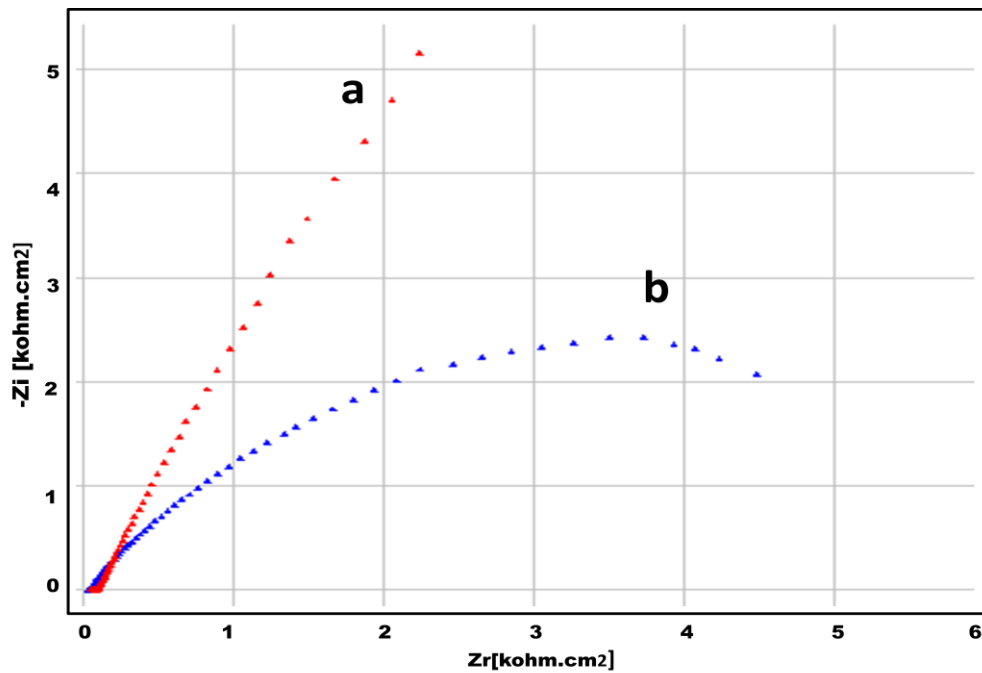


Figure IV-4 : Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP (a) non modifiée et CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), dans NaCl à 0,1 M ; $\text{pH} = 7$

II.1.3. Caractérisation morphologique de CPE-NP / PAS

La caractérisation morphologique de la surface des électrodes, mère et modifiée, a été étudiée par microscopie optique (Fig IV-5). Nous pouvons constater que la présence du film d'anticorps à la surface de l'électrode la rend rigoureuse et compacte.

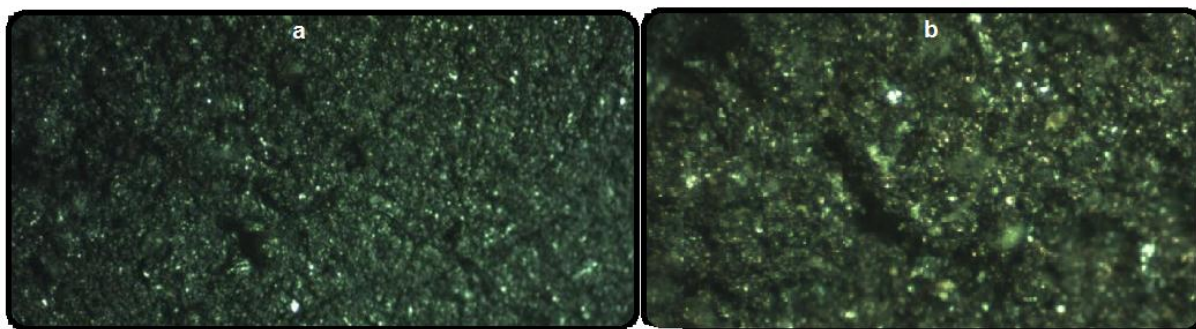


Figure IV-5 : Electrode de pâte de carbone phosphate avant modification (a) et Après modification par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b)

II.2. Optimisation des paramètres d'adsorption

II.2.1. Choix du temps de dépôt

Afin d'obtenir un temps de dépôt optimal du conjugué peroxydase-anticorps à la surface de l'électrode, celle-ci a été trempée à différents temps de contact, dans une solution du conjugué peroxydase-anticorps secondaire à une concentration fixe, allons de 2, 10, 15, 20 et 30 mn. La Figure 5 montre la superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire, à différents temps de dépôt. Après dépôt du film d'anticorps le voltammogramme présente des pics d'oxydation et de réduction, ce qui montre que le modificateur possède des propriétés redox. Les densités de courant augmentent jusqu'à 15 mn au delà, nous constatons une chute remarquable des courants Figure IV-6, probablement en raison de la formation d'un polymère non conducteur. Le temps de dépôt de 15 mn a été retenu pour la suite des expériences.

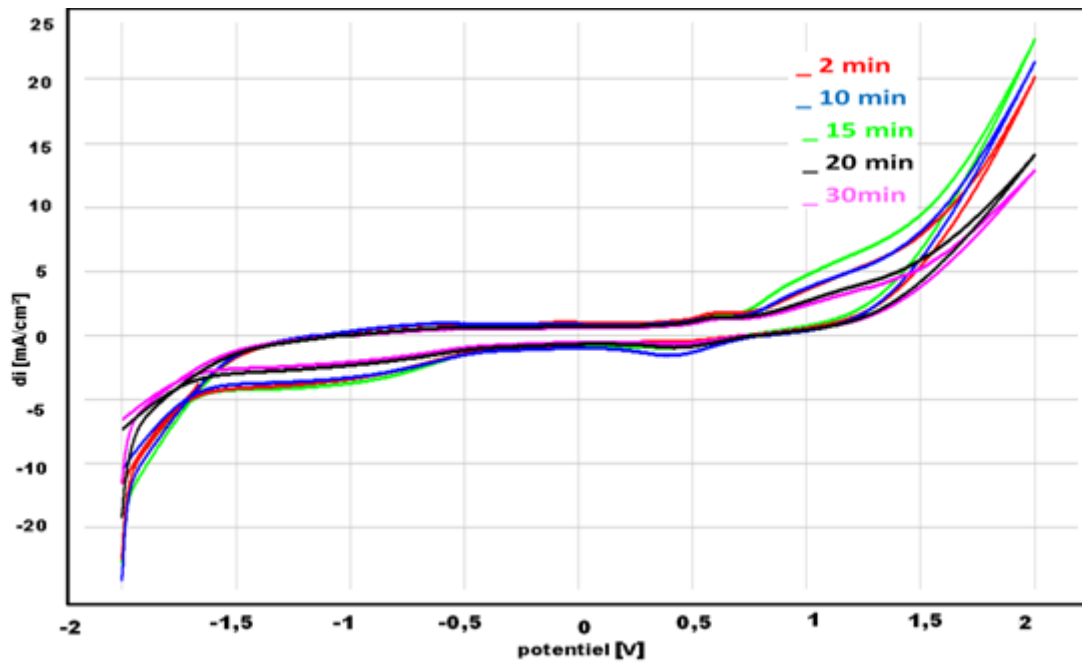


Figure IV-6 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7

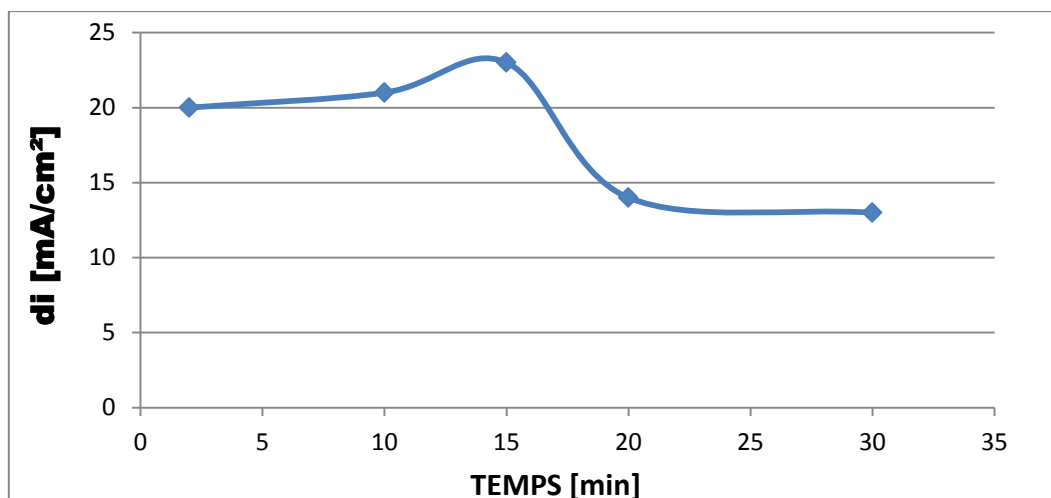


Figure IV-7 : Densité de courants en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS

II.2.2. Etude électrochimique de CPE-NP en fonction de la dilution du conjugué peroxydase-anticorps secondaire

Pour optimiser la concentration de conjugué peroxydase-anticorps secondaire, les électrodes à pâte de carbone ont été trempées dans des solutions du conjugué peroxydase-anticorps secondaire à différentes concentrations pendant 15 mn (temps de dépôt optimal). Les résultats sont illustrés dans la Fig. IV-8, la réponse augmente avec l'augmentation de la concentration du conjugué peroxydase-anticorps secondaire jusqu'à 2,5 mg/ ml, puis la

densité de courant diminué, donc une meilleure électroactivité de CPE-NP / PAS modifiée à une concentration de 2,5 mg/ ml de conjugué peroxydase-anticorps secondaire:

- À des faibles concentrations de conjugué peroxydase-anticorps secondaire, le signal est très bas. Les anticorps immobilisés sur la surface n'assurent pas un recouvrement complet de tous les sites de la surface.
- À des concentrations de 2,5 mg/ ml, il est évident que le signal augmente, révélant l'adsorption de conjugué peroxydase-anticorps secondaire sur la surface. Le conjugué peroxydase-anticorps secondaire assure un recouvrement complet de tous les sites de la surface
- À des concentrations plus élevées, une légère tendance révélant la saturation des sites de la surface.

La concentration 2,5 mg/ ml a été sélectionnée comme concentration optimale pour toutes les expériences pour maximiser la réponse et minimiser la quantité du conjugué peroxydase-anticorps secondaire utilisée.

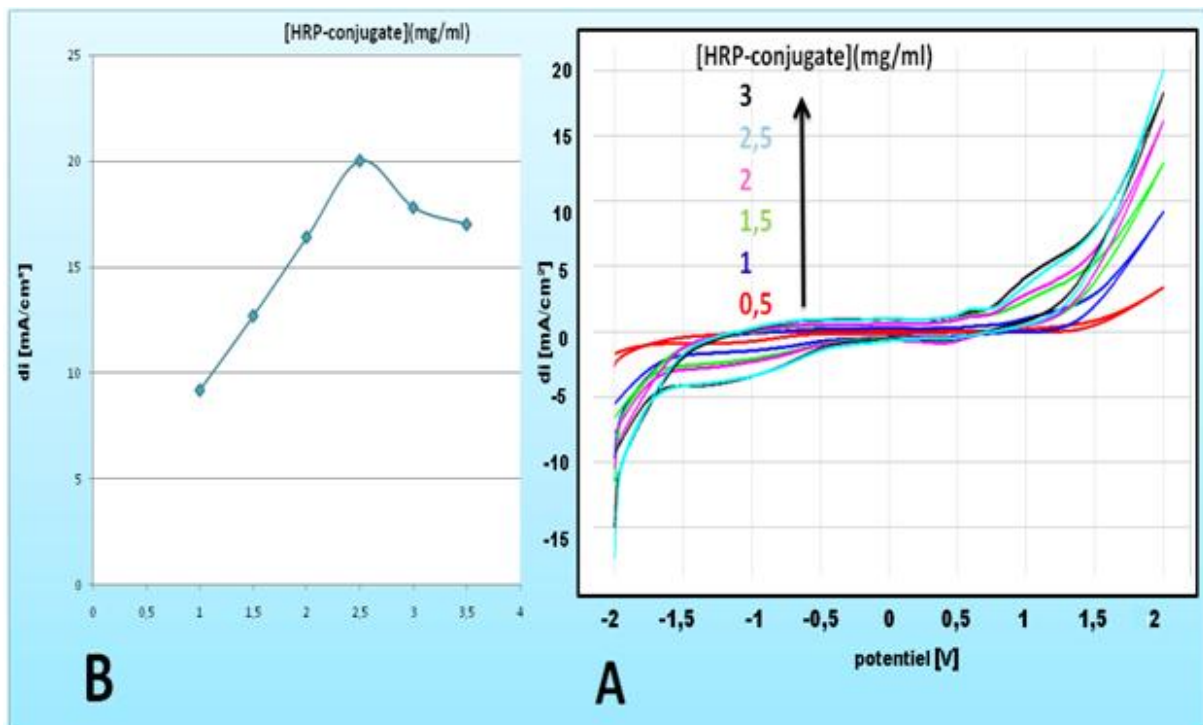


Figure IV-8 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP modifiée aux différentes concentrations de peroxydase-anticorps secondaire dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

II.3. Etude électrochimique de CPE-NP / PAS

II.3.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

L'électrode à pâte de carbone modifiée avec le conjugué peroxydase-anticorps secondaire par adsorption a été caractérisée en présence des anticorps. La Figure IV-9 illustre le voltamogramme cyclique enregistré pour l'électrode CPE-NP modifiée, en milieu NaCl (0,1M et pH = 7) en présence et en absence des anticorps. Nous constatons que la présence des anticorps se manifeste par l'apparition d'un pic de réduction à 0,2 V sur le voltamogramme.

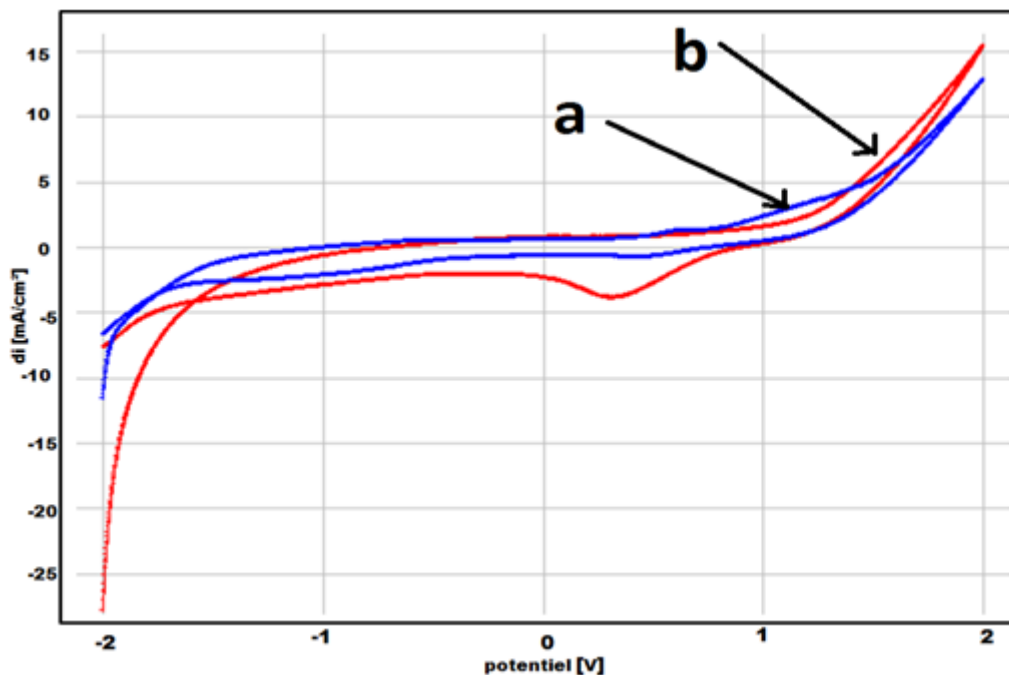


Figure IV-9 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS (a) sans anticorps et CPE-NP / PAS avec anticorps (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

II.3.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

L'exploration par voltammétrie à ondes carrée a donné les résultats reportés sur la Figure IV-10. Les anticorps se détectent à un potentiel de -0,2 V (dans la zone de potentiel allant de -2 à 2 V).

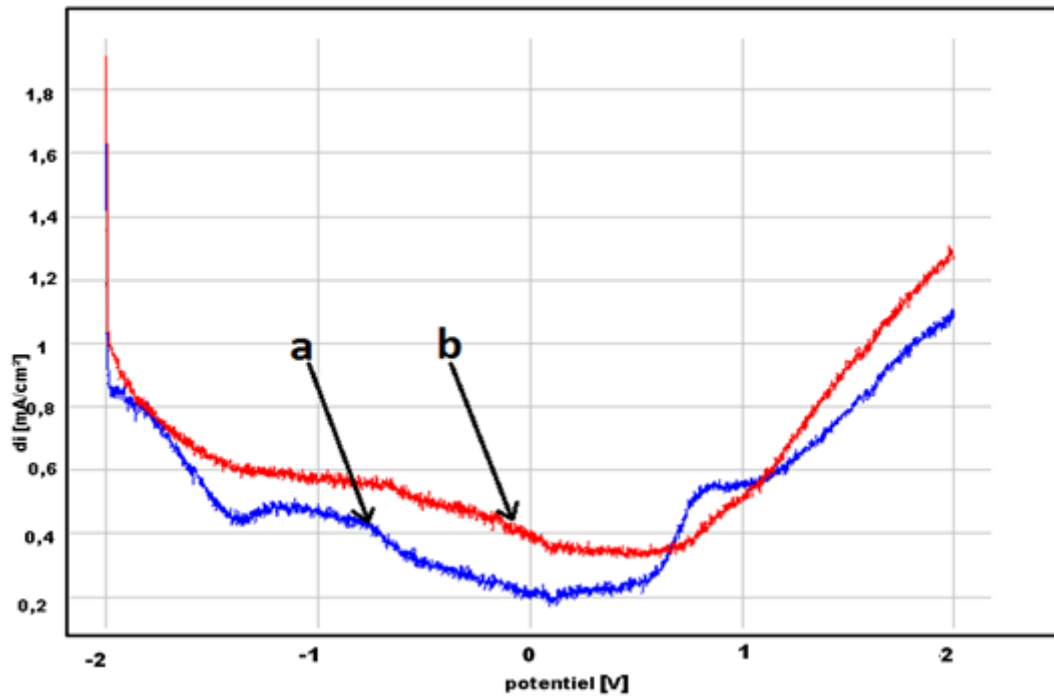


Figure IV-10 : Superposition des voltammétries à ondes carrées de CPE-NP / PAS (a) sans anticorps et CPE-NP / PAS avec les anticorps (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

III.3.3. Caractérisation morphologique

La surface de l'électrode à pâte de carbone et le phosphate avant et après modification par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire à 20 mn de temps de dépôt a été observée au microscope optique (Fig. IV-11). Le film modificateur forme une couche compacte et continue sur toute la surface.

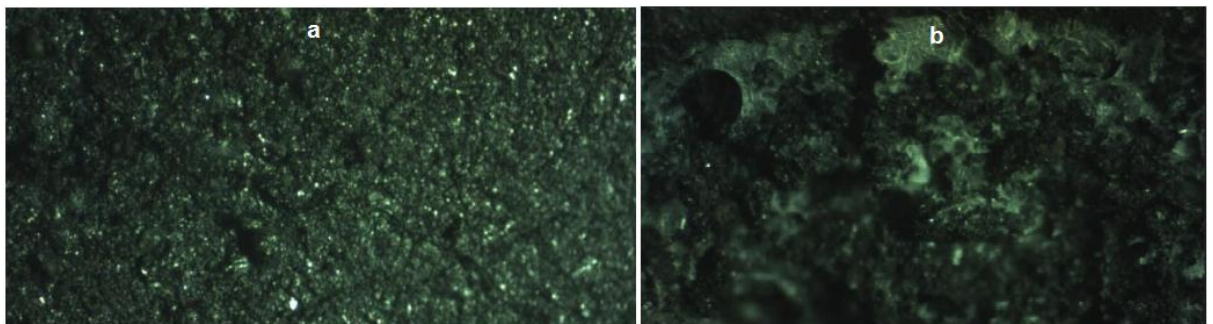


Figure IV-11 : Electrode CPE-NP / PAS avant incubation dans les anticorps (a) et après, 20 mn d'incubation dans les anticorps (b)

La représentation schématique de la préparation d'une couche d'immuno-détection est schématisée comme suit :

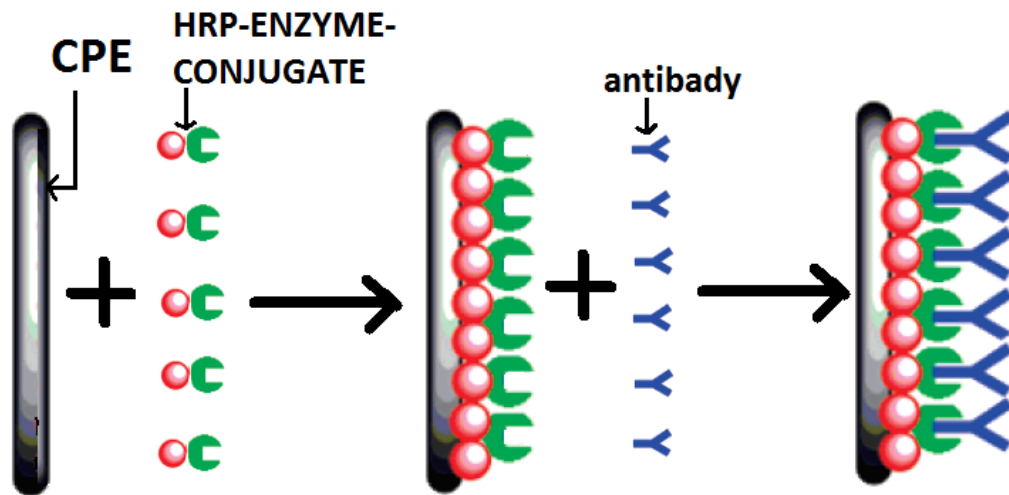


Figure IV-12 : représentation schématique de la préparation d'une couche d'immunodétection

II.4. Optimisation des conditions expérimentales

II.4.1. Etude électrochimique de l'effet du temps d'incubation des anticorps

III.4.1.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

Le capteur immunologique CPE-NP / PAS a été incubé avec une solution contenant des anticorps à différents temps de contact (Figs IV-13 et 14). On observe une alternance au niveau de la densité de courant des pics enregistrés en fonction du temps de contact avec les anticorps, pendant les 20 premières minutes de contact avec les anticorps, la densité de courant de pic cathodique augmente rapidement avec le temps d'incubation, ce qui traduit une bonne électroactivité de l'électrode due à l'affinité des anticorps avec le peroxydase-anticorps secondaire, qui forme une liaison très forte. Au-delà de 20 min, Les densités de courant se stabilisent en raison de la saturation des sites. Ainsi, le temps de contact qui sera adopté par la suite est 20 minutes.

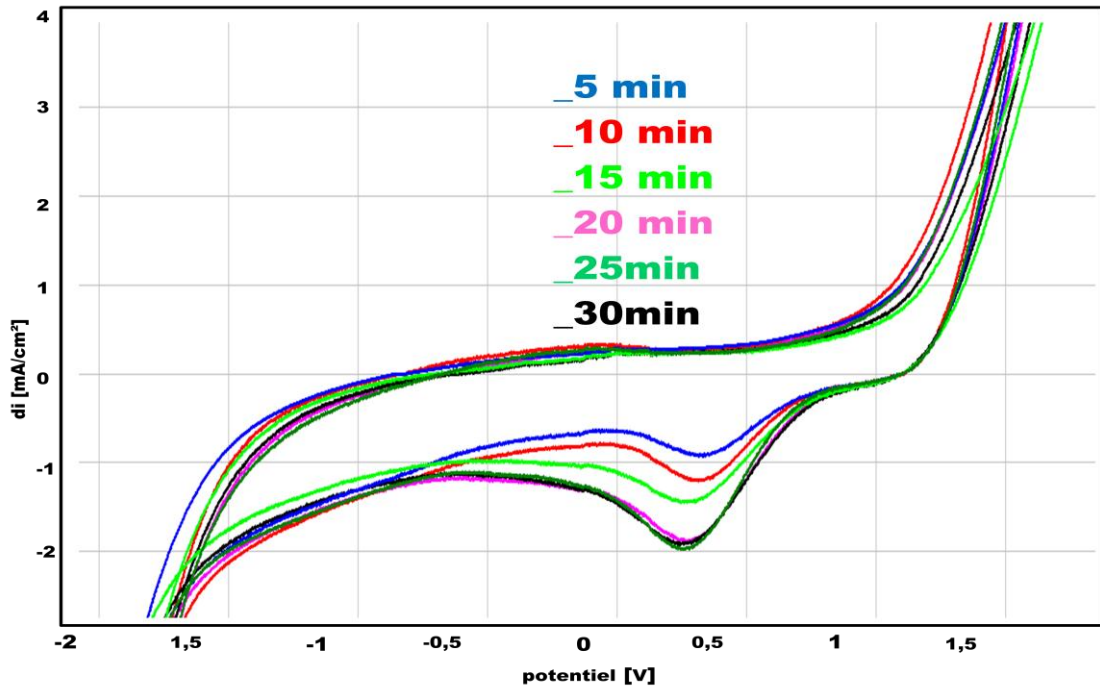


Figure IV-13 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7

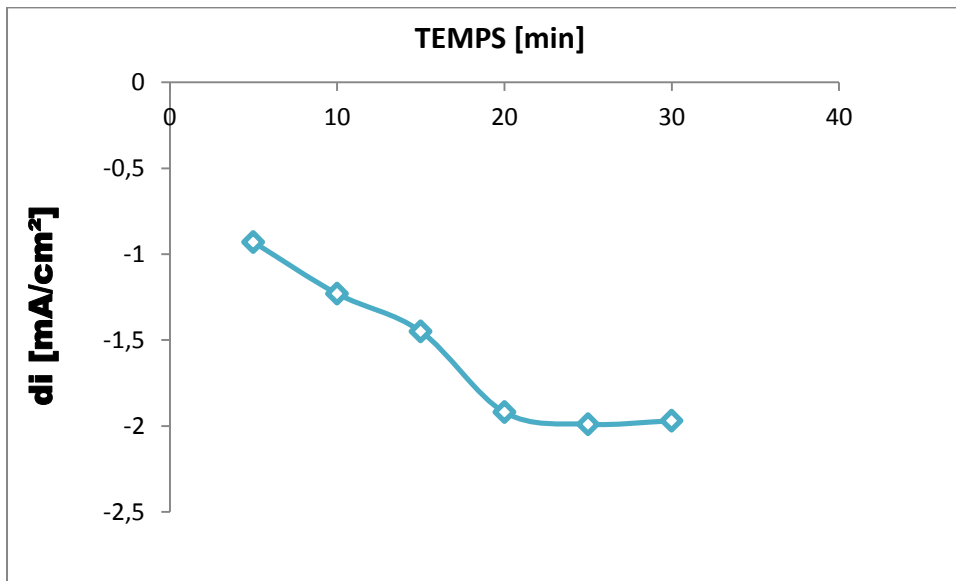


Figure IV-14 : Densité du courant en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps

III.4.1.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

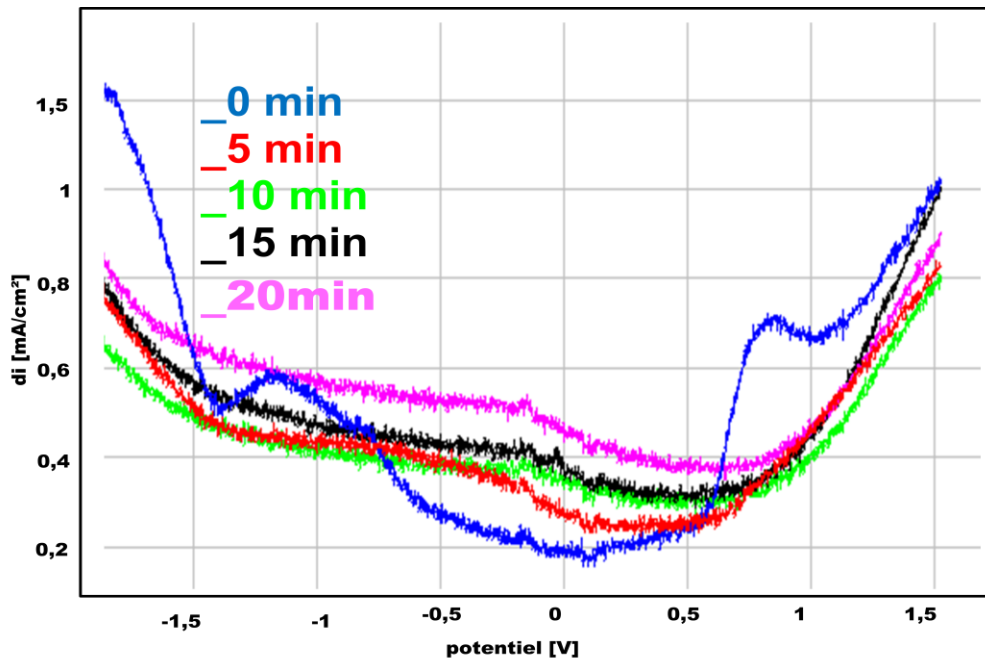


Figure IV-15 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE-NP / PAS aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7

II.4.1.3. Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps

Après chaque temps d'incubation de l'électrode élaborée dans la solution des anticorps, des prélèvements de la solution d'incubation ont été réalisés dans le but de mesurer la densité optique de l'échantillon après la réalisation du test Elisa. Pour chaque échantillon nous avons calculé le pourcentage (% S/N). Sur le tableau IV-6 nous résumons les résultats obtenus.

Tableau IV-6 : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps

Temps (mn)	5	10	15	20	30	40	50
DO	0,235	0,265	0,272	0,289	0,3	0,298	0,3
% S/N	0,144	0,162	0,166	0,173	0,184	0,182	0,184

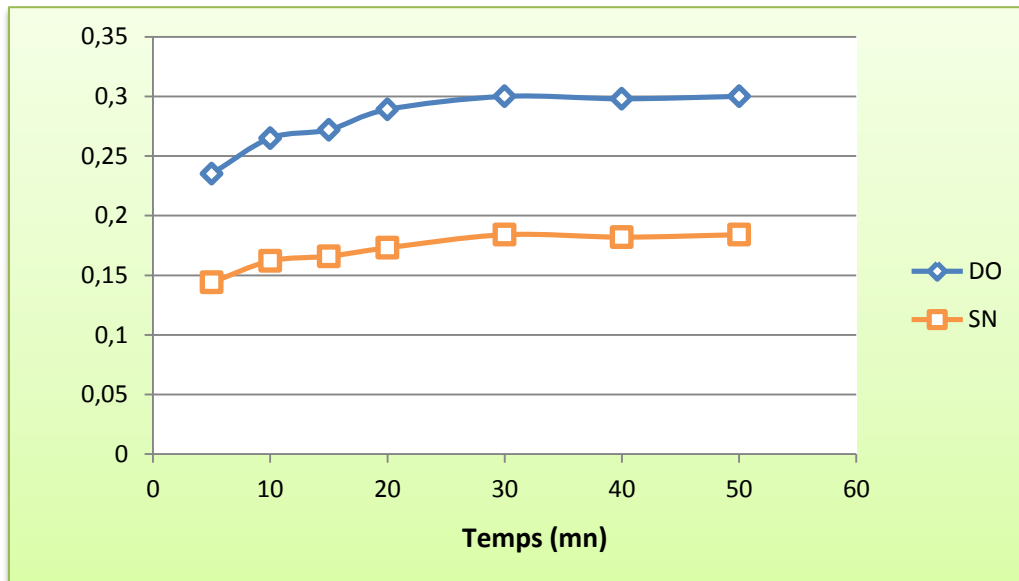


Figure IV-16 : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS

Avec les anticorps

On remarque que la DO et le S/N augmentent en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps, ce qui se traduit par une diminution de la quantité des anticorps restant dans les solutions, et exprime la force de l'électrode élaborée à adsorber une bonne quantité d'anticorps.

II.4.2. Etude de l'effet vitesse de balayage sur CPE-NP / PAS en présence des anticorps

La Figure IV-17 ; 18 illustre les voltamogrammes cycliques enregistrés par une électrode CPE-NP- peroxydase-anticorps secondaire, à différentes vitesses de balayages de potentiel. L'allure générale des voltamogrammes n'est pas affectée, en revanche l'effet de la vitesse de balayage entraîne une augmentation remarquable des densités des courants du pic et leur déplacement vers les valeurs anodiques. Plus la vitesse de balayage devient importante, plus la surface de l'électrode libère des sites actifs.

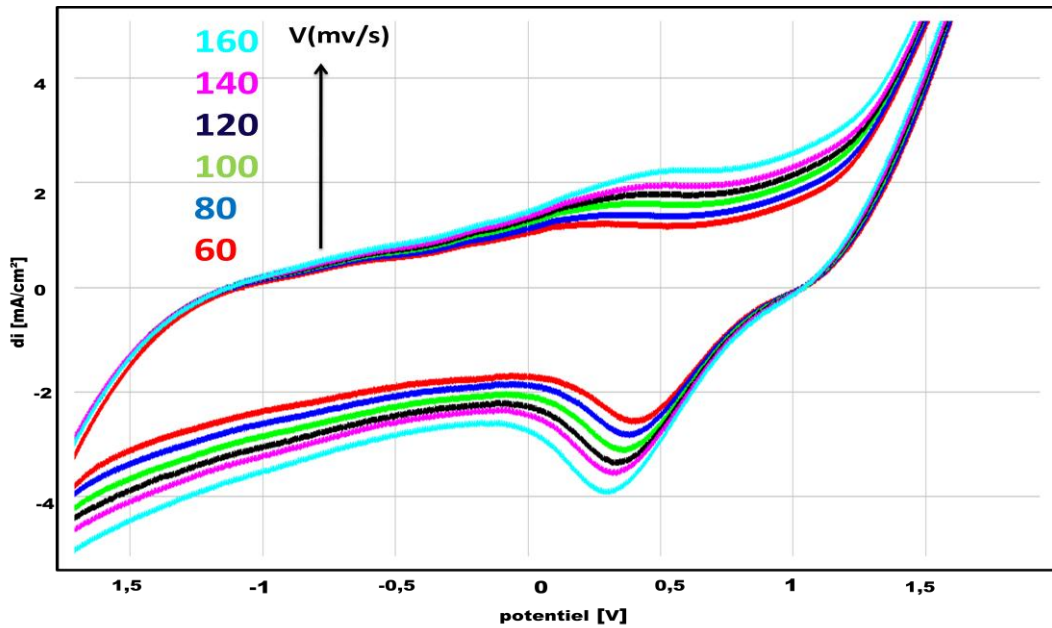


Figure IV-17 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différentes vitesses de balayage, 60, 80, 100, 120,140, 160, mV/s dans NaCl à 0,1 M ; de -2V à 2V

Tableau IV-7 : Densité du courant en fonction de vitesses de balayage

Racine de vitesse de balayage en mV/s	7,74	8,94	10	10,95	11,83	12,64	13,41	14,14
P2	-2,6	-2,84	-3,16	-3,38	-3,62	-3,96	-3,98	-4,05
P1	1,13	1,41	1,54	1,72	1,91	1,99	2,22	2,27

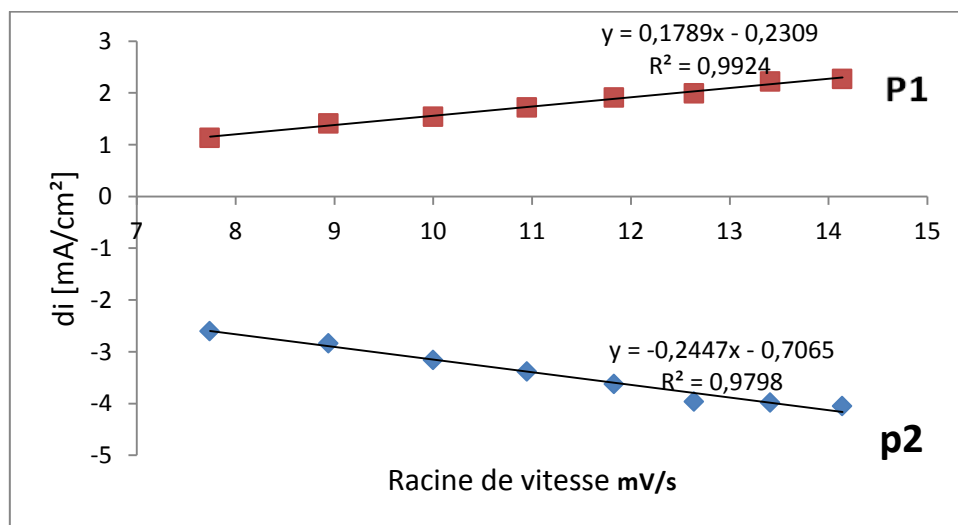


Figure IV-18 : Densité du courant de pic d'oxydation et de réduction en fonction de vitesses de balayage

III.4.3. Etude de l'effet du pH de la solution d'incubation sur les performances de l'électrode CPE-NP / PAS.

Le pH de la solution d'incubation est un facteur déterminant dans les performances du capteur, puisque l'activité des anticorps et des anticorps secondaire peut être influencé par l'acidité de la solution. La figure IV-19 illustre l'effet du pH de la solution électrolytique NaCl ($0,05 \text{ mol l}^{-1}$) contenant les anticorps sur la hauteur du pic de réduction. La courbe atteint sa valeur optimale à pH 7,0, puis diminue à pH 8,0. Ce qui laisse suggérer que CPE-NP / PAS atteint son pouvoir maximum d'adsorption des anticorps à pH 7, par conséquent, le pH 7,0 a été choisi comme pH de la solution de détection.

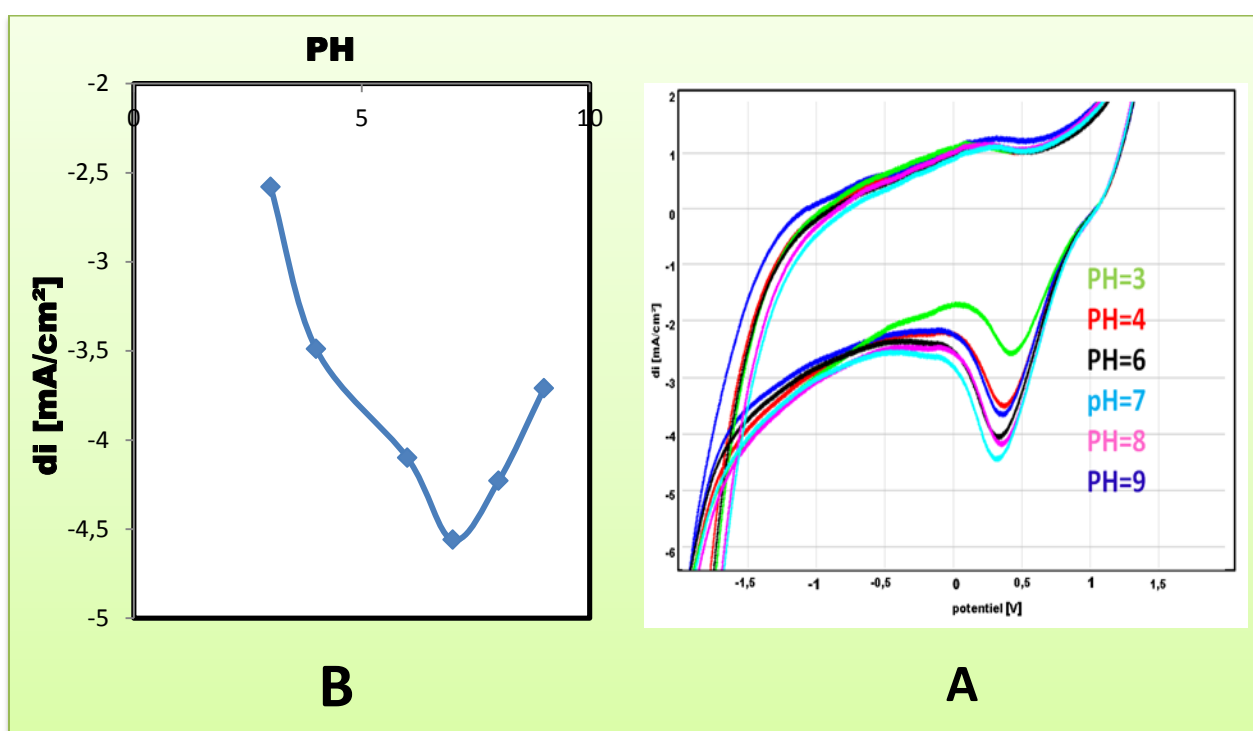


Figure IV-19 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différents pH en présence des anticorps dans NaCl à $0,1 \text{ M}$; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

II.4.4. Etude de l'effet du facteur de dilution des anticorps (l'effet de concentration)

II.4.4.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

L'immunocapteur a été incubé dans différents milieux contenant des concentrations croissantes des anticorps pendant 20 min. On enregistre une augmentation de la densité de courant, au fur et à mesure que la concentration des anticorps augmente. Comme le montre la Figure IV-20, le pouvoir de détection de l'électrode augmente donc avec l'augmentation de la charge des anticorps jusqu'à C2, puis se stabilise:

- À des faibles concentrations des anticorps adsorbés, le signal est très bas mais pas nul, la quantité des anticorps immobilisés à la surface est insuffisante,
- À des concentrations plus élevées, le signal augmente, révélant l'adsorption spécifique des anticorps sur le conjugué adsorbé puis on assiste à la stabilisation des densités de courant à des concentrations élevées, Ce comportement électrochimique est confirmé par voltammétrie à ondes carrées.

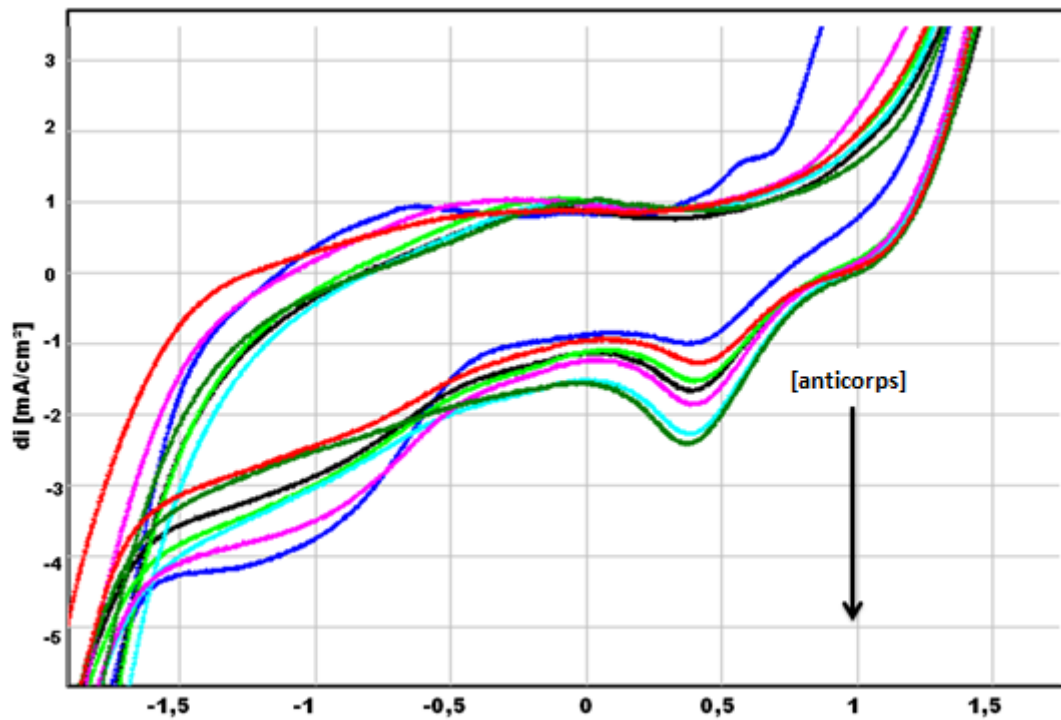


Figure IV-20 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différentes concentration des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

III.4.4.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

La Figure IV-21 présente les courbes typiques de la voltamétrie à ondes carrées enregistrées pour l'électrode CPE-NP / PAS, qui a été incubée dans des milieux contenant des différentes concentrations des anticorps. L'intensité de pics caractéristique augmente linéairement avec la concentration des anticorps.

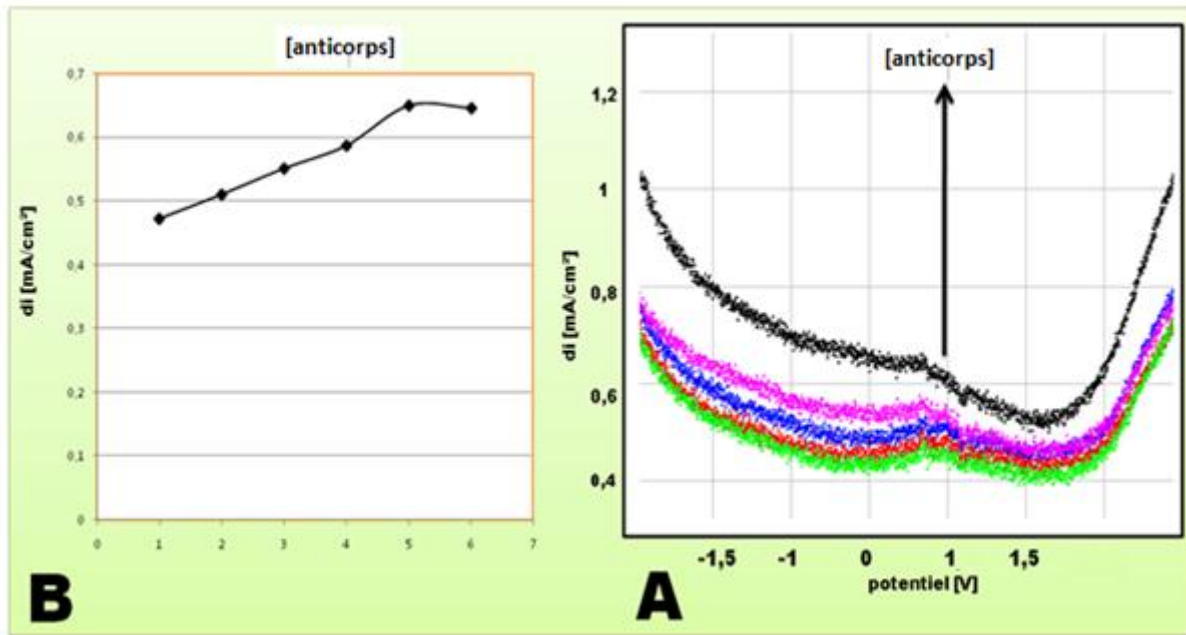


Figure IV-21 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE-NP / PAS à différentes concentration des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

III.4.4.3. Caractérisation par spectroscopie d'impédances électrochimiques

III.4.4.3.1. Paramètres des spectres d'impédances électrochimiques

Les diagrammes d'impédance dans le plan Nyquist, sont représentés sur la Figure IV-22. Les paramètres déduits des spectres d'impédance électrochimiques, tels que le diamètre de la boucle qui représente la résistance de transfert des électrons et la capacité de l'électrode sont présentés dans le tableau IV-8. Les diagrammes sont sous formes d'un demi cercle qui pourra correspondre au transfert des électrons (R_t). R_t baisse lorsque la concentration augmente, ce qui confirme les résultats précédents.

Tableau IV-8: Paramètres des spectres d'impédance électrochimiques de CPE-NP / PAS

C ($\mu\text{g/ml}$)	Diamètres (kohm.cm^2)	C ($\mu\text{F/cm}^2$)
C1	27,71	65,12
C2	12,96	125,6
C3	7,90	140,0
C4	9,18	153,5
C5	5,85	194,2
C6	3,68	309,3

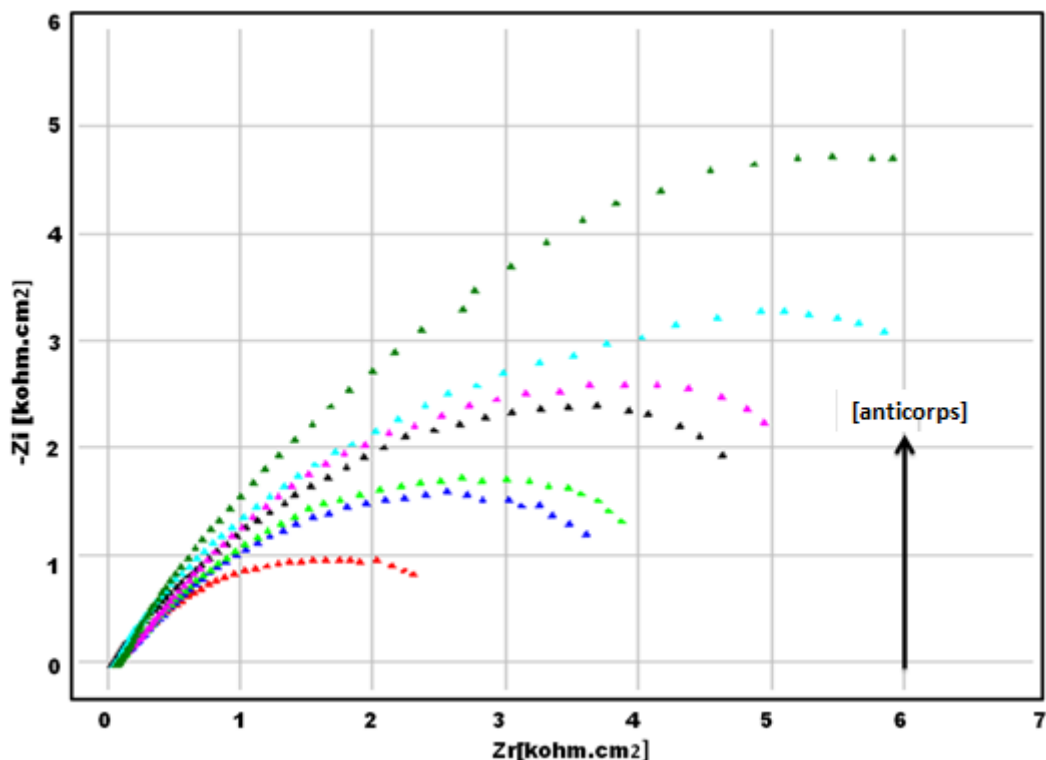


Figure IV-22: Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP / PAS à différentes concentrations des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; de 100 mHz à pH = 7

II.4.4.4. Etude de l'effet de la densité optique (DO) des anticorps sur les performances de CPE-NP / PAS.

II.4.4.4.1. La courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été tracée dans les conditions optimales, précédemment décrites, à l'aide de la voltammétrie cyclique. L'intensité de courant du pic cathodique est proportionnelle à la densité optique (DO) des anticorps, obtenu après le test ELISA, dans la gamme de concentrations comprises entre C6 à C1 (Fig. IV-23). Cette linéarité est exprimée par la relation suivante :

$$D_i = 11,79 \text{ DO} - 5,292 \quad R^2 = 0,982$$

Tableau IV-9 : Influence de la concentration des anticorps sur l'intensité des pics de réduction Obtenus par VC à la surface de CPE-NP / PAS

ECH	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Densité de courant	-0,75	-0,92	-1,28	-1,53	-1,86	-2,28
DO	0,38989	0,36891	0,34132	0,31124	0,28523	0,26512

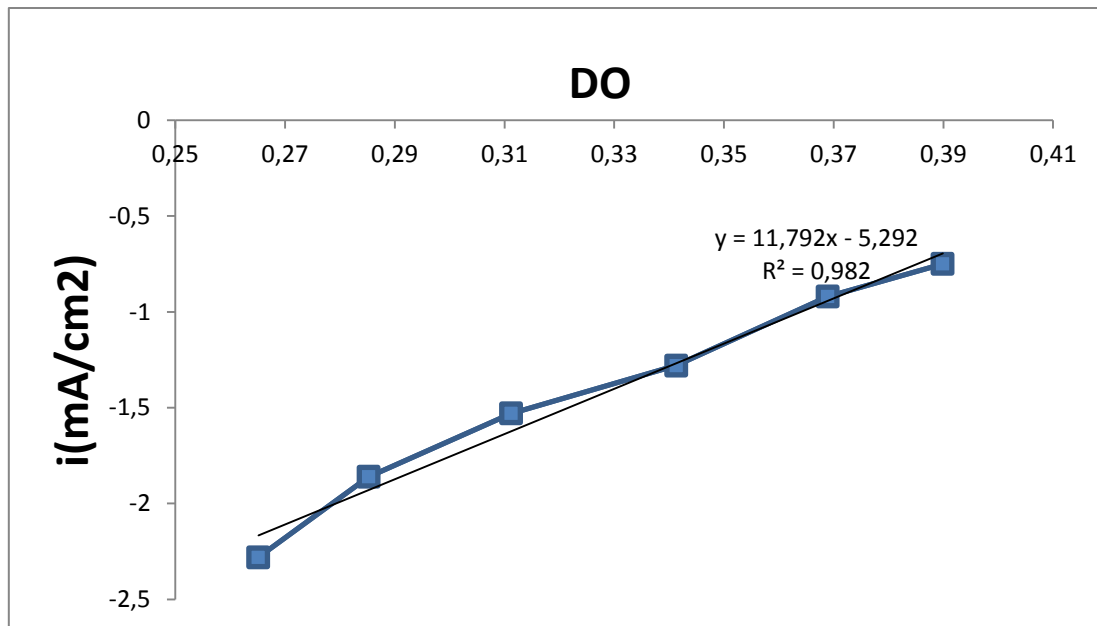


Figure IV-23 : Densité de courant en fonction de la densité optique

II.4.4.5.1. Détermination des limites de détection et de quantification de CPE-NP / PAS

D'après Miller et Miller [2], la déviation standard du courant moyen (SD) mesuré peut être modélisée par l'équation:

$$SD = \frac{1}{(n-2)} \sum_{j=1}^n (i_j - I_j)^2$$

Où i_j est la valeur expérimentale du courant identifié à la manipulation j et I_j est la valeur correspondante calculée à la même densité optique en utilisant l'équation de calibration. n est le nombre de mesure effectué. La valeur de SD (déviation standard) calculée est utilisée pour la détermination de la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ).

Pour l'électrode élaborée, la limite de détection est de $1,8 \cdot 10^{-3} M$ et la limite de quantification est de $7,2 \cdot 10^{-2} M$.

III.5. Application analytique

L'applicabilité de l'immunocapteur pour la détection des anticorps dans le sérum de caille a été démontrée (Figure IV-24). 5 échantillons de sérum de caille avec les différents degrés d'infection ont été testés. Les résultats donnés dans le Tableau IV-10. confirment que le capteur immunologique répond aux exigences analytiques attendues pour évaluer le degré de l'infection par *West Nile* dans le sérum de caille.

Tableau IV-10: L'applicabilité de l'immunocapteur pour la détection des anticorps dans le sérum de caille

échantillon Sérum de caille (2 ml)	volum ajoutée de sérum positif μL	Current/ mA	DO trouvée	DO après teste Elisa	le pourcentage		le pourcentage	
					S/N trouvée	positifs	S/N après teste Elisa	positifs
1	100	-1,23	0,3445	0,35989	33%	positifs	34%	positifs
2	150	-1,61	0,3122	0,32132	30,3%	positifs	30,8%	positifs
3	200	-1,92	0,2860	0,29124	27,5%	positifs	28%	positifs
4	250	-2,47	0,2393	0,25523	23%	positifs	24,3%	positifs
5	300	-3,78	0,1282	0,1412	12,32%	positifs	13,35	positifs

Interprétation: Pour chaque échantillon; nous avons calculé le pourcentage (% S/N) par la relation suivante :

$$S/N = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO}_{CN}} \times 100$$

Où : DO_{CN} : Contrôles Négatifs = 0,96023564

- Les échantillons présentant un S/N inférieur ou égal à 40% sont considérés comme positifs
- Les échantillons présentant un S/N supérieur à 50% sont considérés comme négatifs

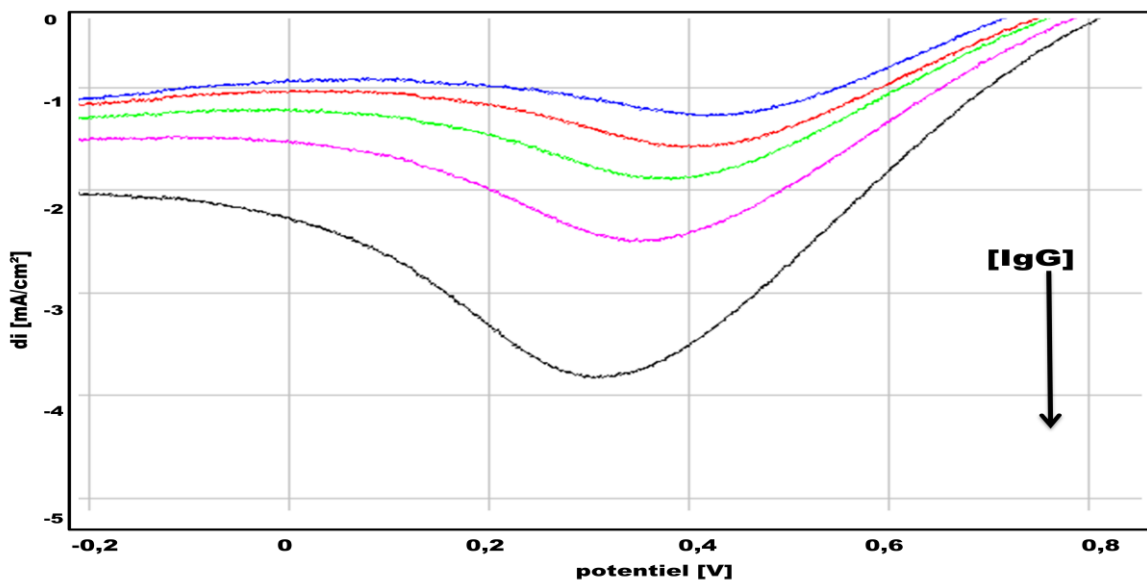


Figure IV-24 : Superposition des voltammogrammes de CPE-NP / PAS à différentes concentrations des anticorps dans échantillon Sérum de caille; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; $\text{pH} = 7$

Conclusion

Le système développé permet une détermination fiable des anticorps dans le sérum. Il offre aussi certains avantages, tel que la simplicité de fabrication, la rapidité de mesure et étant renouvelable par simple manipulation.

La gamme dynamique linéaire et la limite de détection ont été déterminées après optimisation de divers paramètres expérimentaux. En outre, la sélectivité, la stabilité et la régénération de la surface de l'immunosenseur ont été étudiés. L'application analytique a été réalisée sur l'échantillon de sérum de caille, et les résultats ont été comparés avec la méthode classique ELISA.

Références bibliographique

[1] Phosphate Naturel de la Région de Khouribga (Maroc), CERPHOS 37, Bd My Ismail, Casablanca, Maroc.

[2] ID.VET INNOVATIVE DIAGNOSTIQUE; 167 RUE MEHDI BEN BARKA ZONE GAROSUD_34070 MONTPELLIER-France

[3] D.Sboui 2016 développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de legionella pneumophila dans les échantillons environnementaux

[4] T.Kreisig, A. Prasse, K.Zscharnack, D.Volke, and T.Zuchner His-tag protein monitoring by a fast mix-and-measure immunoassay 2014; 4: 5613.

CHAPITRE V

Détermination électrochimique de l'adénosine par électrode à pâte de carbone modifiée par le phosphate naturelle

Introduction

Le rôle de l'adénosine extracellulaire a été démontré dans différentes études. En effet, l'adénosine extracellulaire est impliquée dans la régulation des fonctions du système nerveux central [1], de l'immunité et de l'inflammation [2,3], du foie [4], du système urinaire [5], de la différenciation cellulaire, de la régénération tissulaire [6], etc. En outre, l'adénosine extracellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires [8], neuronales (Parkinson, Huntington, Alzheimer, Epilepsie) [9], les cancers [10,11] et le diabète chez l'homme [12]. Où La détection sensible de l'adénosine est d'une grande importance dans le diagnostic des maladies cliniques. Ces dernières années, diverses approches ont été développées pour détecter l'AD, telles que l'électrophorèse capillaire [13], l'électrochimie [14, 15,16], la fluorescence [17], la chimie. La luminescence [18], la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) sont les plus populaires en raison de leur sensibilité et de leur sélectivité [19,20]. Mais les limitations inhérentes, telles que la préparation sophistiquée des échantillons, les instruments coûteux, les processus de détection fastidieux et l'exigence d'opérateurs bien formés, sont devenus des obstacles [22]. Pour surmonter ces défauts, nous proposons une méthode électrochimique rapide, sensible et efficace pour l'identification et la quantification de l'adénosine.

Dans cette étude, une méthode de voltamétrie électrochimique sensible pour l'analyse de l'adénosine (AD) extracellulaire utilisant une pâte électrochimique à base de carbone (CPE) modifiée avec un matériau poreux, tel que le phosphate naturel (NP), a été entreprise.

I. Partie expérimentale

I.1. Appareillages

Les expériences électrochimiques ont été réalisées en utilisant un potentiostat voltalab (modèle PGSTAT 100, Eco Chemie BV., Utrecht, Pays-Bas) piloté par le logiciel de traitement de données des systèmes électrochimiques à usage général (logiciel Master 4). Un système conventionnel à trois électrodes.

I.2. Réactifs

I.2.1. Le carbone graphite

La poudre commerciale de graphite a été fournie à partir par (Carbone, Lorraine, référence 9900). Cette poudre a été utilisée sans subir un traitement préalable.



Figure V-1 : Poudre commerciale de graphite

I.2.2.L'adénosine

L'adénosine a été fournie par Génome [7]. Toutes ces solutions ont été préparées avec de l'eau bi distillée.

I.2.3.Le Phosphate Naturel

Le phosphate naturel (PN) utilisé dans ce travail provient de la région de Khouribga au Maroc [23]. Avant son utilisation, cette poudre a été tamisée, calcinée à 900°C pendant une heure afin de la débarrasser de tous composés organiques susceptibles d'interférer dans nos résultats, puis lavée et séchée.



(a)



(b)

Figure V-2 : Poudre de phosphate naturel : (a) avant calcination, (b) après calcination

I.2.3.1 Composition et caractérisation du Phosphate Naturel

Les phosphates naturels sédimentaires tiennent leur source des dépôts des excréments d'espèces marines sur fond océanique. Ils sont généralement formés en zone côtière peu profonde. Les gisements exploités dans plusieurs parties du monde, se présentent avec des

propriétés chimiques et physiques très contrastées. Les phosphates marocains sont de loin les plus importants aussi bien en quantité qu'en qualité [24].

I.2.3.2 Composition minéralogique du Phosphate Naturel

Les phosphates naturels comportent une variabilité texturale et structurale liées à leurs origines. Le phosphore se trouve combiné sous différentes espèces minéralogiques dont la plus répandue, est la fluoroapatite carbonatée cristallisée dans le système hexagonal P63/m.

Cette apatite se trouve plus ou moins substituée et/ou associée à de multiples composés minéraux et organiques qui forment la gangue. Le tableau 1 ci-dessous donne la composition minéralogique du phosphate naturel de la région de Khouribga utilisé dans cette étude.

Tableau V-11 : La Composition Minéralogique de la Région de Khouribga [24]

Elément	CaO	P ₂ O ₅	F	CO ₂	NA ₂ O	MGO	K ₂ O	AL ₂ O ₃	FE ₂ O ₃	SIO ₂
% masse	52,70	33,60	4,30	4	0,66	0,28	0,05	0,45	0,20	1,20

La gangue peut être soit extérieure aux grains phosphatés (éxogangue), soit incluse dans les grains (endogangue). La taille, la nature, et la quantité de la gangue influencent fortement les propriétés de l'apatite phosphatée. Les minéraux les plus réponsus sont:

- Les carbonates sous deux formes principales: la calcite CaCO₃ et la dolomite (Ca, Mg(CO₃)₂).
- Les minéraux siliceux sous différentes formes: quartz (SiO₂), l'opale (SiO₂, nH₂O), et divers silicates d'alumine de fer et de magnésium.
- Les sulfates représentés par le gypse CaSO₃, 2H₂O et l'anhydrite CaSO₄.
- Le fer sous forme oxyde (Fe₂O₃) ou hydroxyde.
- La matière organique généralement en faible abondance 0,1 % à 0,6 % résultant de la transformation des restes d'organismes vivants et de débris organiques divers enfuis au moment de la sédimentation phosphatée. Il s'agit de bitumes, d'acides humiques, fulviques, aminés.

I.2.3.3 Composition de la matière phosphatée

Parmi tous les phosphates, les apatites sont les plus abondantes. Le composé le plus fréquent dans la nature est la fluoroapatite avec ses variétés carbonatées et hydroxylées, cette

apatite se trouve plus ou moins substituée avec d'autres éléments. Les substitutions les plus importantes dans la plupart des gisements sédimentaires sont:

- Substitution des ions fluorures par les ions chlorures ou hydroxyles pour former la chloroapatite et l'hydroxyapatite.
- Substitution des ions orthophosphates PO_4^{3-} par les carbonates CO_3^{2-} pour donner une fluoroapatite carbonatée (francolite).
- Substitution de Ca^{2+} par Na^+ et Mg^{2+} Les hydroxyapatites carbonatées sont d'un intérêt primordial pour les biologistes, car ces composés sont les principaux constituants des os et des dents de mammifères.

I.2.3.4 Structure des apatites

Les apatites répondent à la formule générale $\text{Me}_{10}(\text{RO}_4)_6\text{X}_2$, où M est un métal bivalent (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ln^{2+} ), RO_4 un anion trivalent (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , MnO_4^{3-} ), et X est un anion monovalent (F^- , Cl^- , OH^- ). Ces matériaux constituent une famille cristallographique de composés solides isomorphes qui cristallisent dans le système hexagonal. Les Figures V-3 et V-4 représentent la projection de la maille de l'hydroxyapatite.

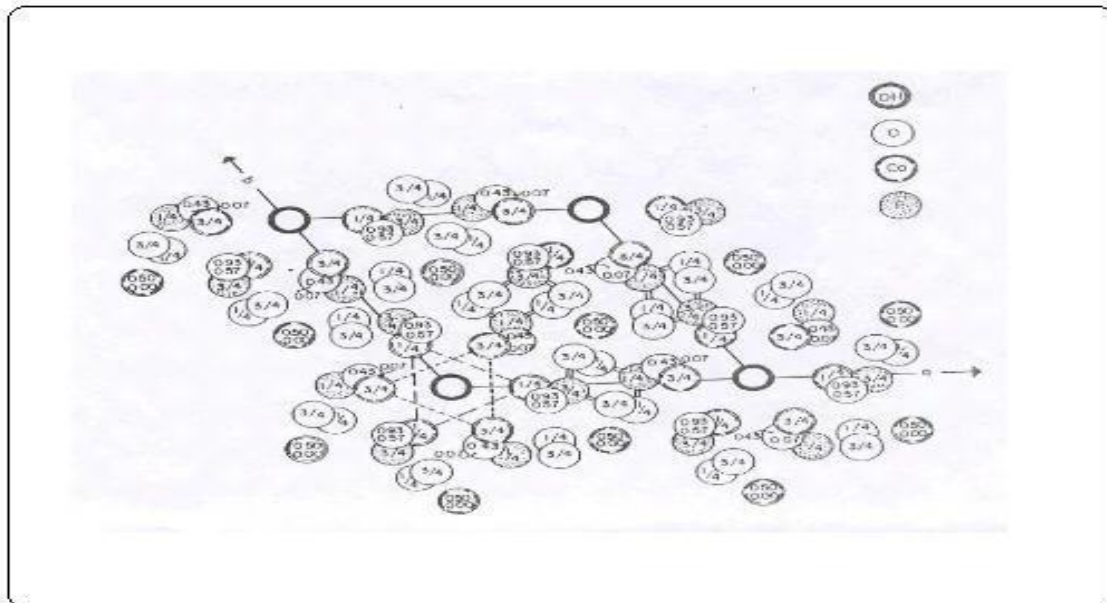


Figure V-3 : Projection de la maille hexagonale sur le plan 001 de l'hydroxyapatite [25].

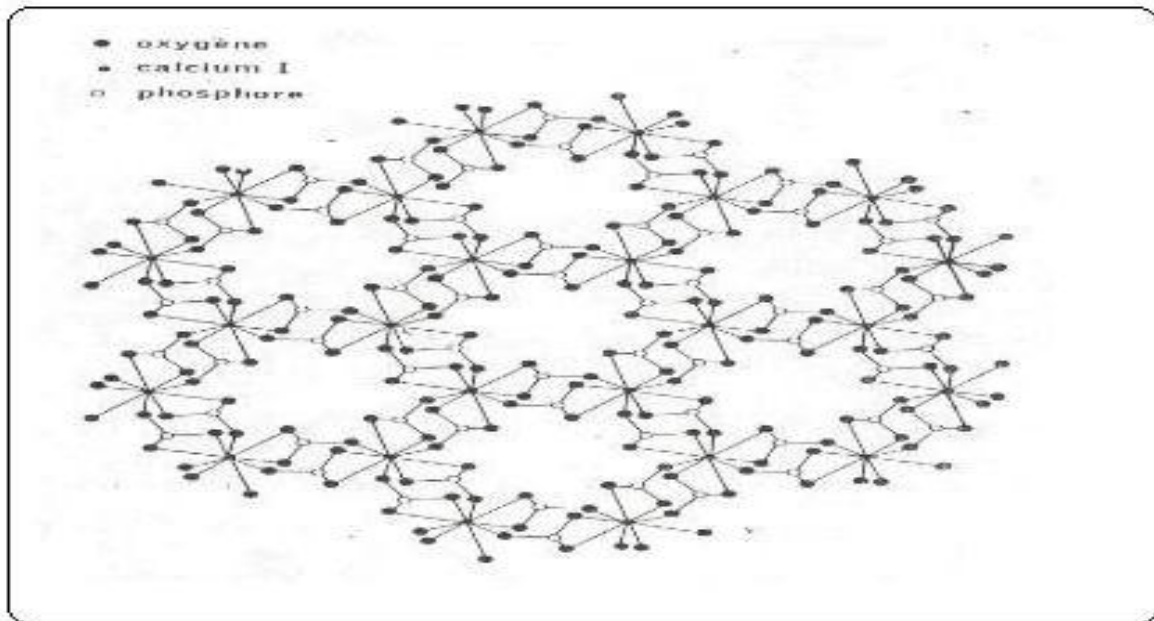


Figure V-4 : Projection sur le plan de base 001 de la structure de l'apatite on a retiré les ions OH ainsi que les ions calcium qui entourent l'axe sénaire hélicoïdal afin de mettre en évidence les tunnels) [25]

I.2. 4. Préparation de sérum

I.2. 4.1 Equipement et infrastructures

Tableau V-12 : Equipement et infrastructures

Matériel	Modèle / Marque	Fournisseur
Centrifugeuse vacutainer 5ml	Sigma 3-16K	Bioblock
Pipette 1000	Gilson P1000	Genome Biotechnologies
Cônes 1000		
Tubes eppendorf safe-lock 1.5ml ou 2ml	Eppendorf	
Marqueur fin indélébile		
Gants latex		
Frigo ou congélateur -20°C		



Figure V-5 : Photographie Centrifugeuse Sigma 3-16K avec ses portoirs Vacutainer 5ml.

I.2. 4.2 procédure de Préparation de sérum

- ✓ Stocker les tubes de sang à température ambiante (20-25°C), verticalement, pendant 3 à 8 h après la prise de sang (vérifier l'heure)
- ✓ Centrifuger à température ambiante à 5000 rpm pendant 5 minutes
- ✓ Récupérer le sérum à l'aide d'une pipette, sans aspirer de sang coagulé.
- ✓ Déposer le sérum dans un eppendorf identifié (bague et date) de 1.5 ou 2ml, sans dépasser respectivement 1 ou 1.5ml (risque d'explosion du tube lors de la congélation)
- ✓ Le culot est ensuite récupéré à l'aide d'une pipette et d'un cône dont l'extrémité aura été coupée, et déposé dans un tube eppendorf identifié de 1.5 ou 2 ml.
- ✓ Les tubes sont stockés dans des portoirs en polystyrène, identifiés, en congélateur - 20°C ou -80°C.

I.3. Procédure de Préparation des électrodes à pâte de carbone modifiées par le phosphate Naturel

L'étape la plus importante dans la préparation de l'électrode consiste au choix du rapports NP/CPE (dans ce travail 50% en poids) [26], qui donne le meilleur résultat, suivi de la préparation de la pâte, en mélangeant la poudre de carbone graphite avec le phosphate et l'huile de paraffine utilisée comme liant, puis une partie du matériau composite résultant était compressée dans un cylindre en PTFE. La surface géométrique de l'électrode de travail est de 0,1256 cm². Le contact électrique est assuré par une barre de carbone.

L'électrode préparée est immergée dans une solution contenant une concentration bien définie d'adénosine, l'effet du temps d'accumulation a été étudié. Après rinçage à l'eau distillée, l'électrode est transférée dans la cellule de mesure contenant l'électrolyte support, NaCl (0,1 M). La solution a été désoxygénée en faisant barboter de l'azote pur avant chaque

mesure électrochimique. La voltamétrie cyclique a été enregistrée dans la gamme de potentiel comprise entre -2 V et 2 V. Les conditions optimales ont été établies en mesurant les courants de pics essentiels en fonction de tous les paramètres qui ont de l'influence en l'occurrence le temps de préconcentration, pH de la solution de mesure, la vitesse de balayage et la composition de la pâte. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante.

II. Résultats et discussion

II.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode à pâte de carbone avant et après modification par le phosphate naturel

II.1.1. Comportement électrochimique du NP-CPE

Les voltammogrammes (Fig.V-6) enregistrés pour les deux électrodes, en milieu électrolytique, présentent des allures différentes, ce qui suggère que la pâte de carbone est bien modifiée par le phosphate naturel. Le voltammogramme de l'électrode à pâte de carbone ne présente aucun pic dans le domaine de potentiel considéré, c'est une caractéristique du carbone graphite qui ne manifeste aucune activité, vis à vis, du potentiel. En revanche, nous pouvons constater l'apparition de deux pics, Le premier anodique à environ 1,05 V et le second cathodique vers -1,2 V, sur le voltammogramme enregistré en utilisant l'électrode NP-CPE.

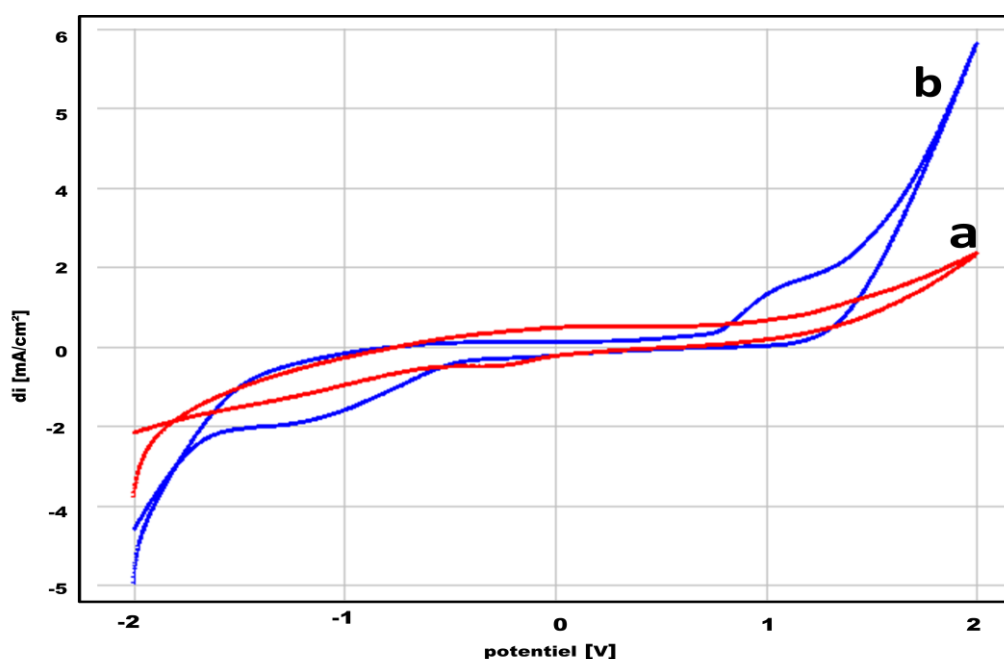


Figure V-6: Voltammogrammes cycliques enregistrés pour CPE (a) et NP-CPE (b), dans NaCl 0,1 M à 100 mv / s, pH = 7

III.1.2. Morphologie de la surface

Pour l'étude de la morphologie de la surface de l'électrode nous avons fait recours à la Microscopie Electronique à Balayage (MEB). La composition de la pâte et le cliché sont donnés dans la Figure V-7. Nous constatons que la surface présente un aspect rugueux et constituée de particules compactes de fractions entre 80 et 300 μm riches en phosphate. Le phosphate naturel traité a la composition chimique suivante en pourcentage (%):

CaO	P ₂ O ₅	F	SiO ₂	SO ₃	CO ₂	MgO	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	K ₂ O
54,12	34,24	3,37	2,42	2,21	1,13	0,68	0,46	0,36	0,04

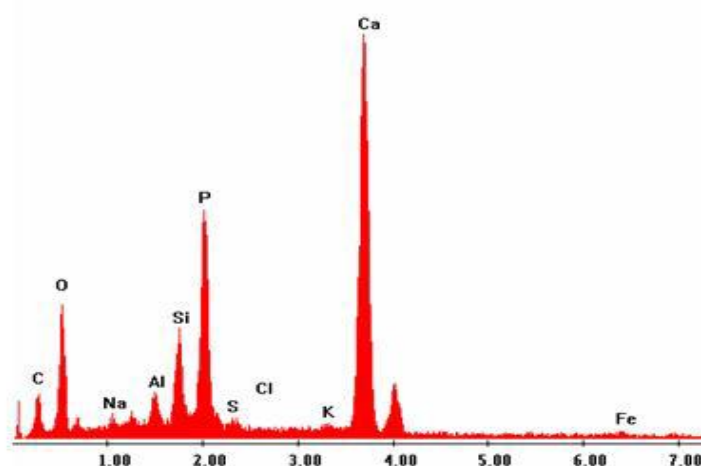
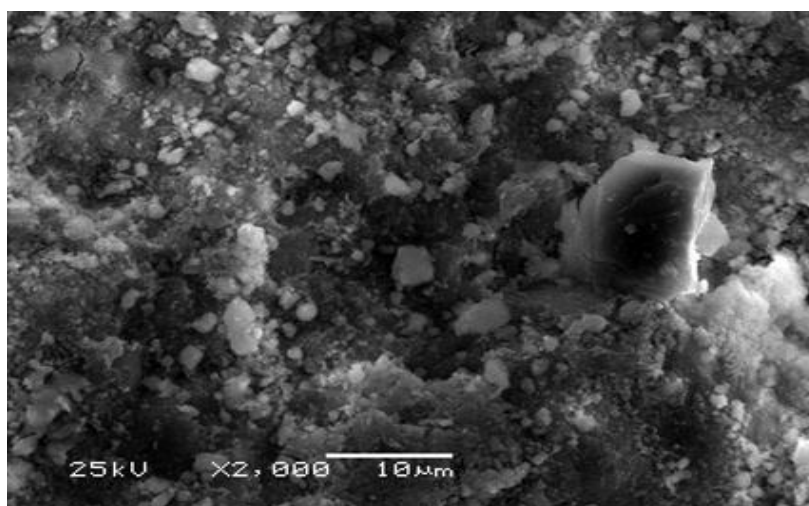


Figure V-7 : Micrographie électronique de phosphate naturel.

Le phosphate associé à l'électrode possède une structure cristallochimique de la matière semblable à celle de la fluoroapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), comme il est montré par la diffraction des rayons X (Fig. V-8) et la spectroscopie d'émission infrarouge (Fig. V-9). Cette donnée est très importante dans la mesure où le réseau de la fluoroapatite est très tolérant à la substitution des sites vacants, par exemple le calcium peut être remplacé par Sr, Pb, Co et Na, PO_4 par AsO_4 , VO_4 et SO_4 et F^- peut être remplacé par OH^- et Cl^- . Le phosphate naturel présente une faible surface spécifique de l'ordre de $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

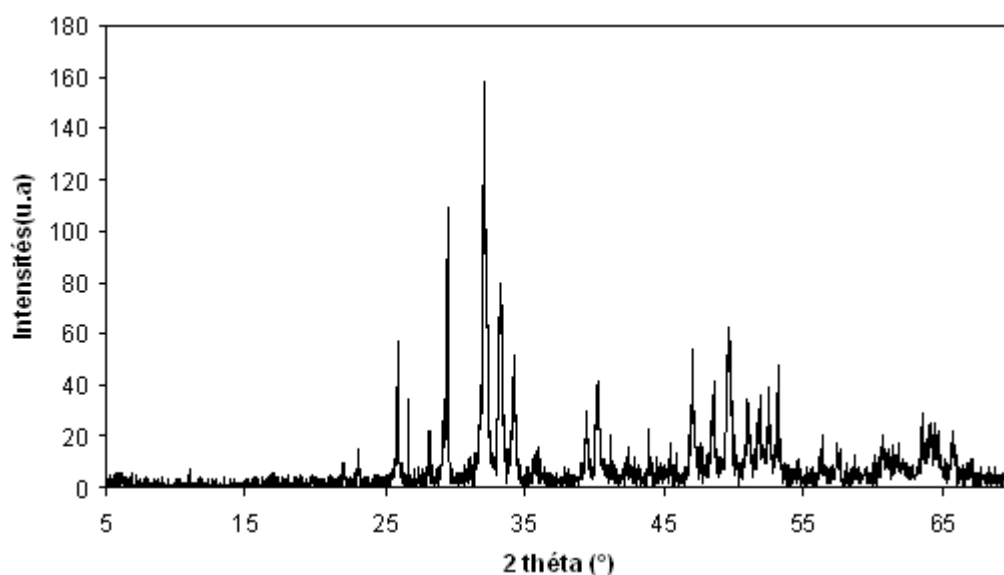


Figure V-8 : Spectre de diffraction X de phosphate naturel après traitement.

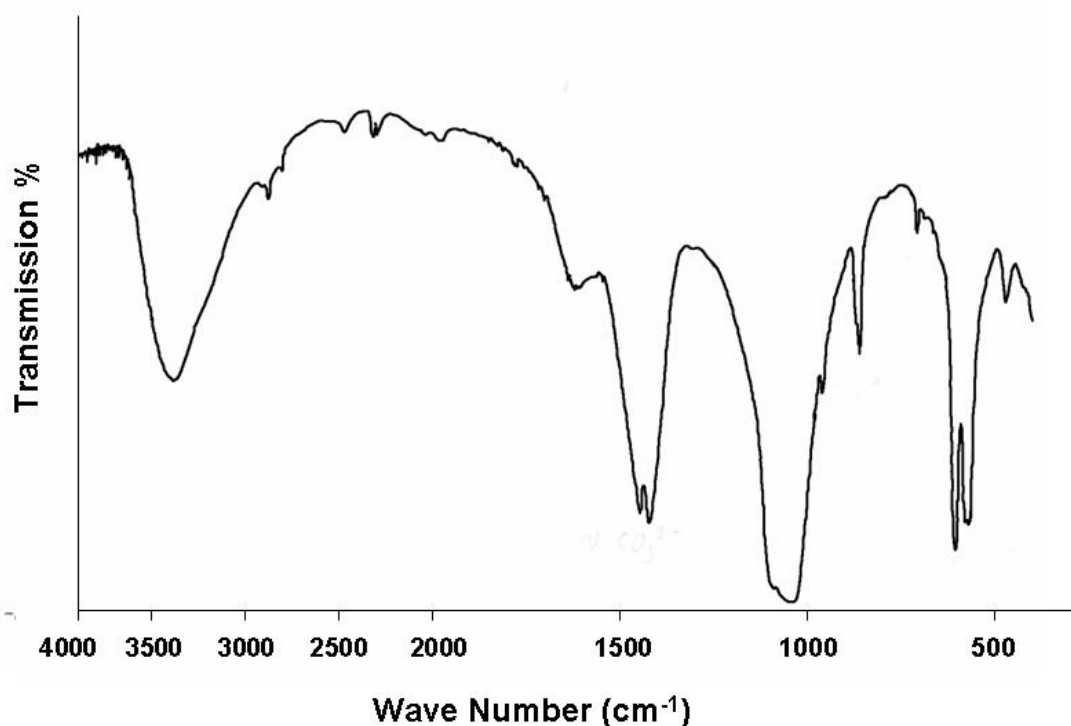


Figure V-9 : Spectre d'adsorption infrarouge de phosphate naturel traité à 900°C

II.2. Détection d'adénosine

II.2.1. Caractérisation électrochimique.

II.2.1.1. Caractérisation électrochimique par la voltammétrie cyclique et voltampérométrie à ondes carrées

Après pré concentration de l'électrode dans une solution contenant l'adénosine, nous avons enregistré le voltammogramme à ondes carrées, ce dernier présente un pic bien défini -0,2 V qui correspond à la réduction de l'adénosine en milieu électrolytique (Fig. V-10). La présence du phosphate naturel fait augmenter la sensibilité de l'électrode à pâte de carbone vis-à-vis, de l'adénosine.

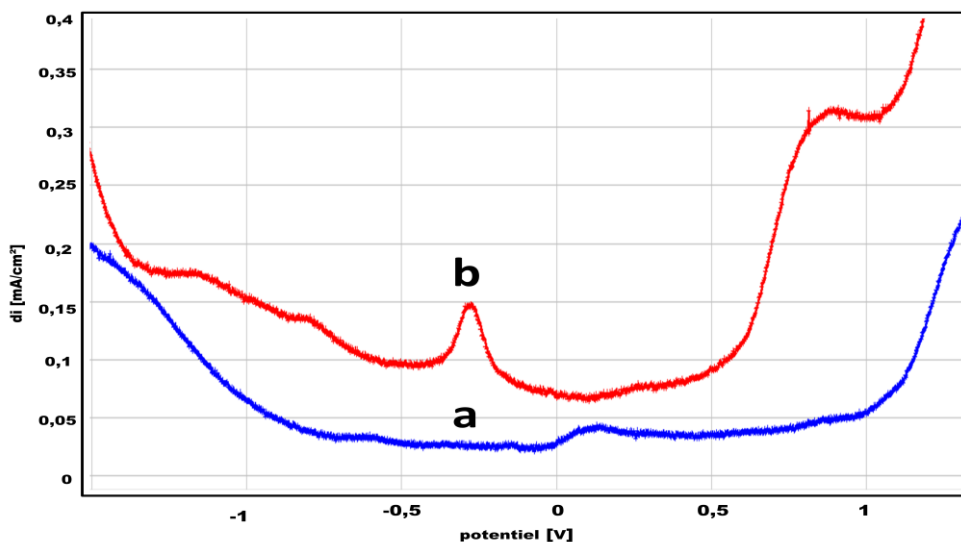


Figure V-10 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés pour CPE (a) et pour NP-CPE (b) après accumulation dans une solution contenant de l'adénosine 0,1 M NaCl, pH = 7 , le temps de préconcentration = 20 min.

La Figure V-11 montre des voltammogrammes cycliques (CV) enregistrés à la surface de l'électrode à pâte de carbone modifiée au phosphate naturel (NP / CPE), chargée (courbe b) ou non (courbe a) par l'adénosine, à 100 mV / s. La présence d'adénosine à la surface de l'électrode se manifeste par l'apparition d'un pic de réduction à environ -0,2 V et un pic d'oxydation à 0,3V.

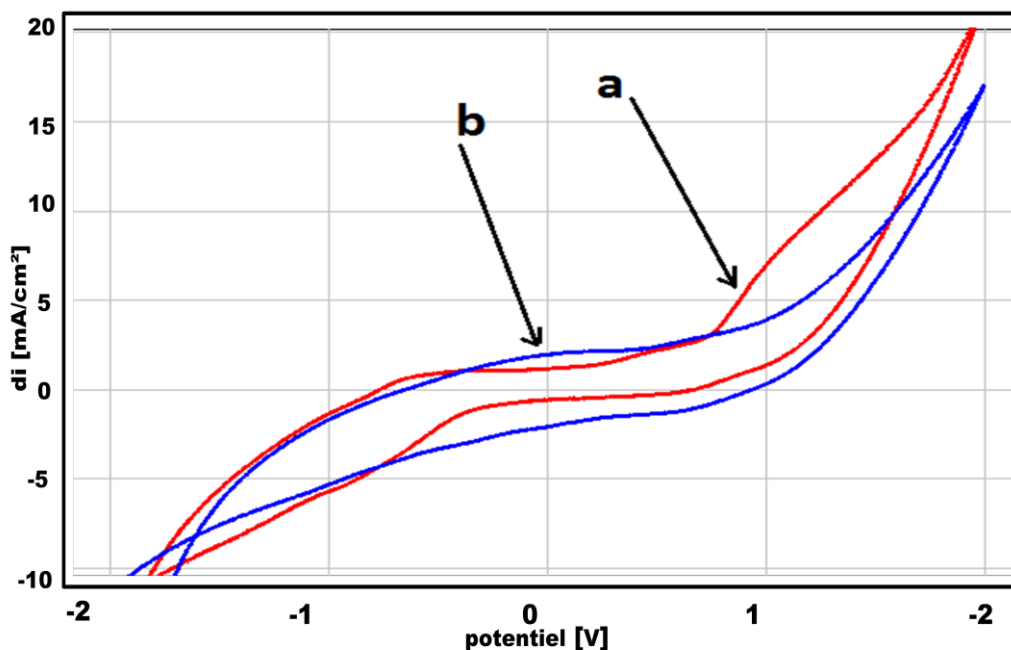


Figure V-11 : Voltammogrammes cycliques enregistrés pour CPE-NP (a) avant accumulation de l'électrode dans la solution contenant de l'adénosine et (b) après accumulation dans une solution d'adénosine (20 μM) , 0,1 M NaCl, pH = 7 = le temps de préconcentration 20 min

II.2.1.2. Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique

Pour confirmer les résultats obtenus par voltammétrie nous avons fait appel à la spectroscopie d'impédance. Les diagrammes enregistrés avant et après pré concentration de l'électrode dans une solution contenant l'adénosine, sont regroupés dans la Figure. V-12. Dans les cas, les demi-cercles associés au transfert d'électron sont dispersés et asymétriques, en raison de l'hétérogénéité de la surface de l'électrode. La présence de l'adénosine à la surface provoque un déphasage remarquable de la courbe vers les basses fréquences, en raison de la nature de la réaction de la molécule électro active.

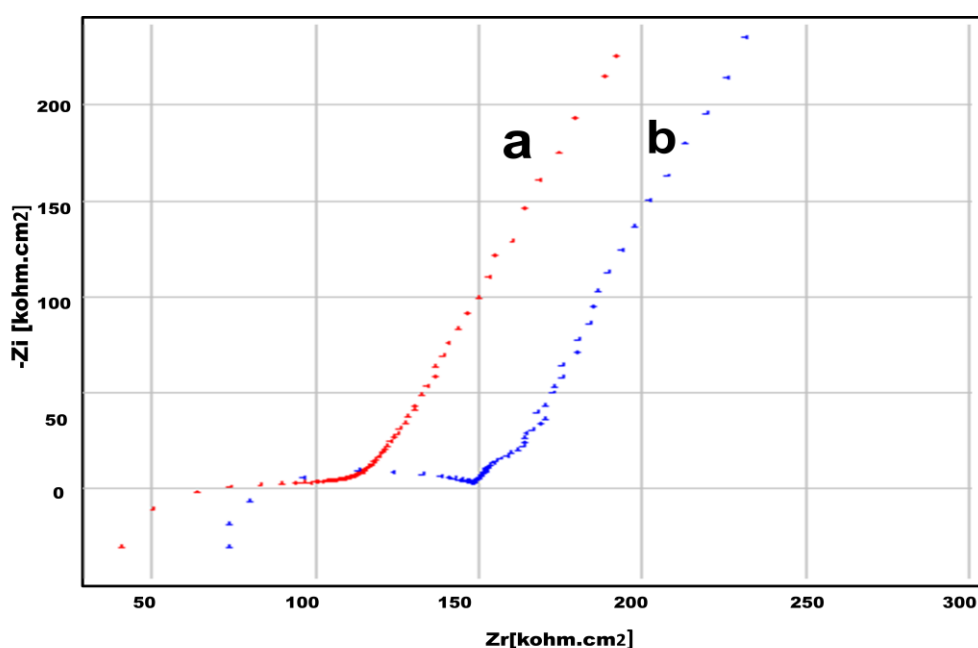


Figure V-12 : Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP (a) avant accumulation de l'électrode dans la solution contenant de l'adénosine et (b) après accumulation dans une solution d'adénosine (20 μM), 0,1 M NaCl, pH = 7 = le temps de préconcentration 20 min de 100 mHz à 100 kHz, 100 mV / S, pH = 7.

II.2.1.3. Caractérisation morphologique

II.2.2. Optimisation des conditions expérimentales.

Afin d'optimiser les performances de l'électrode NP-CPE, pour la détermination de l'adénosine, nous avons étudié les paramètres influençant la réponse électrochimique, tels le pH de la solution accumulée, le temps d'accumulation, l'influence du taux de balayage et les électrolytes de support.

II.2.2.1. Influence du temps de préconcentration

La dépendance de la densité de courant des pics avec le temps de préconcentration a été étudiée (Fig. V-13). Les densités de courant des pics croissent avec l'augmentation du temps de préconcentration jusqu'à 20 min, puis on assiste à une stabilité des densités de courant, en raison de la saturation de l'électrode.

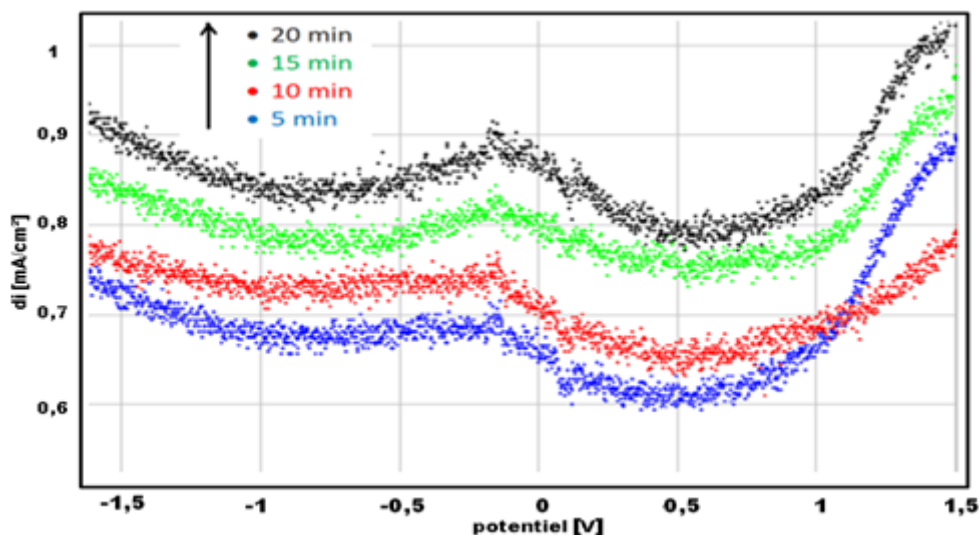


Figure V-13 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés sur NP-CPE, dans NaCl 0,1 M contenant 20 µM d'adénosine à différents temps de préconcentration, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

II.2.2.2. Influences du pH

L'effet du pH sur la réponse de l'électrode a été étudié. La Figure V-14 montre l'influence du pH de la solution de pré concentration sur la réponse électrochimique de l'adénosine sur l'électrode NP-CPE. Les densités de courant du pic de réduction dépendent fortement du pH de la solution. Les densités de courant du pic de réduction les plus élevés sont obtenus à pH 7.

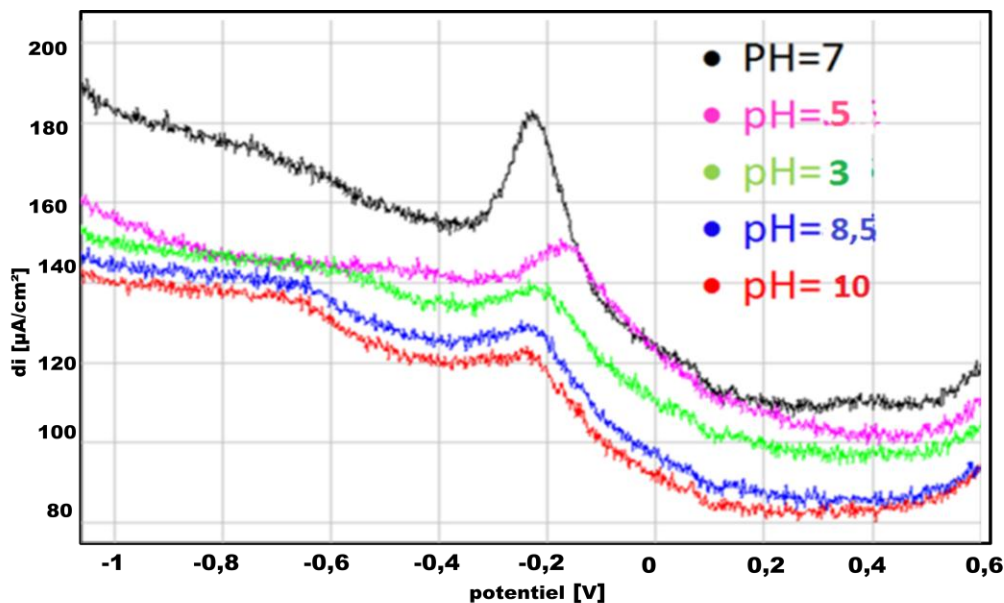


Figure V-14 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés sur NP-CPE, dans NaCl 0,1 M contenant 20 μM d'adénosine à différents pH, vitesse de balayage 100 mV / S, pH =7

II.2.2.3. Effet de la vitesse de balayage

L'influence de la vitesse de balayage sur les performances de l'électrode élaborée NP-CPE a été étudiée. La Figure V-15 montre que les densités de courant des pics rédox augmentent linéairement avec la vitesse de balayage dans la gamme comprise entre 40 et 180 $\text{mV}\cdot\text{S}^{-1}$ (Fig. V-16), suggérant que les réactions redox sont contrôlées par un phénomène d'adsorption.

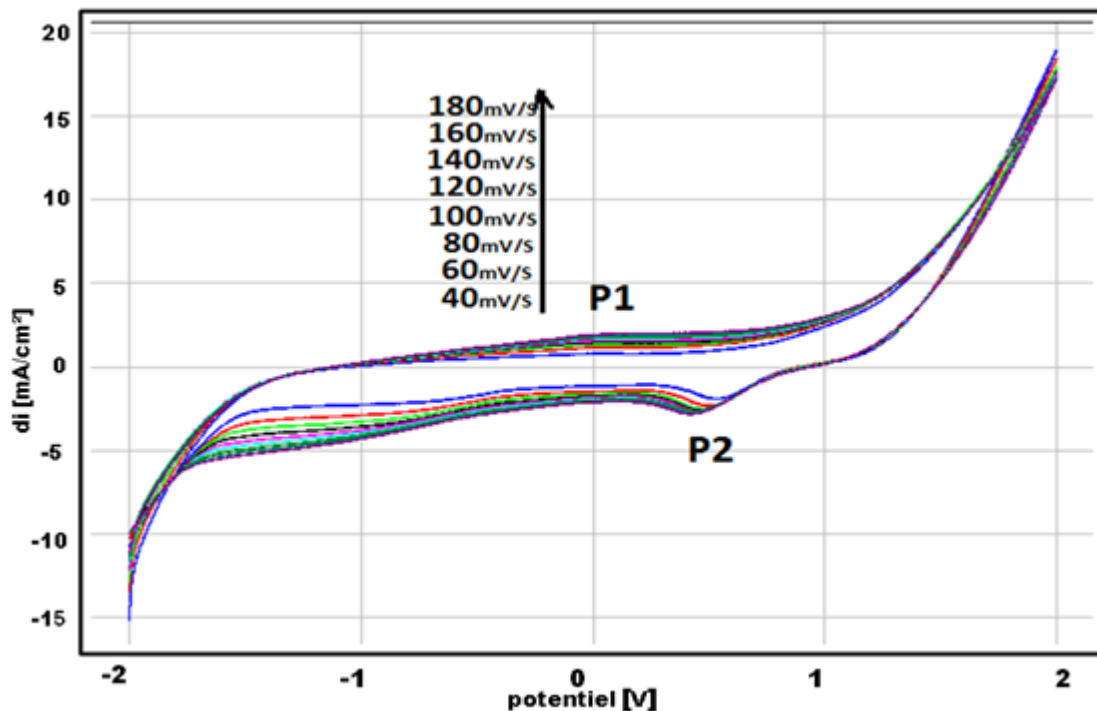


Figure V-15: Voltammogrammes cycliques de 20 µM d'adénosine dans 0,1 M NaCl , pH = 7 à différentes vitesses de balayage mV / S.

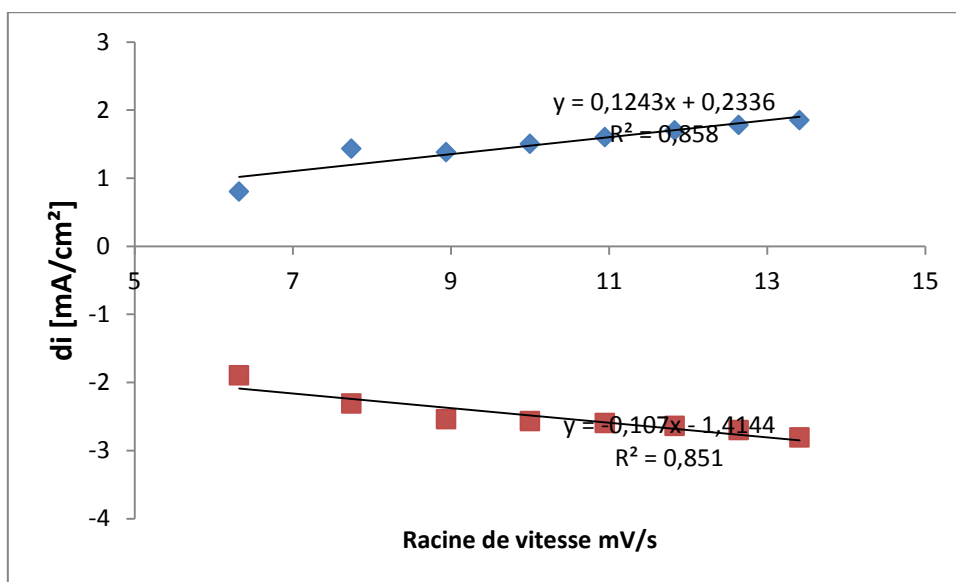


Figure V-16 : Tracé de la surface des pics par rapport au taux de balayage

Le courant de réduction peut être exprimé par l'équation de **Randles-Sevcik**. L'intégration du pic d'oxydation montre que le nombre d'électrons impliqués dans cette réaction approche 2,

ce qui est en accord avec la littérature [21], et la réaction électrochimique proposée est donné dans la Figure V-17:

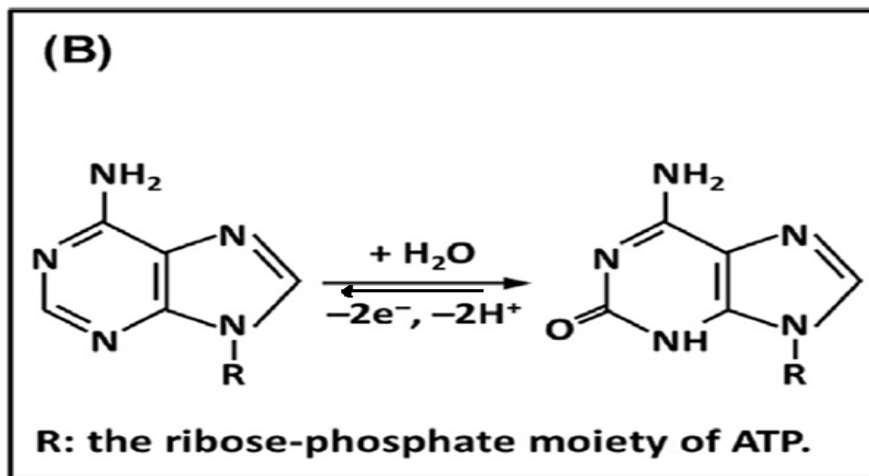


Figure V-17 : Réaction redox de l'adénosine [21]

II.2.2.4. Effet de l'électrolyte

Divers électrolytes, tels que NaCl, KCl et Na₂SO₄, sont testés pour l'étude des performances de l'électrode élaborée, dans la détection de l'adénosine (Fig. V-18). La meilleure sensibilité est obtenue avec 0,1 M NaCl.

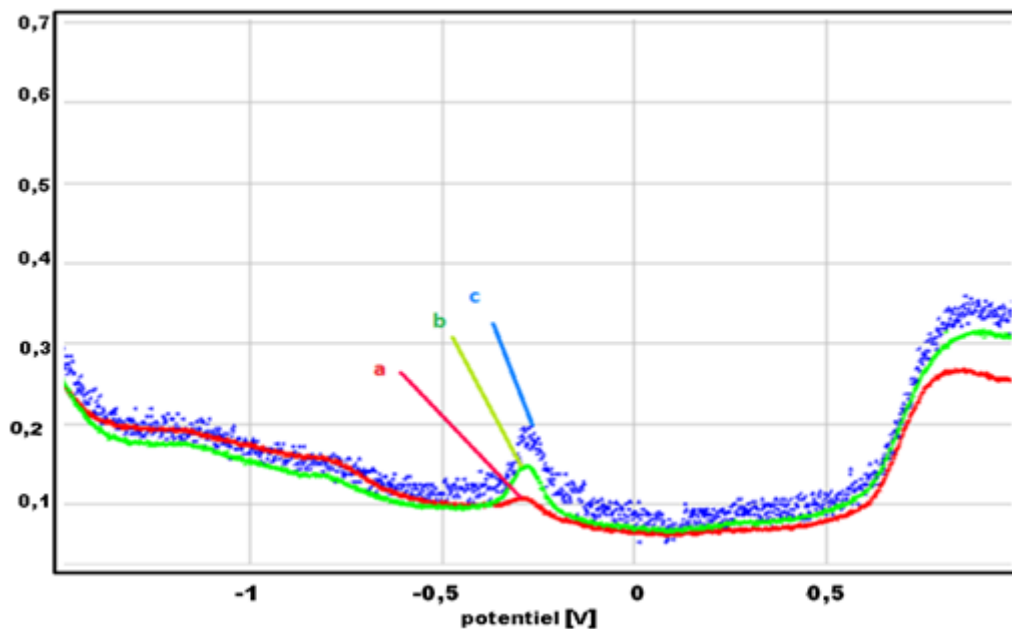


Figure V-18 : Voltammogrammes à onde carrée d'adénosine à 20 μM à différents électrolytes 0,1 M de (c) NaCl, (b) Na₂SO₄, (a) KCl.

II.2.2.5. Effet de la concentration d'adénosine

L'effet de la concentration d'adénosine a été investi conjointement par voltamétrie cyclique (Fig. V-19) et voltampérométrie à onde carrée (Fig. V-21). On constate que les densités de courant des pics augmentent avec la concentration d'adénosine, ce qui montre que l'électrode élaborée a une surface active très importante.

II.2.2.5.1. Caractérisation voltamétrie cyclique

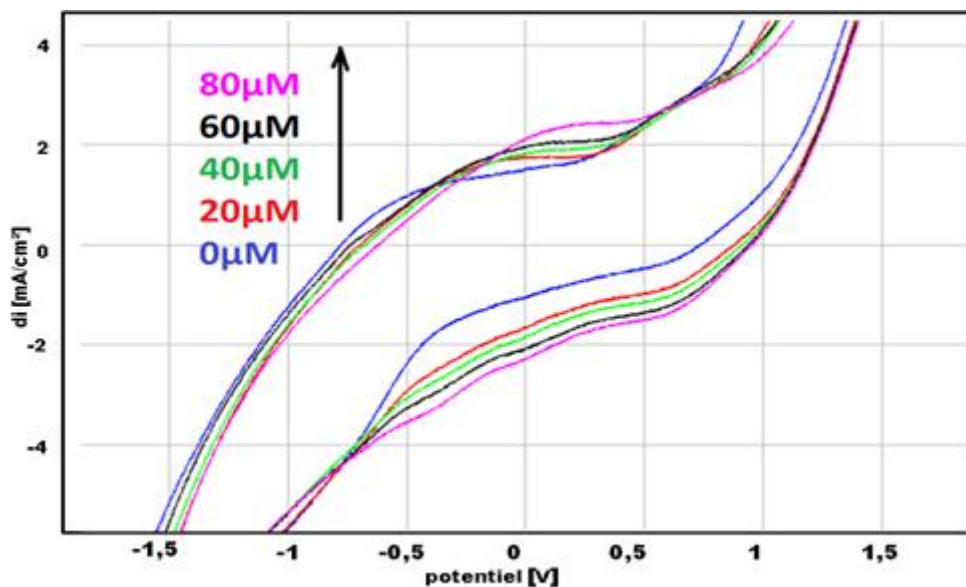


Figure V-19: Voltamogrammes cycliques de différentes concentrations d'adénosine dans 0,1 M NaCl, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

II.2.2.5.2. Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique

L'étude de l'effet de la concentration de l'adénosine a été aussi étudié par spectroscopie d'impédance, l'allure de la courbe de la figure V-20 n'a pas changé ce qui suggère que le mécanisme de la réaction n'est pas affecté par la concentration, on enregistre un déphasage vers les basses fréquences pour des valeurs de concentration très élevées.

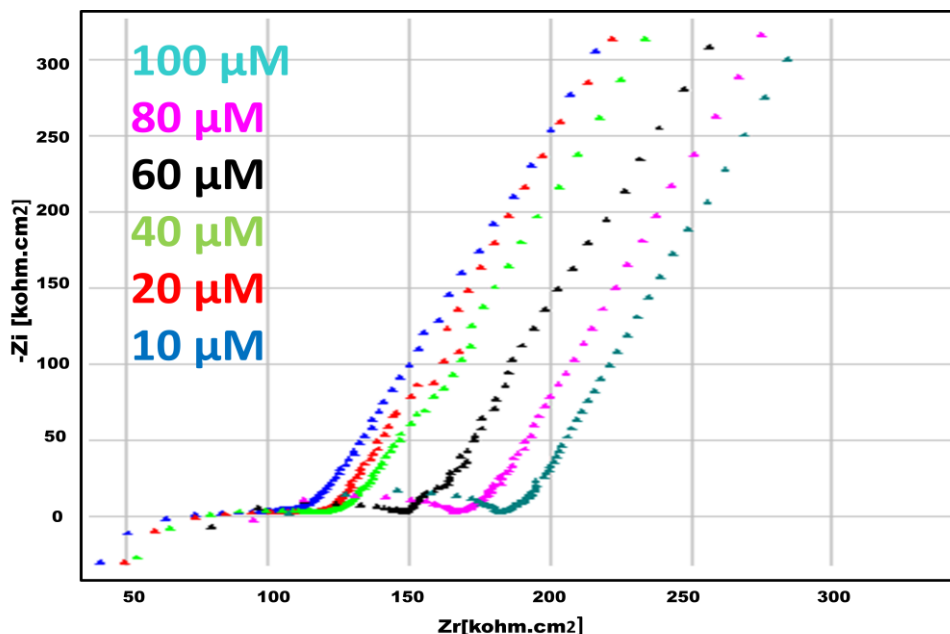


Figure V-20 : Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP de différentes concentrations en adénosine dans 0,1 M NaCl, de 100 mHz à 100 kHz, 100 mV / S, pH = 7.

II.2.2.5.3. Courbe de calibration

Afin d'obtenir une courbe analytique pour l'électrode développée, nous avons réalisé des voltammogrammes à ondes carrée pour la réduction de l'adénosine, à différentes concentrations, en milieu NaCl 0,1 M, après optimisation des paramètres expérimentaux (Fig. V-21). Dans ces conditions, l'électrode élaborée présente une réponse linéaire typique (Figure V-22) pour une gamme de concentration comprise entre 7,41 μM et 20 μM , l'équation de calibration pourra être exprimée selon l'équation suivante :

$$i_P (\mu\text{A}/\text{cm}^2) = 0,001 \times [\text{AD}] + 0,091.$$

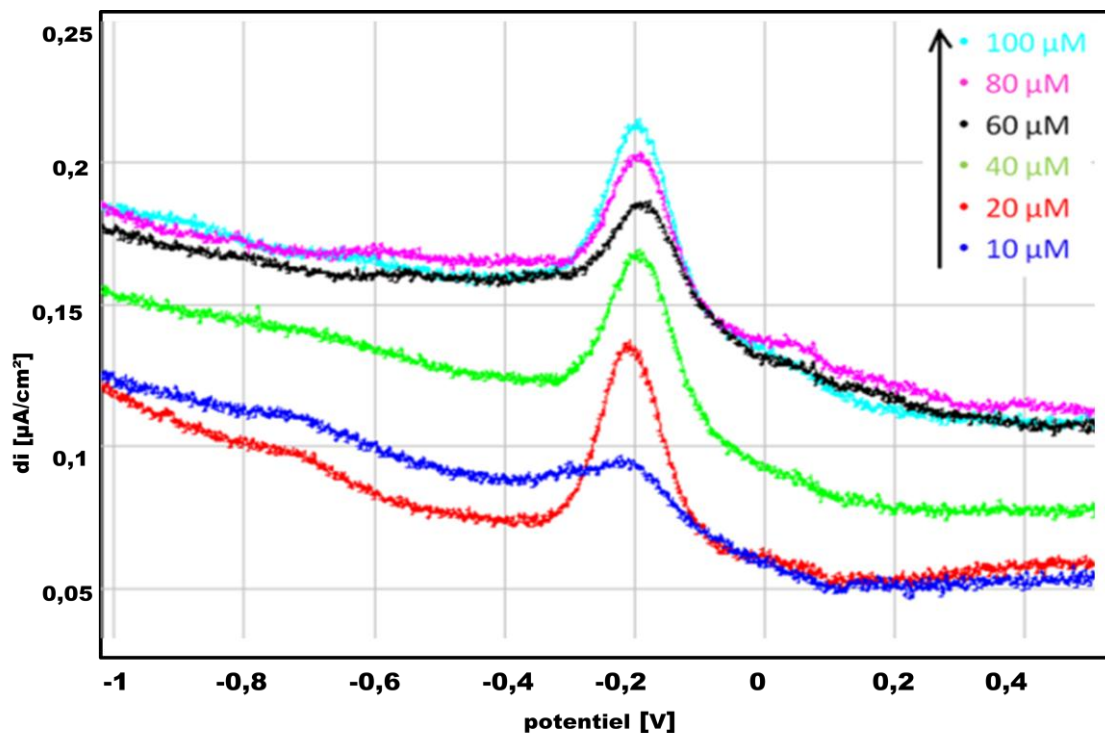


Figure V-21 : Voltammogrammes à ondes carrées de différentes concentrations en adénosine dans 0,1 M NaCl, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

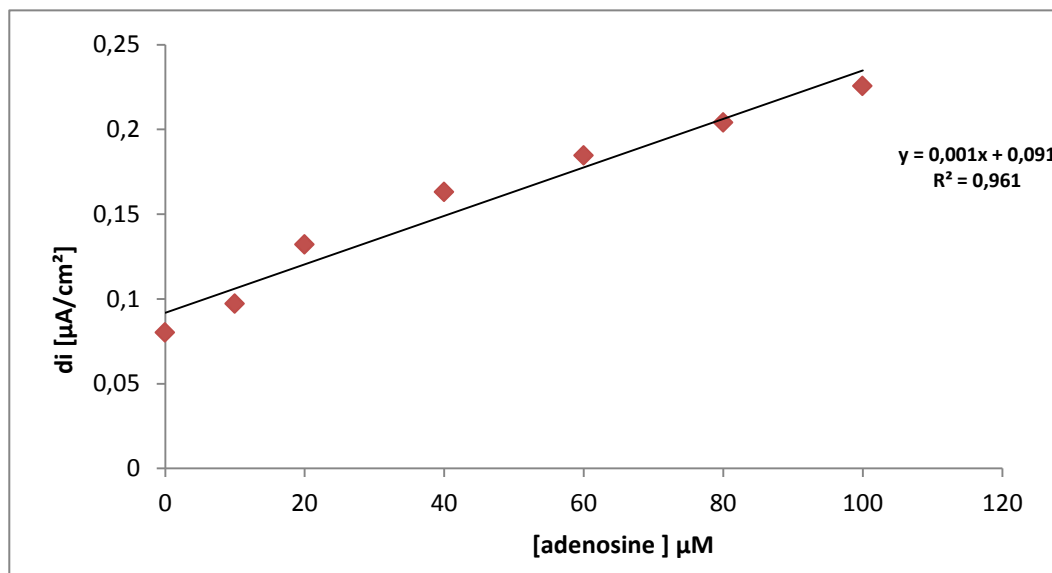


Figure V-22: Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration d'adénosine dans 0,1 M NaCl, pH=7, le temps préconcentration =20 min.

III.2.3. Application analytique

Dans les conditions optimisées, le système analytique a été utilisé pour la détermination de l'adénosine dans un échantillon de sérum sans aucun prétraitement. Les courbes

analytiques ont été obtenues par CV et SWV, à la surface de l'électrode élaborée. Il a été établi que les densités de courant du pic augmentent linéairement avec la concentration de l'adénosine dans le sérum (Figs. V-23, 24 et 25).

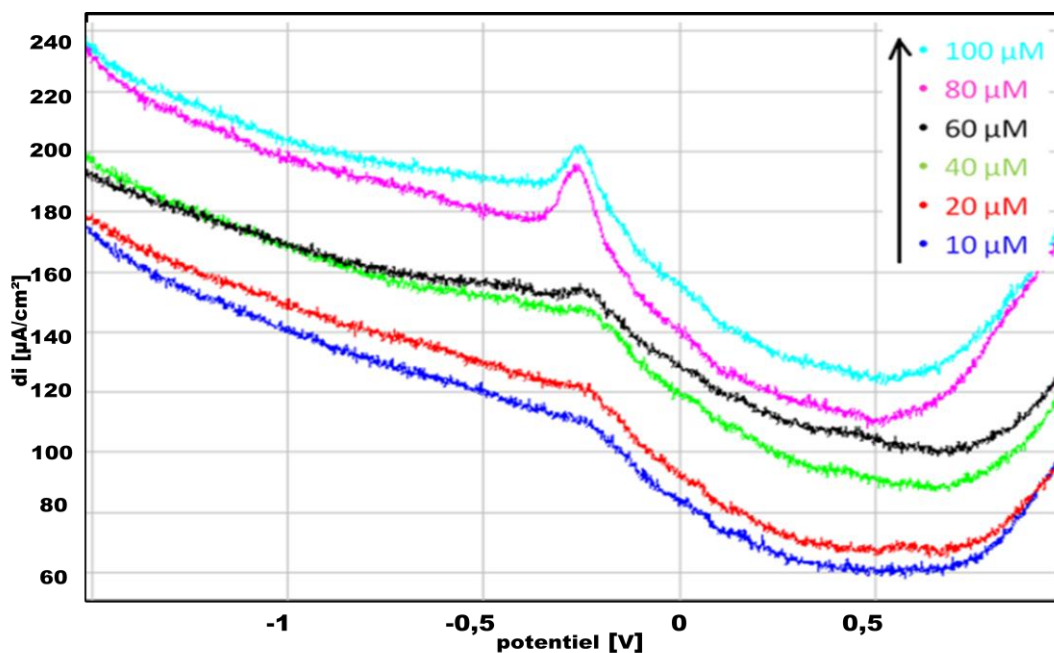


Figure V-23 : Voltammogrammes à onde carrée de différentes concentrations d'adénosine dans le sérum, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

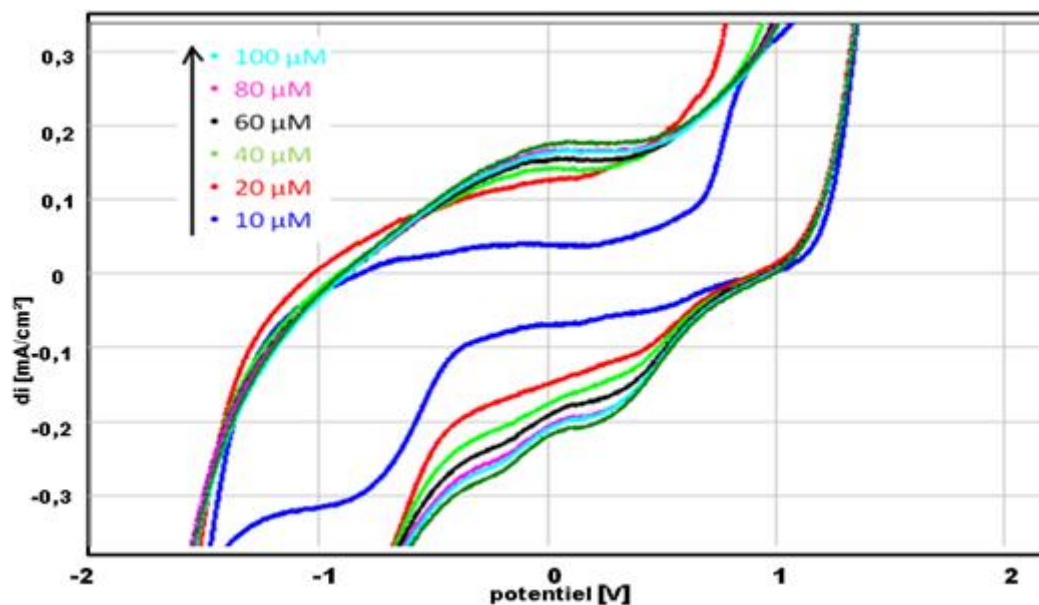


Figure V-24 : Voltammogrammes cycliques de différentes concentrations d'adénosine dans le sérum, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7

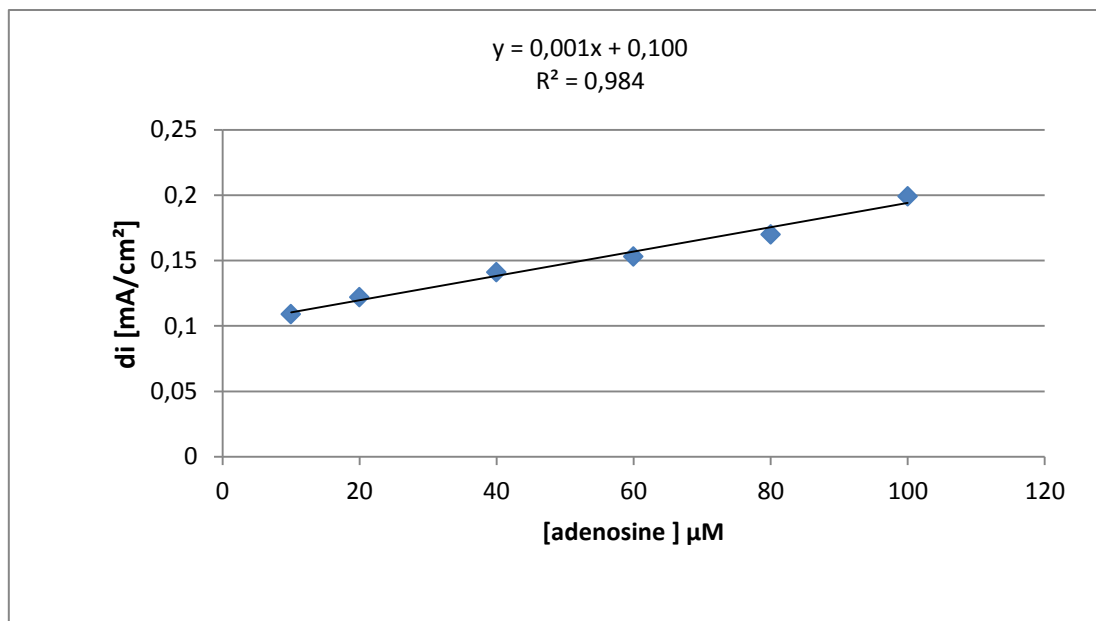


Figure V-25 : Tracés de la surface du pic de réduction par rapport à la concentration ajoutée d'adénosine dans le sérum, pH = 7, temps de préconcentration = 20 min.

La densité de courant augmente avec la concentration en adénosine dans le sérum. La Figure V-25 montre une réponse linéaire typique, qui peut être exprimée selon l'équation suivante:

$$i_p(\mu\text{A}/\text{cm}_2) = 0,001 [\text{AD}] + 0,1.$$

Conclusion

Ces travaux ont démontré que l'électrode à pâte de carbone modifiée par le phosphate naturel constitue une alternative réalisable pour la détermination analytique de l'adénosine. L'électrode élaborée a été testée avec succès dans des échantillons de sérum. De plus, sa durée de détection est satisfaisante. L'élaboration de l'électrode est extrêmement simple et peu coûteuse.

Références

- [1] P.A. Borea, S. Gessi, S. Merighi, K. Varani, Adenosine as a multi-signalling guardian angel in human diseases: when, where and how does it exert its protective effects *Trends Pharmacol. Sci*, 37 (2016) 419.
- [2] A.Eisenstein, S. Patterson, K. Ravid, The many faces of the A2b adenosine receptor in cardiovascular and metabolic diseases, *J. Cell. Physiol*, 230 (2015) 2891.
- [3] M. Majetschak, Multiple ways of targeting the adenosine/adenosine receptor axis in lung inflammation and injury, *Crit. Care Med*, 44 (2016) 853.
- [4] G.Burnstock , B. Vaughn, and S.C. Robson, *Purinergic signalling in the liver in health and disease*. *Purinergic Signal*, 10 (2014) 51.
- [5] G.Burnstock, L.C. Evans, and M.A. Bailey, *Purinergic signalling in the kidney in health and disease*. *Purinergic Signal*, 10 (2014) 71.
- [6] T Glaser,, et al., *Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration*. *Purinergic Signal*, 8 (2012) 523.
- [7] Adresse : Ain Sebaa Boulevard Moulay Slimane, Par D'activites Oukacha I Imm.E No.13, 2 Eme Etage, Casablanca 20250.
- [8] M.D Cerqueira, , *Advances in pharmacologic agents in imaging: new A2A receptor agonists*. *Curr Cardiol Rep*, 8 (2006) 119.
- [9] G., Burnstock , B.B. Fredholm, and A. Verkhratsky, *Adenosine and ATP receptors in the brain*. *Curr Top Med Chem*, 11 (2011) 973.
- [10] J, Spychala , *Tumor-promoting functions of adenosine*. *Pharmacol Ther*, 87(2000)161
- [11] D, Virgilio, F., *Purines, purinergic receptors, and cancer*. *Cancer Res*, 72 (2012) 5441
- [12] G, Burnstock . and I. Novak, *Purinergic signalling and diabetes*. *Purinergic Signal*, 9 (2013) 307
- [13] H.F. Fang, M.L. Pajski, A.E. Ross, B.J. Venton, Quantitation of dopamine, serotonin and adenosine content in a tissue punch from a brain slice using capillary electrophoresis with fast-scan cyclic voltammetry detection, *Anal. Methods*, 5 (2013) 2704
- [14] Y.T. Wang, J.J. Feng, Z.A. Tan, H.Y. Wang, Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitive detection of adenosine with dual backfillers, *Biosens. Bioelectron*, 60 (2014) 218.
- [15] D. Wu, X. Ren, L.H. Hu, D.W. Fan, Y. Zheng, Q. Wei, Electrochemical aptasensor for the detection of adenosine by using PdCu@MWCNTs-supported bienzymes as labels, *Biosens. Bioelectron*, 74 (2015) 391.
- [16] D. Han, H.M. Kim, R. Chand, G. Kim, I.S. Shin, Y.S. Kim, Rhodium complex and enzyme couple mediated electrochemical detection of adenosine, *Appl. Biochem. Biotech*, 177 (2015) 812.
- [17] Y. Zhu, X.C. Hu, S. Shi, R.R. Gao, H.L. Huang, Y.Y. Zhu, X.Y. Lv, T.M. Yao, Ultrasensitive and universal fluorescent aptasensor for the detection of biomolecules (ATP, adenosine and thrombin) based on DNA/Ag nanoclusters fluorescence light-up system, *Biosens. Bioelectron*, 79 (2016) 205.

- [18] Y. Xiluan, C. Zhijuan, K. Masaaki, L. Jianzhong, Label-free aptamer-based chemiluminescence detection of adenosine, *Talanta* 79 (2009) 383.
- [19] J.S. Jeon, M.J. Lee, M.H. Yoon, J.A. Park, H. Yi, H.J. Cho, H.C. Shin, Determination of arbutin, niacinamide, and adenosine in functional cosmetic products by high-performance liquid chromatography, *Anal. Lett.* 47 (2014) 1650.
- [20] A. Van Dycke, A. Verstraete, K. Pil, R. Raedt, K. Vonck, D. Boison, P. Boon, Quantitative analysis of adenosine using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (LC/APCI-MS/MS), *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1493.
- [21] Po Wanga,b, Zhiyuan Chenga, Qian Chena, Lulu Qua, Xiangmin Miaoa, Qiumei Fengaa Construction of a paper-based electrochemical biosensing platform for rapid and accurate detection of adenosine triphosphate (ATP), *Sens. Ac+*.
- [22] S. Touzara, R. Najih and A. Chtaini, Electrochemical Sensor Based on 2-Benzimidazolethiole Modified Carbon Paste Electrode for Lead Chelation Therapy, *J. Biomol. Res. Ther.* 5 (2016) 2167.
- [23] Phosphate Naturel de la Région de Khouribga (Maroc), CERPHOS 37, Bd My Ismail, Casablanca, Maroc.
- [24] Natural Phosphate (NP) comes Khouribga Region (Morocco). It is readily available (raw or treated) from CERPHOS 37, Bd My Ismail, Casablanca, Morocco.
- [25] M. Slansky, Géologie des phosphates, *Mémoire du BRGM* (1980) p.114.

Chapitre VI

**Electrode à pâte de carbone modifiée par
l'amoxicilline pour le dosage immunologique de
la bactérie Escherichia coli**

Introduction

L'eau de boisson et la nourriture sont les principales sources des agents pathogènes, chaque année 1,5 million de décès sont causés par la contamination des aliments vitaux. Malgré que la plupart des micro-organismes sont passifs, la présence d'*Escherichia coli*, dans la nourriture ou dans l'eau indique la détérioration de la qualité microbiologique. Une méthode d'analyse fiable, rapide et peu coûteuse est nécessaire. Les méthodes classiques existantes impliquent généralement la culture sélective et l'isolement des cellules suivies de confirmations biochimiques et sérologiques et sont multiples et fiables et très précises mais nécessite souvent beaucoup de temps et surtout très coûteuses.

Pour la majorité des bactéries, l'amoxicilline constitue le traitement de première ligne, il s'agit d'un antibiotique de la famille des aminopénicillines [1]. Il possède comme les autres pénicillines, une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine, précurseur du peptidoglycane (composante essentielle de la paroi cellulaire bactérienne participant au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse) [2]. Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP (Protéines Liant les Pénicillines), d'où notre réflexion à utiliser l'amoxicilline comme modificateur d'électrodes.

L'objectif de ce travail est la fonctionnalisation par l'amoxicilline des électrodes à pâte de carbone, pour la détection des bactéries de type *Escherichia coli* et leur caractérisation par les méthodes électrochimiques.

I. Partie expérimentale

I.1. Réactifs

I.1.1. Amoxicilline

L'antibiotique est procuré directement de la pharmacie [3]. Sa composition est exprimée en amoxicilline (sous forme trihydratée).

I.1.2. Les bactéries

I.1.2.1. Le protocole de la culture

La culture des bactéries a été réalisée selon le protocole de culture suivant :

- Préparation du milieu LB solide (Luria-Bertani) agar, sa composition pour 1L d'eau distillée est comme suit :
- 10g de tryptone

- 10g de NaCl
 - g d'extrait de levure
 - 15g d'Agar-Agar
- a. Stérilisation dans l'autoclave et Coulage des boîtes
 - b. Ensemencement de la bactérie
 - c. Incubation à 37° pendant 24heures
 - d. Préparation de l'eau physiologique (9g de NaCl dans 1L d'eau distillée)
 - e. Stérilisation de l'eau physiologique dans l'autoclave
 - f. Introduction des bactéries dans l'eau physiologique
 - g. Lecture de la Densité Optique (DO) d'un échantillon à l'aide du spectrophotomètre

I.1.1.1. Détermination de la concentration bactérienne

✓ Principe

La concentration bactérienne est déterminée par l'utilisation du test Mc Farland standard, c'est une série d'étalons d'opacité différente, permettant une estimation de la densité et la concentration des suspensions microbiennes, ces étalons sont désignés par le numéro des tubes de l'échelle initialement décrite par Mc Farland (image VI-1).

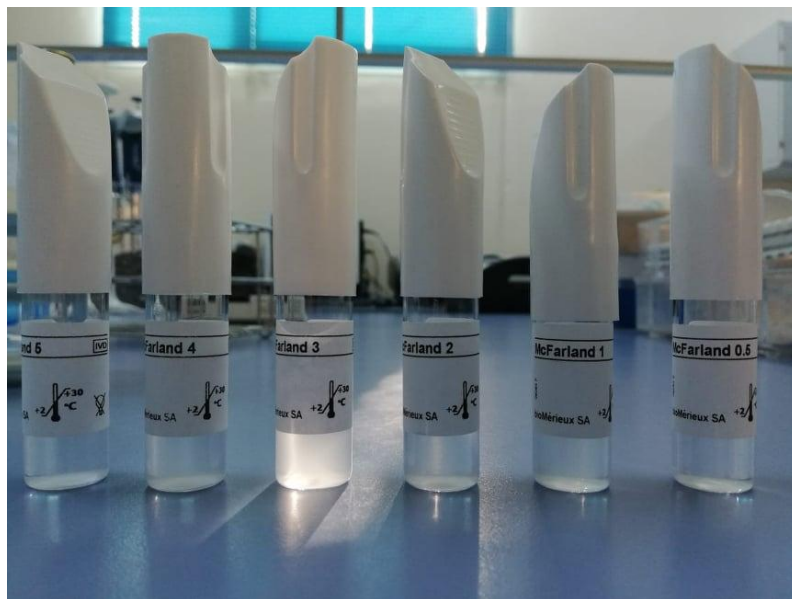


Figure VI-1 : série d'étalons d'opacité différente McFarland standard

✓ Mode opératoire

Le mode opératoire est comme suit :

- a. Prendre l'étalon choisi comme référence ;
- b. Préparer une suspension bactérienne dans une ampoule de même diamètre bien homogénéisé ;
- c. Agiter rageusement l'ampoule étalon ;

- d. Comparer aussitôt les deux opacités en plaçant les deux ampoules devant un fond noir ;
- e. S'il est nécessaire d'ajuster la suspension bactérienne, on agite à nouveau l'étalon avant de procéder a une nouvelle comparaison.

✓ **Interprétation des résultats**

Tableau IV-13 : Tableau d'équivalences et la Détermination de la concentration bactérienne

Etalon	Concentration bactérienne 10 ⁶ /ml	Densité optique théorique a 550 nm
0.5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,50
3	900	0,75
4	1200	1,00
5	1500	1,25

I.2. Préparation de l'électrode

I.2.1. Elaboration de l'électrode à pâte de carbone (CPE)

La poudre commerciale de graphite (1,6 g) a été mélangée avec le liant, l'huile de paraffine (0,4 ml), et avec le solvant, l'éthanol absolu. Une portion de la pâte résultante est compactée dans une petite cavité du corps de l'électrode (0,1256 cm²). Le contact électrique est assuré avec une barre de carbone. . Une fois l'électrode est prête, elle est séchée à température ambiante pendant 24 heures puis sa surface est polie mécaniquement à l'aide d'un papier lisse, avant son utilisation pour éliminer toutes les irrégularités et obtenir une surface régulière et plus reproductible.

I.2.2. Modification de l'électrode à pâte de carbone par l'amoxicilline

La solution d'antibiotique a été préparée, en dissolvant 1 g d'amoxicilline, dans 100 mL d'eau distillée, soit une concentration de $2,737 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

Afin de déterminer le temps optimal d'accumulation de l'antibiotique à la surface de l'électrode, nous avons trempées cette dernière dans la solution d'amoxicilline, pendant les temps de séjour suivant ; 10, 20, 30 et 60 min. Au cours de ce trempage, nous avons procédé à l'agitation de la solution d'amoxicilline, grâce à un barreau magnétique tournant à vitesse constante tout en permettant la réhomogénéisation du liquide appauvri en substances. La

durée de l'agitation est fonction de la durée de l'accumulation ou de la préconcentration, les étapes étant simultanées.

I.2.3. Caractérisation de l'électrode modifiée en présence des bactéries

L'électrode élaborée est immergée dans une cellule contenant l'échantillon de bactéries. Pour la caractérisation électrochimique, nous avons fait appel à la spectroscopie d'impédance électrochimique, aux voltammétries cyclique, linéaire et à ondes carrées.

Les conditions optimales ont été établies en mesurant la variation de la densité de courant maximum en fonction des paramètres physicochimiques tels que: le temps de contact ou de séjour de l'électrode mère avec l'émulsion des bactéries, la concentration de l'amoxicilline, le pH. En parallèle avec la caractérisation électrochimique, l'évolution de la quantité des bactéries dans la solution de séjour a été suivie par densité optique.

A la fin de cette étude, les surfaces des électrodes ont été observées à l'aide du microscope optique (MO) à réflexion.

II. Résultats et discussion

II.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode à pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline

II.1.1. Caractérisation électrochimique

II.1.1.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

L'électrode à pâte de carbone modifiée avec l'amoxicilline (CPE/AMX.) a été caractérisée tout d'abord à blanc en milieu électrolytique.

La comparaison des voltammogrammes montre que l'électrode à pâte de carbone mère a été bien modifiée. Cette modification se traduit par une baisse des densités de courant en raison de la présence du film formé par l'amoxicilline qui présente une résistance non négligeable au passage du courant électrique (Fig. V-2).

L'effet de la vitesse de balayage est aussi étudié dans la gamme comprise entre 40 et 120 mV/s Figure VI-3. Nous constatons que l'allure des voltammogrammes correspond à un système électrochimique rapide, la forme des courbes voltamétriques est insensible aux facteurs physiques susceptibles de modifier la vitesse de la réaction électrochimique. Cela démontre donc sa stabilité. De ce fait nous avons choisi de travailler avec des vitesses relativement élevées, cette rapidité permet d'améliorer la reproductibilité des résultats en

diminuant les fluctuations dues à des contaminations. La vitesse de balayage choisie est donc 100 mV/s.

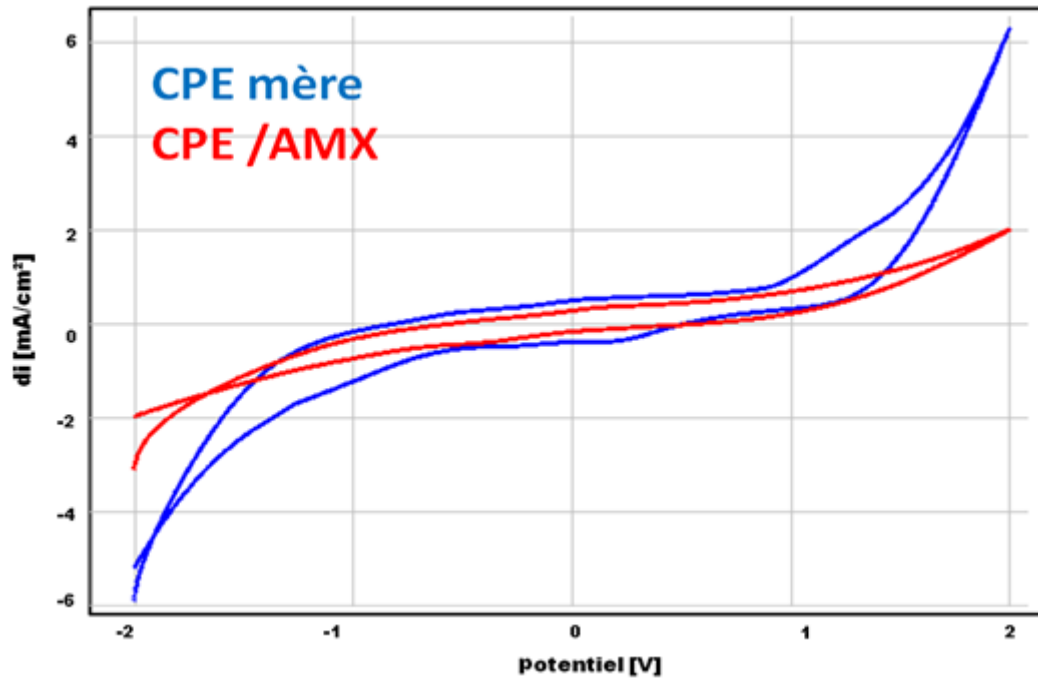


Figure VI -2 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE mère et CPE/AMX

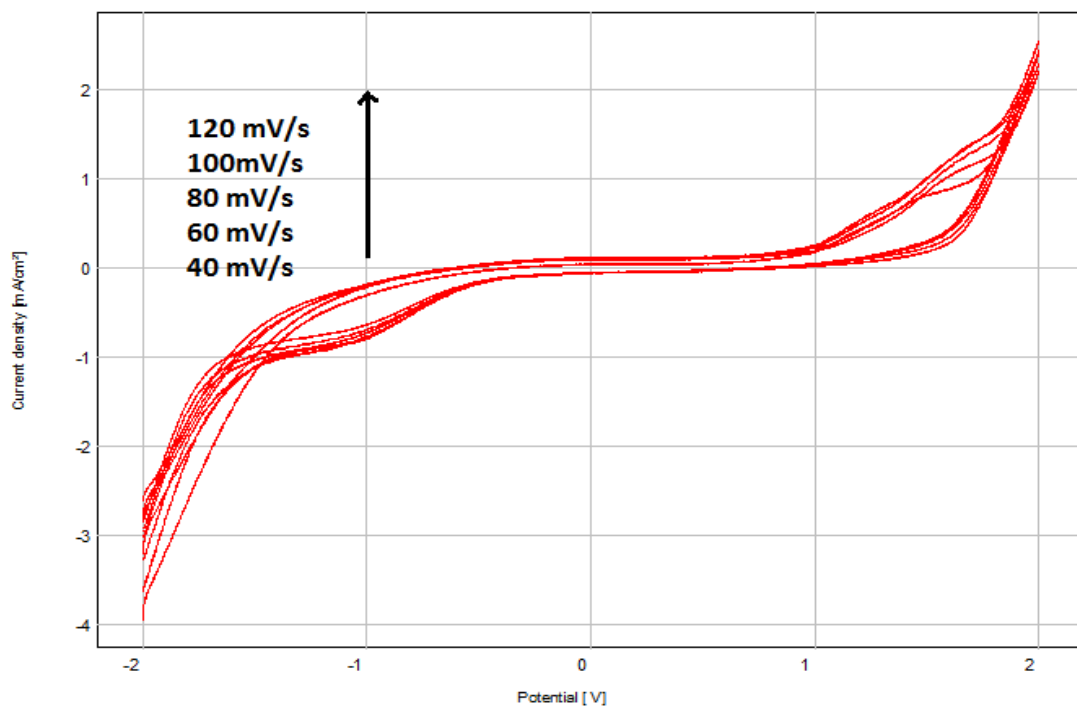


Figure VI-3 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE mère à différentes vitesses de balayage 10, 20, 30, 50 et 100 mV/s dans NaCl à 0,1 M ; de -2V à 2V

II.1.1.2.Choix du temps de dépôt

Afin d'obtenir le temps de dépôt optimal de l'amoxicilline à la surface de l'électrode, celle-ci a été trempée à différents temps dans une solution d'antibiotique à une concentration de 10g/L : 10, 20, 30 et 60 mn. Après une caractérisation électrochimique des différentes électrodes obtenues, le temps de dépôt optimal retenu est 20 mn.

L'effet du temps de séjour de l'électrode à pâte de carbone est illustré sur la Figure V-4, De 5 à 10 mn de trempage, le voltammogramme présente une baisse de la densité de courant : Il y a un début de formation du film d'amoxicilline à la surface de l'électrode.

- De 20 mn à 30 mn de trempage, la densité de courant à considérablement baissée, ce qui dénote de la présence d'un film formé, celui de l'amoxicilline. La couche est donc à son dépôt optimal.
- de 30 mn à 1 heure de trempage, on note une augmentation de la densité de courant : le film formé par l'amoxicilline commence sûrement à se détacher de la surface Figure VI-5 [4].

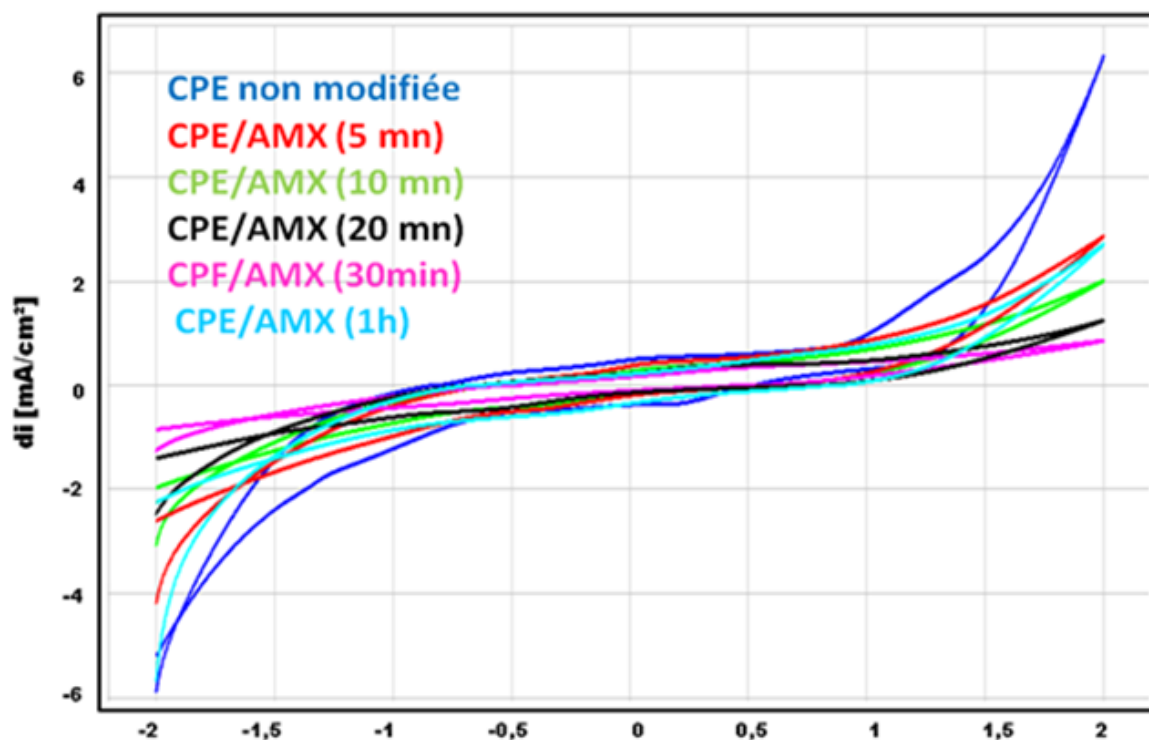


Figure VI-4 : Superposition des voltammogrammes cycliques de l'CPE non modifiée et CPE modifiée par l'amoxicilline aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; v = 100mV/s, de -2V à 2V, pH = 7

II.1.2. Caractérisation morphologique

La surface de l'électrode à pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline, a été observée par microscopie optique. (Figure IV-5)

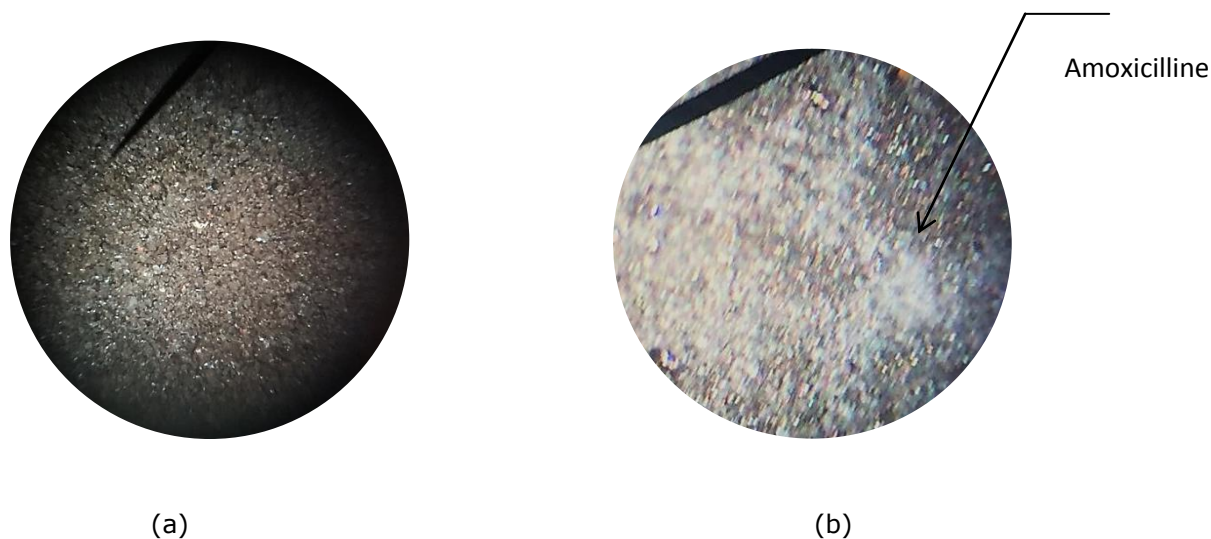


Figure VI-5 : Electrode de pâte de carbone avant modification (a) et après modification par l'amoxicilline, 20 mn de temps de dépôt (b)

II.2. Caractérisations électrochimiques de CPE/AMX en présence des bactéries

II.2.1. Caractérisation par voltammétrie cyclique

L'exploration par la voltammétrie cyclique a donné les résultats reportés en la Figure IV-6. La réponse due à la présence des bactéries se manifeste par un pic d'oxydation qui apparait environ -0,6 V.

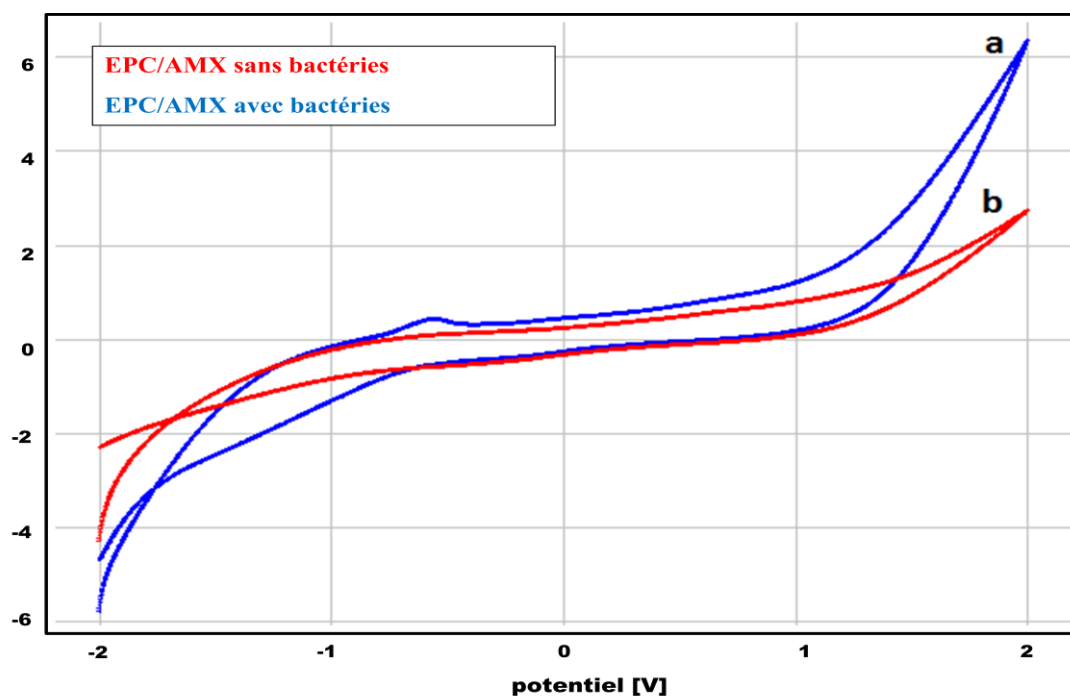


Figure VI-6 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE/AMX ads. sans bactéries (a) et CPE/AMX ads. avec bactéries (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

L'exploration par voltammétrie à ondes carrées a donné les résultats reportés sur la Figure IV-7, la présence des bactéries fait apparaître un pic à -0,6 V, ce qui confirme les résultats obtenus par voltammétrie cyclique.

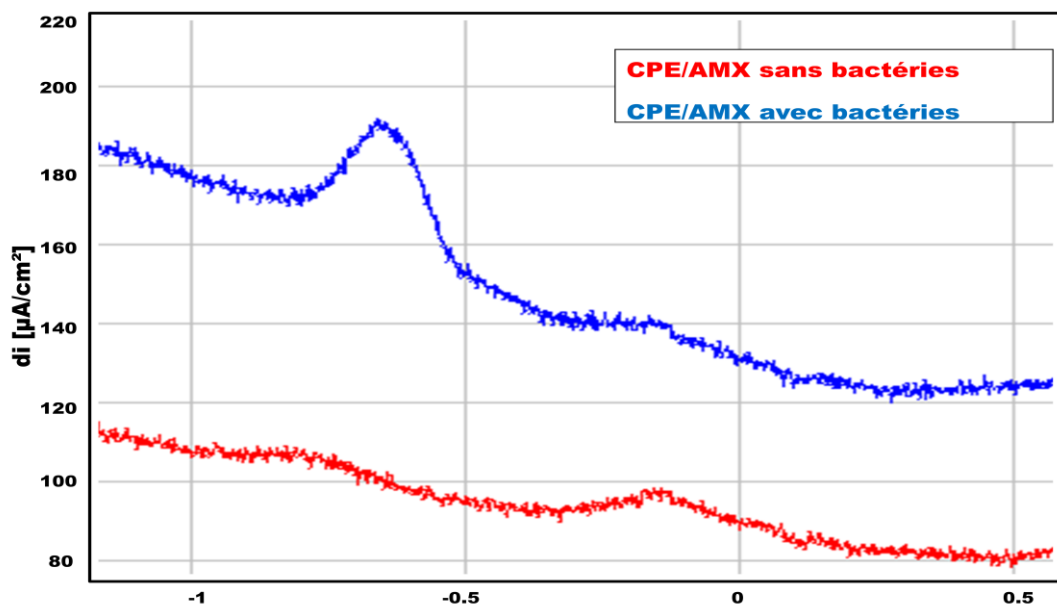


Figure IV-7 : Voltammogrammes à ondes carrées de CPE/AMX ads. sans bactéries (a) et CPE/AMX ads. avec bactéries (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{ mV/s}$, de -1V à 0,5V

II.2.3. Etude électrochimique de CPE /AMX ads. En fonction du temps de contact avec la bactérie.

Afin de choisir le meilleur temps de dépôt de l'amoxicilline, à la surface de l'électrode à pâte de carbone, nous avons testé ces électrodes, préparées à différents temps de séjour, pour la détection des bactéries.

II.2.3.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

On observe une alternance au niveau de la densité de courant des pics enregistrés en fonction du temps de contact avec la bactérie Figure IV-8.

Pendant les 25 premières minutes de contact avec les bactéries, la densité de courant augmente, ce qui traduit une bonne électroactivité de l'électrode due à l'affinité des bactéries avec l'amoxicilline, plus précisément à l'ouverture du noyau β -lactame suivi de la formation de la liaison covalente avec la bactérie.

En effet, la paroi cellulaire bactérienne, composante essentielle au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse, est composée en partie de peptidoglycane et d'amoxicilline, comme les autres pénicillines, possède une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine, précurseur du peptidoglycane (Figure IV-9). Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP. En réagissant avec la pénicilline, la PLP ouvre le noyau β -lactame qui ensuite forme une liaison covalente avec le site actif (Figure IV-10).

A partir de 30 minutes de contact avec la bactérie, la densité de courant diminue.

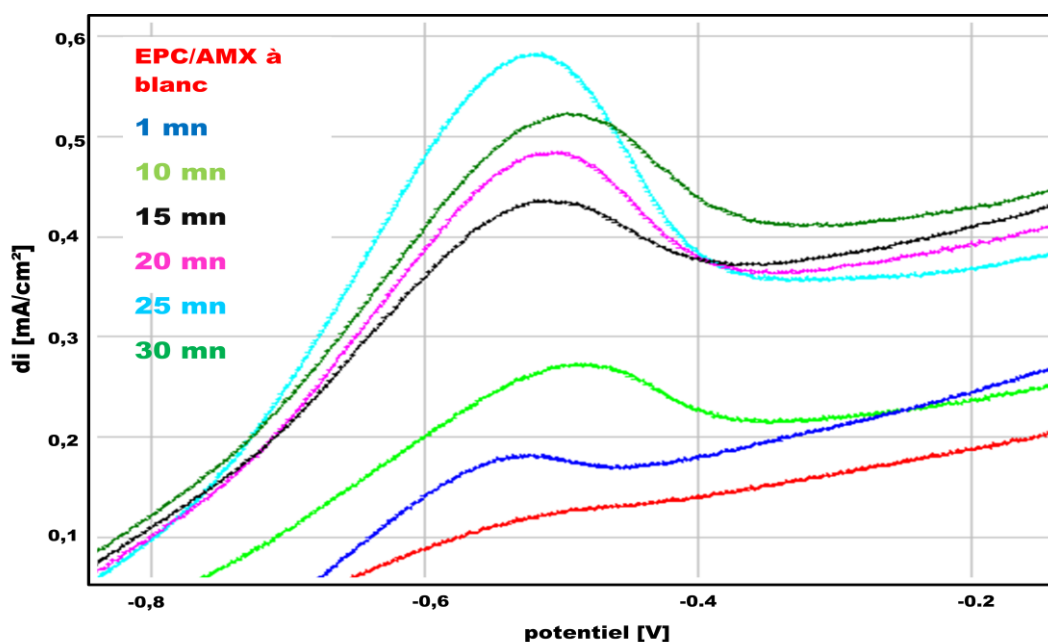


Figure VI -8 : Superposition des voltammogrammes anodique CPE/AMX ads. En fonction du temps de contact avec la bactérie (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

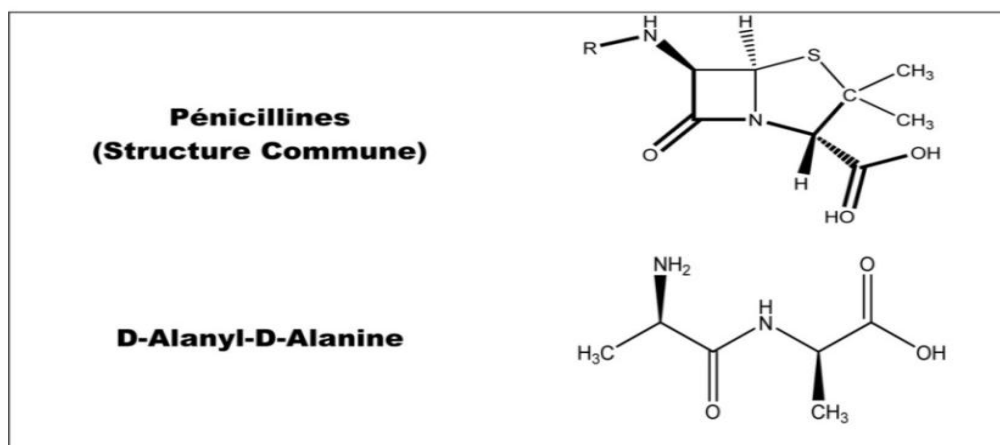


Figure VI -9 : Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine

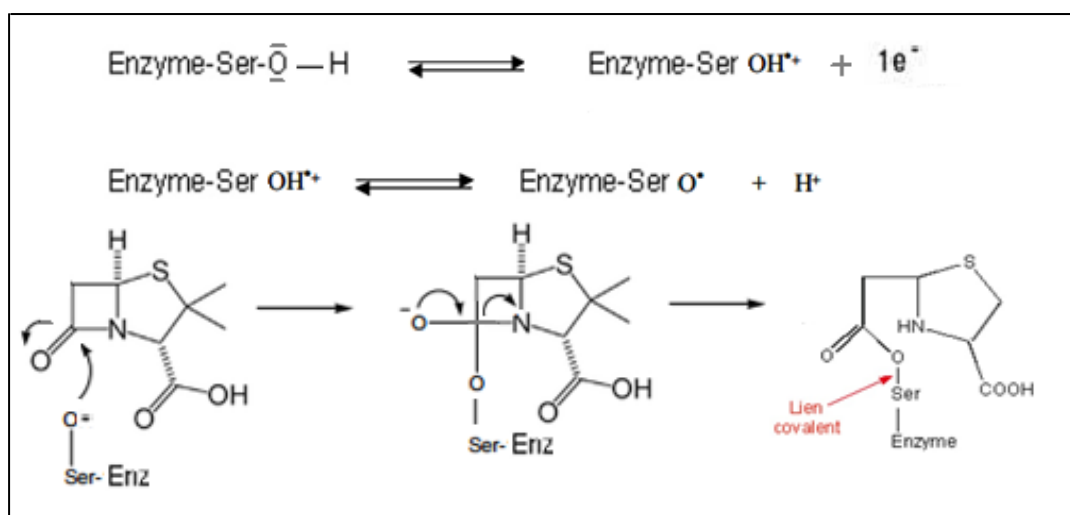


Figure VI -10 : Mécanisme de l'ouverture du noyau β -lactame

II.2.3.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

L'effet du temps de séjour de l'électrode mère sur les densités de courant du pic, révélant la présence des bactéries, est illustré dans la Figure IV-11. Les densités de courant du pic les plus élevées sont obtenues à 25 min de contact avec l'amoxicilline (Fig. IV-12 et Tableau IV-14).

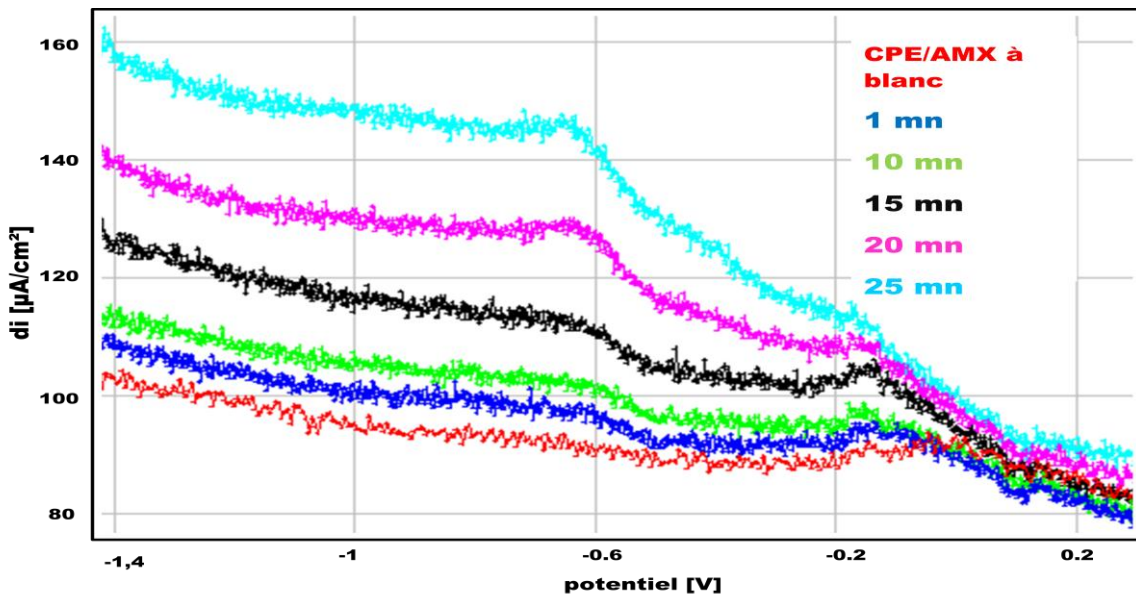


Figure VI -11 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de l'électrode de CPE/AMX En fonction du temps de contact avec la bactérie, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100 \text{ mV/s}$, de -2V à 2V

Tableau IV-14 : Densité du courant en fonction du temps de contact de CPE/AMX ads. Avec la bactérie

Temps (mn)	0	1	10	15	20	25	30	40
$d_i \text{ (mA/cm}^2\text{)}$	0,1036	0,1841	0,2756	0,4345	0,4856	0,5802	0,5174	0,5051

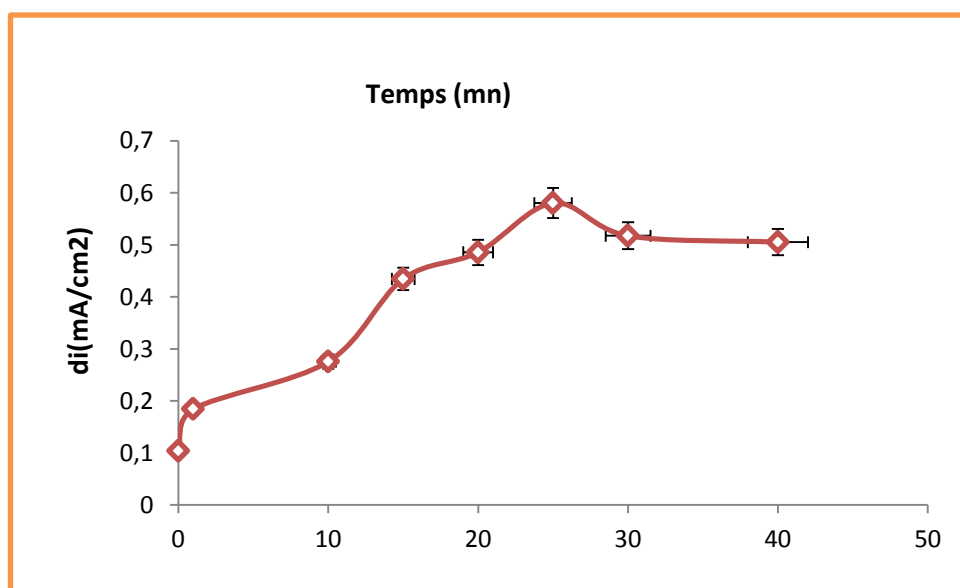


Figure VI -12 : Densité du courant en fonction du temps de contact de CPE/AMX ads. avec la bactérie

II.2.3.3. Evolution de la densité optique avec le temps de contact

Le suivi de la densité optique, de la solution de séjour, en fonction du temps a révélé que la concentration des bactéries baisse après chaque passage de l'électrode. Figure IV-13.

Les bêtalactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant sur les protéines liant les pénicillines (PLP). Ces protéines sont des carboxypeptidases et des transpeptidases nécessaires à la liaison entre les chaînes latérales des peptidoglycanes. L'inhibition d'une ou plusieurs de ces enzymes fait accumuler des précurseurs de peptidoglycanes qui activent le système autolytique de la bactérie et entraînent sa lyse. [5] Ce qui explique la diminution de la densité optique.

Tableau IV-15 : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE /AMX ads. Avec la bactérie

Temps (mn)	0	1	10	15	20	25	30	40
DO	0,983	0,917	0,864	0,809	0,754	0,698	0,650	0,577

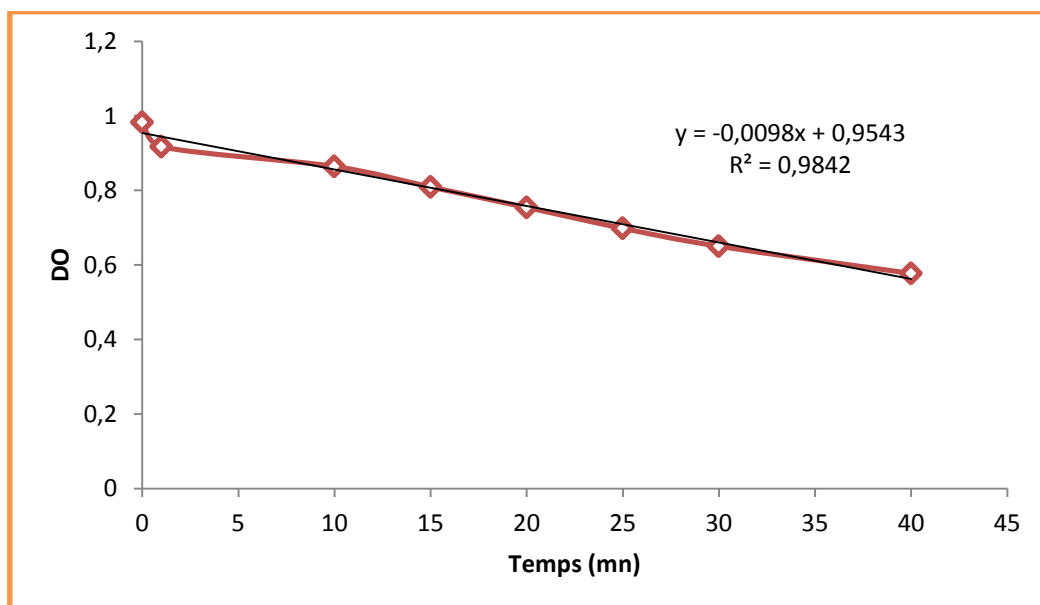


Figure VI -13 : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE/AMX ads. avec les

II.2.3.5. Comparaison du comportement électrochimique et morphologique de CPE /AMX ads. Avant et après le temps de contact avec la bactérie

Après 1 h de contact avec les bactéries, l'électrode à pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline, tend vers l'état initial, c'est-à-dire vers la structure de l'électrode mère. Les bactéries semblent entraîner les molécules d'amoxicilline avec elles. Ce résultat est confirmé par des photographies issues de l'observation au microscope optique. Figure IV-14

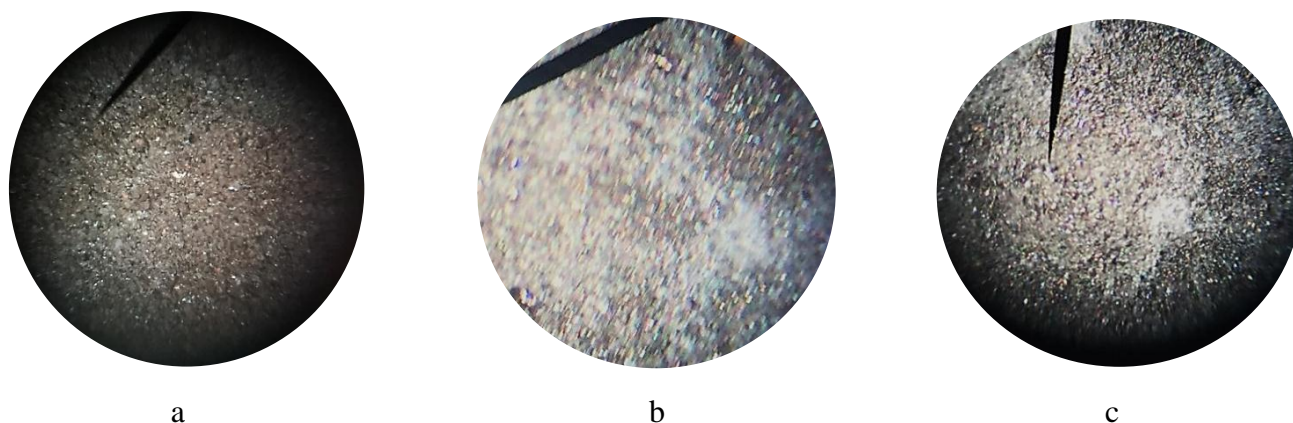


Figure VI-14 : Electrode de pâte de carbone mère (a), après modification par l'amoxicilline (b) et après 1h de temps de contact avec la bactérie (c)

II.2.4. Etude électrochimique de l'effet de la concentration de l'amoxicilline

Les électrodes à pâte de carbone ont été trempées dans des solutions d'amoxicilline à différentes concentrations pendant 20 mn (temps de dépôt optimal). Après 30 mn de contact avec les bactéries, des prélèvements de l'électrolyte (contenant les bactéries) ont été réalisés dans le but de mesurer la densité optique de l'échantillon.

II.2.4.1. Caractérisation par voltammétrie cyclique

La Figure IV-15 -16 montre que les densités de courant croissent en fonction de avec la concentration de l'amoxicilline jusqu'à 8 g/l, au delà de cette concentration l'activité de l'électrode chute, probablement en raison de la désorption des complexes Amoxicilline-bactéries.

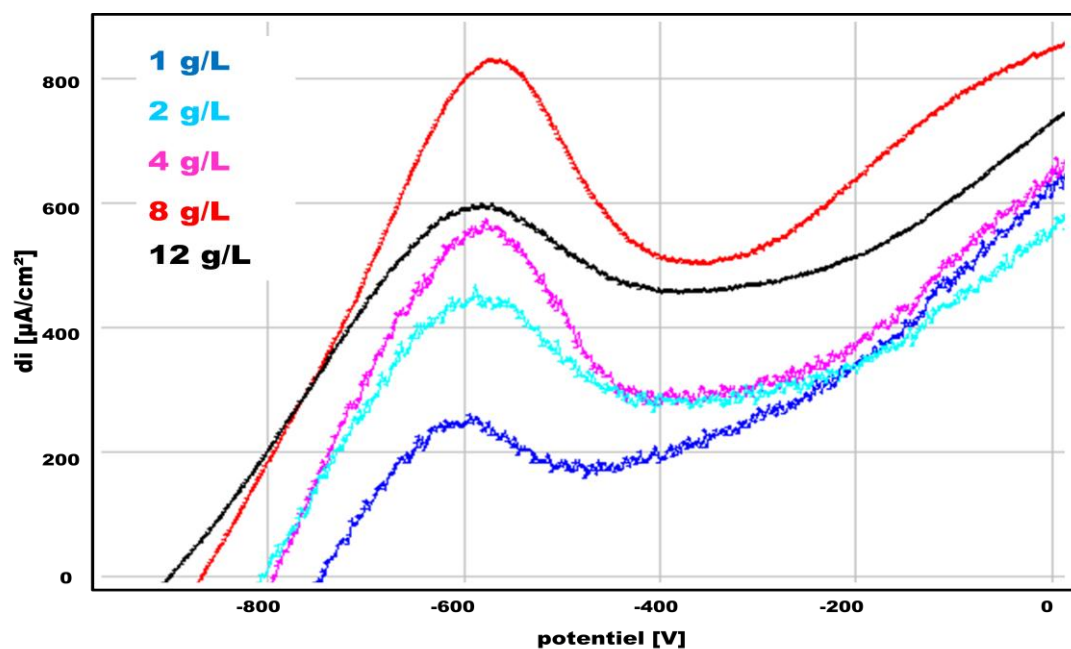


Figure VI -15 : Superposition des voltammogrammes anodique de CPE/AMX ads. Modifiées à différentes concentrations de l'antibiotique en présence des bactéries dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100 \text{ mV/s}$, de -2V à 2V

Tableau IV-16 : Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de CPE /AMX ads.

Concentration [AMX] (g/L)	0	1	2	4	8	12	14
$d_i \text{ (mA/cm}^2\text{)}$	0,1296	0,2074	0,4424	0,5664	0,8276	0,602	0,5282

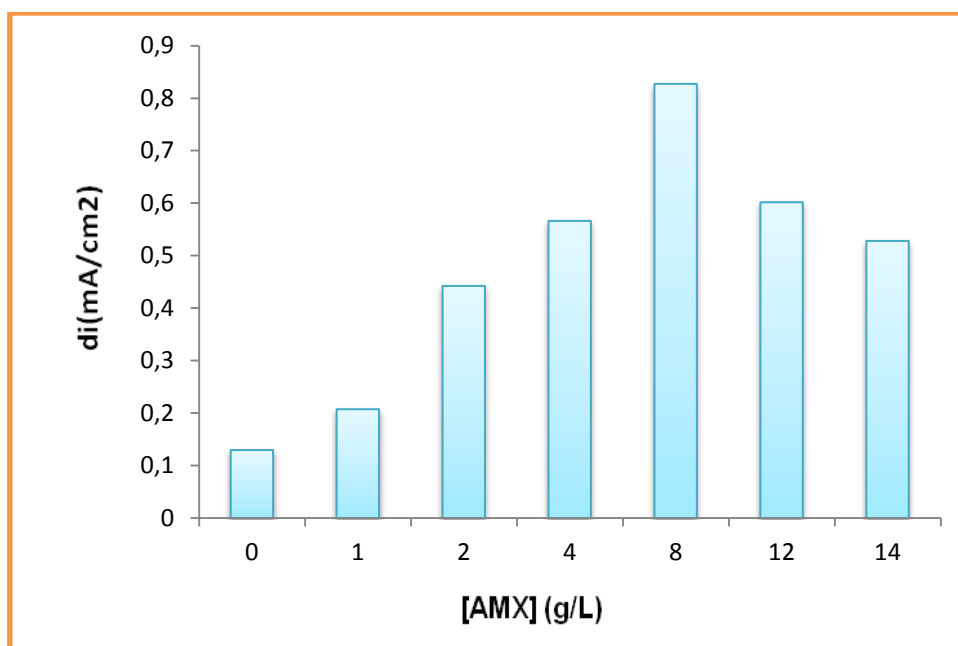


Figure VI -16 : Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de CPE /AMX ads.

II.2.5. Etude de l'effet de la densité optique (DO) de la solution de séjour sur l'activité de l'électrode CPE/AMX.

L'électrode à pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline, à la concentration de 8 g/L, a été caractérisée en présence de bactéries à différentes valeurs de la densité optique.

II.2.5.1. Caractérisation par voltammétries cyclique et à ondes carrée

On enregistre une augmentation linéaire des densités de courant, avec la densité optique. Ce comportement électrochimique de l'électrode est confirmé par la voltammétrie à ondes carrées. (Figs. IV-17, 18 et 19).

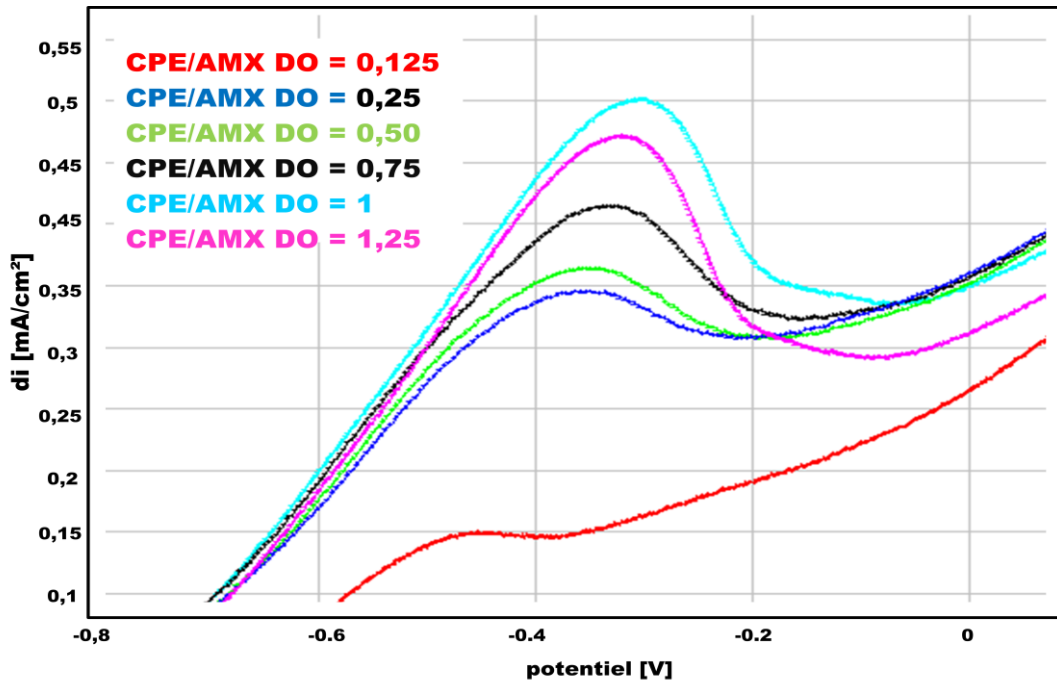


Figure VI -17 : Superposition des voltammogrammes anodique de CPE/AMX ads. à blanc et CPE/AMX ads. (10g/L) en présence des bactéries à différentes densités optiques dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

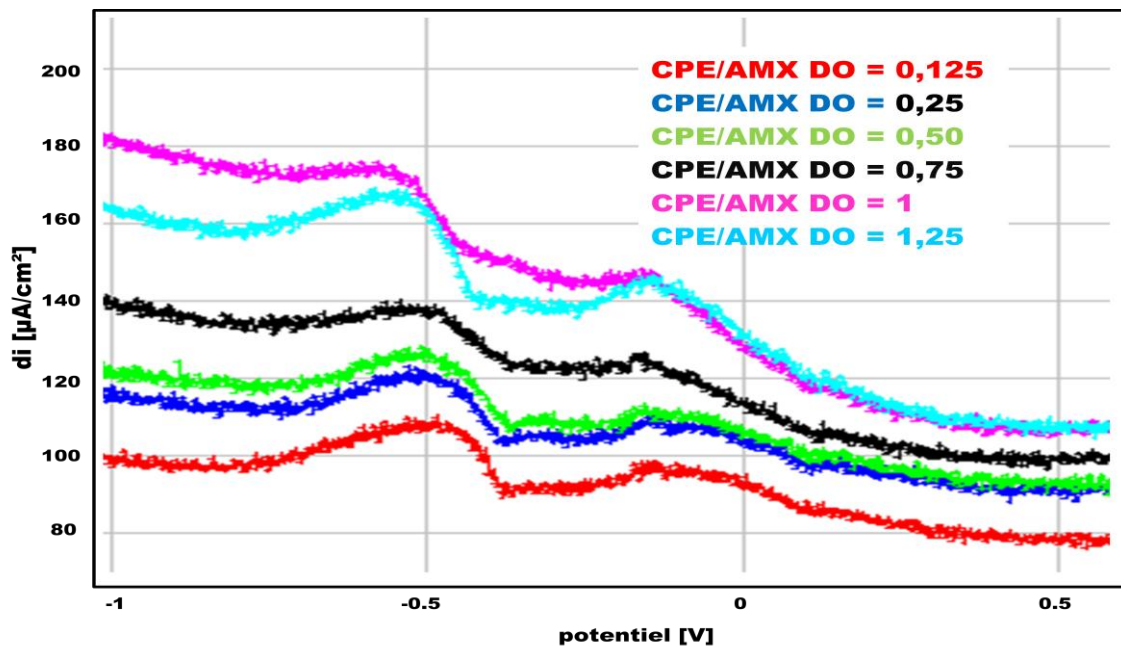
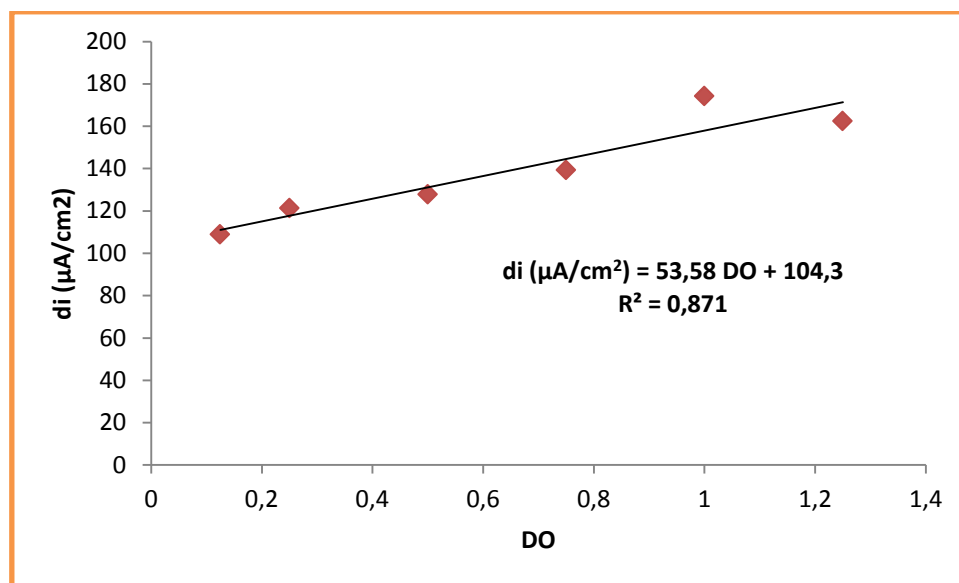


Figure VI -18: Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE/AMX ads. à blanc et CPE/AMX ads. (10g/L) en présence des bactéries à différentes densités optiques dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Tableau IV-17 : Densité de courant (CPE/AMX) en fonction de la densité optique

Densité optique à 550 nm	0,125	0,25	0,50	0,75	1	1,25
di ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	108,9	121,2	127,8	139,3	174,2	162,3

**Figure VI -19** : Densité de courant (CPE/AMX ads.) en fonction de la densité

- **Détermination des limites de détection et de quantification**

Par Utilisation de la densité optique Pour l'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline :

- Equation de courbe régression $IP = 53,58 \text{ DO} + 104,3$ $R^2 = 0,871$
- la limite de détection est de $8,95 \cdot 10^{-5}$ et la limite de quantification est de $2,98 \cdot 10^{-4}$.

Par Utilisation de la concentration bactérienne Pour l'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline,

- Equation de courbe régression $IP = 0,044 [\text{E.COLI}] + 104,33$ $R^2 = 0,871$
- la limite de détection est de $100,1 \cdot 10^3/\text{ml}$ et la limite de quantification est de $333,68 \cdot 10^3/\text{ml}$.

II.2.6. Etude de l'effet du pH

Les performances de l'électrode CPE/AMX ont été testées à différents pH (4,35 ; 5,5 ; 7,5 et 8,5). Dans les conditions optimales antérieurement déterminées, l'électrode élaborée atteint son activité maximale à pH acide (Figs. IV-20 et 21). Un excès de protons dans la solution favorise l'adsorption des bactéries à la surface de l'électrode.

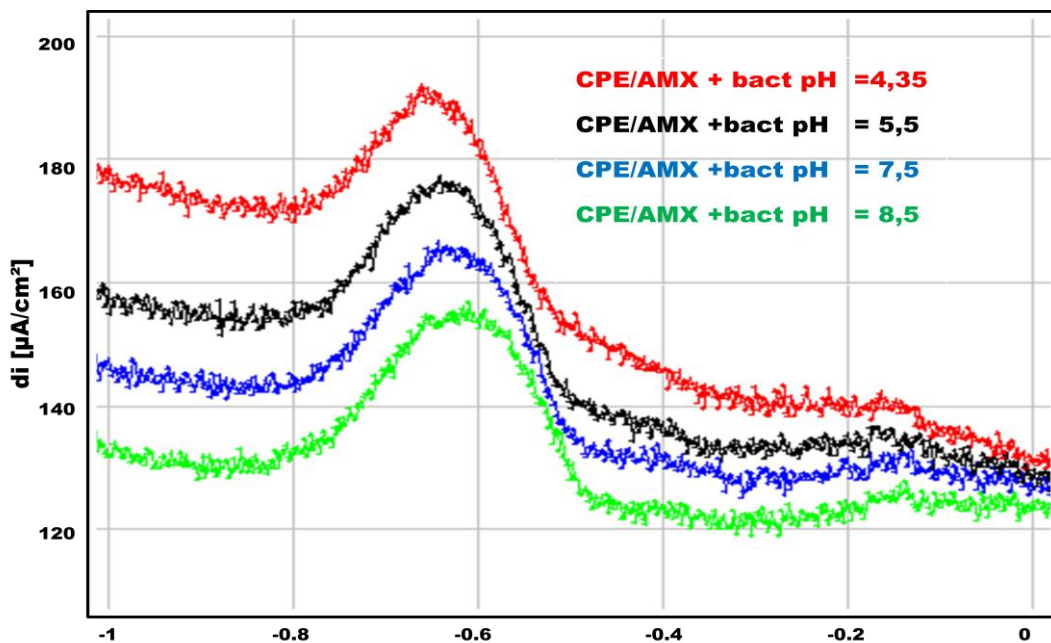


Figure VI -20 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE AMX ads à différents pH en présence des bactéries dans NaCl à 0,1 M ; v = 100mV/s, de -1V à 0 V

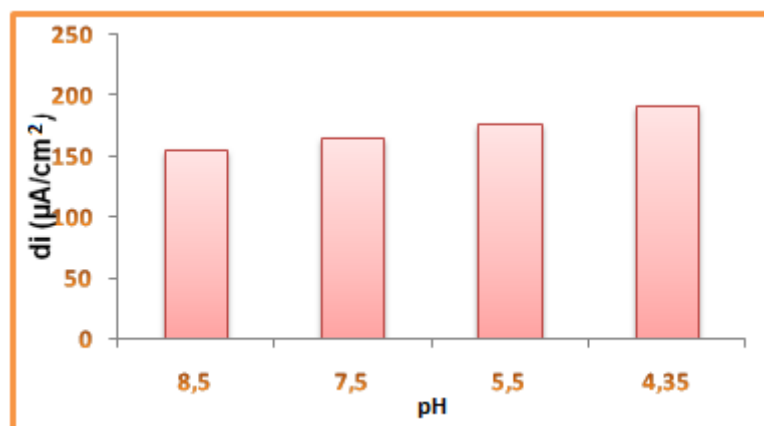


Figure VI -21 : Densité de courant (CPE/AMX) en fonction du PH du milieu.

Au regard de ces résultats, nous pouvons dire que notre électrode présente une meilleure électroactivité en milieu acide ; pH = 4,35.

II.3. Application analytique dans de l'eau de robinet

Pour tester l'efficacité de l'électrode élaborée, dans un milieu réel, nous avons choisi l'eau de robinet. Pour cette étude analytique, nous avons ajouté différentes quantités de bactéries de façon progressive dans la solution de séjour dont le solvant est l'eau de robinet Figure VI-22 ; 23.

Pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline, la limite de détection obtenue dans l'eau de robinet est de $5,91 \cdot 10^{-6}$ et la limite de quantification est de $1,97 \cdot 10^{-5}$.

Dans l'ordre d'évaluer l'applicabilité de l'électrode élaborée à analyser des échantillons réels, trois échantillons d'eau de robinet sont analysés. Le test de recouvrement est calculé par l'addition d'une concentration d'*Escherichia coli* à chaque échantillon. Les résultats obtenus à partir de ce test sont regroupés dans le tableau IV-17. On remarque qu'il y a presque une superposition entre la valeur de (DO) de l'échantillon déterminée par spectrophotomètre de la concentration ajoutée et celle trouvée par l'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline avec un taux de recouvrement acceptable.

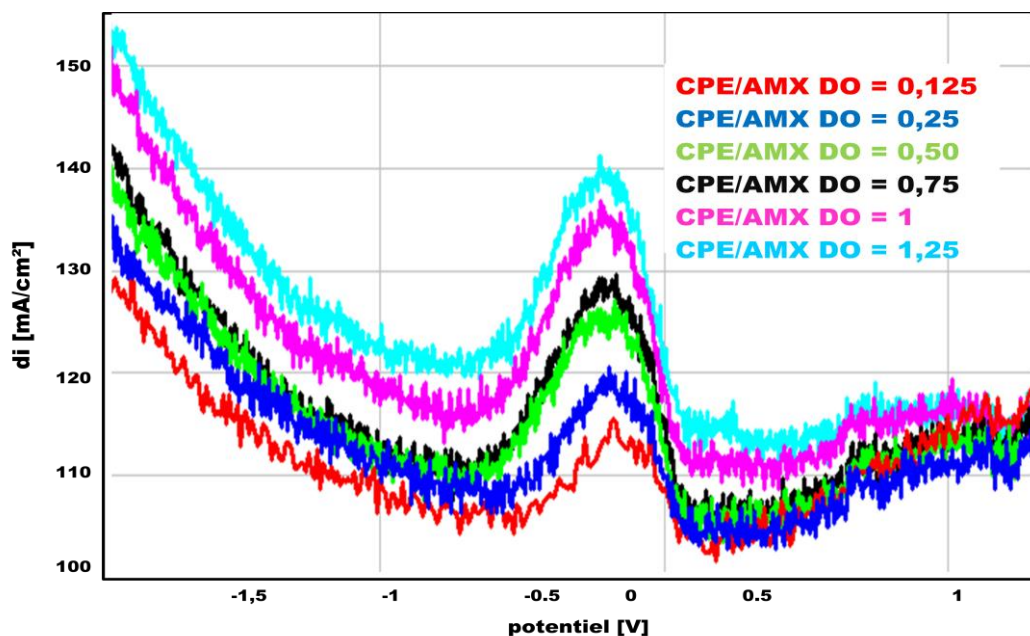
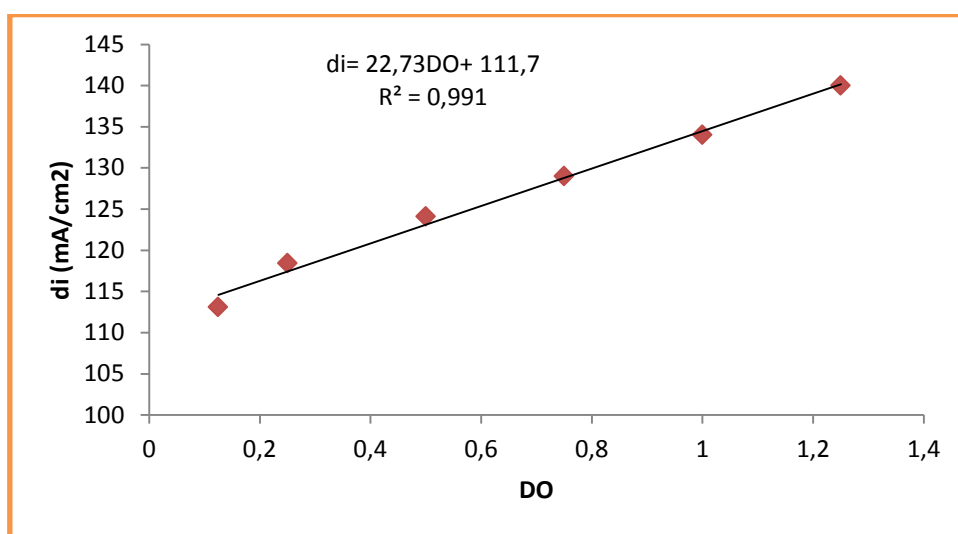


Figure VI-22 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE/AMX ads. En présence des bactéries à différentes densités optiques dans de l'eau de robinet; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 4,68

Tableau IV-18 : Densité de courant (CPE/AMX ads.) en fonction de la densité optique dans l'eau de robinet

DO	0,125	0,25	0,50	0,75	1	1,25
di (mA/cm²)	113,1	118,4	124,1	129	134	140

**Figure IV-23** : la densité de courante en fonction densité optique dans l'eau de robinet**Tableau IV-19** : Détermination d'*Escherichia coli* dans des échantillons d'eau de robinet

	Lecture (DO) de l'échantillon à l'aide du spectrophotomètre	densité de courante d_i ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	(DO) de l'échantillon à l'aide du l'électrode (CPE/AMX ads.)	Le taux de Recouvrement
1	0,22	116,246	0,233	105,9
2	0,60	126,24	0,64	106,66
3	0,95	137,61	1,14	120

Conclusion

La méthode proposée pour la détection d'*Escherichia coli* est caractérisée par la simplicité d'invention. Les résultats obtenus montrent que la méthode proposée (SWV) rapide et très simple et facile à mettre en œuvre. Elle est peu coûteuse et applicable. La pâte de carbone donne forte électroactivité se justifie par l'oxydo-réduction du matériau constituant l'électrode c'est-à-dire le carbone en régime pur de transfert de charge. L'amoxicilline, possédant une

conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine du précurseur du peptidoglycane (composante essentielle de la paroi cellulaire), a donc une affinité pour le site actif de la PLP. En réagissant avec la pénicilline, la PLP ouvre le noyau β -lactame qui ensuite forme une liaison covalente avec le site actif, ce qui empêche la PLP de poursuivre la synthèse du peptidoglycane. Cette réaction permet donc une augmentation de la densité de courant d'où la bonne limite de détection et de quantification.

REFERENCE

- [1] D.L,Nelson, M.M,Cox. (2008). Enzymes Lehninger Principles of biochemistry 5th edition. Ch.4:pp. 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.
- [2] E. L. Crump, "Economic Impact Analysis For the Proposed Carbon Black Manufacturing NESHAP Prepared by:" U.S. Environmental Protection Agency, no. May, 2000
- [3] Sociétés du Groupe Glaxo Smith Kine .
- [4] O. Koffi , A.Bile, R.El Amraoui, O.Abdelaoui and A.Chtaini Electro Analytical Method for Detection of Bacteria Using Amoxicillin Modified Carbon Paste Electrode: Analytical Application in Milk 10 : 2155-1000554.
- [5] E .Bergogne-bérézin, P.Dellamonica ; antibiothérapie en pratique clinique ; Masson ; 2^{ème} édition 1999.

Conclusion générale

La recherche sur les électrodes modifiées a connu un essor remarquable durant les dernières décennies, si l'on considère le rôle primordial qu'elles jouent dans différents aspects d'application, à la fois en analyse et en synthèse. L'actualité de ces études peut s'analyser en examinant les publications majeures qui ont jalonné ces dernières années, ce qui permet d'observer la situation des thèmes récurrents et de détecter les thèmes émergents. La préoccupation commune est relativement nouvelle. Dans ce contexte, nous avons élaboré des électrodes à pâte de carbone sur lesquelles est déposé un film d'ADN, destinées à la détection électrochimique de différents métaux lourds tels que le mercure (II) et le plomb (II). Une autre génération d'électrodes modifiées a attiré notre attention, il s'agit des électrodes biologiques destinées à la détection des anticorps spécifiquement dirigés contre le virus *West Nile* et la détection des bactéries de type *Escherichia coli*, dans des échantillons de sérum de vache et des échantillons de l'eau de robinet. Un autre capteur électrochimique, sensible et sélectif conçu pour la détection et l'analyse de l'adénosine (AD) extracellulaire, a été étudié. Dans cette étude nous avons investi des techniques de voltammétrie cyclique, linéaire, à ondes carrées et par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). Les matériaux (carbone graphite, et phosphate naturel) utilisés dans ce travail ont prouvé une grande efficacité comme support pour étudier le comportement électrochimique à la surface des électrodes. Les modificateurs ne sont pas solubles dans l'eau, non toxique et non polluante. Aucune relargage de l'électrode, à cause de la faible solubilité des modificateurs en solution aqueuse, n'a été observé.

Les résultats obtenus pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film d'ADN, ont montré une grande flexibilité du film biologique à chélater le mercure et le plomb, par la formation d'un complexe plus au moins stable. Les conditions expérimentales optimisées tels que, le temps de préconcentration, le pH de la solution de préconcentration et la vitesse de balayage, ont été étudiées. L'intensité du pic correspondant à l'électroactivité de l'élément analysé augmente avec la durée d'accumulation jusqu'à atteindre une limite à partir de laquelle le profil du pic change. Il devient plus large et l'intensité de son maximum reste constante. Nous avons évalué les performances de la méthodologie analytique, par la détermination simultanée de plusieurs ions métalliques. Les électrodes de type ADN-CPE

sont facilement préparées et ne sont pas très solubles dans l'eau. et les électrodes préparées, ont été testées dans des échantillons, tels que, l'eau de robinet.

Concernant les immunocapteurs électrochimiques élaborés pour des fins immunologiques, utilisant des anticorps sensibles au virus *West Nile*, les résultats obtenus ont montré une grande efficacité en milieu analytique tel que le sérum. Ces capteurs offrent aussi certains avantages, tels que la simplicité de fabrication, la rapidité de mesure. Les paramètres analytiques, tels que, la limite de détection et la détection standard ont été déterminés après optimisation de divers paramètres expérimentaux. Les résultats ont été comparés avec la méthode classique ELISA, et ont montré que le capteur immunologique répond aux exigences analytiques attendues pour évaluer le degré l'infection par *West Nile* dans le sérum de caille.

L'analyse électrochimique de l'adénosine extracellulaire, a été réalisée par l'électrode à pâte de carbone graphite modifiée par le phosphate naturel, les tests voltamétriques ont montré une grande efficacité. Il s'est avéré possible de réaliser des électrodes stables à partir des matériaux simples.

Pour La détection des *Escherichia coli* dans des solutions analytiques, la limite de détection a atteint $5.91.10^{-6}$ et la limite de quantification est de $1,97.10^{-5}$.

Dédicace

*Mon cher Père Salah Samini, A Ma chère Mère Anaya
Belkaoui, ma femme Hanaa mansour*

Mes Sœurs Imane, Sihame, Ikrame

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Electrochimie et des Matériaux Inorganiques (LEMI) à la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal à l'Université Sultan Moulay Slimane (Maroc), dirigé par le Professeur Abdelilah CHTAINI.

Ma première pensée va naturellement à mon encadrant, le Professeur Abdelilah CHTAINI qui m'a accueilli au sein de l'équipe d'électrochimie moléculaire et matériaux inorganiques et guidé tout au long de mes recherches. Ses précieux conseils m'ont éclairé durant ces trois années de thèse. Je le remercie sincèrement pour son soutien et pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Nos discussions, même dans les moments les plus critiques m'ont beaucoup apporté.

Je ne peux manquer de remercier toute l'équipe dirigeante de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal en l'occurrence le Professeur Said Melliani Doyen ; le Professeur Khalid Habbari vice doyen, le Professeur Abdelamajid Zyad, Responsable de la Formation doctorale.

Je remercie tous les membres de l'Equipe d'Electrochimie Moléculaire et des Matériaux Inorganiques (EMMI) de la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal à l'Université Sultan Moulay Slimane.

À tous ceux que j'ai oubliés de citer, recevez mes sincères remerciements.

RESUME

La modification des surfaces des électrodes à pâte de carbone par des molécules biologiques naturelles est largement utilisée pour la détermination électrochimique d'une gamme assez large de substances à de faibles concentrations. Cette modification d'électrodes est réalisée dans le but d'améliorer les performances analytiques des biocapteurs électrochimiques. Il en résulte une augmentation de la sensibilité, un abaissement des limites de détection, une extension du domaine de linéarité. L'objectif de ce travail consiste tout d'abord, à l'élaboration des électrodes à pâte de carbone sur lesquelles est déposé un film d'ADN, par auto-assemblage. Ces électrodes ainsi préparées ont été utilisées pour l'élimination et la détection électrochimique de différents métaux lourds tels que le mercure (II) et le plomb (II). Une autre génération d'électrodes modifiées a attiré notre curiosité, il s'agit des immunocapteurs destinés à la détection des anticorps spécifiquement dirigés contre le virus *West Nile* et la détection des bactéries de type *Escherichia coli* dans des échantillons de sérum de caille et des échantillons de l'eau de robinet. Les méthodes électrochimiques utilisées, voltammétries cyclique et à ondes carrée ont montré une bonne cohérence. Enfin, nous avons proposé une méthode électrochimique rapide, sensible et efficace pour l'identification et la quantification de l'adénosine extracellulaire en utilisant une pâte électrochimique à base de carbone modifiée avec un matériau poreux, tel que le phosphate naturel.

Mots clés : capteur électrochimique, Electrodes modifiées, immunocapteur , phosphate naturel, pâte de carbone , métaux lourds , amoxicilline, bactéries (*Escherichia coli*), virus West Nile, Adénosine, Voltammétrie cyclique, Voltammétrie à ondes carrées, Voltammétrie linéaire, spectroscopie d'impédance électrochimique.

ABSTRACT

The surface modification of carbon paste electrodes by natural biological molecules is widely used for the electrochemical determination of a fairly wide range of substances at low concentrations. This electrode modification is carried out to improve the analytical performance of electrochemical biosensors. These results are in an increase in sensitivity, a decrease in detection limits, and an extension of the linearity range. The objective of this work is to develop carbon paste electrodes in which a DNA film is deposited, by self-assembly. These prepared electrodes have been used for the elimination and electrochemical detection of various heavy metals such as mercury (II) and lead (II). Another generation of modified electrodes has attracted our curiosity, namely immunosensors for the detection of antibodies directed explicitly against the West Nile virus and the detection of *Escherichia coli* bacteria in quail serum samples and tap water samples. The electrochemical methods used, cyclic and square wave voltammetries, showed good consistency. Finally, we proposed a rapid, sensitive and effective electrochemical method for the identification and quantification of extracellular adenosine, using a carbon paste electrode modified with a porous material, such as natural phosphate.

Keywords : electrochemical sensor, modified electrodes, immunosensor, natural phosphate, carbon paste, heavy metals, amoxicillin, bacteria (*Escherichia coli*), West Nile virus, Adenosine, Cyclic voltammetry, Square wave voltammetry, linear voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Généralités	
I. Les biocapteurs	5
I.1. Généralités sur les biocapteurs.....	5
I.2. Historique.....	5
I.3. Définition.....	6
I.4. Transducteurs	7
I.4.1. Transducteurs électrochimiques.....	7
I.5. Différents type des biorecepteurs.....	8
I.5.1. Biorécepteurs métaboliques.....	9
I.5.1.1. Enzymes.....	9
I.5.1.2. Microorganismes.....	10
I.5.2. Biorécepteurs d'affinité.....	10
I.5.2.1. Anticorps.....	10
I.5.2.1.1.Principe.....	10
I.5.2.1.2.Exemples pour la détection d'une toxine et d'une protéine.....	11
I.5.2.2. Acides nucléiques L'ADN.....	12
I.6. Techniques d'immobilisation du biorécepteur.....	14
I.6.1. Adsorption.....	15
I.6.2. Inclusion.....	15
I.6.3. Réticulation.....	15
I.6.4. Couplage covalent.....	15
I.7. Qualité d'un capteur.....	16
I. 8. Grandeurs d'influence.....	17
I. 9. Conclusion.....	18
II. Electrodes modifiées.....	18
II.1. Généralités sur les électrodes modifiées.....	18
II.2. Electrode modifiée par un film polymère.....	20
II.3. Electrode à pâte de carbone modifiée.....	20

II.3.1. Noir de carbone.....	20
II.3.1.1. Electrode à pâte de carbone à composé électroactif incorporé.....	22
II.3.1.2. Quelques exemples d'électrodes à pâte de carbone modifiées.....	23
II.4. Electrode modifiée par le phosphate naturel	23
II.4.1. Généralités sur le phosphate naturel.....	23
II.4.2. Utilisation des phosphates naturels.....	24
II.3.2. Quelques exemples d'électrodes modifiées par le phosphate naturel.....	24
III. Métaux lourds	
III.1. Introduction.....	24
III.2. Intoxication avec les métaux lourds.....	25
III.2.1. Pollution de l'écosystème aquatique par les métaux lourds.....	25
III.2.2. Bioaccumulation des métaux lourds.....	26
III.3. Origine et devenir des métaux lourds.....	27
III.3.1. Introduction.....	27
III.3.2. Rejets des métaux lourds dans l'eau	28
III.3.3. Effet sur la santé humaine.....	28
IV. Adénosine	
IV.1. Généralités sur L'adénosine.....	30
IV.2. Structure chimique de l'adénosine	31
IV.3. Production de l'adénosine	32
IV.4. Rôle de l'adénosine extracellulaire	32
V. Virus West-Nile	
V.1. Généralités.....	34
V.2. Historique	34
V.4. Structure et génome.....	35
V.5. Classification.....	35
V.6. Cycle de transmission.....	36
V.7. Traitement.....	36
VI. La bactérie Escherichia coli	
VI.1. Introduction	37
VI.2. Définition.....	37

VI.3. Sources et mode de transmission d'Escherichia coli.....	38
VI.4. Détection d'Escherichia coli.....	39

VII. Amoxicilline

VII.1.Découverte des β -lactamines et développement de l'amoxicilline.....	39
VII.2.Structure et propriétés physico-chimiques.....	40
VII.2.1.Structure.....	40
VII.2.2.Ionisation.....	41
VII.2.3.Hydrosolubilité et liposolubilité.....	42
VII.2.4.Stabilité en milieu acide.....	42
VII.3.Propriétés biologiques de l'amoxicilline.....	43
VII.3.1.Structure et polymérisation du peptidoglycane.....	43
VII.3.2.Mécanisme d'action des antibiotiques de type bêta-lactamine.....	44
VII.3.1.1.Principe.....	45
VII.3.1.2.Principe Déroulement.....	45
VII.3.1.2.1.Pénétration dans la bactérie.....	46
VII.3.1.2.2.Activité antibactérienne.....	46
• Arrêt de la croissance bactérienne.....	46
• Effet bactéricide.....	47
Références bibliographiques.....	48

Chapitre II : Techniques expérimentales

I. Voltamétrie.....	58
I.1.Composants et principes des techniques voltamétriques.....	58
I.2.Analyses voltamétriques.....	59
I.2.1. Voltamétrie cyclique.....	59
I.2.2. Voltamétrie à onde carrée (SWV : square wave voltammetry).....	63
II. Mesure d'impédance électrochimique.....	63
III.Chronoampérométrie.....	66
IV.Chronopotentiométrie.....	67
V.Spectrométrie infrarouge.....	68
VI.Diffraction des rayons X.....	69
VII.Microscopie électronique à balayage.....	69
VIII.Surfaces spécifiques d'échanges (méthode BET).....	70
Références.....	71

Chapitre III : Biocapteur électrochimique à pâte de carbone modifiée par l'ADN pour la détection et l'élimination du mercure (II) et du plomb(II)

Introduction.....	73
I. Partie Expérimentale.....	75
I.1. Réactifs et produits chimiques.....	75
I.2. Appareil.....	75
I.3. Préparation des électrodes.....	75
I.4. Procédure.....	76
II. Résultats	76
II.1. Optimisation des conditions expérimentale.....	76
II.1.1. Caractérisation de l'électrode modifiée par l'ADN.....	76
II.1.2.: Influence du temps de séjours	78
II.2. Analyse électrochimique des produits estimés être toxiques.....	79
II.2.1. Détection du mercure.....	79
II.2.1.1. Comportement électrochimique du Hg (II) à la surface de CPE-ADN.....	79
II.2.1.2. Influence du temps de préconcentration.....	80
II.2.1.3. Influence de la vitesse de balayage.....	81
II.2.1.4. Influence du pH du milieu.....	82
II.2.1.5. Influence de la concentration de mercure.....	83
II.2.1.6. Courbe de calibration.....	83
II.2.2 Détection du Pb(II).....	86
II.2.2.1. Comportement électrochimique du Pb (II) à la surface de CPE-ADN.....	86
II.2.2.2. Influence du temps de préconcentration des ions Pb^{2+}	88
II.2.2.3. Effet de la vitesse de balayage.....	89
II.2.2.4. Influence du pH du milieu	90
II.2.2.5. Influence de la concentration de Pb^{2+}	91
II.2.2.5.1 Paramètres des spectres d'impédances électrochimiques.....	91
II.2.2.5.2. Courbe d'étalonnage.....	92
II.3. Interférence des ions Hg^{2+} , Pb^{2+} et Cu^{2+}	94
II.4. Application analytique : eau du robinet.....	96
II.4.1. Caractérisation par voltmmétrie cyclique.....	97
II.4.1. Courbe d'étalonnage.....	98

Conclusion.....	99
Chapitre IV : immunocapteurs électrochimiques pour dosage immunologique des anticorps du virus West Nile.....	101
Introduction.....	102
I. Partie expérimentale	102
I.1.Appareillages.....	102
II.2.Réactifs.....	102
II.2.2. Conjugué peroxydase-anticorps secondaire (HRP-conjugate).....	102
II.2.3. Sérum positif contient Les anticorps du virus West Nile	104
II.3.Procédure.....	104
II.3.1.Elaboration de l'électrode de pâte de carbone phosphate CPE-NP.....	104
II.3.2.Modification des électrodes mères par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire.....	104
II.3.3.Caractérisation des électrodes modifiées en présence des anticorps (de West Nile).....	105
II.3.3.1.Etude de l'effet du temps de contact avec les anticorps.....	105
II.3.3.2.Etude de l'effet de facteur de dilution de peroxydase-anticorps secondaire.....	105
II.3.4. Caractérisation des anticorps par teste Elisa.....	106
II.3.4.1. Principe Test ELISA.....	106
II.3.4.2.Mode opératoire.....	107
III. Résultats et discussion.....	108
III.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de carbone phosphate avant et après modification par conjuguer peroxydase-anticorps secondaire.....	108
III.1.2.Caractérisations électrochimiques de CPE-NP / PAS.....	108
III.1.2.1.Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	108
III.1.2.2.Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	109
III.1.2.3.Caractérisation par l'EIS	110
III.1.3.Caractérisation physique de CPE-NP / PAS	111
III.2.Optimisation des paramètres d'adsorption.....	111
III.2.1.Choix du temps de dépôt.....	111
III.2.2. Etude électrochimique de CPE-NP en fonction de la dilution du conjugué peroxydase-anticorps secondaire	112
III.3.Etude électrochimique de CPE-NP / PAS en présence des anticorps West Nile.....	114

III.3.1.Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	114
III.3.2.Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	114
III.3.3.Caractérisation morphologique	115
III.4.Optimisation des conditions expérimentales.....	116
III.4.1. Etude électrochimique L'effet du temps d'incubation des anticorps West Nile	116
III.4.1.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	116
III.4.1.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	118
III.4.1.3. Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps.....	118
III.4.2.Etude de l'effet vitesse de balayage sur CPE-NP / PAS en présence des anticorps.....	119
III.4.3. Etude de l'effet du pH de la solution d'incubation sur les performances de l'électrode CPE-NP / PAS.....	121
III.4.4.Etude de l'effet du facteur de dilution des anticorps (l'effet de concentration).....	121
III.4.4.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	121
III.4.4.2.Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	122
III.4.4.3.Caractérisation par spectroscopie d'impédances électrochimiques.....	123
III.4.4.3.1.Paramètres des spectres d'impédances électrochimiques.....	123
III.4.4.4.Etude de l'effet de la densité optique (DO) des anticorps sur CPE-NP / PAS.....	124
III.4.4.4.1. Courbe d'étalonnage.....	124
III.5.Application analytique.....	125
Conclusion	127
Référence	127
Chapitre V : Détermination électrochimique de l'adénosine par Électrode en pâte de carbone modifiée au phosphate naturelle : application analytique en Sérum	128
Introduction	130
I. Partie expérimentale.....	130
I.1. Appareillages	130
I.2. Réactifs.....	130
I.2.1. Carbone ghraphite	130
I.2.2. Adénosine	131
I.2.3. Phosphate Naturel.....	131
I.2.3.1 Composition et caractérisation du Phosphate Nature.....	131

I.2.3.2 Composition Minéralogique du Phosphate Naturel.....	132
I.2.3.3 Composition de la matière phosphatée.....	132
I.2.3.4 Structure des apatites.....	133
I.2.4.Préparation de sérum.....	134
I.2.4.1 Equipement et infrastructures.....	134
I.2.4.2 Procédure de Préparation de sérum.....	135
I.3. Procédure de Préparation des électrodes à pâte de carbone modifiées par le phosphate Naturel.....	135
II. Résultats et discussion.....	136
II.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de la pâte de carbone avant et après modification par le phosphate naturel.....	136
II.1.1. Comportement électrochimique du NP-CPE	136
II.1.2. Morphologie de la surface.....	136
II.2. Détection d'adénosine	139
II.2.1. Caractérisation électrochimique.....	139
II.2.1.1.Caractérisation électrochimique par la voltammétrie cyclique et voltampérométrie à ondes carrées.....	139
II.2.1.2.Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique.....	140
II.2.1.3.Caractérisation morphologique	141
II.2.2.Optimisation des conditions expérimentales.....	141
II.2.2.1.Influence du temps de préconcentration.....	141
II.2.2.2.Influences du pH.....	142
II.2.2.3.Effet du taux de balayage.....	143
II.2.2.4. Effet de l'électrolyte	144
II.2.2.5.Effet de la concentration d'adénosine.....	145
II.2.2.5.1. Caractérisation voltammétrie cyclique	145
II.2.2.5.2.Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique.....	146
II.2.2.5.3.Courbe de calibration.....	146
III.2.3.Application analytique.....	147
Conclusion.....	149
Références.....	150

Chapitre VI Détection d'Escherichia coli par l'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline	152
Introduction.....	153
I. Partie expérimentale.....	153
I.1.Réactifs.....	153
I.1.1.amoxicilline.....	153
I.1.2.Les bactéries.....	153
I.1.2.1. Protocole de la culture.....	154
I.1.2.1. Protocole de la culture Détermination de la concentration bactérienne	154
I.2. Préparation des électrodes.....	154
I.2.1.Elaboration de l'électrode de pâte de carbone (CPE).....	155
I.2.2.Modification des électrodes mères par adsorption de l'amoxicilline.....	155
I.2.3.Caractérisation des électrodes modifiées en présence des bactéries.....	156
II. Résultats et discussion.....	156
II.1.Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline.....	156
II.1.1.Caractérisation électrochimique.....	156
II.1.1.1.Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	156
II.1.1.2.Choix du temps de dépôt.....	158
II.1.2.Caractérisation morphologique.....	158
II.2. Caractérisations électrochimiques de CPE/AMX en présence des bactéries.....	159
II.2.1.Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	159
II.2.2.Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	160
II.2.3.Etude électrochimique de CPE /AMX ads. En fonction du temps de contact avec la bactérie.....	160
II.2.3.1.Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	160
II.2.3.2.Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	162
II.2.3.3. Evolution de la densité optique avec le temps de contact	163
II.2.3.5.Comparaison du comportement électrochimique et morphologique de CPE /AMX ads. Avant et après le temps de contact avec la bactérie.....	164
II.2.4. Etude électrochimique de l'effet de la concentration de l'amoxicilline	165
II.2.4.1.Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	165
II.2.5. Etude de l'effet de la densité optique (DO) de la solution de séjour sur l'activité	

De l'électrode CPE/AMX.....	165
II.2.5.1.Caractérisation par voltammétries cyclique et à ondes carrée.....	166
II.2.6.Etude de l'effet du PH.....	169
II.3.Application dans de l'eau de robinet	170
Références bibliographique	171
Conclusion.....	172
Conclusion générale.....	175

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

- Figure I-1:** Nombre de travaux concernant les biocapteurs à partir de 1956.
- Figure I-2:** principe de fonctionnement d'un biocapteur
- Figure I-3:** Représentation schématique de quelques biorécepteurs.
- Figure I-4:** Structures d'un anticorps.
- Figure I-5:** Biocapteur élaboré au laboratoire pour la détection de PB1-F2.46
- Figure I-6:** Structure schématique et composition de l'ADN
- Figure I-7:** Évolution du nombre de publication d'articles entre 1995 et 2015 traitant des biocapteurs électrochimiques à ADN. Recherche effectuée avec les mots clés « DNA electrochemical biosens ».
- Figure I-8:** Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation du biorécepteur.
- Figure I-9 :** Schéma idéal de la réponse d'un capteur
- Figure I-10:** Aspect (a), structure chimique (b) et représentation schématique d'une particule (c) de noir de carbone.
- Figure I-11:** Observations MEB du noir de carbone (Vulcain XC72) mettant en évidence les dimensions des particules de noir de carbone ainsi que la formation d'agrégats.
- Figure I-12:** Cycle de l'eau
- Figure I-13:** Structure chimique de l'adénosine : Base purique (en rouge) liée au ribose (en bleu). (Grenz et al. 2011)
- Figure I-14:** Principales sources de l'adénosine.
- Figure I-15:** Rôle de l'adénosine dans le système nerveux central. Les fonctions cérébrales sont en bleu, les dysfonctionnements en rouge et les maladies en orange. AD : adénosine. D'après .
- Figure I-16:** Apparence du virus West Nile en microscopie électronique (Source : Site internet Bioquest: Community Resources for problem solving in biology)
- Figure I-17 :** Phylogénies des différentes souches d'*Escherichia coli* déterminée à partir des génomes disponibles des souches d'*E.Coli* présentes dans le microbiote humain
- Figure I-18 :** Structure semi-développée de l'amoxicilline identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau β -lactamine
- Figure I-19 :** Structure des pénicillines
- Figure I-20 :** Structure du peptidoglycane
- Figure I-21 :** Réaction de polymérisation du peptidoglycane

Figure I-22 : Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine

Figure I-23 : Réaction de transpeptidation

Figure I-24 : Inhibition de la transpeptidation par la bêta-lactame

Chapitre II

Figure II-1 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat.

Figure II-2 : Fonction imposée.

Figure II-3 : Voltammogramme cyclique enregistré pour une espèce Red seule en solution.

Figure II-4 : Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps.

Figure II-5 : Voltammogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.

Figure II-6 : Représentation de la variation de l'impédance d'un système électrochimique en fonction de la pulsation ω . Cas idéal où les pulsations ω_c , ω_a , ω_d sont suffisamment différentes les unes des autres.

Figure II-7 : Chronoampérogramme typique ; ires le courant résiduel.

Figure II-8 : Chronopotentiogramme typique d'un système électrochimique réversible.

Chapitre III

Figure III-1 : Les voltammogrammes cycliques enregistrés dans une solution tampon (pH 7), à CPE et ADN-CPE, vitesse de balayage 100 mV / s.

Figure III-2 : Spectres EIS de CPE (courbe a) et DNA-CPE (courbe b), la plage de fréquences a été réglée sur 1 Hz jusqu'à 1 MHz.

Figure III-3 : Superposition des voltammogrammes cycliques CPE modifiée par ADN aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7,42

Figure III-4 : Les voltammogrammes cycliques enregistrés dans une solution tampon (pH 7), à ADN-CPE (a) et ADN-CPE (b) Hg^{2+} , vitesse de balayage 100 mV / s.

Figure III-5 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés sur CPE-ADN, dans NaCl 0,1 M contenant 3 mmol/l de Hg^{2+} à différents temps de préconcentration, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

Figure III-6 : Effet du temps de préconcentration sur l'intensité du pic redox de 3 mmol.l⁻¹ du mercure sur CPE-ADN, électrolyte support 0,1 mol l⁻¹ Na₂SO₄.

Figure III-7 : Voltammogramme cyclique, enregistré, dans une solution NaCl 0.1M après l'accumulation de Hg^{2+} , à différentes vitesses de balayage, pour l'électrode CPE-ADN.

Figure III-8 : Influence de la vitesse de balayage sur l'intensité des pics redox du mercure (3 mmol l⁻¹) pour CPE-ADN. (3

- Figure III-9** : Voltammogrammes cyclique b et à onde carrée a enregistrés sur CPE-ADN, dans NaCl 0,1 M contenant 3 mmol/l de Hg^{2+} à différents pH, vitesse de balayage 100 mV / S, pH =7
- Figure III-10** : Voltammogrammes à ondes carrées de différentes concentrations en Hg^{2+} dans 0,1 M NaCl, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.
- Figure III-11** : Voltammogrammes cyclique de différentes concentrations en Hg^{2+} dans 0,1 M NaCl, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.
- Figure III-12** : Influence de la concentration de Hg^{2+} sur l'intensité des pics redox Obtenus par VC pour CPE-ADN.
- Figure III-13** : Microscopie optique correspondant à a-CPE/Pb(II), b-CPE-ADN/Pb (II), c-CPE et d ADN-CPE.
- Figure III-14** : Voltammogrammes cycliques enregistrés dans une solution 0.1 mol l⁻¹ de NaCl pour CPE-ADN (a), et CPE-ADN /pb²⁺ (b), tp=10 min, V= 100 mV.s⁻¹.
- Figure III-15** : Voltammogrammes SQW enregistrés dans une solution 0.1 mol l⁻¹ de NaCl Pour CPE-ADN (a), et CPE-ADN /Pb²⁺ (b), tp=10 min, V= 100 mV.s⁻¹.
- Figure III-16** : Influence du temps de préconcentration sur l'intensité du pic d'oxydation, pH=7 pour CPE-ADN
- Figure III-17** : Voltammogramme cyclique, enregistré, dans une solution nacl 0.1M après l'accumulation de Pb²⁺, à différentes vitesses de balayage, pour l'électrode CPE-ADN.
- Figure III-18** : Influence de la vitesse de balayage sur les intensités de pics d'oxydation dans une solution de NaCl 0.1M après l'accumulation de Pb²⁺ pH=7
- Figure III-19** : Voltammogrammes cycliques enregistrés sur CPE-ADN, dans NaCl 0,1 M contenant 3 mM /l de pb²⁺ à différents pH, vitesse de balayage 100 mV / S, pH =7
- Figure III-20** :Superposition des spectres d'impédance enregistrés à l'ADN-CPE, après la préconcentration à différentes concentrations de plomb, dans NaCl à 0,1 de 100 mHz à 100 kHz, pH = 7,42
- Figure III-21** : Voltammogrammes SQW enregistrés à l'ADN-CPE, dans une solution tampon après la préconcentration à différentes concentrations de plomb.
- Figure III-3** : Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration de Pb (II).
- Figure III-4** : Microscopie optique correspondant à a-CPE/Pb(II), b-CPE-ADN/Pb(II), c-CPE et d-ADN-CPE.
- Figure III-5** : Effet des interférences des trois cations étudiés en solution tampon.
- Figure III-6** :Voltammogrammes enregistrés dans l'eau de robinet de l'électrode CPE-ADN en présence (b) et en absence (a) de plomb (II) A et de mercure (II) B

Figure III-26 : Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration de Pb (II) dans l'eau de robinet

Figure III-27 : Evolution des densités de courant des pics en fonction de la concentration de Hg (II) dans l'eau de robinet.

Chapitre IV

Figure IV-1 : Le principe Test ELISA

Figure IV-2 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE-NP non modifiée et CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-3 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP (a) non modifiée et CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-4 : Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP (a) non modifiée et CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), dans NaCl à 0,1 M ; pH = 7

Figure IV-5 : Electrode de pâte de carbone phosphate avant modification (a) et après modification par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire (b), 20 mn de temps de dépôt (b)

Figure IV-6 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP modifiée par le conjugué peroxydase-anticorps secondaire aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7

Figure IV-7 : Densité de courants en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS

Figure IV-8 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP modifiée aux différentes concentrations de peroxydase-anticorps secondaire dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-9 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS (a) sans anticorps et CPE-NP / PAS avec anticorps (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-10 : Superposition des voltammétrie à ondes carrées de CPE-NP / PAS (a) sans anticorps et CPE-NP / PAS avec les anticorps (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-11 : Electrode CPE-NP / PAS avant incubation dans les anticorps (a) et après, 20 mn d'incubation dans les anticorps (b)

Figure IV-12 : représentation schématique de la préparation d'une couche d'immunodétection

Figure IV-13 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7

Figure IV-14 : Densité du courant en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps

Figure IV-15 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE-NP / PAS aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7

Figure IV-16 : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS Avec les anticorps

Figure IV-17 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différentes vitesses de balayage, 60, 80, 100, 120,140, 160, mV/s dans NaCl à 0,1 M ; de -2V à 2V

Figure IV-18 : Densité du courant en fonction de vitesses de balayage

Figure IV-19 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différents pH en présence des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

Figure IV-20 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différentes concentration des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-21 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE-NP / PAS à différentes concentration des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Figure IV-22: Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP / PAS à différentes concentration des anticorps dans NaCl à 0,1 M ; de 100 mHz à pH = 7

Figure IV-23 : Densité de courant en fonction de la densité optique

Figure IV-24 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE-NP / PAS à différentes concentration des anticorps dans échantillon Sérum de caille; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7

Chapitre V :

Figure V-1 : Poudre commerciale de graphite

Figure V-2 : Poudre de phosphate naturel : (a) avant calcination, (b) après calcination

Figure V-3 : Projection de la maille hexagonale sur le plan 001 de l'hydroxyapatite [10]

Figure V-4: Projection sur le plan de base 001 de la structure de l'apatite (on a retiré les ions OH ainsi que les ions calcium qui entourent l'axe sénaire hélicoïdal afin de mettre en évidence les tunnels) [10]

Figure V-5 : Photographie n° 1 : Centrifugeuse Sigma 3-16 K avec ses portoirs Vacutainer 5ml.

Figure V-6 : Voltammogrammes cycliques enregistrés pour CPE (a) et NP-CPE (b), dans NaCl 0,1 M à 100 mv / s, pH = 7

Figure V-7 : Micrographie électronique de phosphate naturel.

Figure V-8 : Spectre de diffraction X de phosphate naturel après traitement.

Figure V-9 : Spectre d'adsorption infrarouge de phosphate naturel traité à 900°C

Figure V-10 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés pour CPE (a) et pour NP-CPE (b) après accumulation dans une solution contenant de l'adénosine 0,1 M NaCl, pH = 7, le temps de préconcentration = 20 min.

Figure V-11 : Voltammogrammes cycliques enregistrés pour NP-CPE: (a) avant accumulation de l'électrode dans la solution contenant de l'adénosine et (b) après accumulation dans une solution d'adénosine (20 μ M), dans NaCl 0,1 M à 100 mV / s, pH = 7, temps de préconcentration = 20 min.

Figure V-12: Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP (a) avant accumulation de l'électrode dans la solution contenant de l'adénosine et (b) après accumulation dans une solution d'adénosine (20 μ M), 0,1 M NaCl, pH = 7 = le temps de préconcentration 20 min de 100 mHz à 100 kHz, 100 mV / S, pH = 7.

Figure V-13 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés sur NP-CPE, dans NaCl 0,1 M contenant 20 μ M d'adénosine à différents temps de préconcentration, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

Figure V-14 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés sur NP-CPE, dans NaCl 0,1 M contenant 20 μ M d'adénosine à différents pH, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7

Figure V-15 : Voltammogrammes cycliques de 20 μ M d'adénosine dans 0,1 M NaCl, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7 à différentes vitesses de balayage mV / S.

Figure V-16 : Tracé de la surface des pics par rapport au taux de balayage

Figure V-17 : Réaction redox de l'adénosine

Figure V-18 : Voltammogrammes à onde carrée d'adénosine à 20 μ M à différents électrolytes Les 0,1 M de (c) NaCl, (b) Na₂SO₄, (a) KCl.

Figure V-19: Cyclic voltammograms of different concentration of adenosine in 0,1 M NaCl, scan rate 100 mV/S, pH= 7.

Figure V-20 : Superposition des spectres d'impédance électrochimique de CPE-NP de différentes concentrations en adénosine dans 0,1 M NaCl, de 100 mHz à 100 kHz, 100 mV / S, pH = 7.

Figure V-21 : Voltammogrammes à ondes carrées de différentes concentrations en adénosine dans 0,1 M NaCl, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

Figure V-22 : Plots of reduction peak area versus added concentration of adenosine, in 0.1 M NaCl, pH=7, preconcentration time=20 min.

Figure V-23 : Voltammogrammes à onde carrée de différentes concentrations d'adénosine dans le sérum, vitesse de balayage 100 mV / S, pH = 7.

Figure V-24 : Voltammogrammes cycliques de différentes concentrations d'adénosine dans le sérum, taux de balayage 100 mV / S, pH = 7

Figure V-25 : Tracés de la surface du pic de réduction par rapport à la concentration ajoutée d'adénosine dans le sérum, pH = 7, temps de préconcentration = 20 min.

Chapitre VI

Figure VI -1 : série d'étalons d'opacité différente McFarland standard

Figure VI -2 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE mère et CPE/AMX ad

Figure VI-3 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE mère à différentes vitesses de balayage 10, 20, 30, 50 et 100 mV/s dans NaCl à 0,1 M ; de -2V à 2V

Figure VI-5 : Electrode de pâte de carbone avant modification (a) et après modification par l'amoxicilline, 20 mn de temps de dépôt (b)

Figure VI-4 : Superposition des voltammogrammes cycliques de l'CPE non modifiée et CPE modifiée par l'amoxicilline aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, $\text{pH} = 7$

Figure VI-6 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE/AMX ads.sans bactéries (a) et CPE/AMX ads. avec bactéries (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

Figure IV-7 : Voltammogrammes à ondes carrées de CPE/AMX ads.sans bactéries (a) et CPE/AMX ads.avec bactéries (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{ mV/s}$, de -2V à 2V

Figure VI -8 : Superposition des voltammogrammes cycliques CPE/AMX ads. En fonction du temps de contact avec la bactérie (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; $\text{pH} = 7$

Figure VI-9 : Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine

Figure VI-10 : Mécanisme de l'ouverture du noyau β -lactame

Figure VI-11 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de l'électrode de CPE/AMX En fonction du temps de contact avec la bactérie, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{ mV/s}$, de -2V à 2V

Figure VI-12 : Densité du courant en fonction du temps de contact de CPE/AMX ads.avec la bactérie

Figure VI-14 : Electrode de pâte de carbone mère (a), après modification par l'amoxicilline (b) et après 1h de temps de contact avec la bactérie (c)

Figure VI-15 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE/AMX ads. Modifiées à différentes concentrations de l'antibiotique en présence des bactéries dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{ mV/s}$, de -2V à 2V

Figure VI-16 : Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de CPE /AMX ads.

Figure VI-17 : Superposition des voltammogrammes cycliques de CPE/AMX ads. à blanc et CPE/AMX ads. (10g/L) en présence des bactéries à différentes densités optiques dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

Figure VI-18: Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE/AMX ads. à blanc et CPE/AMX ads. (10g/L) en présence des bactéries à différentes densités optiques dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; $\text{pH} = 7$

Figure VI-19 : Densité de courant (CPE/AMX ads.) en fonction de la densité optique

Figure VI-20 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE AMX ads à différents pH en présence des bactéries dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

Figure VI-21 : Densité de courant (CPE/AMX) en fonction du PH du milieu.

Figure VI-22 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de CPE/AMX ads. En présence des bactéries à différentes densités optiques dans de l'eau de robinet; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 4,68

Figure VI-23 : la densité de courante en fonction densité optique dans l'eau de robinet

LISTE DES TABLAUX

- Tableau I-1** : Principaux modes de détection appliqués dans l'élaboration de biocapteurs.
- Tableau III-2** : Résultat de l'analyse du Pb^{2+} et d' Hg^{+} dans des échantillons d'eau de robinet.
- Tableau IV-3**: Gamme de dilutions
- Tableau IV-4** : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS
- Tableau IV-5** : Densité de courant en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps
- Tableau IV-6** : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE-NP / PAS avec les anticorps
- Tableau IV-7** : Densité du courant en fonction de vitesses de balayage
- Tableau IV-8** : Paramètres des spectres d'impédance électrochimiques de CPE-NP / PAS
- Tableau IV-8** : Paramètres des spectres d'impédance électrochimiques de CPE-NP / PAS
- Tableau IV-9** : Influence de la concentration des anticorps sur l'intensité des pics de réduction Obtenus par VC à la surface de CPE-NP / PAS
- Tableau IV-10**: L'applicabilité de l'immunocapteur pour la détection des anticorps dans le sérum de caille
- Tableau V-11** : La Composition Minéralogique de la Région de Khouribga
- Tableau V-12** : Equipement et infrastructures
- Tableau IV-13** : Tableau d'équivalences et la Détermination de la concentration bactérienne
- Tableau IV-14** : Densité de courant (CPE/AMX) en fonction de la densité optique
- Tableau IV-15** : Densité optique en fonction du temps de contact de CPE /AMX ads. Avec la bactérie
- Tableau IV-16** : Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de CPE /AMX ads.
- Tableau IV-17** : Densité de courant (CPE/AMX) en fonction de la densité optique
- Tableau IV-18** : Densité de courant (CPE/AMX ads.) en fonction de la densité optique dans l'eau de robinet
- Tableau IV-19** : Détermination d'*Escherichia coli* dans des échantillons d'eau de robinet

Abréviations

CPE :	Electrode à pâte de carbone graphite
ECS :	Electrode à calomel saturée
CE :	Electrophorèse capillaire
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse
HPLC-MS :	Chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectroscopie de masse
SAA :	Spectrométrie d'adsorption atomique
SEA :	Spectrométrie d'émission atomique
ICP-AES :	Spectrométrie d'émission plasma
CVAAS :	Spectrométrie d'adsorption atomique en phase vapeur à froid
SWV :	Voltamétrie à onde carrée
VC :	Voltamétrie cyclique
DPASV :	Voltamétrie par redissolution anodique à onde carrée.
DPP :	Polarographie pulsionnelle différentielle
ASV :	Voltamétrie par redissolution anodique
DPV :	Voltamétrie pulsionnelle différentielle
MEB :	Microscopie électronique à balayage
AFM :	Microscopie à Force Atomique
UV :	Ultraviolet
LD :	Limite de détection
LQ :	Limite de quantification

PN : Phosphate naturel

AD : Adénosine

ADN : Acide désoxyribonucléique

BET : Surfaces spécifiques d'échanges

CPAS : conjugué peroxydase-anticorps secondaire

PAS : peroxydase-anticorps secondaire

HRP : horseradish peroxidase

DO : densité optique

AMX : amoxicilline

Ads : adsorption

Tp : Temps de préconcentration

EMMI : Electrochimie Moléculaire et Matériaux Inorganiques

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

FWN : Fièvre West Nile

VWN : virus West Nile