HAL
open science

Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt

Quentin Palomar

To cite this version:

Quentin Palomar. Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt. Chimie théorique et/ou physique. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV069 . tel-01715215

HAL Id: tel-01715215

https://theses.hal.science/tel-01715215v1

Submitted on 22 Feb 2018

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

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

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie-physique moléculaire et structurale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Quentin Palomar

Thèse dirigée par **le Dr. Michael Holzinger de l'université Grenoble Alpes**, et le **Pr. Robert Marks de l'université de Beer Sheva, Israël.**

codirigée par **le Dr. Chantal Gondran de l'université Grenoble Alpes**

et préparée au sein du **laboratoire Biosystèmes Électrochimiques et Analytiques du Département de Chimie Moléculaire**

dans **l'École Doctorale EDCSV**

Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt.

Thèse soutenue publiquement le **« 06/12/2017 »**,
devant le jury composé de :

Dr. Laurent Dessemond
Professeur de l'Université Grenoble Alpes ; Président

Dr. Hubert Perrot
Directeur de Recherche CNRS à l'Université P. et M. Curie ; Rapporteur

Dr. Carole Chaix
Directeur de Recherche CNRS à l'Université Claude Bernard ; Rapporteur

Dr. Carole Baffert
Maître de conférence à l'université Aix-Marseille ; Examinateur

Dr. Michael Holzinger
Directeur de Recherche CNRS à l'Université Grenoble Alpes ; Membre

Dr. Chantal Gondran
Maître de conférence à l'Université Grenoble Alpes ; Membre

Dr. Serge Cosnier
Directeur de Recherche CNRS à l'Université Grenoble Alpes ; Invité

Remerciements :

Après plusieurs années de travail, de rédaction mais aussi de belles rencontres et d'expériences en tout genre, voici donc venu le temps de conclure ces travaux de thèse. J'ai eu la chance au cours de ces trois années de rencontrer de nombreuses personnes, aussi bien au travail que dans la vie de tous les jours et il est donc l'heure de remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à rendre cette expérience inoubliable.

Je commencerai donc par remercier les différents membres du jury qui ont pris le temps de juger mes travaux. Tout d'abord Laurent Dessemond, pour avoir accepté de présider ce jury et pour l'aide qu'il m'a apporté, aussi bien pendant les comités de suivi de thèse que pour les différents cours que j'ai pu donner à l'IUT. Je remercie également mes deux rapporteurs, Carole Chaix et Hubert Perrot, pour avoir accepté de relire mon travail et pour les questions et discussion pertinentes à l'issue de ma soutenance. Enfin je remercie Carole Baffert, qui après notre rencontre à Lyon a accepté de participer au jury en qualité d'examinateur. Merci pour tes remarques et ton aide pour la correction.

Viens maintenant le temps de remercier les différents membres de l'équipe biosystèmes électrochimiques et analytiques au sein de laquelle j'ai passé ces trois ans. En premier lieu j'exprime toute ma gratitude à Serge Cosnier pour m'avoir accepté dans son équipe et son laboratoire. Je te remercie également pour tous les conseils que tu as pu me donner, pour ta bonne humeur de tous les jours et bien entendu pour tous les matchs de foot que nous avons pu jouer ensemble ! Tu as vraiment été un chef d'équipe exceptionnel pour moi.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Michael Holzinger, sans qui cette thèse n'aurait pas pu se faire. Merci pour ta disponibilité, ton savoir-faire et toutes tes idées qui m'ont aidées à avancer dans mes travaux. Tu as toujours été là lorsque j'en avais besoin et je te remercie pour tout cela. Mes remerciements à mon second directeur, Robert Marks, qui m'a permis de découvrir d'autres pays à travers Singapour et l'Israël. Cela n'aurait pas été possible sans toi.

Je remercie bien évidemment Chantal Gondran, mon encadrante, qui est celle à qui je dois le plus pour ces trois ans. Je suis arrivé dans le laboratoire avec seulement de vagues notions d'électrochimie et j'espère pouvoir en repartir en tant qu'électrochimiste. Si cette thèse a pu aboutir à tous ces résultats et tous ces travaux, c'est grandement grâce à toi et je te remercie donc tout particulièrement pour ton aide, ton engagement au quotidien (et en particulier lors de la réaction) et ta sympathie.

Je tiens également à remercier tous les membres permanents de l'équipe, en particulier Arielle pour sa disponibilité et sa gentillesse. Tu as toujours été présente et souriante pendant ces quelques années. Mais aussi Karine, qui m'a beaucoup aidé dans mes enseignements et dans ma recherche, jusqu'aux dernières répétitions avant la soutenance. Merci à Yannig pour les différentes expériences que nous avons pu faire ensemble. Enfin, merci à Alan et Fabien, collègues mais aussi coéquipiers sur le terrain !

L'équipe ne se résume pas seulement aux permanents et je me dois donc de remercier toutes les personnes qui en ont fait partie, aussi bien thésards que postdocs ou stagiaires. La liste serait trop longue pour tous les citer mais il y en a plusieurs que je tiens à remercier personnellement. Je vais donc commencer par les anciens thésards, Noémie et Fatima, qui nous ont fait découvrir, aux petits nouveaux comme moi, le laboratoire et la façon dont il fonctionne. Merci à toutes les deux pour votre aide. Tous mes remerciements évidemment, et bien plus, à Solène, avec qui j'aurai partagé ces trois ans mais aussi bien d'autres années auparavant. J'aurai galéré sans toi avec ma cheville ! J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir très bientôt. Pleins de réussites à toi en Suisse ! Un grand merci à Caroline, qui elle aussi est arrivée en même temps que Solène et moi. Tu as toujours été sympa, souriante et prête à résoudre tous les problèmes, merci pour ton aide pendant la rédaction et pour tout le reste ! On se reverra aussi bientôt, peut-être à Paris. Merci à Lumi et Oana, nos collègues et amies roumaines. Merci à Marie C, la relève des thésards, j'espère que tout se passera bien pour toi mais je n'en doute pas. Merci à Marie B, pour tes péripéties avec tes cheveux, avec ta voiture garée au musée et toutes celles que j'ai dû oublier à travers nos différentes soirées en ville. On aura bien rigolé grâce à toi et je pense qu'on continuera encore à le faire à l'avenir !

Je tiens à remercier également les différents postdocs que j'ai pu croiser. Kamal pour son aide à Singapour, Andrew et Raoudha pour leur sympathie. PY pour ton année au labo et nos sorties bières/repas après le travail ! Et bien évidemment un merci particulier à Jules que j'ai eu la chance de connaître au cours de cette dernière année, qui j'espère sera le début d'une longue amitié. C'est un peu grâce à toi si je parle anglais maintenant !

Merci également à tous les stagiaires, ceux que j'ai pu encadrer, Maelis et Libertad, mais aussi Estelle, Savanah et tous les autres. J'espère n'oublier personne dans cette longue liste, mais je tenais à dire que je fus chanceux de pouvoir réaliser ces trois années dans un laboratoire et une équipe aussi sympathique et où la bonne ambiance règne. Vous avez tous contribué à rendre cette thèse inoubliable mais surtout à la rendre agréable à vivre !

Une mention spéciale à mes trois anglais préférés, Bridget, Laura et Matt. Je pense que les copains se rappellent encore de nous, et j'attends avec impatience de tous vous revoir pour continuer nos aventures dans les différents bars du monde, autour d'une Maredsous si possible ! En tout cas Bridget, je suis vraiment heureux de t'avoir rencontré et j'espère qu'on continuera nos petits voyages pour garder contact encore longtemps !

Il faut maintenant passer à l'autre grande famille que j'ai rencontré durant ces trois années, à savoir mes innombrables et merveilleux colocataires ! La liste est longue avec tout d'abord les anciens Carine, Cindy, Eloi, Clement, Florine, Guillaume avec qui j'ai passé de bons moments. Mention spéciale à LM avec qui il a suffi de quelques mois pour créer une belle amitié et des soirées mémorables. Les actuels, avec Eva, Maria, Ophélie, Vero, Anthony. Je ne vais pas faire un paragraphe pour chacun d'entre vous mais j'espère que ces derniers mois ensemble auront été aussi bien pour vous qu'ils l'ont été pour moi. Pleins de bisous et d'amour et de jeux et que sais-je encore ! Et surement à très bientôt !

Et enfin les premiers, ceux avec qui la coloc s'est créée et surtout ceux qui sont devenus des amis proches, Lisa, Rachel, Antoine, Mathilde et Yoann. Merci à vous pour cette magnifique première année de coloc et merci pour toutes ces soirées, tous ces voyages, ces repas et tout le reste. Encore une fois, c'est juste une autre étape et pas la fin je l'espère !

Je me dois également de citer tous les voisins et amis que j'ai pu rencontrer, Mathias (désolé de ne pas bien avoir soigné ma cheville malgré tes conseils !), Laura, Camille, Adrien, Coralie et toute la bande ! Merci beaucoup à vous tous. Comme pour les autres, on se revoit bientôt ! Merci aussi aux anciens grenoblois, Pierre, Thomas, Geoffrey et Flo. C'est toujours cool de vous revoir, comme si on était toujours dans la même ville et que rien n'avait changé.

On arrive maintenant à la fin de ces remerciements, avec les amis proches et la famille, ceux qui me connaissent et supportent depuis des années maintenant. Pleins d'amour et de jolis cœurs pour Benjamin, Léo, Simon et Milian. Mes amis d'enfance et mes amis pour la vie. Peu importe où l'avenir nous portera, on finira toujours par se retrouver. Merci à vous les Chie Noix.

Enfin, merci à ma famille. Tout d'abord mon frère et ma sœur, Thibaud et Sabrina, on ne se voit pas forcément tout le temps et on ne discute pas non plus des heures durant, mais je sais que je peux compter sur vous et que vous serez toujours là. Toute ma gratitude à mon « beau », « nouveau », « vrai » père Christophe d'être présent pour moi, pour ma famille et pour ma mère. Merci beaucoup à toi pour avoir su et voulu remplacer celui qui n'était pas là ce jour-là. Evidemment un immense merci à mère, Laurence, sans qui je n'aurai pas pu poursuivre toutes ces études. Je sais que ce ne fût pas toujours facile toute seule mais tu as réussi à nous donner un bel avenir à tous grâce à tes sacrifices et sache que j'en suis bien conscient et reconnaissant. Je vous aime tous et même au loin je penserais à vous.

Un dernier remerciement à ma chérie, Anaïs. Nous seuls savons que le chemin a été long et compliqué, et on ne sait pas de quoi demain sera fait, mais je te remercie d'avoir été et d'être encore à mes côtés malgré tout ce que nous avons vécu et malgré mon caractère par forcément facile tout le temps ! Je ne te le dis pas souvent mais je t'aime et je tiens à toi. J'espère que l'avenir sera encore meilleur pour nous, des bisous…

Maintenant une nouvelle page va s'écrire pour moi et j'espère pouvoir à nouveau partager de bons moments avec vous tous. Encore une fois, merci à vous et à bientôt…

Tonight is The Night…

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE 5

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 9

A. Les Biocapteurs 12

1. Définition d'un biocapteur 12

2. Les biorécepteurs 14

3. Les méthodes de transduction 17

B. Les méthodes d'immobilisation 32

1. L'adsorption 32

2. La réticulation 34

3. L'encapsulation 34

4. Les assemblages moléculaires 35

5. Le greffage chimique 37

C. Les nanomatériaux dans les biocapteurs 40

1. Les Nanoparticules et Quantum Dot 40

2. Les nanomatériaux carbonés 42

3. Les dichalcogénures de métaux de transition 54

4. Techniques de caractérisations structurales des nanomatériaux 58

II. CONCEPTION D'ELECTRODES NANOSTRUCTUREES 65

A. Conception et caractérisation d'un film de CNTs 68

1. Méthode de réalisation du film de CNTs 68

2. Caractérisation structurale 70

3. Caractérisation électrochimique 83

B. Conception et caractérisation d'un film de nanobâtonnets de WS_2 91

1. Méthode de réalisation de films de nanobâtonnets de WS_2 92

2. Caractérisation structurale 93

3. Caractérisation électrochimique 99

III. BIOCAPTEUR IMPEDANCEMETRIQUE POUR LA DETECTION DE L'ANTICORPS DE LA TOXINE DU CHOLERA 107

A. Construction de l'édifice moléculaire 111

1. Dépôt du film de nanotubes de carbone 111

2. Electropolymérisation d'un film de pyrrole-NTA 111

3. Immobilisation de la toxine du choléra 113

4. Caractérisation électrochimique de l'assemblage 115

B. Détection de l'anticorps anti-toxine du Choléra 118

1. Détection de l'anticorps spécifique à la toxine du choléra 118
2. Incubation des anticorps non-spécifiques 121

IV. BIOCAPTEUR IMPEDANCEMETRIQUE POUR LA DETECTION DE L'ANTICORPS DE LA TOXINE DE LA DENGUE 123

A. Construction de l'édifice moléculaire 128

B. Caractérisation de l'édifice moléculaire 130

C. Détection de l'anticorps du virus de la Dengue..... 135

1. Mesure en milieu tamponné..... 135
2. Mesure en présence de plasma sanguin bovin 136
3. Courbes d'étalonnage..... 138

V. BIOCAPTEUR POUR LA DETECTION DU CATECHOL ET DE LA DOPAMINE..... 143

A. Construction de l'édifice moléculaire 147

B. Détection du catéchol..... 148

1. Mesures par chronoampérométrie..... 148
2. Exploitation des résultats 149

C. Détection de la dopamine 156

1. Mesures par ampérométrie..... 156
2. Interprétation des résultats : 157

CONCLUSION GENERALE 161

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 165

EXPERIMENTAL PART 191

A. Cholera biosensor 192

1. Materials 192
2. Electrochemical Measurements 192
3. Preparation of the sensor electrodes 192

B. Dengue antibody biosensor 194

1. Materials 194
2. Electrochemical Measurements 194
3. Surface modification of the glassy carbon electrodes..... 194
4. Immobilization of the Dengue Virus 2 NS1 glycoprotein 195
5. Antibody 195

C. Catechol and Dopamine biosensor 196

1. Materials 196
2. Electrochemical Measurements 196
3. Preparation of the sensor electrodes 196
4. Detection of the species 197

LISTE DES ABREVIATIONS 199

LISTE DES PUBLICATIONS 201

RESUME 202

Introduction Générale

Depuis une vingtaine d'année, l'électrochimie et la bioélectrochimie connaissent un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique. Cet engouement s'explique par le fait que ces deux disciplines jouent un rôle clé dans les domaines d'intérêt que sont le domaine de l'énergie et le domaine médical. La bioélectrochimie, notamment, s'articule autour de deux thématiques fondatrices liées à ces domaines, à savoir la conception de biocapteurs pour la détection de molécules d'intérêt et la réalisation de biopiles enzymatiques.

Les biopiles visent à remplacer le catalyseur le plus utilisé aujourd'hui dans les piles à combustible, à savoir le platine, en s'inspirant du monde du vivant et notamment des enzymes. En effet, ces espèces sont des catalyseurs biologiques naturels et peuvent donc être intéressantes pour être intégrées dans de tels dispositifs.

Concernant les biocapteurs, l'intérêt de ce type de système repose sur l'utilisation de matériel biologique pour permettre ou, du moins, faciliter la détection de la molécule ciblée. En électrochimie classique, un capteur permet d'imposer la réalisation d'une réaction d'oxydation ou de réduction à la surface d'une électrode, réaction qu'il est possible de suivre par analyse du courant électrique. Ce courant permet par la suite de remonter à la concentration des espèces impliquées dans la réaction. La détection de l'espèce se fait donc par étude du courant faradique, c'est-à-dire du transfert électronique entre l'espèce ciblée et l'électrode. Or, à travers la modification de la surface de l'électrode, par immobilisation d'une enzyme notamment, il est possible de faciliter ou d'amplifier ce signal et donc d'augmenter la sensibilité du capteur.

La détection peut aussi se faire par simple reconnaissance entre la cible et son substrat, comme dans le cas d'un système anticorps-antigène. Cette reconnaissance n'implique pas directement un processus faradique mais engendre tout de même une modification de la surface de l'électrode qu'il est possible de quantifier à l'aide de différentes méthodes électrochimiques et notamment par spectroscopie d'impédance. La quantité de matériel biologique immobilisée à la surface de l'électrode, et donc l'architecture moléculaire mise en place pour assurer cette immobilisation, impacte la sensibilité du biocapteur obtenu.

De plus, les biocapteurs profitent de la sélectivité inhérente aux systèmes biologiques, à savoir la reconnaissance entre une enzyme et son substrat ou encore la reconnaissance spécifique entre un anticorps et un antigène. Ces différentes affinités peuvent être utilisées pour mettre en place des capteurs très spécifiques à la reconnaissance d'une molécule ciblée. C'est pourquoi la classe des biocapteurs est actuellement très étudiée, la spécificité et la sensibilité étant deux des problématiques à prendre en compte lors de la conception d'un système de détection. Par exemple, si l'on prend le cas du capteur le plus couramment décrit dans la littérature, à savoir le capteur à glucose, la modification de la surface, la cible et son environnement jouent un rôle essentiel dans la conception du capteur. L'intérêt d'un tel système reposant sur la faculté du capteur à doser le glucose directement dans le sang. Or, le sang est un milieu très complexe au sein duquel il existe une très grande variété d'espèces chimiques, rendant la détection d'une molécule ciblée d'autant plus difficile. C'est ici qu'interviennent les biocapteurs de par leur spécificité.

Enfin, l'intérêt de ce type de biocapteurs réside également dans le fait qu'il soit possible de miniaturiser les dispositifs de mesure en un appareil portable pour une utilisation sur le terrain. La mesure doit pour cela se faire dans un laps de temps court et être simple à mettre en place pour l'utilisateur. Les capteurs à glucose pour les personnes souffrant d'un diabète ou encore les tests de grossesses sont des exemples de ce type d'applications.

Pour favoriser la miniaturisation mais aussi repousser les limites de détection, une famille de composés, les nanomatériaux, ont commencé à émerger et à être intégrer dans la conception et la réalisation de biocapteurs depuis une quinzaine d'années. L'intérêt de ce type de matériaux repose sur la grande surface spécifique qu'ils offrent ainsi que sur la nature du matériau utilisé. En effet, selon s'il s'agit d'un nanomatériau carboné, type graphène ou nanotube de carbone, ou bien d'une nanoparticule, les propriétés apportées seront différentes. Il est donc possible d'adapter le matériau à l'application envisagée. Les nanotubes de carbone peuvent par exemple être utilisés pour faciliter le transfert électronique de par leur bonne conductivité et permettent également l'immobilisation d'une plus grande quantité de biorécepteurs grâce à leur grande surface spécifique.

Dans ces travaux de thèse, l'accent sera mis sur l'incorporation de deux différents types de nanomatériaux dans la conception de biocapteurs : les nanotubes de carbone et les nanobâtonnets de disulfure de tungstène. Avant d'être utilisés dans un dispositif de détection, une étude décrivant la formation de dépôts contrôlés et reproductibles de ces deux matériaux sera présentée. Cette étude s'appuiera sur une caractérisation structurale détaillée des couches minces formées ainsi que sur l'analyse électrochimique de celles-ci. Pour cela différents méthodes de caractérisations seront mises à contribution telles que la microscopie à force atomique, la microscopie électronique à balayage ou encore la spectroscopie Raman.

Enfin, la réalisation de trois différents biocapteurs électrochimiques sera décrite. Le premier capteur sera utilisé comme modèle pour la suite des travaux et portera sur la détection de l'anticorps de la toxine du choléra par spectroscopie d'impédance électrochimique. Pour cela, une technique d'immobilisation de la toxine du choléra mettant en jeu un film électrogénéré de poly-pyrrole à la surface d'une couche de nanotubes de carbone et porteur d'une fonction nitrilotriacétique sera présentée.

Le second biocapteur traitera quant à lui de la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue, une cible de grand intérêt de par la propagation actuelle de cette maladie. Ce système reposera lui aussi sur l'utilisation d'une couche de nanotubes de carbone portant un film de poly-pyrrole présentant cependant une fonction N-hydroxysuccinimide à l'inverse des travaux sur le choléra, ainsi que sur l'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique comme méthode de détection.

Enfin, le troisième et dernier biocapteur portera lui sur la détection d'un neurotransmetteur, la dopamine et d'un polluant environnemental, le catéchol. Contrairement aux deux premiers capteurs présentés, ce dernier s'appuiera sur l'utilisation non pas de nanotubes de carbone mais de nano-bâtonnets de disulfure de tungstène. Ces matériaux novateurs seront utilisés pour l'immobilisation de la polyphénol oxydase, une enzyme permettant la dégradation du

catéchol et de la dopamine par oxydation. Le suivi des réactions à l'électrode et la détection des deux molécules ciblées seront assurés par chronoampérométrie dans ce travail.

Chapitre I :

Etude bibliographique

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 9

A. Les Biocapteurs 12

1. Définition d'un biocapteur 12
2. Les biorécepteurs 14
   a) Biocapteurs métaboliques 14
   b) Biocapteurs d'affinité 15
3. Les méthodes de transduction 17
   a) Biocapteurs optiques 17
      (i) La spectroscopie UV-Visible 17
      (ii) La fluorescence 18
      (iii) La résonnance de plasmon de surface 19
   b) Biocapteur thermique 21
   c) Biocapteurs piézoélectriques 21
   d) Biocapteurs électrochimiques 22
      (i) Biocapteurs potentiométriques 23
      (ii) Biocapteurs ampérométriques 23
      (iii) Biocapteurs impédancemétriques 27

B. Les méthodes d'immobilisation 32

1. L'adsorption 32
2. La réticulation 34
3. L'encapsulation 34
4. Les assemblages moléculaires 35
5. Le greffage chimique 37

C. Les nanomatériaux dans les biocapteurs 40

1. Les Nanoparticules et Quantum Dot 40
   a) Les nanoparticules 40
   b) Les Quantum Dot 41
2. Les nanomatériaux carbonés 42
   a) Les nanodiamants 43
   b) Le fullerène 44
   c) Les nanotubes de carbone 45
      (i) Structures et propriétés 45
      (ii) Fonctionnalisation des nanotubes 47
   d) Les feuillets de graphène 51
      (i) Structure et propriétés 51
      (ii) Fonctionnalisation 53
      (iii) Intégration dans des biocapteurs 53
3. Les dichalcogénures de métaux de transition 54
   a) Structure et propriétés 54
   b) Fonctionnalisation 56

c) Applications 57
4. Techniques de caractérisations structurales des nanomatériaux 58
a) Microscopie à force atomique 59
b) Microscopie électronique à balayage 60
c) Microscopie électronique en transmission 61
d) Spectroscopie Raman 62

Cette étude bibliographique s'articulera essentiellement autour de trois grands points. Le premier portera sur l'étude des biocapteurs, définissant ce que représente ce terme et présentant les différentes classes existantes de biocapteur ainsi que les propriétés et les inconvénients qu'ils peuvent apporter.

Le second s'intéressera pour sa part à la présentation des différentes méthodes d'immobilisation, chimiques ou physiques, de molécules à la surface d'un transducteur et plus précisément sur l'immobilisation de biorécepteurs.

Enfin le troisième et dernier point mettra en avance l'utilisation de nanomatériaux dans la réalisation de biocapteurs, présentant de ce fait les plus grandes familles de nanomatériaux couramment utilisés de nos jours.

A. Les Biocapteurs

1. Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est constitué de deux éléments fondamentaux, avec d'une part un élément biologique appelé biorécepteur et d'autre part le transducteur auquel ce dernier est lié. Le biorécepteur permet la reconnaissance d'une cible spécifique du milieu appelée analyte (antigène, substrat, ADN complémentaire…). Cette reconnaissance étant ensuite traduite en un signal analytique par le biais du transducteur.

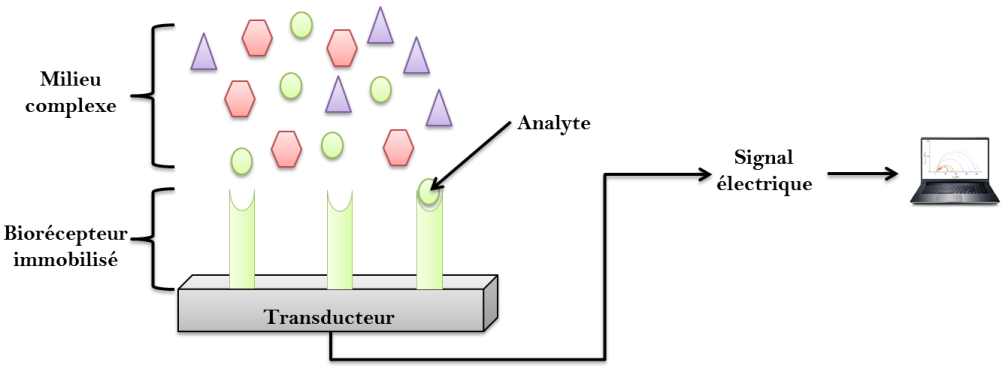


Figure 1: représentation schématique du fonctionnement d'un biocapteur.

Le transducteur joue donc un rôle de convertisseur du signal, transformant un phénomène physique ou chimique (émission de particule, variation de masse…), dû à la reconnaissance entre l'analyte et le biorécepteur, en un signal électrique. Le signal est ensuite transmis à une unité d'analyse permettant l'exploitation des données. La transduction peut se faire par différents moyens, donnant ainsi naissance à diverses familles de capteurs avec notamment les biocapteurs optiques[1,2], électrochimiques[3] ou encore thermiques[4].

Les performances d'un biocapteur sont quant à elles étudiées selon les critères suivants[5] :

- La spécificité : le biocapteur se doit d'être spécifique à la cible souhaitée afin d'éviter toutes interactions non spécifiques pouvant entraîner un biais dans l'interprétation des résultats. Ce paramètre est fortement sujet à la complexité du milieu étudié (plasma sanguin, eau polluée etc.).

- La limite de détection : elle correspond à la concentration minimale d'analyte pouvant être observée à l'aide du système et ceci de manière fiable, avec une valeur différente du blanc ou du bruit engendré par le biocapteur.

- Domaine de linéarité : la linéarité est le domaine pour lequel la réponse du biocapteur est proportionnelle à la concentration d'analyte présent en solution. Ce domaine s'étend théoriquement de la limite de détection à la concentration pour laquelle le biocapteur est proche de la saturation en analyte. Ce domaine permet le tracé d'une courbe d'étalonnage nécessaire à l'utilisation du biocapteur. A l'aide de celle-ci, il est ainsi possible de corréler signal de réponse et concentration en solution de la cible à analyser.

- La sensibilité : cette valeur est égale à la pente de la courbe d'étalonnage obtenue dans le domaine de linéarité. Elle traduit directement la variation du signal mesuré en fonction de la concentration en analyte.

- Le temps de réponse : il s'agit du temps nécessaire à l'obtention de données exploitables après avoir mis le biocapteur en présence de l'échantillon à analyser. Pour une utilisation optimale, la lecture de la mesure doit pouvoir se faire en temps réel.

- Le coût : la viabilité d'un biocapteur réside également dans son coût de fonctionnement. La mesure et l'utilisation du biocapteur en général doivent engendrées peu de frais pour être utilisable en condition réelle.

Ce type de capteur présente donc un intérêt croissant pour la recherche de par leur flexibilité et leur spécificité. C'est pourquoi ce domaine a connu de nombreuses avancées depuis une dizaine d'année, en lien avec l'essor des nanotechnologies et de nouvelles techniques de détection permettant la construction de ce type de dispositif[6,7].

2. Les biorécepteurs

Il existe de nombreux édifices moléculaires pouvant être utilisés comme biorécepteur au sein d'un biocapteur. En effet, tout système présentant une spécificité de reconnaissance vis-à-vis d'une cible est susceptible d'être utilisé comme tel. Selon le biorécepteur utilisé, il est possible de classer les biocapteurs résultant au sein de deux grandes familles : les biocapteurs métaboliques et les biocapteurs d'affinité[8].

a) Biocapteurs métaboliques

Cette première famille met en jeu des phénomènes catalytiques, le plus souvent entre une enzyme et son substrat. Les biocapteurs enzymatiques représentent la classe de biocapteur la plus courante au sein des capteurs métaboliques. Cependant d'autres types de récepteurs entrent également dans cette famille, tels que les capteurs à base de micro-organisme (bactéries) ou à base de cellules complètes[9,10].

Pour ce type de capteur, la détection se fait donc à l'aide d'une activité catalytique. Dans le cas d'une enzyme, le substrat de celle-ci va être transformé en un produit sous l'action de l'enzyme, qui elle reste intacte (ou est régénérée) au cours de l'opération. C'est généralement ce produit auquel est sensible le transducteur. L'enzyme peut, suite à cela, initier un nouveau cycle catalytique à partir d'un nouveau substrat. Ce type de transformation met donc en jeu une réaction chimique (oxydo-réduction, hydrolyse, transfert de protons etc.) permettant sa détection. Le principe de fonctionnement de ce type de capteur est représenté ci-dessous (Figure 2).

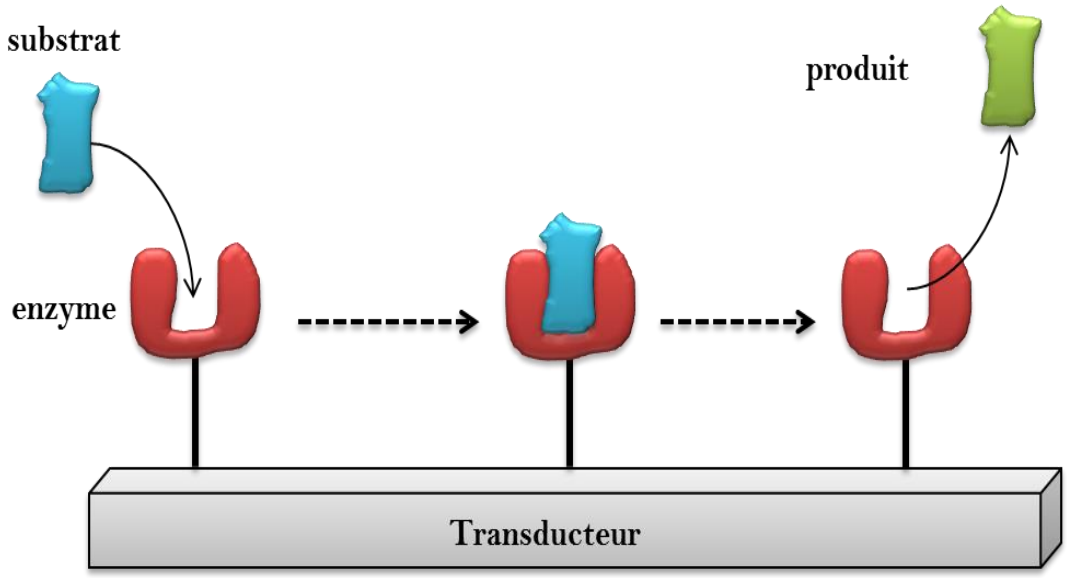


Figure 2: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur enzymatique.

L'autre grande famille de composés utilisés dans ce type de biocapteur est celle des micro-organismes, notamment les bactéries. Elles sont capables de métaboliser un substrat en un produit, comme lors du métabolisme énergétique. Ce type de réaction est généralement de type oxydo-réduction et conduit à la libération d'énergie mais aussi à celle d'une molécule résiduelle qu'il est possible d'analyser. Ce type de capteur est cependant moins performant

que les capteurs classiques à base d'enzyme (manque de sélectivité, long temps de réponse). Ceci est dû au fait que, au sein d'un même micro-organisme, ils existent de nombreuses enzymes différentes qui peuvent donc réagir avec différents substrats.

b) Biocapteurs d'affinité

La deuxième famille de biocapteur est pour sa part basée sur la reconnaissance spécifique entre le récepteur et l'analyte (ou sonde), comme c'est le cas dans le système antigène/anticorps, ou encore entre un brin d'ADN cible et un brin d'ADN sonde. Cette reconnaissance ne met donc pas en jeu une transformation de l'analyte en un produit à l'inverse de la classe des biocapteurs métaboliques, mais engendre cependant une modification physico-chimique du système. C'est cette modification qui sera donc observée et traduite en un signal afin de permettre l'analyse de celle-ci. Cette classe de biocapteur, du fait de la grande affinité entre le récepteur et la sonde, permet la réalisation de capteur ayant une très forte sélectivité et une bonne sensibilité. Différents types de biocapteurs d'affinité sont représentés au sein de la Figure 3.

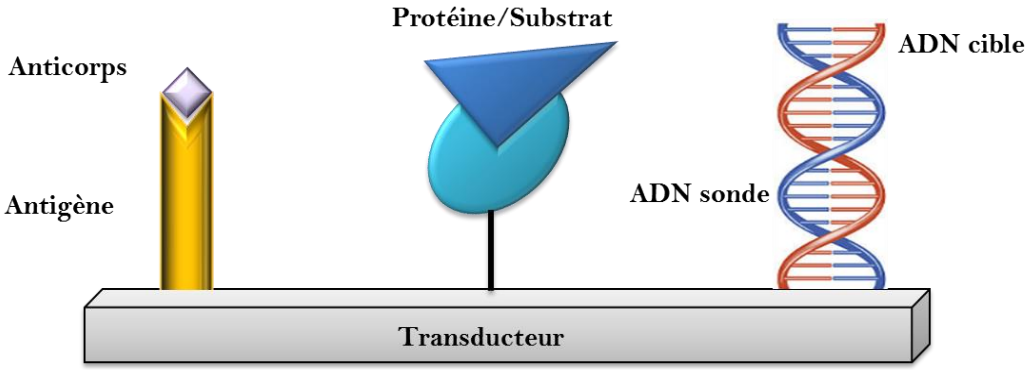


Figure 3: Représentation schématique des différents types de biocapteurs d'affinité.

Le système antigène/anticorps repose sur la formation d'un complexe entre ces deux entités dont la caractéristique première est une très forte spécificité. Les anticorps sont des glycoprotéines présentent au sein des organismes vivants et jouent un rôle clé dans le système immunitaire. Leur structure de base en forme de Y est constituée de deux chaînes peptidiques lourdes et deux légères. Ils présentent une partie constante, comportant des fonctions effectrices, mais aussi des parties variables à leur extrémité dont les paratopes. Ce sont eux qui vont permettre la reconnaissance spécifique d'un antigène (Figure 4). Les antigènes quant à eux sont généralement des molécules étrangères à l'organisme et portent des épitopes. Ils sont reconnus par les sites de liaison des anticorps, les paratopes[11].

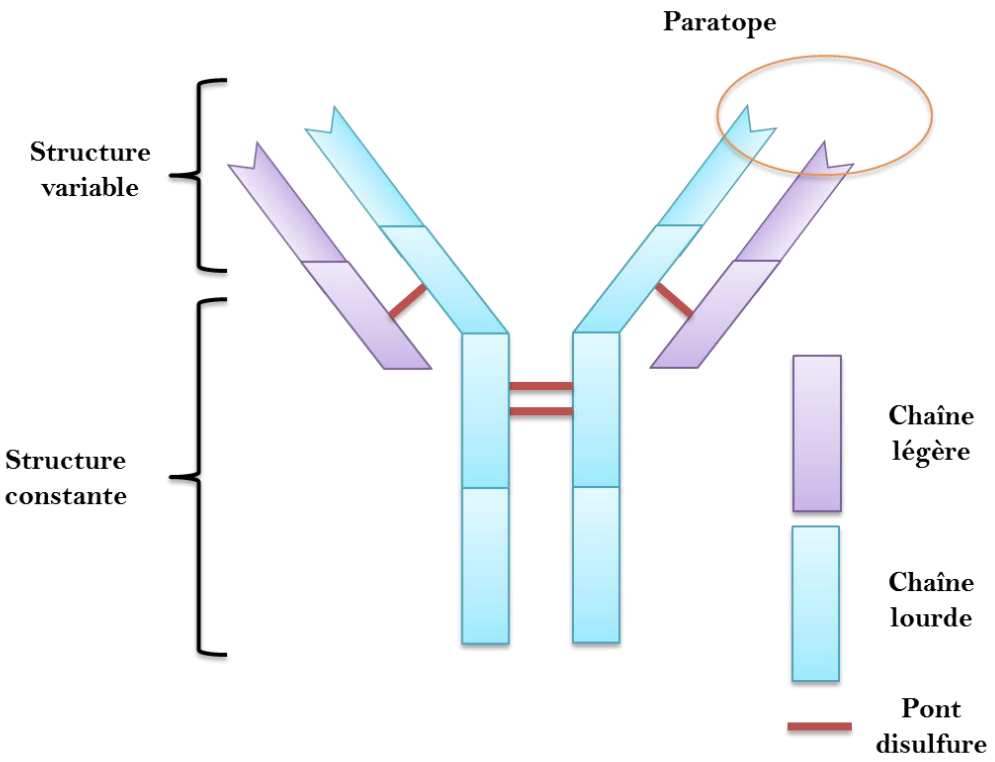


Figure 4: représentation schématique de la structure d'un anticorps.

Comme on peut le voir, chaque paratope est constitué d'un fragment de chaîne légère et d'un fragment de chaîne lourde. Ainsi chaque anticorps présente deux sites d'ancrages pour l'antigène auquel il est spécifique, ce sont donc des molécules bivalentes. A l'inverse, les antigènes sont eux multivalents et possèdent à leur surface une multitude d'épitopes. Ils seront donc reconnus par plusieurs anticorps.

Les biocapteurs à ADN reposent sur la complémentarité entre les deux brins d'acides nucléiques qui constituent la double hélice de l'ADN. En effet, l'ADN est formé d'une double chaîne hélicoïdale de désoxyribonucléotides, dont chacune des chaînes ou brins sont complémentaires à l'autre. En immobilisant un de ces brins d'ADN, appelé ADN sonde, il est donc possible de détecter par complémentarité l'ADN cible spécifique.

La formation de glycoconjugué est un exemple courant de reconnaissance entre une protéine et un substrat. Un glycoconjugué résulte de l'association covalente d'un glucide avec une protéine, ou un lipide. On forme alors une glycoprotéine. Ces interactions sucre-protéine peuvent être par la suite détecté et donc conduire à la réalisation d'un biocapteur.

Enfin, on peut également citer d'autres types de biocapteurs d'affinité tels que les capteurs à aptamère [12] ou encore les polymères à empreintes moléculaires (MIP)[13,14]. Ce type de polymère a été développé dans l'optique de mimer le comportement de récepteurs biologiques naturels.

3. Les méthodes de transduction

Une fois la reconnaissance entre analyte et récepteur effectuée, il est nécessaire de traduire celle-ci en un signal quantifiable et analysable. Pour cela, différents moyens de transduction peuvent être utilisés. Ces différentes techniques de transduction présentent chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Comme dit précédemment, il est alors possible de catégoriser les biocapteurs en quatre grandes familles, à savoir les biocapteurs optiques, thermiques, piézoélectriques et électrochimiques.

a) Biocapteurs optiques

La famille des biocapteurs optiques se base sur l'analyse de la lumière émise, absorbée ou réfléchie résultant de l'interaction entre l'analyte et le récepteur. C'est une des méthodes de transduction les plus fréquemment utilisées dans le domaine biologique.

(i) La spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible repose sur l'étude de l'interaction d'une onde électromagnétique et d'un atome (ou molécule). Le domaine utilisé en spectroscopie UV-visible est compris entre 190 nm et 800 nm. L'absorption de ce rayonnement électromagnétique, ici constitué de photon, va entraîner un changement du niveau d'énergie des électrons de la couche de valence de la molécule. On parle alors de spectroscopie d'absorption. Ce changement, appelé transition électronique, correspond à au passage d'un niveau d'énergie E1 à un niveau de plus haute énergie E2 (Figure 5). Cette différence d'énergie est directement liée à la nature de l'atome et permet dont l'étude de celui-ci en fonction de la longueur d'onde absorbée.

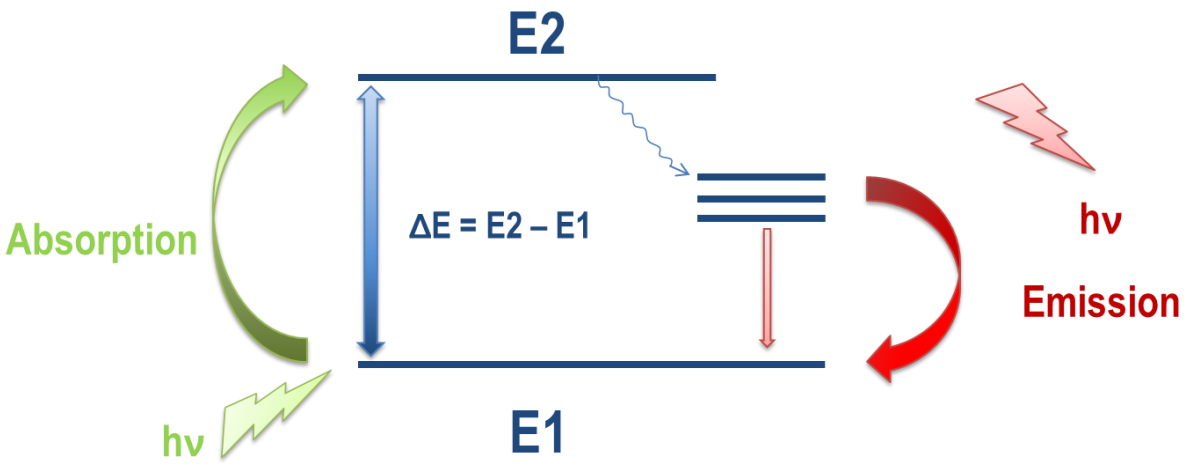


Figure 5 : Principe de l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et une molécule

Enfin, le retour de l'état excité E2 vers l'état fondamentale E1 peut se faire sous forme d'un rayonnement électromagnétique. Il s'agit dans ce cas-là de spectroscopie d'émission, mis à profit dans les techniques de fluorescence et phosphorescence.

(ii) La fluorescence

La fluorométrie est une technique optique dite à marquage, c'est-à-dire qu'elle nécessite le plus souvent d'incorporer à la molécule à analyser une molécule fluorescente. Ce marqueur est appelé fluorophore. Il va permettre l'absorption d'un rayonnement lumineux (lumière d'excitation) et surtout la restitution de celui-ci sous forme d'une lumière fluorescente (lumière d'émission). Cependant dans certains cas la molécule biologique peut être naturellement fluorescente. Un fluorophore doit répondre à différents critères tels que son coefficient d'extinction molaire, son rendement quantique ou encore la durée de vie de son état excité. Le coefficient d'extinction molaire traduit l'efficacité qu'a le marqueur à absorber le rayonnement. Le rendement quantique est lui défini comme étant le nombre de photons émis divisé par le nombre de photons absorbés par la molécule. Il traduit donc l'efficacité du fluorophore à restituer l'énergie absorbée. Enfin la durée de vie de l'état excité correspond au temps nécessaire au marqueur pour restituée l'énergie emmagasinée sous forme de rayonnement. Un temps de vie faible est donc recherché (de l'ordre de la nanoseconde). Une des applications courantes de ce type de technique est le marquage de cellules vivantes pour en suivre le comportement ou les réponses vis-à-vis d'un stimulus ou de leur environnement[15]. Dans les années 2010, l'équipe de Morris a travaillé sur l'imagerie de différents événements moléculaires dynamiques et de processus biologiques complexes en suivant par fluorométrie l'activité de kinases[16]. Ces enzymes vont être surexprimées lors d'altérations génétiques telles que les troubles neurodégénératifs, l'immunodéficience ou encore les différents types de cancer. En tant que tels, elles constituent des cibles attrayantes pour le développement de la thérapeutique, ainsi que des biomarqueurs pertinents de la maladie. En suivant par fluorescence ces protéines, le groupe de Morris a ainsi pu obtenir des images possédant une très bonne résolution à différentes étapes du cycle cellulaire (Figure 6).

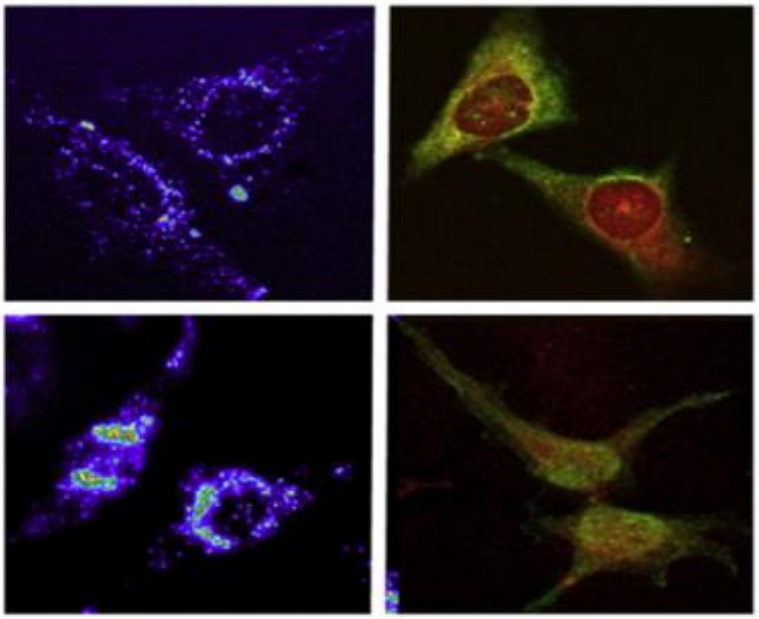


Figure 6: Photographie par fluorescence montrant la répartition préférentielle des kinases dépendantes des cyclines (CDK)/Cycline à différents stades du cycle cellulaire à gauche et de la cycline B aux mêmes stades à droite.

Le groupe de Feng a notamment travaillé sur une classe de fluorophore particulière, des polymères conjugués solubles dans l'eau et porteur d'une fonction fluorescente[17,18]. Ils ont ainsi pu développer un biocapteur sensible à l'Acetylcholinesterase (AchE ; maladie d'Alzheimer) en utilisant comme fluorophore le poly{1,4-phenylene-[9,9-bis(4-phenoxybutylsulfonate)]fluorene-2,7-diyl} (PFP-SO_3^-). La fluorescence de ce composé est très fortement « quenché » par l'acetylcholine (ACh). Ainsi, lors de l'ajout d'AchE, l'hydrolyse de l'acetylcholine en choline et en un résidu négativement chargé (porteur de l'inhibiteur de fluorescence) va permettre la restauration de la fluorescence du PFP-SO_3^-. Ceci est dû à la répulsion électrostatique engendrée entre le résidu et le polymère. Il est alors possible de suivre l'évolution du signal en temps réel (Figure 7).

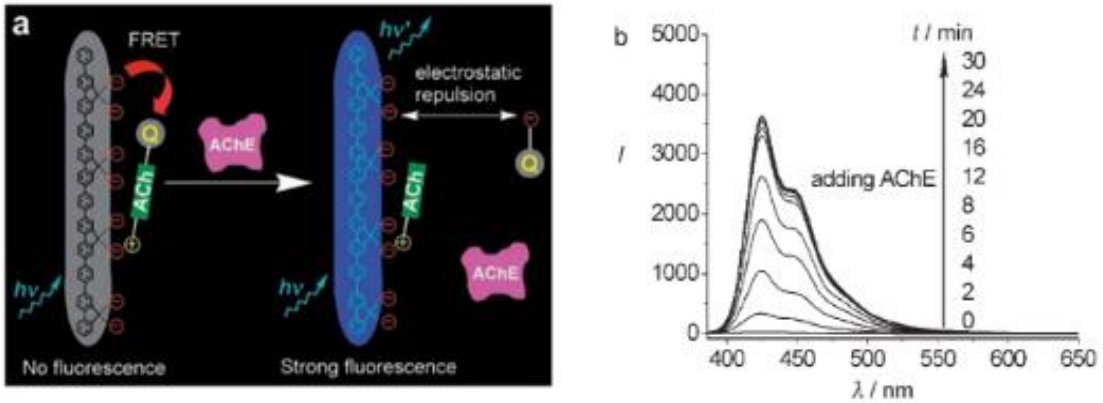


Figure 7: a) Représentation schématique du principe de fonctionnement du biocapteur ; b) Spectre d'émission de PFP-SO_3^- fonction du temps de réaction après injection de AChE. Reproduit à partir de [17]

Un autre exemple d'utilisation de capteur par fluorescence est le fruit du travail de l'équipe de Liu qui a réalisé en 2013 un capteur pour la détection de cellules cancéreuses[19]. Ils ont utilisé pour cela un assemblage de type « sandwich » utilisant à la fois des nanotubes de carbone, des nanoparticules d'or, de la polydopamine, de la concanavalin A et enfin un aptamère capable de reconnaître l'ADN ciblé. Ce biocapteur a montré une sensibilité élevée avec une limite de détection de 50 cellules/mL. De plus, il est capable de distinguer les cellules cancéreuses des cellules saines, ce qui en fait un outil puissant pour la détection de cette maladie.

(iii) La résonnance de plasmon de surface

La résonance de plasmon de surface est une technique optique qui met à profit la réfraction de la lumière et plus précisément l'onde évanescente. Cette onde est une des composantes électromagnétiques de la lumière. Lorsque la lumière est totalement réfléchie, l'onde évanescente va se propager perpendiculairement à l'interface et créer un champ évanescent. A l'intérieur de ce champ, les protons du faisceau peuvent entrer en résonnance avec les électrons libres du matériau. C'est la résonance plasmonique de surface. Lors de ce phénomène, de l'énergie est transférée aux électrons. Il est ainsi possible de détecter cette perte d'énergie dans le faisceau réfracté de la lumière à travers l'angle d'intensité minimum appelé angle de résonnance (Figure 8). Cet angle est directement lié à la densité du milieu. Les différentes interactions pouvant avoir lieu à la surface du matériau, telle que la

reconnaissance entre un analyte et son récepteur, vont donc directement modifier la densité du milieu en augmentant la masse de molécules greffées à la surface. Ce changement va modifier l'angle de résonance et permettre la détection du phénomène sans avoir recours à un marqueur fluorophore. Afin d'obtenir une surface riche en électrons libres, celle-ci est habituellement recouverte d'une fine couche d'or pour permettre la formation du plasmon entre les photons et les électrons du métal.

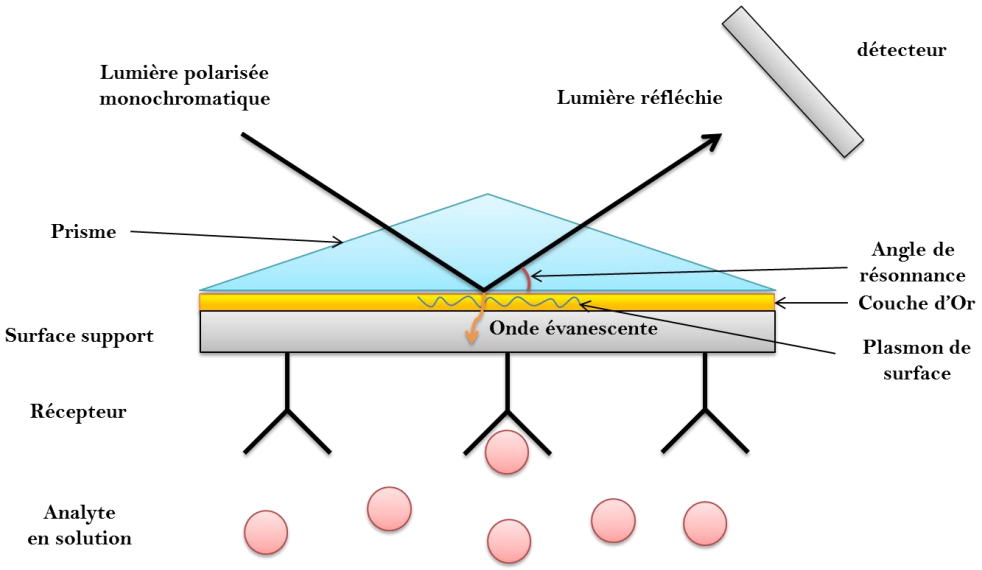


Figure 8: Représentation schématique du principe de la résonance de plasmon de surface.

En 2015, Singh et al. ont mis au point un capteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra basé sur cette technique[20]. L'innovation de ce dispositif repose sur l'incorporation et l'utilisation d'une monocouche de graphène comme matériau support pour l'immobilisation de la toxine du choléra par utilisation d'un film de pyrène-NTA et un complexe de cuivre. Cette architecture permet ainsi d'atteindre une bonne limite de détection de l'ordre de 0,004 ng.mL^{-1} avec une gamme de linéarité entre 0,004 et 4 ng.mL^{-1} (Figure 9).

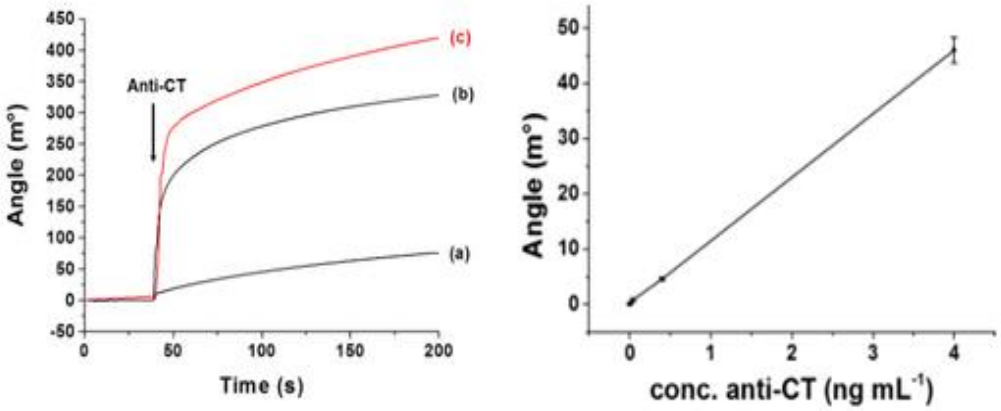


Figure 9: Variation de l'angle de résonance après injection de 35 ng.mL^{-1} de l'anticorps de la toxine du choléra sur différente surface : a) or pur ; b) or + graphène ; c) or + graphène + polypyrène-NTA/Cu2+/b-Cholera Toxine et 2) courbe d'étalonnage du biocapteur entre 0.004 et 4 ng.mL^{-1} d'anticorps de la toxine du choléra. Reproduit à partir de [20]

b) Biocapteur thermique

Les biocapteurs thermiques utilisent la variation d'enthalpie ou de température due à la réaction biochimique entre le biorécepteur et son analyte. Pour cela, un microcalorimètre ou une résistance thermique sont utilisés afin de mesurer ce type de variations. Les biocapteurs thermiques ne mesurent donc pas les produits de la réaction mais seulement l'échange de chaleur au cours de celle-ci. Ce type de biocapteur a été développé dans les années 1970 et ont depuis connu de nombreuses avancées [21,22]. Récemment les capteurs thermiques ont été notamment utilisés dans le secteur de l'agro-alimentaire et de l'environnement. Ainsi le groupe de Kirchner a développé en 2012 un capteur calorimétrique pour la détection de H_2O_2 dans les processus de stérilisation[23]. Ce capteur présente une bonne sensitivité jusqu'à des concentrations élevées de H_2O_2.

L'intérêt principal de ces biocapteurs est la rapidité de leur temps de réponse et leur fiabilité. De plus, de par sa méthode de détection, ce type de capteur n'est pas sensible au interférent tels que les produits dérivés de la réaction, les interférents optiques ou encore électrochimiques. Cependant, le coût des capteurs thermiques restent assez élevés du fait du système complexe à mettre en place.

c) Biocapteurs piézoélectriques

Cette famille de biocapteur mesure les changements de masse pouvant se réaliser à leur surface. Pour cela ils se reposent sur les propriétés piézoélectriques du matériau utilisé, généralement un cristal de quartz. L'effet piézo se manifeste par la polarisation d'un matériau sous l'effet d'une contrainte mécanique. A l'inverse, si l'on applique un champ électrique à ce type de matériau, celui-ci va se déformer. Cette caractéristique va permettre au cristal de quartz d'entrer en oscillation sous l'influence de ce courant électrique lorsque celui-ci est plongé dans un liquide. Cette fréquence d'oscillation peut être mesurée à l'aide d'un fréquencemètre. Ainsi, lorsqu'un changement de masse survient, suite à la reconnaissance entre un biorécepteur et un substrat, il est possible de relier celui-ci au changement dans la fréquence de résonnance. Ce type de biocapteur a pour principale qualité un temps de réponse très court. Cependant, ils sont fortement soumis aux interactions non spécifiques et présentent ainsi une faible sélectivité. L'exemple le plus courant de capteurs piézoélectriques est la microbalance à quartz (QCM) sur laquelle de nombreuses études ont été menées (Figure 10) [24,25].

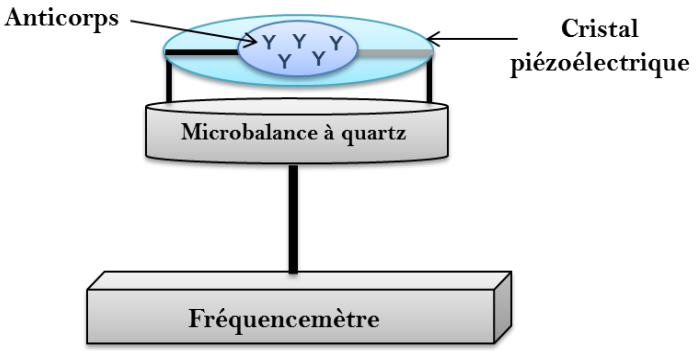


Figure 10: Représentation d'un biocapteur piézoélectrique.

Avec l'essor des nanosciences, de nombreux et divers nanomatériaux ont été testés afin d'être incorporés dans ce type de capteur dans le but d'accroître la sensibilité de ces systèmes. En 2008, Wang et al. ont ainsi utilisé des nanoparticules d'or afin d'augmenter la sensibilité de leur capteur pour la détection de *E. coli*[26,27]. La fabrication de ce biocapteur, comme représenté sur la Figure 11, se compose de deux étapes. Tout d'abord, l'hybridation de brins d'ADN de E. coli avec des nanoparticules d'or immobilisées à la surface d'un cristal de quartz pré-recouvert d'une monocouche auto-assemblée de fragments de thiol. La deuxième étape étant l'hybridation de l'ADN avec des nanoparticules d'or revêtus d'avidine pour améliorer la réponse du signal.

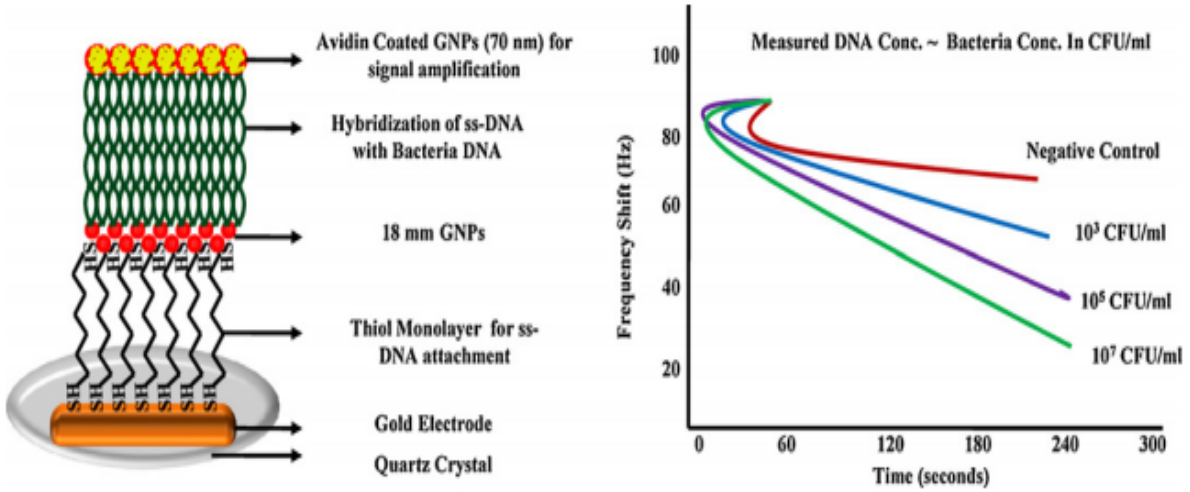


Figure 11: Concept de détection par QCM basée sur l'incorporation de nanoparticules d'or et appliqué à la détection d'E. coli. Reproduit de 17

Ce type de construction leur a permis d'obtenir une sensibilité de l'ordre de 2.10^3 unités de colonisation (CFU) de E. coli / mL.

En 2010, un autre groupe a mis au point un capteur à ADN reposant sur une méthode d'immobilisation utilisant un ADN sonde marqué par une biotine pour détecter le brin ciblé[28]. Ils ont pu obtenir à l'aide de cette méthode une limite de détection de 0,0016 $mol.L^{-1}$.

Dans le domaine des capteurs à ADN, Garcia-Martinez et al. ont développé un capteur très performant capable de fonctionner en régime dynamique (circulation de liquide)[29]. Le capteur conçu est capable de détecter des concentrations d'ADN cible supérieures à 50 $ng.mL^{-1}$.

d) Biocapteurs électrochimiques

Cette classe de biocapteur présente un intérêt historique puisque l'un des premiers biocapteurs créés, en 1962, était électrochimique et permettait la mesure du glucose via l'immobilisation de la glucose oxydase (GOX)[30–32].

Les biocapteurs électrochimiques permettent la transduction d'un phénomène chimique en un signal électrique. Ces capteurs sont généralement classés en trois catégories : les biocapteurs potentiométriques, ampérométriques ou impédancemétriques (ou conductimétriques).

L'intérêt de cette famille de capteur est la facilité de leur mise en œuvre, la rapidité du temps de réponse ainsi que leur faible coût. Cependant ils peuvent souffrir d'un manque de spécificité. Cet inconvénient vient du fait qu'en présence d'un milieu complexe pouvant contenir diverses espèces électroactives, celles-ci peuvent s'oxyder à la surface de l'électrode lorsqu'un potentiel trop élevé est appliqué.

(i) Biocapteurs potentiométriques

Les biocapteurs potentiométriques sont basés sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence. L'électrode de mesure, ou de travail, est rendue sensible à la molécule cible après immobilisation du biorécepteur à sa surface. Ainsi, un équilibre local est créé à la surface de l'électrode et engendre une variation du potentiel proportionnelle au logarithme de la concentration de l'analyte (loi de Nersnt). Ces biocapteurs potentiométriques peuvent ainsi servir à différentes applications telles que la mesure d'une variation de pH, de variations de concentrations d'espèces ioniques ou gazeuses (CO_2, NH_3).

L'un des premiers travaux sur les capteurs potentiométriques est l'œuvre de Severinghaus et al. en 1958[33]. Ce capteur permettait notamment le suivi de la concentration en O_2 ou CO_2 dans le sang et divers autres liquides. Il utilisait pour cela une membrane perméable à l'oxygène ou au dioxyde de carbone selon la molécule ciblée afin de permettre la diffusion de l'espèce jusqu'à l'électrode et ainsi mesurer la différence de potentiel en résultant.

Plus récemment, le groupe de Lakard et al. ont réalisé un biocapteur pour la détection de l'urée[34]. Le principe de ce capteur repose sur l'immobilisation d'urease à la surface de l'électrode par utilisation de film de polyethylenimine. L'uréase va catalyser la dégradation de l'urée en NH_3 et CO_2 et permettre ainsi de suivre l'évolution du pH en fonction de l'ajout d'urée. La réponse potentiométrique de ce capteur possède une gamme de linéarité dans une plage allant de 3 à 10 unités pH.

D'autres types de molécules ont pu être analyser par utilisation de biocapteurs potentiométriques notamment des micro-organismes[35], des polluants métalliques[36,37] ou encore le cholesterol[38,39].

(ii) Biocapteurs ampérométriques

Ce type de biocapteur mesure l'intensité du courant à un potentiel imposé. Pour cela, il est nécessaire que les biorécepteurs immobilisés à la surface de l'électrode de travail consomment ou produisent une espèce électroactive. Le courant est alors fonction de la concentration de l'espèce réduite ou oxydée et est mesuré par rapport à une contre-électrode. Pour réaliser ce type de réactions, les biocapteurs ampérométriques sont le plus généralement utilisés avec des enzymes redox ou des molécules marquées à l'aide de protéines électroactives.

On considère actuellement trois générations de biocapteurs ampérométriques : ceux à transfert électronique direct, ceux sans médiateur et ceux avec médiateur (Figure 12).

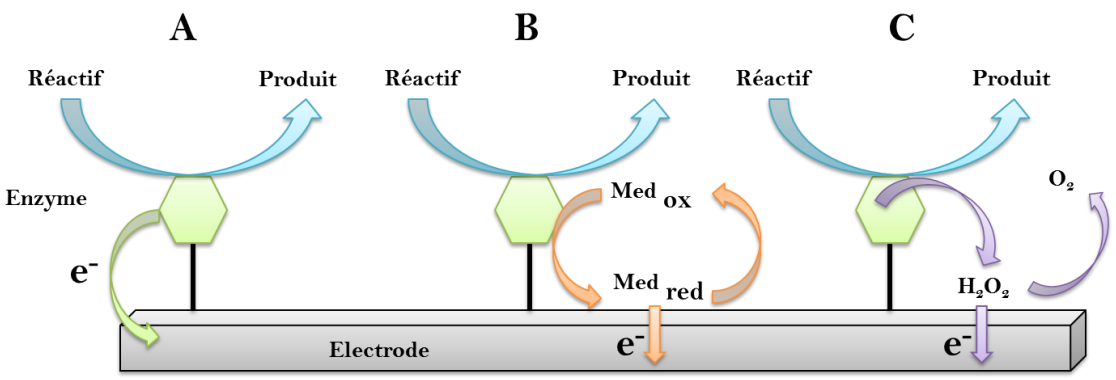


Figure 12: Principe de fonctionnement des différents types de biocapteurs ampérométriques avec a) les capteurs à transfert électronique direct; b) avec médiateur et c) sans médiateur.

Historiquement, les premiers biocapteurs ampérométriques étaient de la famille des capteurs sans médiateur. En 1956, Leland Clark met au point un capteur capable de suivre l'évolution de la concentration en oxygène par électrolyse de ce dernier[40]. En effet, ce type de système utilise directement un sous-produit de la réaction catalysée par l'enzyme. Dans le cas d'un capteur à glucose, qui est l'un des plus décris de la littérature[32], la glucose oxydase est immobilisée à la surface de l'électrode et va catalyser la dégradation du glucose en acide gluconique et H_2O_2 en consommant également de l'O_2. Le capteur peut ainsi suivre la réaction en mesurant la concentration en O_2[41] ou en H_2O_2[22] par réduction ou oxydation de ces espèces à l'électrode. Il s'agit donc d'une mesure indirecte et sans médiateur puisque l'on utilise ici des produits ou des réactifs de la réaction enzymatique. Ces capteurs ne nécessitent donc aucun ajout de réactif pour fonctionner, mais la mesure doit cependant s'effectuer à un potentiel de travail élevé. Pour l'oxydation de H_2O_2 notamment, il est nécessaire de travailler à un potentiel de + 0,65 V par rapport à ECS, or de nombreuses espèces peuvent s'oxyder à ce potentiel et donc créer des interférences. Pour la réduction de l'O_2, le système est très sensible aux variations de la pression partielle en oxygène et à la limitation stœchiométrique d'oxygène (concentration en oxygène dissous bien inférieure à la concentration physiologique en glucose). Malgré différentes études pour tenter de répondre à ces problématiques (utilisation de membranes sélectives[42,43], remplacement de la glucose oxydase[44,45], changement de matériau d'électrode pour diminuer le potentiel de détection de l'oxydation[46] etc.), les capteurs de première génération ont peu à peu laissé place à une seconde génération de biocapteur ampérométrique, les capteurs avec médiateur.

Cette nouvelle génération de biocapteur a donc été initialement développée pour réduire les interférences dues à l'utilisation de potentiels élevés pour la détection des espèces électroactives. Pour cela, ces capteurs utilisent une espèce oxydante supplémentaire, appelée médiateur, capable d'assurer le transfert d'électrons entre le centre enzymatique et l'électrode ou entre un des produits de la réaction catalytique et l'électrode. Le médiateur doit ainsi répondre à plusieurs caractéristiques afin de pouvoir être utilisé en tant que tel. Son activité électrochimique doit s'effectuer à un potentiel plus faible que les potentiels des substances interférentes, le transfert électronique doit être rapide et bien défini. De plus, les formes oxydées et réduites doivent être stables en solution. Les médiateurs peuvent être utilisés directement en solution ou être incorporés dans le système par immobilisation à la surface de

l'électrode. La première technique est plus simple à mettre en place mais n'est pas viable dans le cas d'études *in vivo* (toxicité de certains médiateurs vis-à-vis de l'organisme). L'immobilisation des médiateurs permet également une utilisation en continue et sur un plus long terme du capteur.

Les premiers capteurs ampérométriques utilisant des médiateurs ont été développé dans les années 1980 principalement pour la détection du glucose[47–49]. Ils utilisaient pour cela des médiateurs encore fortement étudiées de nos jours appartenant notamment à la famille des quinones ou des ferrocènes (et leurs dérivés)[50,51]. D'autres médiateurs ont bien évidemment vu le jour depuis, on peut citer par exemple les complexes d'osmium. Une liste non-exhaustive de quelques médiateurs et de leur potentiel d'utilisation est disponible au sein du Tableau 1.

Tableau 1: Potentiel redox de différents médiateurs par rapport à Ag/AgCl

Couple Redox	Potentiel (mV)
Diméthylferrocène	**150**
Hydroquinone	**400**
FAD / $FADH_2$	**-230**
Bleu de méthylène	**-100**
Viologene	**-460**
Os^{2+}/Os^{1+}	**-180**
Tétracyanoquinodiméthane	**+200**

Bien que très étudiés et très utilisés, les capteurs de seconde génération présentent un défaut lié à l'utilisation de médiateurs. En effet de nombreuses contraintes découlent directement du fait d'utiliser des médiateurs. Il faut que ceux-ci répondent à un cahier des charges bien précis. De plus des critères tels que la toxicité, le coût du médiateur ou encore la stabilité du système empêchent l'utilisation poussée de ce type de capteur, notamment dans le milieu médicale et l'implantable.

C'est pourquoi une 3e génération de biocapteurs a été mise au point : les capteurs à transfert électronique direct. Dans ce type de capteur, le transfert d'électron se fait directement de l'enzyme à l'électrode sans intermédiaire. Pour cela, l'enzyme doit être directement connectée à l'électrode. Cependant les matériaux d'électrodes classiques (carbone vitreux, platine…) ne permettent pas une connexion idéale de la plupart des enzymes. En effet pour une utilisation optimale de l'enzyme, il faut que celle-ci conserve sa conformation mais aussi que la distance entre son site catalytique et l'électrode ne soit pas trop grande pour conserver le transfert d'électron. L'utilisation de nanomatériaux a alors grandement contribué au développement de ce type de biocapteur[52,53].

En 2009, Deng et al ont par exemple réalisé un biocapteur à transfert d'électron direct pour la détection du glucose par immobilisation de la GOX sur des nanotubes de carbone (CNT)

dopés par des atomes d'azote[54]. L'utilisation de cette nanostructure permet d'obtenir une bonne biocompatibilité (présence d'azote), une forte conductivité apportée par les CNT et une bonne activité catalytique grâce à l'augmentation de la surface spécifique permettant ainsi le greffage d'une grande quantité d'enzyme. De plus l'étude montre que le dopage à l'azote permet d'accélérer le transfert d'électron entre les sites électroactifs de la GOX et l'électrode. Deng et al ont atteint une limite de détection de 1.10^{-5} mol.L^{-1} par utilisation de ce capteur en plus de conserver une bonne sensibilité et une bonne sélectivité en condition d'utilisation réelle. Ce type d'architecture, utilisant des nanomatériaux carbonés[55], a été très fortement utilisé et sera détaillé plus en profond dans le chapitre I.C.2 de ce manuscrit.

Les nanoparticules, d'or notamment, font également parties des nanomatériaux ayant fortement participé au développement de cette famille de biocapteur. L'équipe de Yin et al a ainsi utilisé en 2008 des nanoparticules d'or couplées à des fibres de soie pour immobiliser la HRP et réaliser ainsi un capteur à transfert électronique direct pour la détection de H_2O_2[56]. La limite de détection atteinte avec ce système est de 5.10^{-6} mol.L^{-1} pour une linéarité comprise entre 10.10^{-6} mol.L^{-1} et 1800.10^{-6} mol.L^{-1}, ce qui place ce biocapteur comme un système prometteur vis-à-vis des données de la littérature[57–60]. Les nanoparticules seront également décrites plus en détail dans le chapitre I.C.1.

Enfin, si ce type de système a largement été utilisé dans la conception de biocapteurs enzymatiques, comme présenté ci-dessus, il a également été appliqué à la réalisation d'autres types de capteurs permettant la détection d'une grande variété de cibles telles que des agents pathogènes (immunocapteurs) ou des polluants.

En 2004, Ionescu et al ont réalisé un biocapteur pour la détection de l'anticorps anti-toxine du Cholera[61]. Lors de cette étude, ils ont utilisé et comparé trois sortes de marqueurs enzymatiques différents : la peroxydase de raifort (HRP), la polyphenol-oxidase marquée par une biotine (PPO-B) et la glucose-oxydase marquée par une biotine (GOX-B). Concernant les médiateurs redox, trois d'entre eux ont également été testés : l'hydroquinone, l'acide ferrocène di-carboxylique et le ferrocyanure. Le système ayant obtenu les meilleurs résultats étant celui faisant intervenir la HRP combiné à l'utilisation d'hydroquinone en tant que médiateur redox avec une limite de détection de 50 ng.mL^{-1} pour un temps de réponse relativement court variant de 5 à 30 secondes.

En 2012, M. Portaccio et al mettent au point un biocapteur capable de détecter le Bisphenol-A (BPA, un polluant)[62]. Dans ce travail, la thionine, incorporée dans de la pâte de carbone, est utilisée comme médiateur et la tyrosinase comme enzyme active. Ce capteur montre de très bons résultats avec une gamme de linéarité allant de 0.15 à 45 µM et une limite de détection de 0.15 µM.

Cavalcanti et al. ont proposé en 2012 une approche originale et très performante pour la détection d'une molécule d'intérêt, à savoir la toxine de la Dengue (DENV)[63]. Des anticorps contre cette toxine sont immobilisés à la surface d'une fibre de carbone modifiée par une couche de Chitosan. Le médiateur utilisé ici est le 2 -azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). La mesure est réalisée dans une solution de H_2O_2 soumise à différentes injections de DENV-HRP/DENV. Il y a ainsi compétition entre les deux espèces et

on peut observer une diminution du courant en fonction de l'augmentation de la concentration en DENV non marquée par la HRP. Le biocapteur obtenu présente une limite de détection de 0,94 ng.mL^{-1} et une gamme de linéarité entre 1 et 175 ng.mL^{-1} (Figure 13).

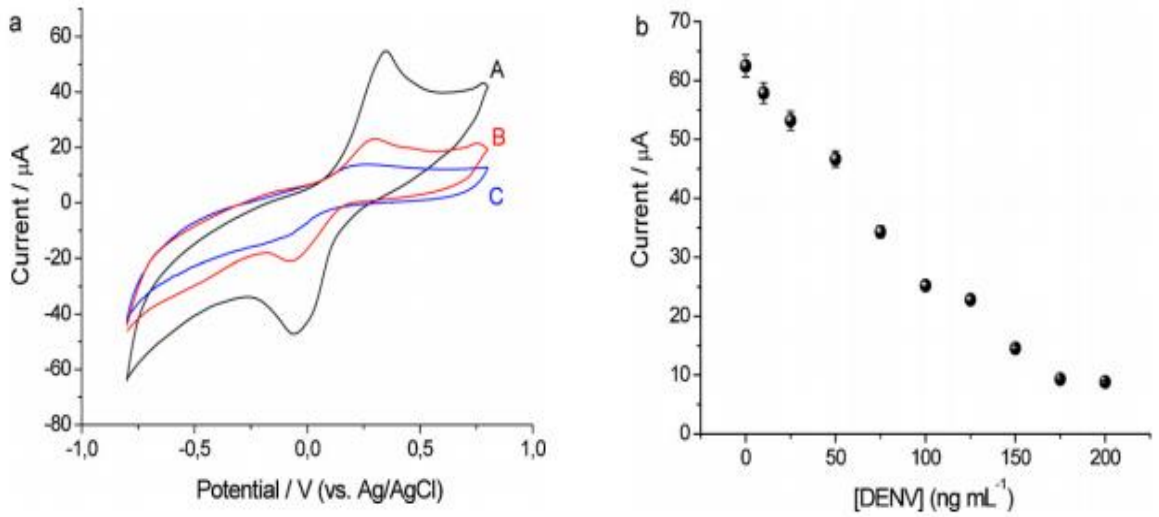


Figure 13: a) Voltammogramme obtenus après injection de 100.10^{-6} mol.mL^{-1} de H_2O_2 en présence de ABTS (A) ; sans ABTS (B) et en présence de ABTS sans toxine (blanc) (C). b) Courbe d'étalonnage obtenue pour différentes concentrations de DENV. Reproduit de [63].

(iii) Biocapteurs impédancemétriques

Les biocapteurs impédancemétriques représentent la dernière famille des biocapteurs électrochimiques. La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) mesure l'impédance du matériau et/ou de l'édifice moléculaire étudiés. Pour cela, le système est soumis à un signal sinusoïdal de faible intensité à différentes fréquences. L'application d'une tension alternative permet alors de mesurer l'impédance électrique à partir de la loi d'Ohm. En effet, l'impédance est alors donnée par le rapport tension/courant en prenant en compte le déphasage.

Avant de jouer un rôle important dans le domaine des biocapteurs, l'impédance a d'abord été un outil très utilisé pour l'étude de système électrochimique, notamment les systèmes corrosifs[64,65], les piles à combustible[66–68] ou encore les batteries[69–71]. Cependant, depuis les années 2000 la EIS s'est révélée être un outil puissant pour l'étude de surface et donc pour la réalisation de biocapteur électrochimique[72]. En effet, l'impédance du système est impactée lorsque la molécule cible va se lier au biorécepteur préalablement immobilisé à la surface de l'électrode. Les espèces biologiques cibles peuvent alors être détectées en mesurant les propriétés électriques et/ou diélectriques de l'électrode. La EIS permet également de déterminer d'autres paramètres tels que la cinétique des réactions moléculaires étudiées, le taux de recouvrement et l'efficacité des greffages ou encore la vitesse du transfert électronique. Enfin, les biocapteurs impédancemétriques sont particulièrement attractifs de par leur faible coût de fabrication, leur facilité de réalisation et le fait que cette technique soit une méthode de transduction sans marquage.

Il existe deux modes d'utilisation pour ce type de capteur. La première technique fait intervenir des électrodes bloquantes, c'est-à-dire que l'électrode est placée dans des conditions telles qu'il ne se produit pas de réaction faradique (pas de transfert d'électrons). Cependant cette technique est très peu utilisée par rapport à la seconde. La deuxième technique met en jeu, pour sa part, l'utilisation d'une sonde redox, si le phénomène de reconnaissance ne fait pas apparaître ou ne consomme pas d'espèce redox. Elle prend donc en compte les processus faradiques. Cette sonde va diffuser à travers l'architecture moléculaire jusqu'à la surface de l'électrode. Il est alors possible de mesurer par impédance la résistance de transfert de charge associée à la réaction d'oxydation ou de réduction ayant lieu à l'électrode. Or cette résistance est directement impactée par l'état de surface de l'électrode. En effet après reconnaissance de l'analyte par un biorécepteur, les phénomènes de transport et de transfert électroniques sont ralentis et donc la résistance totale du système augmente.

La détection non-faradique a notamment été utilisée pour la détection d'ADN[73] ou de protéines[74]. Cependant cette technique nécessite généralement des matériaux d'électrodes complexes et présentent une moins bonne sensibilité que la détection mettant en jeu des sondes redox[75]. C'est pourquoi la seconde technique a été beaucoup plus étudiée et utilisée[76].

Celle-ci est notamment très utilisée dans le domaine médical, pour la détection de l'hybridation de brins d'ADN ou la reconnaissance antigène/anticorps entre autres[77]. En 2010, Baur et al présente un biocapteur pour la détection d'un ADN cible par impédance[78]. Ils utilisent pour cela un film de poly-pyrrole portant une fonction nitrilotriacetique (PP-NTA) afin de permettre l'immobilisation de l'ADN sonde, dans ce cas-là un ADN portant une fonction histidine. Les principaux avantages d'une telle configuration résident premièrement dans le caractère perméable et hydrophile du film de polymère organique, mais aussi dans la proximité au niveau moléculaire entre les deux brins d'ADN et la surface du polymère. Ceci permet alors à la sonde redox, l'hydroquinone, de diffuser à travers le système moléculaire jusqu'à l'électrode et d'obtenir une très bonne limite de détection de l'ordre de 10^{-15} mol.L^{-1} et une bonne linéarité dans la gamme étudiée (Figure 14).

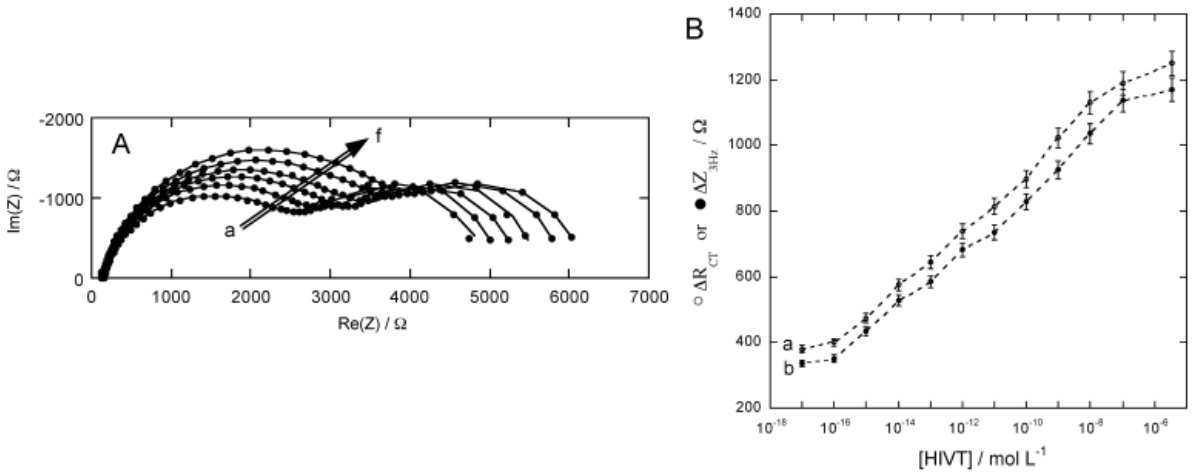


Figure 14: A) Diagramme de Nyquist obtenus par impédance à différentes concentrations d'ADN cible ; B) Courbes d'étalonnage du biocapteur à ADN. Reproduit de [78].

On rencontre de nombreux autres exemples de sondes redox utilisées en impédance dans la littérature. On peut citer notamment $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, $[Co(bpy)_3]^{3+/2+}$, le bleu de méthylène[79,80] ou encore les quinones[81–85]. Ces sondes peuvent être directement utilisées en solution ou être immobilisées dans une matrice de polymère.

Gondran et al ont ainsi créé un biocapteur pour lequel la sonde redox utilisée est directement incorporée dans un film de poly-pyrrole[86]. Le monomère utilisé pour réaliser l'électropolymérisation de ce film est ainsi constitué d'un groupement pyrrole couplé à un groupement viologène et une fonction biotine (Figure 15). Le viologène joue ici le rôle de sonde redox et est donc utilisé pour assurer la transduction impédimétrique de la reconnaissance entre le biorécepteur et l'analyte. La biotine permet quant à elle l'immobilisation de la protéine ciblée.

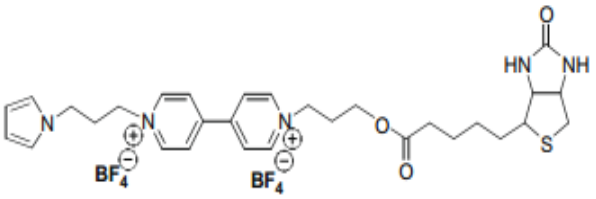


Figure 15: Structure du monomère utilisé dans la réalisation du biocapteur. Reproduit de [86].

L'utilisation de nanomatériaux dans de tels systèmes a également été étudiée. La grande surface spécifique offerte par le caractère nanométrique de ces matériaux permet théoriquement l'immobilisation d'une plus grande quantité de biorécepteur et donc une meilleure sensibilité du capteur. Dans des travaux de 2010, Huang et al présentent un biocapteur dont l'électrode est préalablement modifiée par un film nanobiocomposite constitué d'un assemblage entre un film de O-carboxymethylchitosan et des nanoparticules de Fe_3O_4[87]. La présence de chitosan fourni un microenvironnement approprié pour l'immobilisation d'anticorps, alors que les nanoparticules de fer assurent la mise à disposition d'une grande surface spécifique. Ce système a été utilisé pour la détection de *Campylobacter jejuni*, impliquée dans le développement de Gastroentérite. La gamme de linéarité obtenue est comprise entre 1.10^3 et 1.10^7 CFU/mL, ce qui permet à ce capteur d'avoir une limite de détection suffisamment faible pour en faire un outil de diagnostic médical (Figure 16).

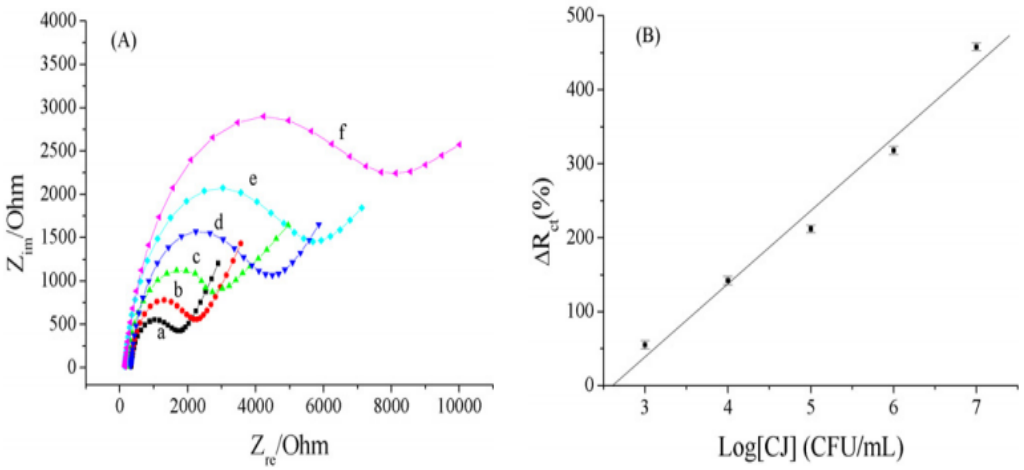


Figure 16: A) Diagramme de Nyquist obtenus pour des concentrations croissantes de Campylobacter jejuni ; B) Courbe d'étalonnage du biocapteur ; reproduit de [87].

Meini et al. ont pour leur part réalisés un biocapteur pour la détection de la thrombine par utilisation de deux différents aptamères[88]. Ces composés, obtenus par synthèse supportée sur phase solide, sont utilisés afin de permettre l'immobilisation ciblée de la thrombine à la surface de l'électrode par formation d'un complexe. Ils obtiennent ainsi un système très sensible permettant une détection jusqu'à une concentration de 3,1 $ng.mL^{-1}$ et une gamme de linéarité comprise en 3 et 50 $ng.mL^{-1}$ pour le meilleur des deux aptamères.

Enfin, certains groupes ont tenté d'incorporer des nanomatériaux carbonés, comme les CNT ou encore le graphène, dans des dispositifs de détection impédancemétriques. C'est le cas du groupe de Abdolahad et al qui en 2012 met au point un biocapteur en utilisant des CNT verticalement alignés comme piège pour l'immobilisation puis la détection de cellules cancéreuses[89]. Ils ont pu montrer que cette architecture assure une réponse plus rapide et plus sensible que divers travaux décrits dans la littérature en atteignant une limite de détection de 4000 cellules/cm² et une sensibilité de $1,7.10^{-3}$ Ω/cm².

Cependant l'utilisation des CNT en impédance n'est pas encore très répandue car l'état de surface est très important lors de la réalisation de cette mesure. Il faut donc s'assurer d'avoir une méthode de réalisation de film de CNT bien contrôlée et reproductible. Cette problématique sera discutée plus en détail au sein de la partie II.A de ce manuscrit.

Conclusion

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

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

B. Les méthodes d'immobilisation

L'immobilisation du biorécepteur à la surface du transducteur joue un rôle clé lors de l'élaboration d'un biocapteur puisqu'elle impacte directement les performances de ce dernier, à savoir son temps de réponse, sa spécificité, sa sélectivité ou encore sa durée de vie. De plus, lors de l'immobilisation de matériel biologique, il faut que celui-ci conserve ses propriétés de reconnaissance, dans le cas de protéines ou d'anticorps notamment, mais aussi son activité catalytique dans le cas des enzymes. Enfin, il faut s'assurer que la méthode d'immobilisation choisie permet la réalisation de dépôt reproductible et homogène.

L'immobilisation des biorécepteurs représente aussi un intérêt financier. Elle permet, notamment dans le cas des capteurs enzymatiques, de conserver le matériel biologique entre différentes mesures et donc d'assurer la réutilisation du biocapteur, ce qui diminue drastiquement le coût de production.

C'est pourquoi de nombreuses méthodes d'immobilisation ont été développées au cours des différentes études menées sur la réalisation de biocapteurs et seront présentées pour les plus courantes d'entre elles dans ce chapitre[90].

1. L'adsorption

La première méthode présentée ici est aussi la plus simple en mettre en œuvre. En effet l'adsorption moléculaire est une caractéristique intrinsèque à certains composés, minéraux ou organiques, leur permettant de se fixer à une surface ou un édifice tridimensionnel. L'adsorption repose sur les interactions faibles de types Van der Waals, liaisons hydrogènes ou encore des interactions ioniques. De par sa nature, cette méthode d'immobilisation souffre principalement d'un manque de sélectivité mais aussi d'un manque de stabilité dans le temps dû au phénomène de désorption. Pour répondre à ce problème et assurer une certaine sélectivité vis-à-vis de la molécule adsorbée, il est possible d'utiliser des matériaux dits « actifs » tels que des résines échangeuses d'ions, des argiles, des céramiques, des zéolites etc.

Plusieurs équipes ont ainsi travaillé sur cette méthode d'immobilisation puisqu'elle reste simple d'utilisation et qu'il est possible de limiter le manque de selectivité[91–95].

Decher et al ont par exemple été un des premiers groupes à travailler sur la modification d'électrode par utilisation de surfaces chargées[96]. Pour cela, ils proposent la formation d'une structure par adsorption successive de couche anionique et cationique à la surface de l'électrode.

L'équipe de Mousty a notamment développé de nombreux systèmes en utilisant des électrodes modifiées par des argiles[97]. Ce type de modification permet d'immobiliser des espèces de différentes manières en exploitant les propriétés de l'argile utilisée. Les espèces peuvent ainsi être accumulées dans la couche d'argile à différents endroits (Figure 17). Cependant, seulement une petite fraction de ces espèces présente une activité redox. En effet, un problème fréquemment rencontré lors de l'utilisation d'un solide non conducteur comme matrice d'immobilisation est le faible transport de charge qui en résulte.

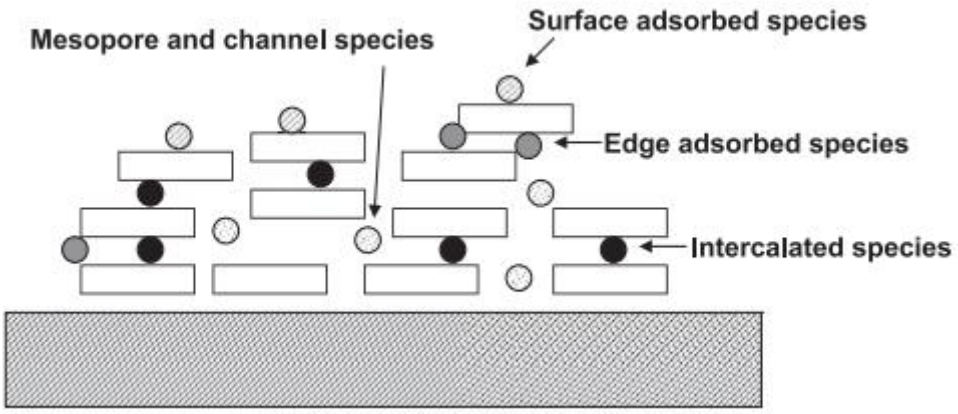


Figure 17: Représentation schématique des différents sites d'adsorptions possibles par utilisation d'une électrode modifiée par de l'argile. Reproduit de [97].

Une variante de l'immobilisation par adsorption consiste à réaliser une monocouche auto-assemblée (SAM) à la surface du transducteur pour favoriser l'adsorption de la molécule cible. Les SAMs sont formées par adsorption spontanée de molécules, de type surfactant, à partir d'une solution ou d'une phase gazeuse sur un substrat pour lequel elles présentent une affinité particulière. Ces molécules sont constituées d'une fonction d'accroche, d'un bras espaceur et d'un groupe fonctionnel terminal (Figure 18). La fonction d'accroche présente une affinité pour la surface du transducteur et initie l'auto-assemblage. Les interactions faibles entre les différents bras espaceurs permettent ensuite la formation de l'assemblage et la stabilisation de la structure. Enfin la fonction terminale assure la sélectivité vis-à-vis de la molécule d'intérêt ciblée. C'est elle qui détermine l'immobilisation covalente ou affine de la cible. Les avantages de cette méthode sont multiples. Tout d'abord il est facile de moduler la fonction terminale pour l'adapter à la molécule que l'on souhaite immobiliser. De plus, elle permet de limiter grandement les phénomènes de désorption et donc d'augmenter la durée de vie du système[98–100].

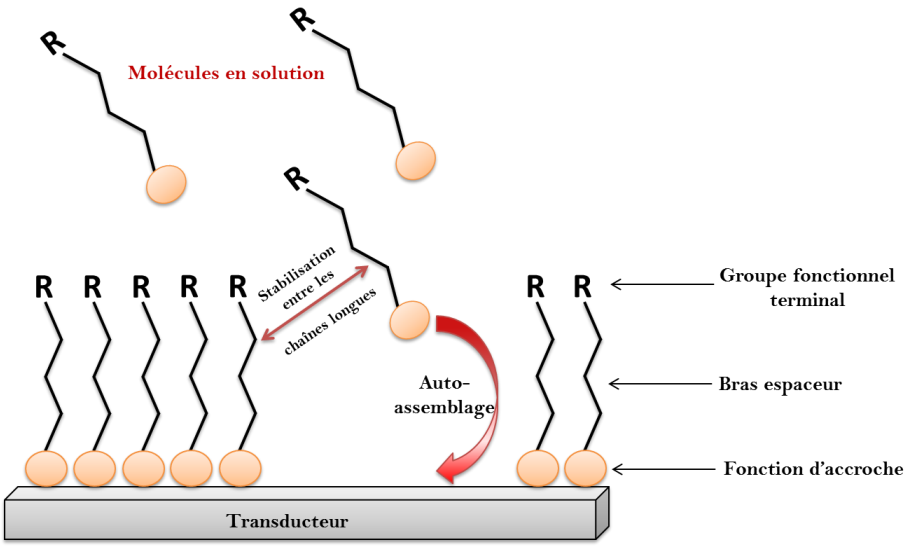


Figure 18: Principe de réalisation d'une monocouche auto-assemblée.

2. La réticulation

La réticulation se fait par utilisation d'agents réticulant, tel que le glutaraldéhyde ou le bisacrylamide[101,102]. L'intérêt de ce type de composés est la présence de multiples fonctions chimiques en leur sein, leur permettant de ponter deux protéines entre elles par réaction avec les fonctions NH_2 présentent à la surface des biomolécules. Il est ainsi possible de lier entre elles différentes protéines par formation d'un réseau de chaînes de polymères. On obtient alors une structure tridimensionnelle, de masse moléculaire plus élevée et présentant des propriétés physico-chimiques différentes de celles des composés pris à part, par exemple l'insolubilité dans les solvants[103,104].

Deux méthodes de réticulation peuvent être utilisées. La première est la méthode classique, utilisant simplement un agent réticulant et la protéine a immobilisé. La seconde est appelée co-réticulation et fait intervenir une seconde protéine, ne présentant pas d'activité catalytique, permettant de stabiliser la structure tridimensionnelle.

La réticulation est avantageuse de par sa simplicité de mis en œuvre. Malgré tout, elle présente différents inconvénients. La création du réseau tridimensionnelle entraîne notamment une modification des propriétés physiques des molécules et peut ainsi diminuer les propriétés mécaniques de la structure. De plus, la modification de la structure de la protéine engendre généralement une diminution de l'activité catalytique due à la modification du site actif de l'enzyme.

3. L'encapsulation

Cette technique consiste à piéger la biomolécule ciblée au sein d'une structure tridimensionnelle. Il ne faut pas confondre cette technique avec la réticulation décrite précédemment. Si les procédés comportent des points communs, la différence majeure vient du fait que dans le cas de l'encapsulation, la protéine n'est pas liée à sa matrice par des liaisons chimiques, elle est simplement piégée mécaniquement à l'intérieur de celle-ci. Il faut ainsi s'assurer que la taille des mailles de la matrice est suffisante pour permettre la diffusion du substrat tout en assurant la rétention de la biomolécule. Les matériaux utilisés en tant que matrice peuvent être de différentes natures : polymères, matériaux composites, gels inorganiques ou organiques…[105–108]

La structure de la protéine n'est pas fortement modifiée par cette technique et donc elle conserve son activité catalytique. Il faut cependant prendre en compte le microenvironnement local autour de la biomolécule. Ainsi le pH, la force ionique ou la vitesse de diffusion des espèces à travers le réseau, ont une influence sur l'activité enzymatique de la biomolécule piégée.

Ce genre de technique est notamment utilisé dans le domaine médical et plus particulièrement pour faciliter l'administration de médicament en améliorant la solubilité ou la biocompatibilité de certaines molécules. Wang et al. utilisent ainsi des capsules de polymères afin d'encapsuler des composés insolubles tels que la thiocoraline ou le paclitaxel[109]. Cette méthode conduit à l'obtention de nanocapsules pouvant accueillir de fortes concentrations de

la molécule ciblée et n'altérant pas l'activité du médicament retenu. Le principe de réalisation de ces capsules est illustré au sein de la Figure 19.

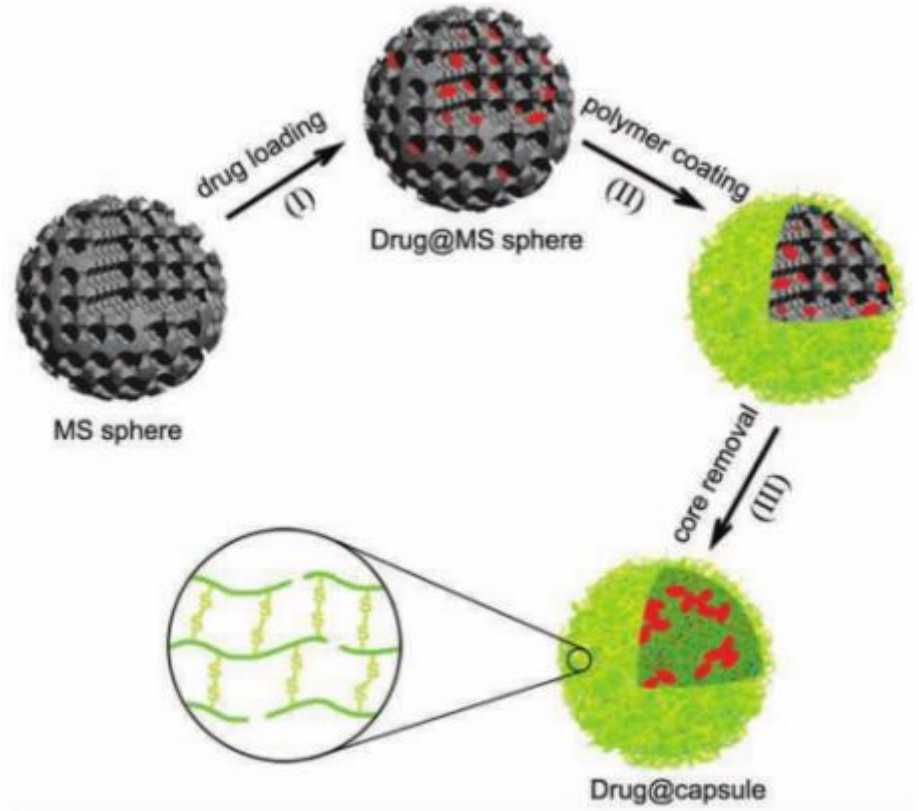


Figure 19 : Illustration schématique de l'encapsulation de molécules insolubles à l'aide d'une couche de polymère et d'une matrice de silices méso poreuses. (I) Introduction de la molécule active au sein de la matrice; (II) Recouvrement de la matrice à l'aide d'une couche de polymère; (III) Extraction de la matrice de silicas afin d'obtenir une nanocapsule uniquement composée de polymères et de principes actifs. Reproduit de [109].

4. Les assemblages moléculaires

L'assemblage moléculaire repose sur l'utilisation des différentes affinités existant entre molécules pour assurer l'immobilisation de la biomolécule d'intérêt. Ces affinités peuvent être de natures variées avec par exemple la complexation métallique, la reconnaissance anticorps-antigène ou encore la reconnaissance entre une enzyme et son substrat. Cette technique est très versatile puisqu'elle permet également l'immobilisation de molécules sans affinité. En effet, si la molécule d'intérêt choisie ne présente aucune interaction particulière vis-à-vis d'une autre molécule, il est possible de fonctionnaliser celle-ci pour créer une affinité ciblée. On trouve ainsi commercialement des protéines marquées par des fonctions histidine ou biotine permettant la réalisation d'assemblage moléculaire.

Un exemple courant d'architectures utilisant ce type d'assemblage moléculaire est le couplage avidine-biotine. Celui-ci a été particulièrement étudié et utilisé car la biotine présente une affinité très forte envers la streptavidine ($K_{abiotine/(strept)avidine} \sim 1.10^{15}$), ce qui rend le complexe résultant de l'association de ces deux molécules très stable et résistant à différents solvants.

Cette interaction est d'ailleurs une des plus fortes interactions non-covalentes présentes dans la nature[110,111]. De plus, la streptavidine est multivalente et permet l'adhésion de quatre fonctions biotines (Figure 20). En sachant que la biotine est couramment utilisée comme marqueur de biomolécules d'intérêt, il est alors possible d'adapter le système à tous types d'études. Ces différentes caractéristiques ont été à l'origine du succès de cette technique, utilisée dans de nombreux travaux[112–115].

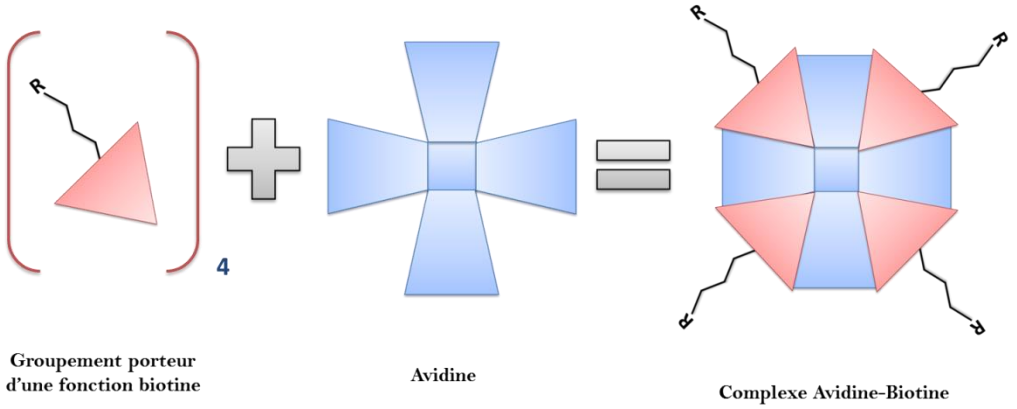


Figure 20: Représentation schématique de la formation du complexe avidine-biotine.

Une autre approche, utilisée au cours de ces travaux de thèse, peut également être citée. Elle met en jeu la formation d'un complexe de cuivre, coordonné à la fois par la fonction acide nitrilo-triacétique (NTA) et la fonction biotine. Le cation métallique Cu^{+2} va former un complexe octaédrique en se liant aux quatre donneurs d'électrons de la fonction NTA et permet donc la complexation de deux fonctions biotines pour compléter sa coordination (Figure 21). Afin de pouvoir réaliser ce type d'assemblage, la fonction NTA est souvent couplé à un monomère de type pyrrole ou pyrène. Ceci va permettre la formation d'un polymère, notamment par électropolymérisation sur une électrode, porteur de la fonction NTA à la surface du transducteur pour ensuite procéder à l'assemblage[78,116–118].

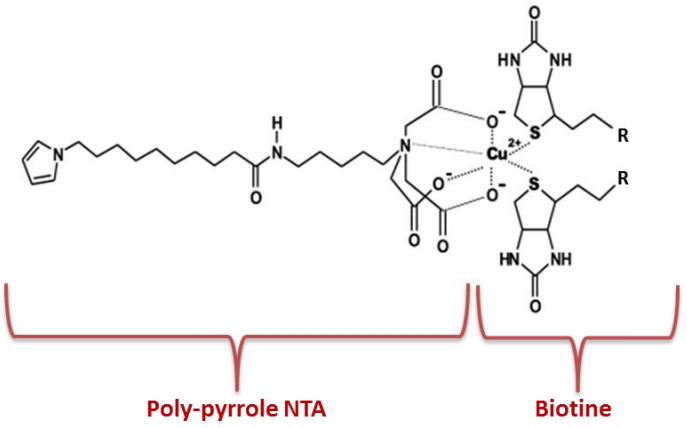


Figure 21: représentation schématique de la formation du complexe de cuivre avec la fonction NTA et deux fonctions biotines.

Enfin, un dernier exemple d'architecture moléculaire d'intérêt est celui de l'association entre l'adamantane et la β-cyclodextrine. Cet assemblage possède une constante d'association de 10^5 et appartient à la famille dite des complexes d'inclusion. Dans ce type de complexe, un des composants, l'hôte (la β-cyclodextrine dans ce cas), forme une cavité au sein de laquelle la seconde partie du complexe, l'invité (l'adamantane), va venir se loger. Cet assemblage peut ainsi être utilisée pour immobiliser différentes molécules marquées par une cyclodextrine sur des surfaces préalablement modifiées par des groupements adamantanes tel que présenté au sein de la Figure 22[119,120].

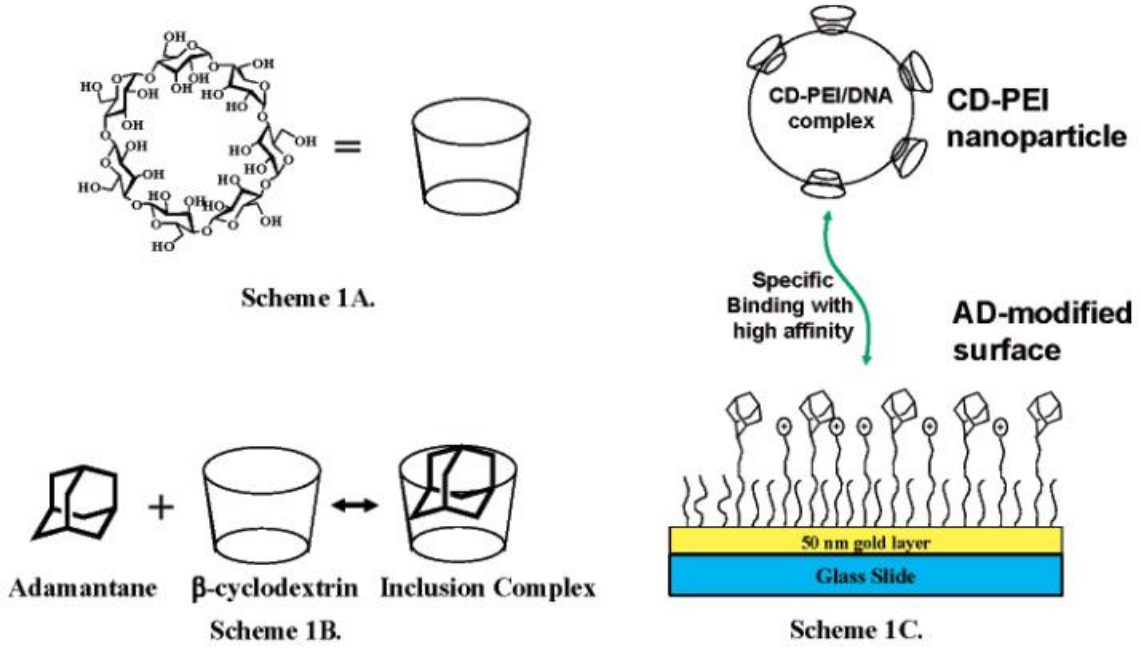


Figure 22: (A) Structure de la β-cyclodextrine, (B) Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion entre la β-cyclodextrine et l'adamantane et (C) Représentation schématique de l'immobilisation de nanoparticules marquées par une β-cyclodextrine sur une surface modifiée par des groupements adamantanes. Reproduit de [115].

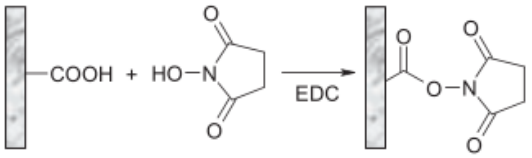
5. Le greffage chimique

La dernière méthode d'immobilisation présentée ici met en jeu des liaisons covalentes réalisées par greffage chimique. Pour mettre en place ce type de méthode d'ancrage, il faut préalablement modifier la surface du transducteur par des groupements fonctionnels capable, après activation, d'initier une réaction chimique avec la biomolécule à immobiliser donnant lieu à la création d'une liaison covalente. Les fonctions amines, hydroxyles, carboxyliques ou encore esters sont ainsi souvent mises à contribution dans ce type de procédé. Différents exemples de greffages chimiques sont illustrés au sein de la Figure 23.

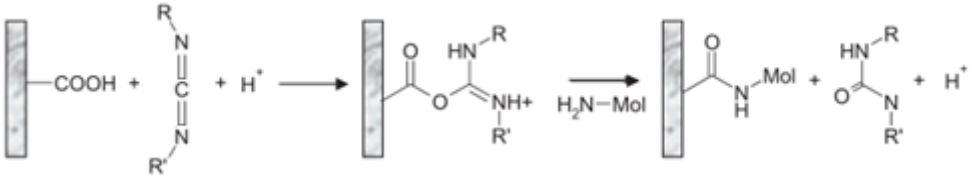
L'avantage de cette méthode réside dans la stabilité de la liaison créé entre la biomolécule et le support chimique. En effet la liaison covalente assure une immobilisation quasi-permanente et donc améliore grandement la durée de vie du biocapteur. Cependant, les réactifs nécessaires à l'activation des groupes fonctionnels et les conditions de réactions nécessaires au greffage risquent de dénaturer la biomolécule et donc de provoquer une perte d'activité pour les

réactions les plus agressives. La réaction d'amidation classique utilisée pour immobiliser du matériel biologique à la surface de différentes surfaces reste cependant une méthode douce. Certaines réactions peuvent également orienter l'enzyme greffée à la surface du transducteur et empêcher l'accès à son site actif, diminuant de ce fait son activité catalytique.

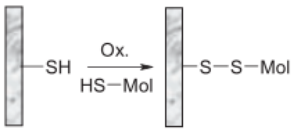
- Greffage par le groupement NHS (N-hydroxysuccinimide)[121]



- Greffage par couplage avec un carbodiimide[122]



- Greffage par un groupe thiol[123]



- Greffage par un groupe diazonium[124,125]

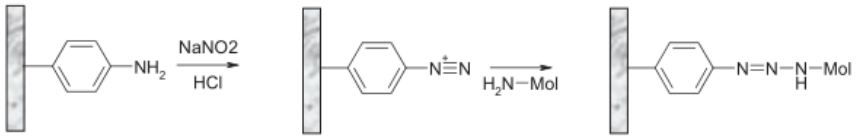


Figure 23: Représentation schématique de différentes voies de greffage chimique

Conclusion

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

C. Les nanomatériaux dans les biocapteurs

Comme il l'a été mentionné précédemment, les nanomatériaux jouent un rôle de plus en plus important dans le développement des biocapteurs. En effet, en passant d'un matériau macroscopique à un matériau à l'échelle nanométrique, de nouvelles propriétés entrent en jeu et peuvent être mises à contribution pour la réalisation de biocapteurs. Par exemple, les longueurs de diffusion deviennent très courtes et, par conséquent, le transport de masse est amélioré. Le rapport surface/volume est également bien plus grand pour les objets à l'échelle nanométrique et permet donc d'obtenir des surfaces spécifiques plus importantes. De telles surfaces donnent ainsi la possibilité d'accroitre la quantité de matériel biologique pouvant être immobilisée. On peut donc s'attendre à une augmentation ou au moins une variation de la performance du biocapteur en utilisant des structures nanométriques.

Trois approches peuvent être explorées quant à l'incorporation de nano-objets dans la réalisation de biocapteur. La première repose sur la modification de la surface du transducteur par des objets nanométriques. Un exemple de ce type de modification est la fonctionnalisation de la surface d'électrode par des nanotubes ou des nanoparticules afin de lui conférer de nouvelles propriétés (augmentation de la surface, affinité pour une certaine classe de molécules etc.). La seconde est la miniaturisation du transducteur en lui-même, avec notamment l'utilisation de nano-électrodes ou d'autres circuits miniaturisés. Enfin la troisième approche consiste à modifier les biomolécules mises en jeu dans le système étudié à l'aide de matériaux nanométriques ou encore de procéder au couplage entre une biomolécule et un nano-objet pour obtenir un matériau composite.

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la première approche, c'est-à-dire à la modification de la surface du transducteur. Pour cela, différentes familles de nanomatériaux peuvent être utilisées. Nous discuterons ici de trois d'entre elles, à savoir les nanoparticules, les nanomatériaux carbonés et enfin les nanomatériaux semi-conducteurs.

1. Les Nanoparticules et Quantum Dot

a) Les nanoparticules

Les nanoparticules ont fait l'objet de nombreux travaux de recherches depuis une vingtaine d'années et sont encore très étudiées de nos jours. Au sein de cette catégorie de nanomatériaux, on retrouve les nanoparticules d'or mais aussi différentes particules magnétiques comme les nanoparticules de nickel ou de fer[126,127]. Les nanoparticules présentent un intérêt certain pour la réalisation de biocapteur du fait de leur propriétés uniques, que celles-ci soient optiques, électriques ou même catalytiques.

Comme décrit plus tôt dans ce manuscrit, Wang et al ont utilisé ce type de matériau, et plus précisément des nanoparticules d'or, dans leur système pour la détection de *Escherichia coli* [26]. Ils ont ainsi démontré que les nanoparticules permettent l'amplification du signal obtenu à l'aide d'une microbalance à quartz. D'autres groupes ont réalisé des travaux pour l'amplification des signaux électrochimiques, obtenus par EIS ou voltampérométrie cyclique notamment, toujours par utilisation de nanoparticules d'or[128,129].

Zhu et al utilisent pour leur part des nanoparticules de platine pour la détection d'ADN[130]. Ces nanoparticules sont déposées à la surface de nanotubes de carbone pour permettre l'immobilisation du brin d'ADN sonde. Le fait de mélanger CNT et nanoparticules de platine permet de profiter de chacune des propriétés de ces deux matériaux. Les CNT accélèrent le transfert électronique et les nanoparticules de platine possèdent une forte activité catalytique. Ils obtiennent à l'aide de ce biocapteur une gamme de linéarité intéressante comprise entre $1{,}0.10^{-11}$ mol.L^{-1} et $1{,}0.10^{-7}$ mol.L^{-1}.

b) Les Quantum Dot

Le second type de particules présentées ici correspond à la famille des « boîtes quantiques » ou « Quantum Dot » (QD) en anglais. Les QD sont constitués par un assemblage d'atomes à l'échelle nanométrique formant une structure, généralement sphérique, nanocristalline de semi-conducteurs. La taille de ces structures varie de 1 à 12 nm. A cette échelle-là, un phénomène de confinement quantique apparait et donne ainsi à la structure des propriétés différentes de celles d'un matériau massif, on parle alors de puits quantiques[131,132].

Ce phénomène donne notamment à ces particules des propriétés optiques particulières leur permettant ainsi d'émettre en fluorescence de façon intense et durable, avec des largeurs de bande d'émission très étroites (15-40 nm). On peut ainsi noter que les QD possèdent un rendement quantique de fluorescence et une stabilité chimique supérieure à ceux des fluorophores organiques conventionnels. Cette stabilité vient du fait qu'il est possible de fonctionnaliser la surface des QD pour leur conférer les propriétés souhaitées (passivation, greffage d'un groupe fonctionnel etc.). On parle alors de particule cœur-coquille (core-shell en anglais). La plupart d'entre elles sont constituées de chalcogénures de cadmium (CdS) ou de chalcogénures de zinc (ZnS)[133]. L'autre propriété rendant les QD si intéressantes vient du fait que la longueur d'onde émise varie en fonction de la taille du QD. Les particules plus petites ont tendance à émettre un rayonnement d'énergie plus élevée (longueur d'onde plus courte, voir Figure 24). Enfin, les QD possèdent également des propriétés d'absorption uniques, ce qui les rend très appropriés pour la construction de biocapteurs optiques[134,135].

En 2005, Goldman et al mettent au point un biocapteur optique utilisant des QD pour la détection de produits explosifs (TNT)[136]. La boîte quantique utilisée est un assemblage cœur/coquille de CdSe-ZnS et est couplée à un fragment d'anticorps pour assurer la reconnaissance spécifique à la TNT. Ce dispositif leurs a permis d'obtenir un capteur sensible avec une limite de détection de 0,5 µg.mL^{-1} et une linéarité comprise entre 0,5 µg.mL^{-1} et 10 µg.mL^{-1}.

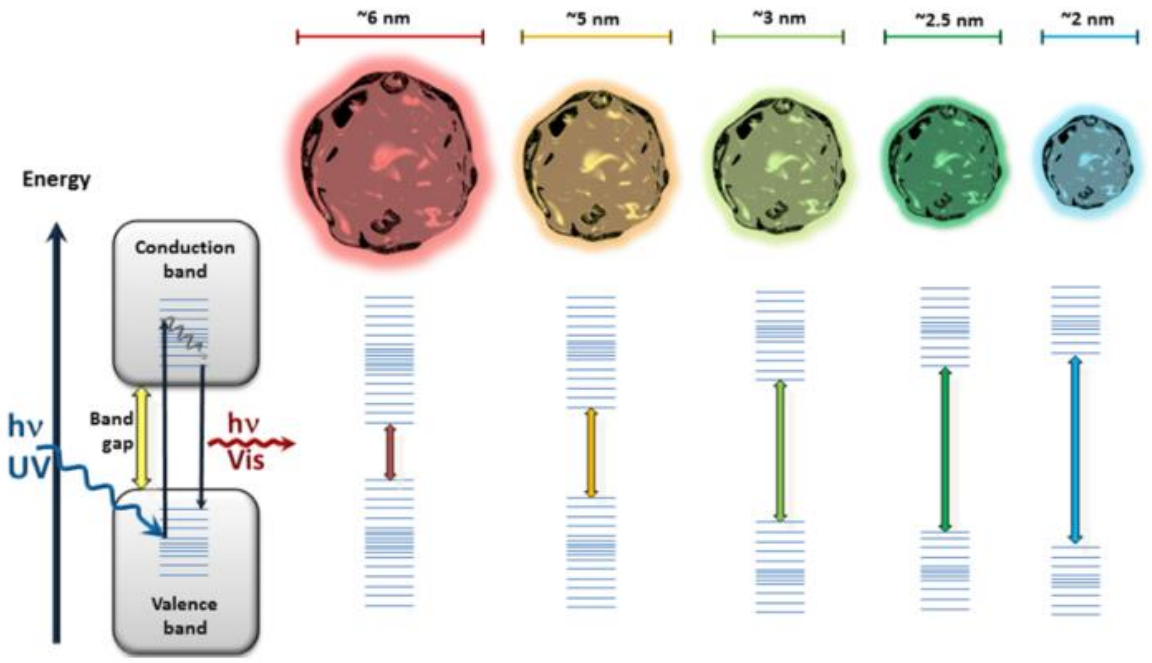


Figure 24: Illustration schématique de la relation entre la taille des QD et la longueur d'onde émise. Reproduit à partir de [133].

2. Les nanomatériaux carbonés

Les composés carbonés peuvent être trouvés sous différentes formes et structures, chacune présentant des caractéristiques et donc des utilisations différentes. Ils sont classés selon leur nombre de dimension ne faisant pas partie de l'échelle nanométrique. On retrouve par exemple les nanotubes (1 D), les feuillets de graphène (2D) ou encore les nanodiamants (0D). Les nanomatériaux carbonés ont joué un rôle central dans le développement des nanotechnologies et continuent à l'heure actuelle d'être très largement utilisés. Ceci s'explique par les propriétés uniques qu'ils peuvent apporter comme une excellente conductivité électrique, une forte résistance mécanique, une bonne conductivité thermique etc.

Comme évoqué précédemment, les structures tridimensionnelles à base de nanomatériaux carbonés se présentent comme une matrice de choix pour l'immobilisation de matériel biologique et donc pour leur incorporation dans la réalisation de biocapteurs. De plus, de nombreuses techniques permettent la fonctionnalisation de ce type de structure, donnant ainsi accès à une large variété de potentielles applications.

Les matériaux carbonés ont joué un rôle clé dans les travaux exposés au sein de ce manuscrit. C'est pourquoi dans cette partie nous décrierons plus en détail les principaux types de nanomatériaux existants et les différentes façons de les fonctionnaliser.

a) Les nanodiamants

Les nanodiamants ont été synthétisés pour la première fois en 1962 par utilisation d'explosifs. En effet, la détonation engendrée par les explosifs permet d'atteindre les niveaux de pression et de température nécessaires à la formation de diamants. De plus, cette technique utilise directement les carbones présents au sein de l'explosif utilisé pour la production du diamant[137,138].

Le motif unitaire donnant lieu à la formation des diamants est l'adamantane, avec saturation des liaisons pendantes par de l'hydrogène. Les nanodiamants obtenus à l'aide de cette technique ont une taille comprise entre 2 et 10 nm, avec une distribution de taille plus importante à 5 nm. Ce type de composé présente un fort ratio surface/volume et peuvent être d'excellents conducteurs (dépendant du rapport C_{sp}^3/C_{sp}^2), ce qui en fait un matériau de choix pour la réalisation de biocapteurs électrochimiques[139,140].

Enfin, comme représenté sur la Figure 25, ce type de matériau comporte en plus de leur cœur diamanté, une couche de carbone amorphe qu'il est possible de fonctionnaliser pour donner au matériau les propriétés voulues.

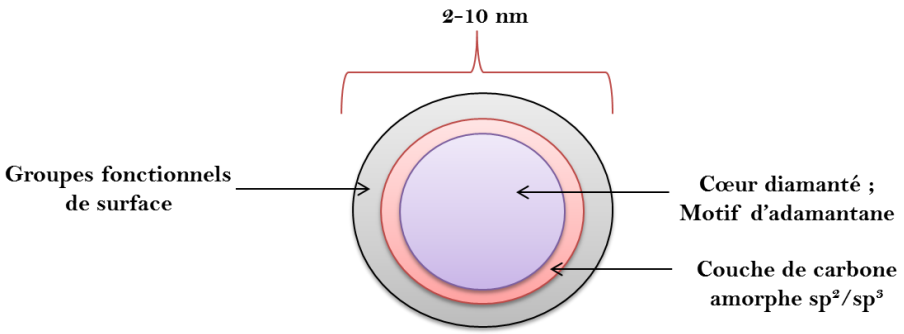


Figure 25: représentation schématique de la structure d'un nanodiamant.

En 2004, Huang et al ont montré qu'il est possible de fonctionnaliser des nanodiamants afin d'immobiliser des anticorps à leur surface[141]. Ils ont ainsi réussi, après avoir réalisé un traitement par plasma sur les nanodiamants, à immobiliser des anticorps anti-*Salmonella* et anti-*Staphylococcus aureus*. L'efficacité de leur système a été validée en confrontant les nanodiamants fonctionnalisés à un test ELISA.

Villalba et al ont développé un biocapteur pour la détection du glucose[142] par immobilisation de la GOX à la surface de nanodiamants. La limite de détection de ce système est de 1.10^{-6} mol.L^{-1} pour une gamme linéaire allant de 1.10^{-6} mol.L^{-1} à 8.10^{-3} mol.L^{-1}. De plus ce biocapteur présente un temps de réponse relativement court de l'ordre de 2 min, ce qui en fait un système prometteur pour la détection du glucose mais aussi pour la détection d'autres molécules par immobilisation de différentes enzymes à la surface des nanodiamants.

En plus d'être des constituants prometteurs de biocapteurs, les nanodiamants ont également été utilisés dans le milieu médical, notamment pour la vectorisation de médicaments[143] ou pour l'imagerie[144].

b) Le fullerène

Le fullerène, découvert en 1985 par Kroto et al, est une des formes allotropiques du carbone[145]. Il est généralement constitué de 60 carbones, d'où sa dénomination « C_{60} », formant une sphère creuse hautement symétrique (Figure 26).

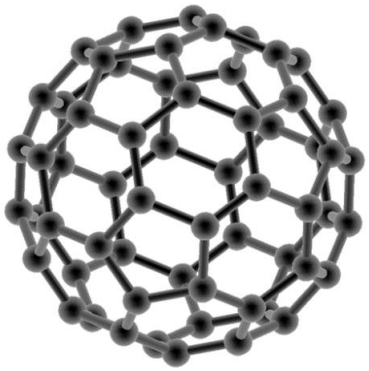


Figure 26: Représentation schématique d'un fullerène à 60 carbones.

Il présente, tout comme les nanodiamants, des propriétés optiques, électriques et mécaniques intéressantes pour le développement de nouveau matériau. On peut notamment citer son fort coefficient d'extinction molaire à 329 nm (ε ~ 50,000 mol.L^{-1}.cm^{-1}) et son intérêt en électrochimie due à son caractère accepteur d'électrons[146,147]. A l'instar des autres matériaux carbonés, il est également possible de fonctionnaliser les fullerènes. Cependant, la chimie de ce composé est assez complexe de par le fait qu'il a tendance à former des agrégats en solution, de plus il est très peu soluble en solution aqueuse et doit donc être utilisé le plus souvent en milieu organique. La Figure 27 ci-dessous présente les différentes voies de fonctionnalisation du fullerène qu'il est possible de mettre en œuvre.

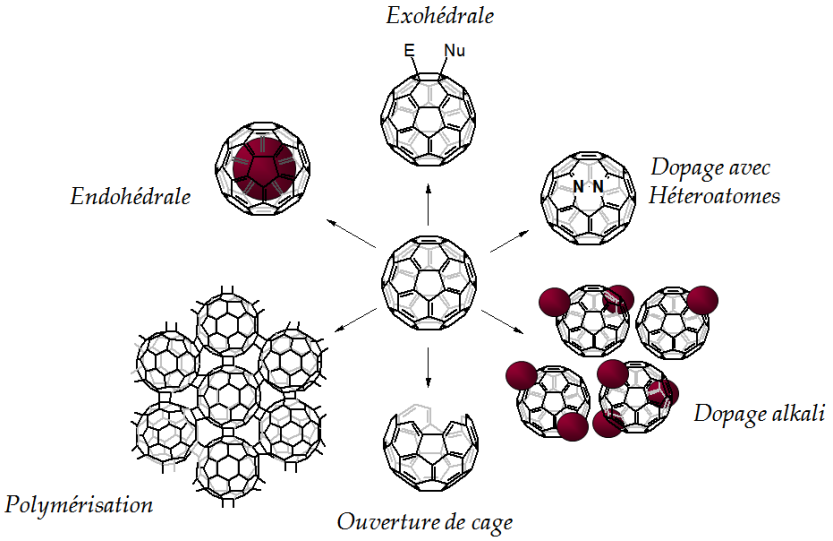


Figure 27: Représentation schématique des différentes voies de fonctionnalisation du fullerène.

Malgré ce défaut majeur qui limite son utilisation dans le domaine du vivant et du biomédical, plusieurs équipes ont tout de même travaillé sur l'incorporation du fullerène dans le développement de biocapteurs[148].

Dans les années 2000, Gavalas et al ont utilisé des fullerènes comme médiateurs pour la construction d'un biocapteur ampérométrique pour la détection du glucose[149]. L'intérêt d'utiliser ce type de matériau réside dans le fait de mettre à contribution les propriétés électrochimiques du fullerène, plus particulièrement ces multiples états redox. Ils ont pour cela immobilisé par adsorption des fullerènes sur une électrode de carbone poreux. La seconde étape de construction du capteur consiste à immobiliser la glucose oxydase à la surface du matériau d'électrode. Cet assemblage a permis de montrer qu'il est possible d'utiliser les fullerènes comme médiateurs redox, permettant ainsi d'abaisser le potentiel de travail et d'obtenir un système ayant un temps de réponse rapide. La limite de détection obtenue est de 13.10^{-6} mol.L^{-1}, ce qui reste moins bon que d'autres capteurs existants, mais qui offre tout de même des perspectives pour le développement d'autres capteurs basés sur ce système. Le groupe d'Afreen et al. ont notamment réalisé de nombreux travaux portant sur l'utilisation de fullerènes comme médiateurs dans des biocapteurs ampérométriques et sur l'optimisation de tels systèmes[150].

c) Les nanotubes de carbone

(i) Structures et propriétés

Les nanotubes de carbone (CNT) ont été découverts en 1991 par Sumio Iijima alors qu'il travaillait sur la synthèse de fullerène[151]. Ils peuvent être décrits comme étant constitué d'une feuille de graphène enroulée sur elle–même et fermée ou non à ses extrémités. Ils présentent ainsi un arrangement hexagonal similaire à celui du graphite qui fut une des premières structures connues du carbone. Comme pour le graphite, les atomes de carbone présents dans les nanotubes sont hybridés sous la forme sp^2 majoritairement (Le rapport C_{sp^2}/C_{sp^3} renseigne sur la pureté des nanotubes). Les CNT ont un diamètre d'environ 1 à 2 nm pour une longueur pouvant varier de quelques nanomètres jusqu'à plusieurs micromètres[152].

Les nanotubes existent sous deux formes distinctes : les nanotubes de carbone monofeuillets (SWCNT) et les nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT). Les SWCNT, comme leur nom l'indique, sont formés d'une seule feuille de graphène enroulée sur elle-même. A l'inverse, les MWCNT sont eux formés par l'emboitement de plusieurs couches de cylindres graphitiques (Figure 28). Ils peuvent alors atteindre un diamètre variant de 2 à 50 nm selon le nombre de cylindres. L'espacement interfeuillets a été déterminé comme étant de l'ordre de 0,34 nm (distance entre deux feuilles de graphène).

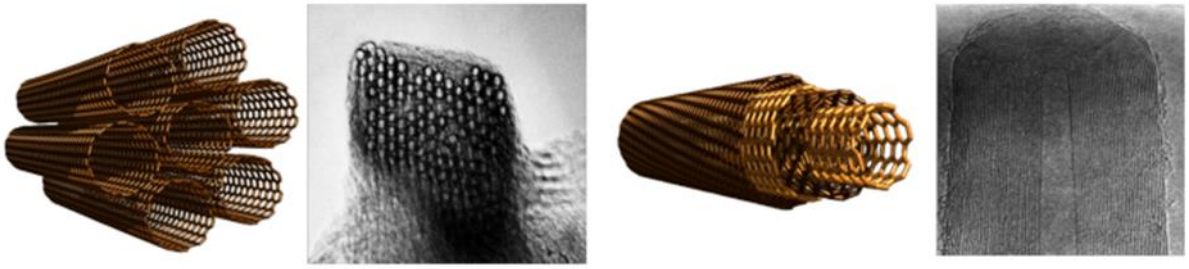


Figure 28: A) Images TEM et représentation schématique de la structure des SWCNT ; B) Image TEM et représentation schématique de la structure des MWCNT.

La méthode classique de productions des nanotubes de carbone se fait par dépôt chimique en phase vapeur (CVD)[153,154]. En présence d'un gaz vecteur (NH_3, H_2) et d'un gaz carboné (CH_3, C_2H_4), les CNT vont croître sur un substrat préalablement modifié par un catalyseur métallique. Le diamètre des nanotubes est ainsi contrôlé par la taille du dépôt de métal et sa longueur par la quantité de gaz carboné fournie. Le catalyseur le plus couramment utilisé pour initier la croissance de nanotubes de carbone est l'or. Cette technique a été fortement améliorée depuis ses premières utilisations, notamment en utilisant des plasmas, et permet aujourd'hui la production de CNT possédant une longueur et une épaisseur contrôlées en plus d'être de très haute pureté. D'autres techniques permettent également une production industrielle des CNT, on trouve par exemple l'ablation laser de feuillets de graphite ou encore l'utilisation d'arc électrique, toujours sur du graphite.

Si les CNT ont connu un tel engouement, c'est que ce matériau présente des propriétés exceptionnelles dans plusieurs domaines. Au niveau tenue mécanique, les nanotubes possèdent un module de Young très élevé (valeur théorique de 1 TPa), ce qui en fait un matériau plus résistant que l'acier tout en étant très léger. Ils sont de bons conducteurs thermiques (jusqu'à 6000 $W.m^{-1}.K^{-1}$ contre 3000 $W.m^{-1}.K^{-1}$ pour du diamant)[155,156] et électriques avec une conductivité d'environ 1.10^5 $S.m^{-1}$ [157–159]. Enfin, les SWCNT sont intéressants de par le fait qu'ils puissent être considérés comme un matériau conducteur ou semi-conducteur selon l'angle d'enroulement de la feuille de graphène. Il est ainsi possible d'ajuster la composition des CNT afin d'obtenir le matériau qui correspond à l'utilisation que l'on souhaite en faire. Ce procédé reste cependant très complexe à mettre en œuvre. Concernant leur application, les nanotubes sont très utilisés dans le renforcement de matériau, notamment en les intégrant dans la conception de fibres ou encore pour donner des propriétés thermiques et électriques particulières à un matériau composite[160–162].

Il est également possible d'incorporer directement les CNT dans un matériau d'électrode. Habituellement, il est difficile de modifier des électrodes directement par des CNT de manière reproductible. En effet, les CNT sont très peu solubles dans la plupart des solvants utilisés traditionnellement. De ce fait, la technique la plus courante pour déposer des CNT à la surface d'une électrode se fait par dépôt puis séchage d'une goutte de solvant (le plus souvent la N-Méthyl-2-pyrrolidone ; NMP) contenant des nanotubes. Cependant, ce mode de dépôt implique un séchage non uniforme de la goutte de solvant, induisant donc un dépôt non homogène de CNT. De plus, il est difficile de contrôler l'épaisseur et l'état de surface du film

de nanotubes créé par utilisation de cette technique. C'est pourquoi plusieurs équipes ont directement incorporé les CNT dans le matériau d'électrode. On trouve ainsi des exemples de CNT incorporés dans des matériaux composites avec notamment du Polytétrafluoroéthylène (PTFE)[163] ou des huiles minérales[164]. Une autre technique consiste à faire croître directement les CNT à la surface de l'électrode[165]. Dans ces travaux, une approche originale pour la formation, et le dépôt à la surface d'électrode, de films de CNT reproductibles permettant également un contrôle de leur épaisseur sera présentée dans le chapitre II.A.

(ii) Fonctionnalisation des nanotubes

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

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone peut être classée en trois catégories mettant en jeu des interactions et des liaisons spécifiques. La première fait intervenir des agents chimiques agressifs et permet une fonctionnalisation covalente des CNT. La seconde utilisent les propriétés des nanotubes pour former des liaisons non-covalentes par interaction π-π principalement. Enfin la troisième recouvre l'utilisation de l'électrochimie comme agent de fonctionnalisation. Elle permet par exemple le recouvrement du CNT par un polymère. Ces différentes techniques de fonctionnalisation sont représentées au sein de la Figure 29 ci-dessous[166].

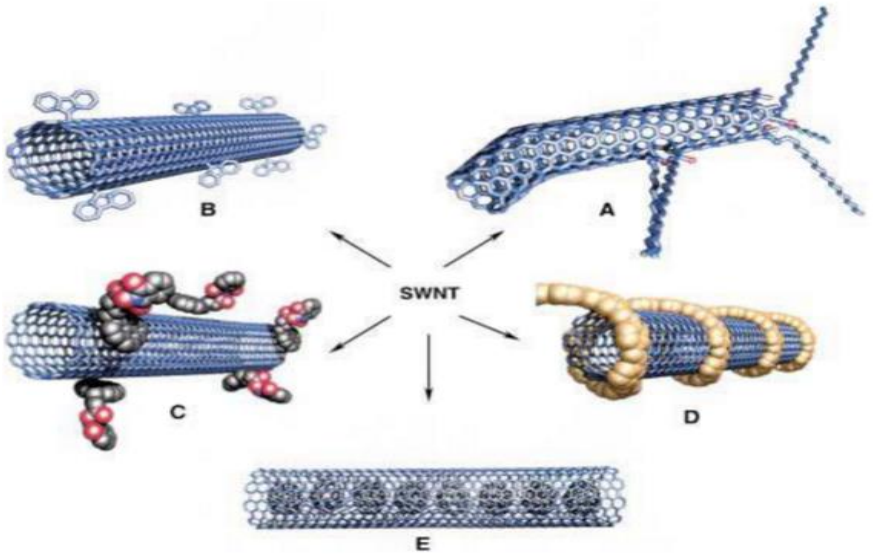


Figure 29: Exemple de fonctionnalisation des SWCNT avec A) la fonctionnalisation des défauts, B) la fonctionnalisation covalente, C) la fonctionnalisation non-covalente, D) la fonction par des polymères et E) la fonctionnalisation endoédrique. Reproduit de [166]

- Fonctionnalisation covalente :

Les CNT sont relativement peu réactifs chimiquement. Pour assurer une fonctionnalisation covalente de ceux-ci, il est nécessaire d'utiliser des espèces chimiques agressives qui vont conduire à la formation d'intermédiaires très réactifs par exemple un radical[167], un carbène[168], un nitrène[169], un diazonium[170] ou un ylure d'azométhine[171]. L'inconvénient de ce type de fonctionnalisation est qu'elle va entraîner une modification de la structure et des propriétés des nanotubes en créant des défauts dans l'arrangement hexagonal des carbones sp^2.

Bahr et al ont décrit en 2001 une voie de fonctionnalisation des nanotubes par utilisation d'un sel de diazonium[172]. Cette technique a été réutilisée de nombreuses fois depuis cette première approche. La réduction électrochimique du sel de diazonium va permettre la formation d'une espèce radicalaire. Cette molécule intermédiaire, hautement réactive, réagit ensuite avec le CNT et entraîne la fonctionnalisation covalente du nanotube. Comme on peut le voir sur la Figure 30, cette méthode permet d'introduire différentes fonctions terminales (groupement fonctionnel « R » substituable) et est donc très versatile.

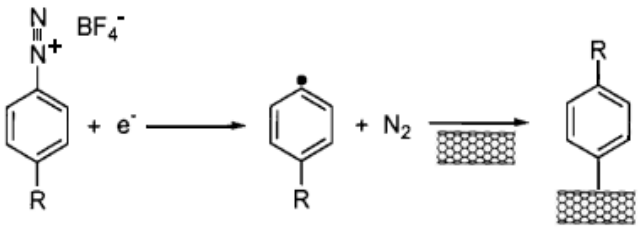


Figure 30: Fonctionnalisation des CNT par utilisation d'un sel de diazonium.

Une autre méthode, ayant été longuement décrite dans la littérature est l'utilisation de nitrène pour la fonctionnalisation des CNT. Holzinger et al décrivent ainsi l'addition de (R)-alkoxycarbonylnitrenes à la surface des nanotubes[173]. Cette fonctionnalisation donne non seulement accès à une grande variété de groupes fonctionnels attachés aux CNT mais améliorent aussi grandement la solubilité des nanotubes. De tels nanotubes de carbone fonctionnalisés impliquant des propriétés de solubilité améliorées peuvent être importants pour le développement de nouveaux matériaux tels que des polymères composites.

- Fonctionnalisation non-covalente :

Si les nanotubes de carbone sont considérés comme étant inerte chimiquement, il existe de nombreuses techniques dites « douce » permettant leur fonctionnalisation. La première utilise la nature même des CNT et l'arrangement hexagonal des carbones. En effet celui-ci permet de mettre à contribution des interactions non-covalentes impliquant les systèmes π. On peut notamment citer le cas des anilines[174], des amines,[146] ou encore des pyrènes[176]. L'adsorption de ces composés se faisant de manière non agressive, à l'inverse des fonctionnalisations covalentes présentées précédemment, les propriétés du nanotube ne s'en trouvent que très peu impactées.

En 2001, Chen et al. proposent une technique permettant d'immobiliser des molécules biologiques à la surface des CNT sans en modifier leur structure ou leur propriété[177]. Pour

cela, ils utilisent un dérivé du pyrène, l'acide 1-pyrenebutyrique N-hydroxysuccinimide ester. La base de cette molécule, constituée de plusieurs cycles aromatiques, porte de nombreuses liaisons π ce qui permet son adhésion à la surface des nanotubes. La fonction N-hydroxysuccinimide va, elle, servir à immobiliser la molécule biologique ciblée. Ce travail a montré que la liaison non-covalente entre le pyrène et la paroi du CNT était quasiment irréversible, assurant donc une bonne stabilité du système dans le temps.

En 2009, Zhao et Stoddart reprennent cette technique et la modifient pour réaliser un système hôte-invité par utilisation d'un pyrène porteur d'un groupement cyclodextrine[178]. Cette architecture a été utilisée pour la réalisation d'un biocapteur dédié à la détection de molécules organiques non fluorescentes, sur la base de leur reconnaissance moléculaire par la cyclodextrine.

L'utilisation des tensioactifs tels que le sodium dodécylsulfate (SDS), pour améliorer la solubilité des CNT notamment, est également une technique de fonctionnalisation non-covalente ayant été étudiée. Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles, elles sont composées de deux parties de polarités différentes. La partie hydrophobe du tensioactif va en solution spontanément se lier aux nanotubes par le biais d'interaction de type Van der Walls. La partie hydrophile va elle s'orienter de façon à être le plus en contact possible avec les molécules d'eau. L'arrangement de plusieurs molécules autour d'un CNT va ainsi former une micelle, permettant la solubilisation du nanotube (Figure 31)[179,180]. L'interaction entre le tensioactif et le CNT peut être renforcée par la composition de la tête hydrophobe. La présence de cycles aromatiques induit par exemple des interactions de type π-π et permet de stabiliser d'autant plus l'adsorption du tensioactifs.

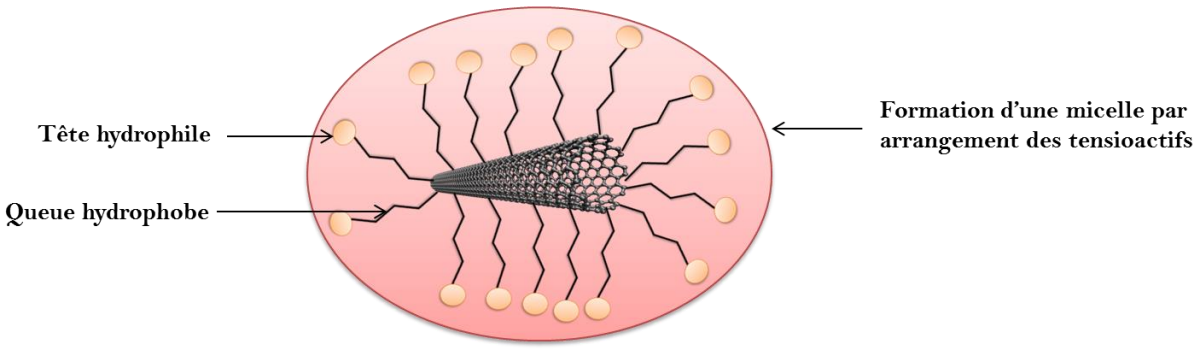


Figure 31: Principe de formation d'une micelle par utilisation de tensioactifs.

- Fonctionnalisation par des polymères :

L'électropolymérisation est une technique de fonctionnalisation des nanotubes présentant un intérêt majeur pour la réalisation de biocapteurs mais aussi pour de nombreuses autres applications comme la microélectronique (transistors) ou encore l'optoélectronique (diode). En effet, cette technique permet la réalisation de matériaux composites à base de polymères conducteurs et de nanotubes, offrant l'accès à de nouvelles propriétés combinant les particularités de chacun de ses composants.

Le polypyrrole est un polymère couramment utilisé pour la fonctionnalisation des CNT. Hugues et al. ont réalisé une étude pour déterminer les propriétés du film composite résultant de cette association[181]. Ils ont ainsi créé un matériau poreux en déposant, simultanément sur une électrode, les nanotubes et le polypyrrole. Le réseau poreux interconnecté formé par les CNT enrobés de polymère présente de très bonnes capacités de transfert de charge et une bonne capacité de stockage de l'énergie. De plus, le caractère poreux du matériau induit une large surface spécifique et assure une bonne diffusion de l'électrolyte. Ces résultats suggèrent que ce type de composite est très prometteur pour les dispositifs de stockage d'énergie tels que les condensateurs et les batteries.

Cette propriété a également été appliquée dans le domaine des biocapteurs. En 2004, Wang et Musameh mettent au point un biocapteur pour la détection du glucose utilisant eux aussi un composite de nanotubes et de polypyrrole[182]. La préparation de l'électrode se fait en une seule étape durant laquelle les CNT sont mis en solution en présence de glucose oxydase et du monomère. La polymérisation est ensuite réalisée dans l'eau en cyclant à 0,1 V/s entre 0,0 et 0,9 V pendant 10 scans. Ce capteur obtient une limite de détection de 2.10^{-4} $mol.L^{-1}$ avec un temps de réponse très court de 15s.

Les polymères peuvent aussi être utilisés pour améliorer la solubilité des nanotubes ou encore leur biocompatibilité sans avoir recourt à l'électropolymérisation. En effet, il est possible de simplement modifier les CNT en utilisant les affinités et interactions, présentées plus tôt au sein du chapitre sur les fonctionnalisations non-covalentes. Ces interactions permettent d'enrouler le polymère autour du nanotube sans en modifier la structure ou les propriétés. Liu et al ont développé un système reposant sur cette méthode et ont ainsi pu recouvrir des CNT d'un polymère de chitosan[183,184]. Le chitosan est un biopolymère présent dans la nature et largement utilisé dans la recherche. Une fois immobilisé autour du nanotube, il lui confère ainsi une meilleure solubilité mais aussi une bonne biocompatibilité qui peut s'avérer intéressante pour la réalisation de biocapteurs.

- La fonctionnalisation endoédrique :

Cette technique de fonctionnalisation exploite la géométrie du nanotube. En effet, elle consiste à insérer des molécules à l'intérieur de celui-ci, et utilise donc l'espace disponible au sein des parois du nanotube. Cette technique est cependant moins développée que celles citées précédemment car elle présente plusieurs contraintes limitant son usage. Tout d'abord, les molécules pouvant être insérées à l'intérieur du CNT sont limitées par la largeur du nanotube qui est de l'ordre de 1 à 2 nm pour un CNT monofeuillet. Enfin, il ne faut pas que la molécule que l'on souhaite intégrer au sein du nanotube s'adsorbe ou réagisse sur les parois de celui-ci.

Luzzi et al décrivent tout de même l'encapsulation d'une forme allongée de fullerène à l'intérieur d'un nanotube de carbone[185]. Cette architecture, jusqu'alors jamais observée, présente également une caractéristique intéressante puisque les C_{60} semblent pouvoir se déplacer à l'intérieur du nanotube sous l'effet d'un rayonnement. Ce système pourrait donc potentiellement être utilisé dans des édifices tels que les moteurs moléculaires ou les ordinateurs quantiques.

d) Les feuillets de graphène

(i) Structure et propriétés

Les propriétés du graphène furent démontrées pour la première fois en 2004 par Andre Geim, qui reçut le prix Nobel de physique pour ses travaux, c'est pourquoi son étude et son intégration dans des systèmes innovants furent plus tardives que celle des CNT. Le graphène est constitué d'un simple feuillet d'atomes de carbones arrangés selon un motif hexagonal en deux dimensions (Figure 32). L'empilement de plusieurs feuillets de graphène conduit à la formation de la structure historique du carbone, le graphite.

Comme pour les nanotubes, le graphène possède de nombreuses propriétés intéressantes pour la recherche. En effet, c'est un matériau mince et très léger, étant constitué d'une monocouche d'atomes de carbone. Il est également un bon conducteur thermique et électrique, à l'image des CNT. Il possède une excellente résistance mécanique (40 GPa/m²) tout en conservant une bonne élasticité. Il peut être étiré jusqu'à environ 20 à 25 fois sa longueur d'origine sans se briser. Enfin, il est imperméable aux gaz, même les plus légers, tels que l'hydrogène et l'hélium[186,187].

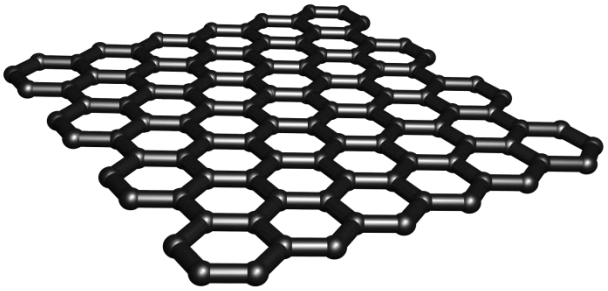


Figure 32: Représentation schématique d'une feuille de graphène.

De nos jours, ce matériau peut être produit selon différentes voies de synthèse. La méthode historique consiste à arracher directement les feuillets de graphène à la structure graphitique à l'aide d'un ruban adhésif. Cette méthode, bien que facile à mettre en œuvre et très peu coûteuse, ne permet cependant pas d'assurer la qualité du graphène obtenu sans en augmenter fortement le prix et ne permet donc pas une production industrielle. C'est pourquoi de nombreuses autres techniques se sont développées au cours des dernières années. On trouve entre autre la synthèse de graphène par épitaxie à partir de carbure de silicium, par dépôt chimique en phase vapeur (CVD) ou encore par exfoliation du graphite par voie chimique. Chacune de ces techniques possède ses avantages et ses inconvénients, la Figure 33 propose une vue d'ensemble en comparant ces différentes techniques d'un point de vue du coût et de la qualité du graphène obtenu[188].

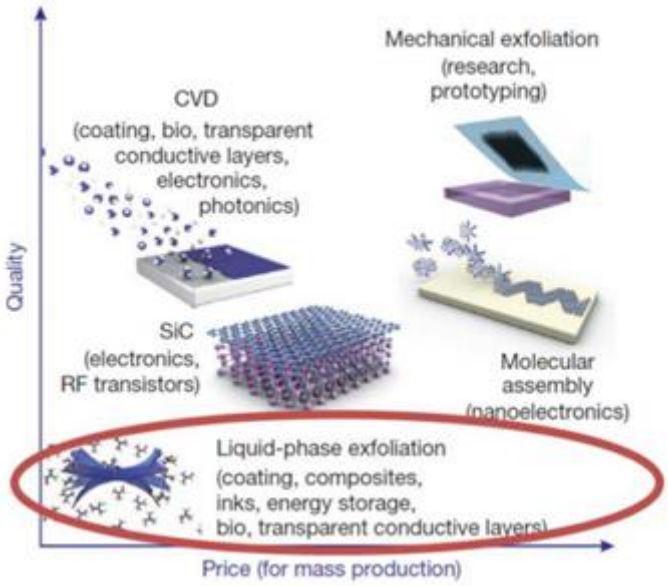


Figure 33: Evolution du coût de production en fonction de la qualité du graphène souhaitée[188].

Comme il est possible de le voir sur ce graphique, la synthèse en phase liquide permet une production de masse adaptable à l'échelle industrielle tout en conservant une qualité suffisante pour les applications envisagées telles que le stockage de l'énergie ou les matériaux composites. Cette voie de synthèse chimique conduit à l'obtention non pas de la structure de graphène présentée sur la Figure 32, mais à celle d'un oxyde de graphène (GO). L'utilisation de forts agents oxydants lors de la synthèse va en effet introduire des fonctions oxygénées au sein de la structure hexagonale du graphène. Cette modification structurale a diverses conséquences sur les propriétés du matériau. Si celui-ci gagne en solubilité (plus hydrophile) et en réactivité chimique, il perd cependant en conductivité et en tenu mécanique. L'utilisation d'agents réducteurs post-synthèse permet cependant de remédier en partie à ces changements. En effet, la réduction de l'oxyde de graphène permet de restaurer la conjugaison des cycles au sein de la structure des plans de graphène et donc de retrouver une partie des propriétés qui font l'intérêt du matériau, à savoir sa conductivité électronique en plus de ses propriétés mécaniques. On obtient alors l'oxyde de graphène réduit (rGO).

Il est également possible de procéder à une exfoliation mécanique en milieu organique, plus particulièrement dans le N, N-diméthylformamide (DMF), ce qui permet d'éviter d'oxyder le matériau et donc d'obtenir du GO. Cette technique est donc particulièrement intéressante puisqu'elle permet l'obtention d'un matériau de bonne qualité et est utilisable à grande échelle[189].

(ii) Fonctionnalisation

La fonctionnalisation du graphène se fait aussi bien en partant du GO comme matériau de base que du rGO et il existe aujourd'hui de nombreuses techniques de greffage décrites dans la littérature. Par exemple, les silicates sont couramment utilisés comme agents pontants de par l'affinité du silicium pour les groupes oxygénés[190,191]. Des réactions d'hétérocyclisation permettent également de fonctionnaliser l'oxyde de graphène[192].

Comme pour le GO, de nombreuses méthodes de greffage sont utilisées pour la fonctionnalisation du graphène réduit. On trouve ainsi des greffages basés sur l'utilisation d'interactions non-covalentes, comme décrites précédemment pour la fonctionnalisation des CNT, telles que le π-stacking et l'utilisation de polymère ou des fonctionnalisations covalentes telles que les réactions de chimie « click » avec les réactions de cycloaddition ou encore par réaction des nitrènes[193–195]. Enfin, l'utilisation des sels de diazonium est largement répandue pour la modification du graphène[196,197].

(iii) Intégration dans des biocapteurs

Comme pour les nanotubes de carbone, les premières intégrations de feuillets de graphène dans des dispositifs pour la détection de molécules biologiques se sont faites à l'aide de systèmes modèles, tels que les capteurs à glucose, avant de se développer et d'être utilisés dans des détections de molécules plus complexes[198].

En 2010, Liu et al proposent ainsi un biocapteur ampérométrique pour la détection du glucose se basant sur l'utilisation de GO pour immobiliser la glucose oxydase[199]. Les fonctions acides carboxyliques présentes à la surface du feuillet de graphène permettent en effet le greffage covalent de l'enzyme par couplage peptidique. Si la limite de détection atteinte par ce système reste relativement faible en comparaison d'autres dispositifs (22.10^{-3} mol.L^{-1}), l'intérêt de ce travail réside également dans le fait que le GO présente une bonne biocompatibilité, impliquant une possible utilisation de ce type de système dans le domaine du biomédical.

Le graphène peut également être utilisé dans des dispositifs de détection par photoluminescence, comme décrit dans le travail de Jung et al[200]. L'oxyde de graphène est ici immobilisé sur une plaque de verre dont la surface a été modifiée par des fonctions amines, l'adhésion se faisant par des interactions électrostatiques entre la surface du graphène chargée négativement et celle du verre chargée positivement grâce à son traitement de surface. Les biorécepteurs, ici des anticorps contre le rotavirus, sont ensuite immobilisés par amidation, permettant la reconnaissance spécifique de la molécule cible. La détection se fait par transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET) entre le GO et des nanoparticules d'or introduites après reconnaissance entre l'analyte et le biorécepteur (Figure 34). Le GO présente en effet de bonnes propriétés optiques avec un rendement quantique de 70,1% et une large bande d'émission à 547 nm. Or, cette émission perd en intensité lorsque les particules d'or se trouvent à proximité des feuillets de graphène (quenching), permettant la détection par fluorescence du rotavirus jusqu'à 10^3 pfu/mL (pfu = plaque-forming unit).

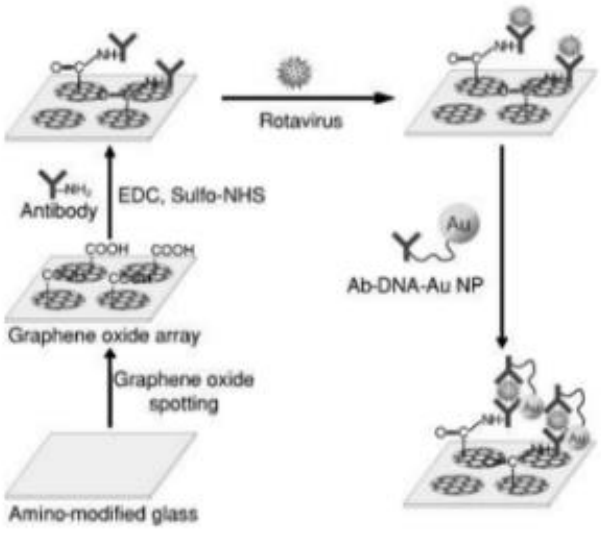


Figure 34: Représentation schématique de la structure du biocapteur pour la détection du rotavirus. Reproduit de [200].

Enfin, le graphène est également utilisé en SPR pour augmenter la sensibilité du système[201]. En effet, l'addition d'une ou plusieurs couches de graphène à la surface du dépôt métallique d'or permet tout d'abord d'adsorber une plus grande quantité de biorécepteurs via les cycles aromatiques de carbone (interaction π-π), mais aussi d'améliorer les propriétés optiques du matériau en modifiant l'indice de réfraction. Ces deux propriétés augmentent ainsi la sensibilité du biocapteur selon la relation suivante : (1 + 0,025 L) x γ (où L correspond à l'épaisseur de la couche de graphène et γ est le facteur par lequel le nombre de biomolécules immobilisées est augmenté). Ainsi, Wu et al ont montré que si le graphène permet d'absorber 4 fois plus de molécules biologiques (γ=4), la sensibilité du système est augmentée de 500% par rapport à un dispositif sans graphène[201].

3. Les dichalcogénures de métaux de transition

a) Structure et propriétés

Depuis quelques années, plusieurs équipes tentent de trouver une alternative aux matériaux carbonés et notamment aux nanotubes de carbone. En effet, bien que ces derniers présentent de nombreuses propriétés avantageuses et soient utilisés dans une grande variété d'applications, ils restent peu représentés pour ce qui est des applications in-vivo ou dans le domaine du biomédical de par leur toxicité.

Des études théoriques ont montré qu'une autre famille de semi-conducteurs pourrait être amenée à remplacer les CNT dans les années à venir, même si cette affirmation reste encore au stade d'hypothèse. Il s'agit de la famille des dichalcogénures de métaux de transition (TMD). Elle comprend notamment des composés tels que le disulfure de molybdène ou le disulfure de tungstène[202]. La formule générale d'un dichalcogénure de métal de transition peut être écrite sous la forme générale MX_2, où M représente un métal de transition et X un chalcogène (Souffre, sélénium, tellure…).

Les TMD sont des matériaux stratifiés de structure similaire au graphite. Une monocouche est constituée d'un arrangement hexagonal des atomes du métal de transition auxquels sont liés de manière covalente les atomes de chalcogène, formant ainsi une structure de type « sandwich » (voir Figure 35). L'arrangement entre les différentes monocouches est régi par des interactions de type van der Waals. Les TMD sont capables d'offrir une large gamme de propriétés. A l'instar des nanomatériaux carbonés, ils présentent une grande surface spécifique, des propriétés optiques et électriques uniques, en plus de leur nature de semi-conducteur. De plus, les premiers rapports de toxicité concernant ce type de composés montrent qu'ils sont, à l'heure actuelle, bien moins toxiques que leurs équivalents carbonés[203]. Enfin, la bande interdite (bandgap en anglais) de ces matériaux est ajustable en fonction de la géométrie et de la constitution de ceux-ci, ce qui les rend particulièrement intéressant pour des applications telles que la réalisation de transistors, de photodétecteurs ou encore de dispositifs électroluminescents[204–207].

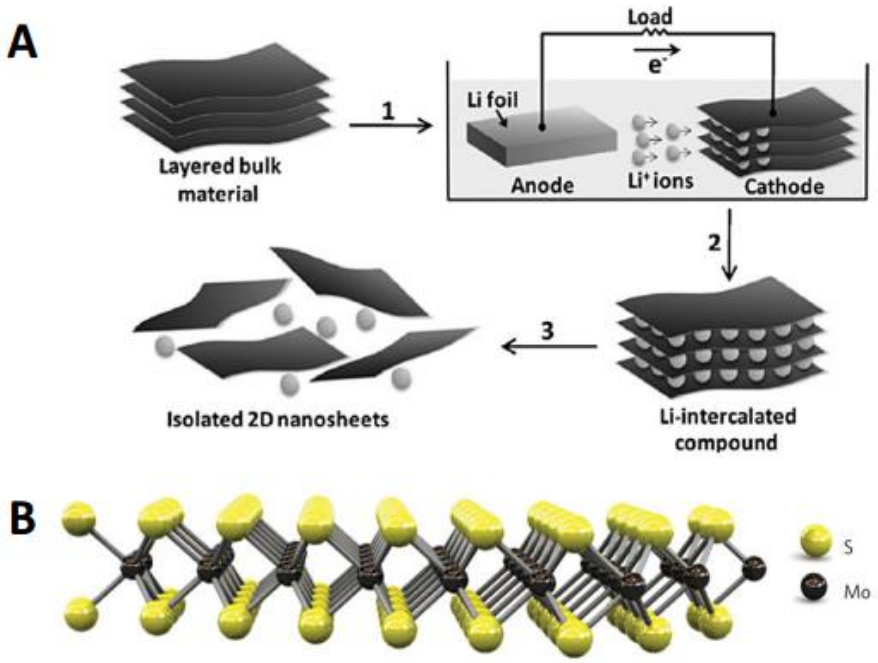


Figure 35: A) Principe d'obtention d'une monocouche de dichalcogénure de métal de transition par intercalation d'ions lithium; B) Représentation schématique de la structure d'une monocouche de dichalcogénure de métal de transition. Reproduit de [203]

Il existe plusieurs méthodes de synthèses pour ce type de composé. A l'image du graphène, les monocouches de TMD peuvent être isolées par clivage mécanique ou par des méthodes d'intercalations en partant du matériau massif, celui-ci possédant une structure de type graphitique [208]. Si ces techniques assurent une excellente qualité de la monocouche synthétisée, elles sont cependant couteuses pour une production à large échelle. C'est pourquoi il existe une variété de méthodes de synthèse basées sur le dépôt chimique en phase gaz (CVD) ou encore sur l'exfoliation en phase liquide[209,210]. Si les TMD sont le plus souvent présents sous forme de feuillets, il est également possible de les trouver sous la forme de nanotubes[211].

Les TMD ont ainsi initialement trouvé des applications dans la production et le stockage d'énergie, notamment pour la réalisation de batteries lithium-ion et de supercondensateurs, et dans les dispositifs opto-électroniques[204,206,212]. Cependant, un intérêt croissant se développe quant à leur utilisation pour la réalisation de biocapteurs, en profitant de la grande surface, de la fluorescence, de la conductivité électrique et du transfert rapide d'électrons hétérogène qu'ils offrent[213].

b) Fonctionnalisation

Comme pour les matériaux carbonés, les TMD nécessitent d'être fonctionnalisés pour pouvoir entrer dans la conception d'un biocapteur. Si les techniques classiques, présentées auparavant concernant la fonctionnalisation du graphène ou des nanotubes, peuvent être appliquées à ce type de matériaux, il faut cependant prendre en compte les modifications qu'elles peuvent induire sur les propriétés des TMD. En effet, la modification de surface de ces matériaux peut entraîner le déplacement de charges et à terme conduire à la formation de dipôles de surface qui peuvent provoquer des effets dramatiques sur la structure électronique du semi-conducteur.

Il existe déjà de nombreuses études portant sur la fonctionnalisation de la surface des composés de formules MoS_2 via des méthodes de fonctionnalisation de surface standard. Une de ces méthodes est la physisorption (ou adsorption). En effet, les composés MoS_2 offrent une très grande surface spécifique présentant une forte affinité pour les interactions de type van der Waals et favorisent donc la physisorption. Cependant, ce type d'interactions est naturellement peu sélectif. Il faut donc s'assurer de la composition du milieu avant de procéder à la fonctionnalisation afin d'absorber sur la surface seulement les molécules ciblées. Le dépôt physique en phase vapeur (PVD) permet notamment de déposer sélectivement une monocouche de molécules à la surface d'un matériau. Cette monocouche peut alors former la base d'un édifice moléculaire qui aboutit à une surface de sélectivité élevée pour une cible spécifique d'analyse biologique[214].

Les réactions mettant en jeu des méthodes à base de silane et de thiol, qui sont communément appliquées pour modifier les surfaces d'oxyde et de chalcogénure, sont également de bonnes alternatives pour la fonctionnalisation de TMD. De telles méthodes dépendent fortement de la formation de groupements hydroxyles (-OH) ou thiol (-SH) à la surface du matériau. Or, ces groupements résultent de la formation de défauts au sein de la structure de formule MX_2 du TMD. Ainsi, en modifiant les conditions de synthèse du matériau, il est possible d'obtenir un taux de défauts plus important, permettant par la suite la fonctionnalisation de ceux-ci[215,216].

Enfin, d'autres méthodes alternatives peuvent également être utilisées. Les liaisons disulfures sous la forme R-S-S-C peuvent être établies par couplage de deux groupes thiol pour immobiliser des entités organiques telles que diverses protéines. Les composés acides contenant des groupes -SOH peuvent également se lier à des protéines et des hydrates de carbone et agir comme catalyseurs ou comme des intermédiaires pour des interactions biologiques[217].

Wang et al ont par exemple réussi à immobiliser un peptide, la thionine, à la surface de TMD en mélangeant simplement des feuillets de MoS_2 et un sel d'acétate de thionine dans du DMF[218]. La Figure 36 montre que la thionine se greffe préférentiellement là où le nombre de défauts est le plus important, c'est-à-dire sur les bords de la structure. Une fois la thionine greffée, cette base a ensuite été utilisée pour immobiliser un brin d'ADN et ainsi permettre la réalisation d'un biocapteur pour la détection d'ADN.

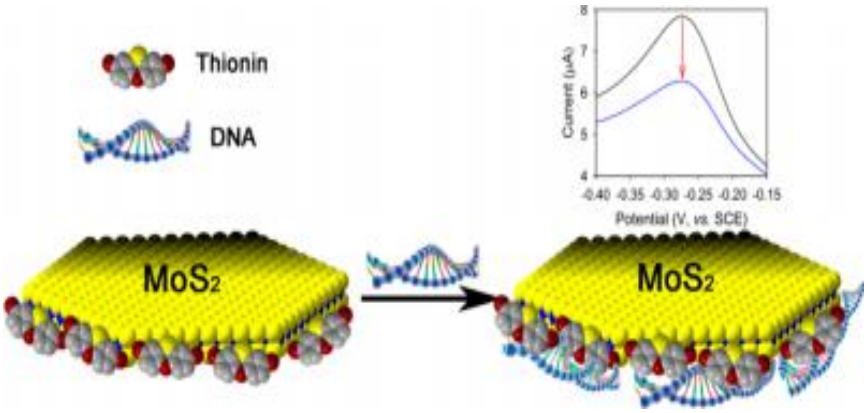


Figure 36: Conception d'un biocapteur à ADN par fonctionnalisation d'un feuillet de MoS2. Reproduit de [218]

c) Applications

Bien que l'incorporation des TMD dans la réalisation de biocapteurs soit relativement récente, plusieurs travaux sont déjà décrits dans la littérature et présagent d'un fort engouement dans les années à venir pour ce type de matériaux.

Zhang et al ont ainsi réalisé un biocapteur pour la détection d'ADN[219]. Ce capteur utilise les propriétés optiques des TMD, et plus particulièrement l'aptitude des TMD à inhiber la fluorescence des brins d'ADN marqués par des fluorophores. Plusieurs espèces ont été testées dans cette étude telles que MoS_2, TiS_2 ou encore TaS_2 afin de réaliser un biocapteur fluorimétrique. Le biocapteur le plus performant (TaS_2) a atteint une limite de détection de 50 $pmol.L^{-1}$, contre 4 $nmol.L^{-1}$ pour une détection basée sur l'utilisation de CNT comme matrice d'immobilisation de l'ADN.

Chao et al. ont pour leur part mis au point un biocapteur pour la détection de NO et H_2O_2[220]. Pour cela, ils ont développé un film composite constitué d'un feuillet de MoS_2 et de nanoparticules d'or. Ce film a ensuite servi à immobiliser l'hémoglobine afin d'assurer la bioreconnaissance vis-à-vis des substrats désirés. Ce type de composite a un double intérêt puisqu'il permet d'une part d'immobiliser la protéine en conservant son activité biologique et l'intégrité de sa structure, mais facilite également le transfert électronique et assure une bonne biocompatibilité. En condition idéale, ce capteur ampérométrique offre une bonne limite de détection de l'ordre de 4 et 5.10^{-6} $mol.L^{-1}$ pour la détection respectivement de H_2O_2 et NO avec une linéarité comprise entre 10.10^{-6} $mol.L^{-1}$ et 300.10^{-6} $mol.L^{-1}$ pour le premier et 10.10^{-6} $mol.L^{-1}$ et 1100.10^{-6} $mol.L^{-1}$ pour le second.

Zheng et al ont eux utilisés les TMD pour des travaux théoriques s'appuyant sur la détection par SPR[221]. Ils ont ainsi montré que l'incorporation de feuillets de MoS_2, couplé à un feuillet de graphène (Figure 37), permet d'augmenter la sensibilité du système d'environ 500 fois par rapport à une détection SPR classique utilisant simplement du graphène. Le graphène est ici utilisé pour assurer l'immobilisation de la biomolécule d'intérêt, alors que la monocouche de MoS_2, grâce à son meilleur coefficient d'absorption de la lumière, permet d'augmenter la sensibilité. Ces travaux ont également montré que le nombre de monocouche de TMD ainsi que l'épaisseur du film d'or peuvent être modifiés selon la sensibilité et la précision recherchées.

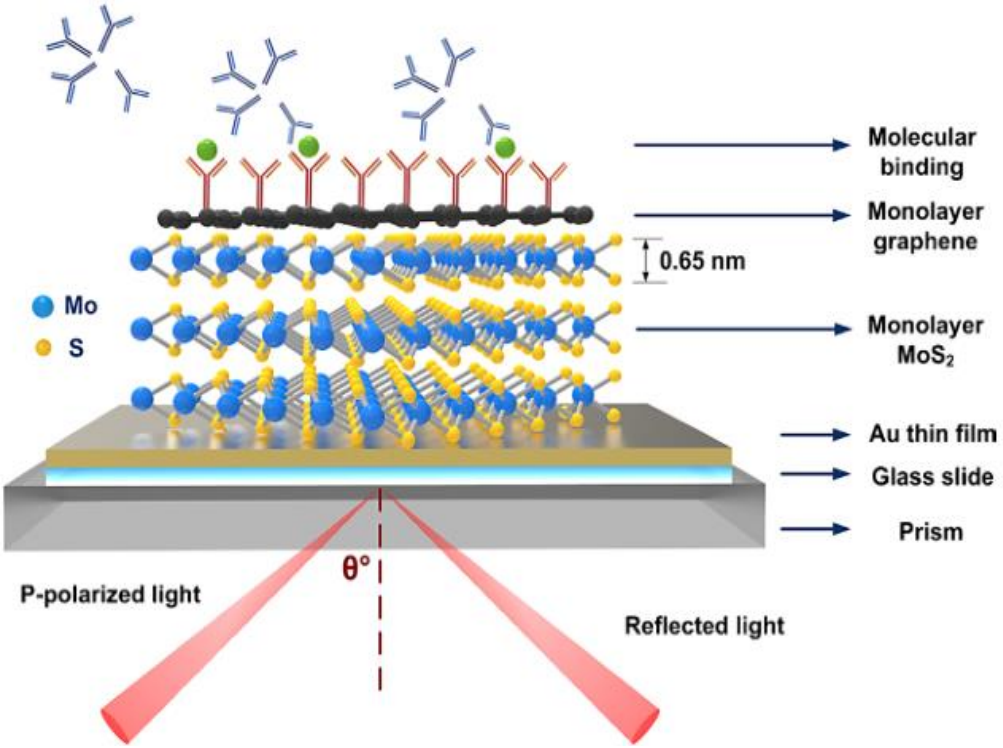


Figure 37: Représentation schématique de la structure du biocapteur. Reproduit de [221].

4. Techniques de caractérisations structurales des nanomatériaux

L'incorporation de nanomatériaux dans la conception de biocapteurs implique l'utilisation de techniques de caractérisations spécifiques à ces derniers. En effet, de par leurs dimensions, certaines techniques conventionnelles n'apportent que peu d'informations une fois appliquée à des objets de taille nanométrique. Ceci s'explique par le fait que la résolution de l'appareil peut être supérieure à la taille de l'objet, empêchant ainsi l'observation et donc la caractérisation de ce dernier à l'aide de ces techniques.

Ce chapitre présente ainsi de manière sommaire quelques-unes des techniques les plus couramment utilisées pour caractériser et imager des structures possédant des dimensions nanométriques.

a) Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM) appartient à la famille des microscopes à sonde locale de balayage (SPM). Ce type de microscope utilise une pointe très fine, pouvant être simplement constituée d'une molécule, pour imager et cartographier la surface d'un matériau. Les SPM sont ainsi conçus pour mesurer les propriétés locales d'un matériau, telles que la hauteur, la rugosité ou encore le magnétisme de celui-ci à l'aide d'une sonde. Pour acquérir une image, les SPM scannent donc une petite zone de l'échantillon, mesurant simultanément les différentes propriétés locale.

Le principe de l'AFM repose sur la mesure des interactions entre une pointe sonde et la surface d'un échantillon. Ces interactions peuvent être de différentes natures avec par exemple les forces de types Van der Walls, les forces de frictions ou encore les forces électromagnétiques. La pointe sonde est située à l'extrémité d'un bras de levier (cantilever) flexible, généralement fait de silicium. C'est la déflexion de ce bras de levier, lorsque la pointe va s'approcher de la surface et être repoussée sous l'action des différentes forces citées, qui va permettre la détection et l'analyse de celles-ci. Pour mesurer ces déflexions, l'AFM utilise un faisceau laser qui va venir frapper le levier et être réfléchi par ce dernier (Figure 40). Le rayon réfléchi est ensuite détecté à l'aide d'un photo-détecteur sensible à la position du faisceau. L'AFM permet ainsi de mesurer les déviations verticales et latérales et donc d'imager la surface de l'échantillon à caractériser[222–224].

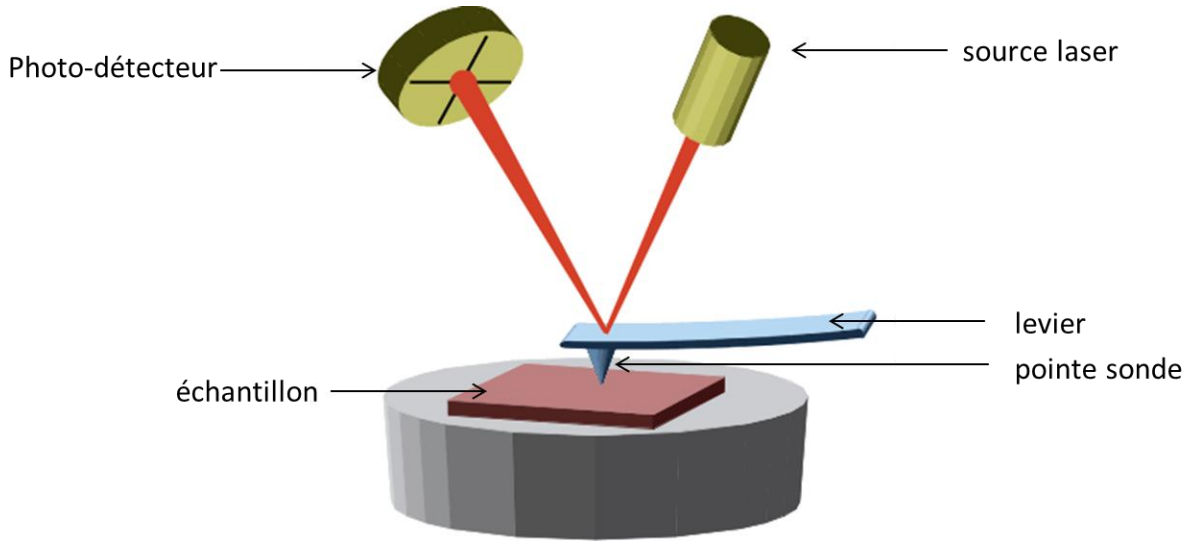


Figure 38: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un AFM.

Différents modes d'utilisation sont disponibles à l'aide de ce type d'appareil. Dans ces travaux, le mode contact a été utilisé pour réaliser une étude de l'état de surface et le mode friction pour déterminer l'épaisseur des films. Le fonctionnement de ses deux modes sera détaillé plus longuement au sein du chapitre II.A.2.b).

b) Microscopie électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB) permet l'obtention d'images en trois dimensions de la surface d'un échantillon avec une résolution pouvant atteindre quelques nanomètres.

Pour cela, le MEB met à contribution un faisceau électronique généralement produit par l'échauffement d'un filament de tungstène. Ce premier faisceau va ensuite être focalisé et condensé à l'aide d'une colonne électronique, constituée de plusieurs bobines électromagnétiques, afin d'obtenir un faisceau très fin (quelques nanomètres) et parfaitement défini. Enfin, ce faisceau électronique est utilisé pour imager la surface du matériau à analyser en balayant point par point et ligne après ligne la surface de l'objet. En entrant en contact avec le matériau, le faisceau d'électrons va générer différents types de particules par interaction avec les atomes présents en surface de l'échantillon[225,226].

Le premier type de particules résulte de l'interaction élastique entre le faisceau et le matériau, il s'agit des électrons rétrodiffusés. Ces électrons sont donc directement issus du faisceau d'électrons initial. En effet, lorsqu'ils s'approchent de la surface du matériau, la trajectoire de certains électrons incidents peut être modifiée sans perte notable d'énergie. Ils ressortent ainsi de la cible avec une énergie voisine de celle qu'ils possédaient initialement. De plus, le nombre d'électrons déviés augmente avec le numéro atomique (Z) de l'atome ciblé. Ainsi, une zone cible riche en élément lourd apparaîtra plus claire qu'une zone contenant un élément léger. L'image fournit donc des informations qualitatives sur la composition chimique de la surface de l'échantillon.

Le second type de particules est lui engendré par l'interaction inélastique du faisceau incident avec la surface de l'échantillon. Dans ce cas, l'électron incident va transférer une partie de son énergie à l'atome qu'il va rencontrer. Suite à cette perte d'énergie, l'électron incident va voir sa trajectoire être modifiée, il s'agit alors d'un électron secondaire. Du fait de leur faible énergie, ces électrons ne peuvent sortir de l'objet que s'ils sont produits en surface de l'échantillon. A l'aide d'un détecteur polarisé positivement, il est tout de même possible d'attirer un grand nombre d'électrons. Concernant l'image obtenue à l'aide de ces particules, celle-ci fournie des informations très précises sur la topographie de surface de l'échantillon. En effet, les électrons secondaires étant émis à une faible profondeur, ils sont très sensibles à la variation de surface du matériau.

Le dernier type de particules provient de l'absorption de l'énergie de l'électron incident par un atome. Cet atome va se trouver dans un état excité suite à cette interaction et peut alors engendrer un électron de faible énergie. Cette émission conduit au final à l'ionisation de l'atome. Il se trouve donc dans un état instable ayant une énergie supérieure à celle de l'état fondamental. L'atome peut alors se désexciter par émission de rayons X provenant des électrons des différentes couches (spectre de raies).

Or ces raies permettent de remonter directement à la nature de l'élément chimique à l'origine du rayonnement puisque chaque émission correspond à une transition électronique entre

niveaux de cœur de l'atome. Il est donc possible de procéder à une analyse chimique élémentaire de la surface d'un échantillon à l'aide de cette méthode.

c) Microscopie électronique en transmission

A l'image du MEB, le microscope électronique à transmission (MET) utilise lui aussi un faisceau d'électrons, le plus souvent émis par un canon à électron (filament de tungstène). Afin d'assurer une bonne résolution, des lentilles électromagnétiques sont également utilisées pour focaliser le faisceau.

Cependant, contrairement au MEB, l'image observée au MET n'est pas produite par l'exploitation d'électrons réfractés mais par celle des électrons ayant traversés le matériau à analyser. Si l'échantillon est assez mince et permet le passage du faisceau, trois types d'électrons peuvent être obtenus (en plus des particules déjà présentes dans le cas du MEB) : les électrons transmis, les électrons diffusés élastiquement et les électrons diffusés inélastiquement (Figure 39)[227–229].

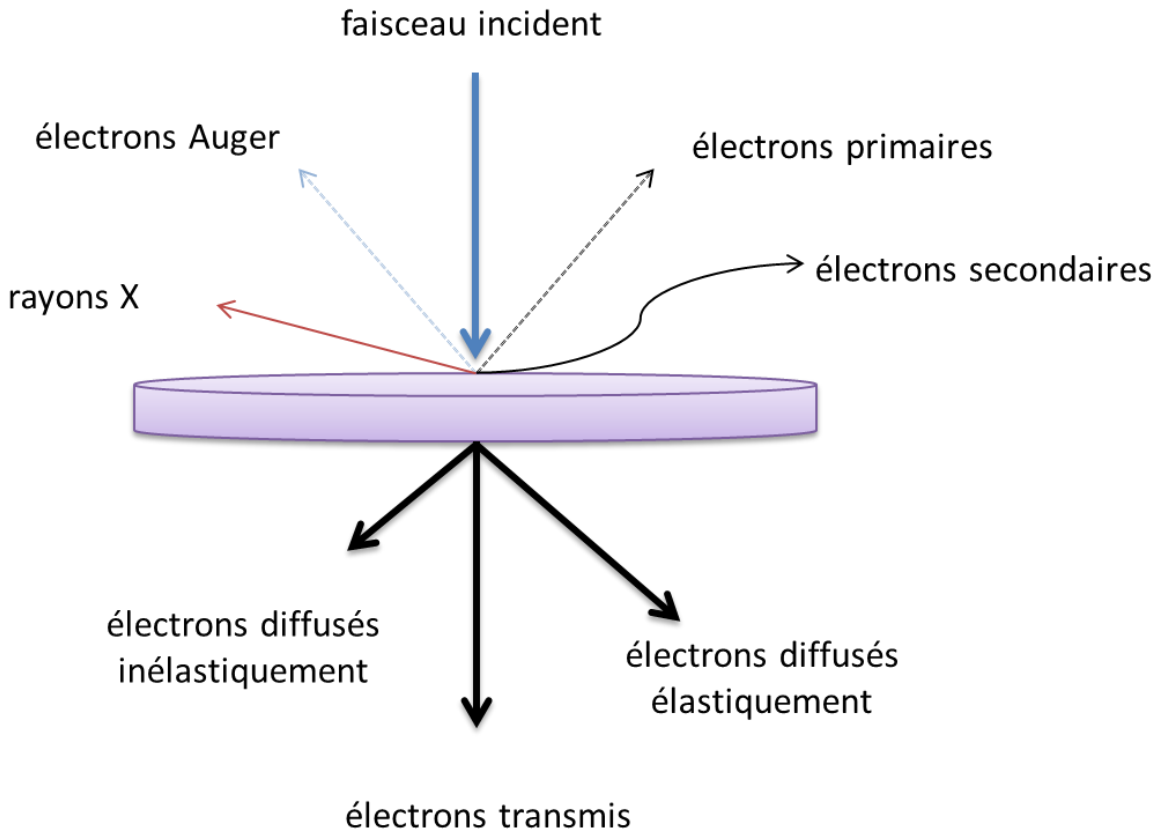


Figure 39: Représentation schématique des différentes particules émises lors de l'utilisation d'un microscope électronique.

Le MET utilise lui les électrons transmis, d'où le terme microscope électronique en transmission. Différents modes d'utilisation sont disponibles à l'aide de cet appareil : le mode image, le mode diffraction et la haute résolution.

En mode image, les électrons traversent l'échantillon et sont directement recueillis à l'aide d'un détecteur placé dans le plan image. La quantité d'électrons parvenant à traverser l'échantillon est directement lié à la nature du matériau. En effet, plus celui-ci sera épais ou dense, plus les électrons seront absorbés, créant donc des contrastes sur l'image obtenue. Ce type de mode d'utilisation permet donc d'observer l'organisation et la structure interne de l'échantillon. Il est beaucoup utilisé en biologie pour observer des cellules puisqu'il permet entre autres de situer le noyau d'une cellule, observer la présence de ribosomes etc.

Le mode diffraction est basé lui sur le comportement ondulatoire des électrons. Lorsqu'un électron va entrer en contact avec un cristal, l'onde va être déviée par celui-ci. En analysant plusieurs de ces ondes diffractées, il est possible d'obtenir un cliché de diffraction de l'échantillon. Or cette diffraction dépend de la configuration des atomes constituants le cristal et également sa nature. L'image obtenue permet donc de déterminer l'organisation des atomes, l'orientation des cristaux…

Enfin, le mode haute résolution fait pour sa part interférer un faisceau transmis avec un faisceau diffracté. L'image obtenue ainsi fait apparaître des points correspondants à la position des atomes. Il s'agit ainsi d'une cartographie des atomes. Ce mode est le plus souvent utilisé pour déterminer l'organisation cristalline d'un échantillon ainsi que les défauts qui s'y trouvent.

d) Spectroscopie Raman

Le terme spectroscopie optique représente l'étude de l'interaction d'un rayonnement électromagnétique avec la matière. Il existe donc différentes méthodes spectroscopiques selon qu'elles soient basées sur des phénomènes d'émission, d'absorption, de fluorescence ou encore de diffusion. La spectroscopie Raman entre dans cette dernière catégorie. En effet, comme son nom l'indique, elle est basée sur l'étude de l'effet Raman. Or, cet effet traduit la variation de fréquence que peut subir un rayonnement lorsque celui-ci traverse un milieu. L'effet Raman est ainsi basé sur la diffusion inélastique du rayonnement incident due à son interaction avec des molécules et permet de détecter les vibrations moléculaires.

Pour cela, l'échantillon est irradié à l'aide d'une lumière monochromatique de fréquence connue (ν_0), le plus souvent un laser. L'analyse se fait par la suite par observation de la lumière dispersée au contact de l'échantillon. En effet, sous l'impulsion du rayonnement électromagnétique, une partie de cette radiation va être réfléchie ou absorbée par le matériau, alors qu'une autre fraction, bien plus faible quantitativement, va être diffusée dans toutes les directions de l'espace. Lorsque la fréquence des photons diffusés est la même que celle de la lumière incidente, le processus est élastique et est appelé diffusion Rayleigh. Cependant, pour certains photons diffusés, (environ 1/10000) la fréquence va varier et on obtient une nouvelle fréquence ν_d. On parle alors de diffusion Raman Stokes ou de diffusion Raman anti-Stokes selon si celle-ci diminue ou augmente.

- Diffusion Raman Stokes : $\nu_d = \nu_0 - \nu_v$
- Diffusion Raman anti-Stokes : $\nu_d = \nu_0 + \nu_v$

Les écarts de fréquences ν_v correspondent aux fréquences de vibration actives en Raman du matériau étudié. Le spectre Raman obtenu permet ainsi d'obtenir différentes informations puisque chaque bande est caractérisée par sa position dans le spectre, reliée à la fréquence d'un mode de vibration, son intensité, liée au nombre de molécules diffusantes, ou encore sa polarisation. En pratique, on déduit de la fréquence de rayonnement, le nombre d'ondes ($\bar{\nu}$ en cm^{-1}) de celle-ci selon la relation suivante :

- $\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$ avec C : vitesse de la lumière et λ la longueur d'onde du rayonnement.

La spectroscopie Raman est donc utilisée pour observer la structure et la pureté d'un matériau par analyse de l'intensité et de la position de ces différentes bandes [230,231].

Conclusion

Nous avons traité dans cette partie des différents nanomatériaux d'intérêt pouvant apporter un plus dans la conception de biocapteurs. Si la dimension nanométrique apporte d'elle-même de nouvelles propriétés, nous avons également montré que la nature chimique et la structure du matériau avaient un rôle important selon le type de biocapteurs recherchés et selon l'application visée.

Ainsi si les nanomatériaux carbonés, en particulier les CNT et le graphène, présentent les propriétés intrinsèques les plus intéressantes, nous avons pu voir que les dichalcogénures de métaux de transition sont plus avantageux en termes de biocompatibilité et sont encore peu étudiés ou encore que les QD sont un matériau tout à fait indiqué pour des applications dans le domaine de l'optique.

Enfin, nous avons présenté les différentes techniques couramment utilisées pour caractériser les matériaux à l'échelle nanométrique.

Chapitre II :

Conception d'électrodes nanostructurées

II. CONCEPTION D'ELECTRODES NANOSTRUCTUREES 65

A. Conception et caractérisation d'un film de CNTs 68

1. Méthode de réalisation du film de CNTs 68

a) Dispersion des nanotubes de carbone 68

b) Filtration et transfert 69

2. Caractérisation structurale 70

a) Caractérisation par microscopie laser 70

b) Caractérisation par microscopie à force atomique 74

c) Caractérisation par microscopie électronique à balayage 77

d) Caractérisation par spectroscopie Raman 78

e) Détermination de la conductivité 80

3. Caractérisation électrochimique 83

a) Détermination de la sonde redox 83

b) Réponse électrochimique 86

B. Conception et caractérisation d'un film de nanobâtonnets de WS_2 91

1. Méthode de réalisation de films de nanobâtonnets de WS_2 92

2. Caractérisation structurale 93

a) Caractérisation par microscopie électronique à balayage 93

b) Caractérisation par microscopie laser 96

c) Caractérisation par spectroscopie Raman 98

d) Mesure de conductivité 99

3. Caractérisation électrochimique 99

a) Caractérisation en milieu organique 100

b) Caractérisation en milieu aqueux 103

c) Caractérisation en présence de sonde électrochimiques et en présence de cibles d'intérêt 104

L'état de surface et l'architecture moléculaire permettant l'immobilisation de la biomolécule d'intérêt jouent un rôle clé dans l'élaboration de biocapteurs. C'est pourquoi une attention particulière a été consacrée, en amont de la conception de biocapteur, à la réalisation de films nanostructurés aux propriétés non seulement contrôlées mais aussi reproductibles. Deux types de nanomatériaux ont été investigués durant ces travaux de thèse dans le but final d'intégrer ceux-ci dans la réalisation de biocapteurs électrochimiques.

Le premier repose sur une technique originale introduite par Wu et al. mettant en jeu des MWCNT pour la conception d'un film nanostructuré[232]. La technique la plus couramment utilisée pour réaliser un dépôt de nanotubes à la surface d'une électrode est la technique du dépôt de goutte suivi d'un séchage ou « drop coating » en anglais. Elle consiste à déposer une goutte de solvant, le plus souvent organique, contenant une certaine masse de nanotubes à la surface de l'électrode. Cependant, en utilisant cette méthode, la morphologie et l'épaisseur du film de nanotubes sont peu contrôlées. En effet, celle-ci se trouve influencée par différents paramètres difficilement contrôlables tels que la température, la vitesse et l'homogénéité de l'évaporation du solvant etc. Or, la morphologie est un paramètre central pour obtenir des dépôts reproductibles et offrant un signal identique en électrochimie. Ainsi, une morphologie non contrôlée présente un inconvénient évident pour la conception du biocapteur. Nous présentons dans notre cas une procédure fiable, basée sur la dispersion et la filtration de CNT en milieu aqueux, permettant la formation de films homogènes possédant des épaisseurs et des morphologies contrôlées et pouvant être facilement transférées sur des surfaces d'électrodes.

Le second matériau sur lequel se sont portées nos recherches est le disulfure de tungstène (WS_2)[233]. Ce matériau, jusqu'alors jamais utilisé au laboratoire, a d'abord été caractérisé sous sa forme brute. En effet, n'ayant que peu d'informations sur sa structure et sur ses propriétés, il a premièrement été soumis à différentes caractérisations physiques, telles que la microscopie à force atomique ou la microscopie électronique à balayage (AFM, MEB), et électrochimiques avant d'être intégré dans la conception de divers systèmes de détection. Pour mettre en forme ces particules de tungstène, sous forme de films minces notamment, nous avons utilisé une approche similaire à celle utilisée pour la réalisation de films de CNT, en adaptant simplement le mode opératoire à la solubilité du disulfure de tungstène dans l'eau.

Au sein de ce chapitre, nous détaillerons donc la conception de deux films nanostructurés, le premier de CNT et le second de WS_2, ainsi que la méthode de transfert utilisée pour déposer ces derniers sur un matériau d'électrode. Enfin, nous présenterons les caractérisations structurales et électrochimiques réalisées avant et après leur mise en forme sous forme de films minces.

A. Conception et caractérisation d'un film de CNTs

1. Méthode de réalisation du film de CNTs

a) Dispersion des nanotubes de carbone

Si les nanotubes de carbone offrent une multitude de propriétés intéressantes pour la conception de biocapteurs, un des problèmes majeurs qu'ils posent lors de leur utilisation est le manque de solubilité de ces derniers, en particulier en milieu aqueux. En effet, en prenant en compte l'application visée, la double difficulté d'obtenir des solutions stables de nanotubes de carbone et à la sensibilité des biomolécules envers des agents tensioactifs et des solvants toxiques entrent en jeu. Pour répondre à cette problématique, une technique de dispersion des CNT en milieu aqueux basée sur le travail de Wu et al[232] a donc été mise au point.

Pour ce faire, une faible quantité de nanotubes (acheté chez Nanocyl), environ 5 mg, est introduite dans un litre d'eau. Cette solution est ensuite soumise à un bain à ultrasons pendant 30 min puis laissée au repos durant 24 heures. La sonication assure une dispersion homogène des nanotubes et permet de briser les agrégats formés spontanément par le caractère hydrophobe des CNT. La phase de repos quant à elle permet d'effectuer une première étape de filtration. En effet, sous l'action du poids, les amas de CNT les plus importants vont migrer vers la partie inférieure du récipient (Figure 40). Il est alors possible de récupérer le surnageant ne comprenant lui que des nanotubes dispersés et non des agglomérats. Cette technique permet ainsi de récupérer une solution de nanotubes de carbone dispersés dans l'eau, le surplus de CNT ayant été éliminé par sédimentation.

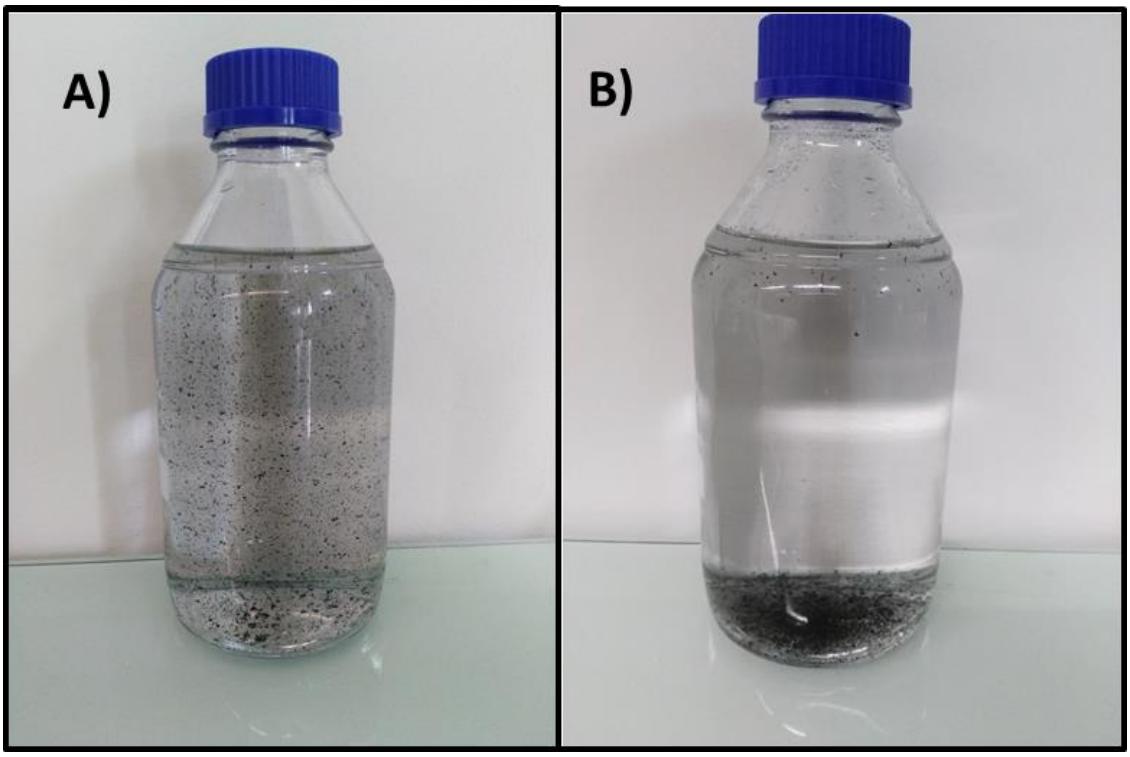


Figure 40: Photos de la suspension de nanotubes de carbone dans l'eau soumise à 30 min d'ultrasons, A) avant repos et B) après 24h de repos.

b) Filtration et transfert

Une fois récupérée, cette solution est filtrée sous vide à l'aide d'une trompe à eau. Pour cela, une membrane de cellulose est utilisée comme filtre. L'intérêt d'utiliser de la cellulose plutôt qu'un autre type de filtre, tel que le PTFE, est que celle-ci peut être dissoute en présence d'acétone, permettant ainsi le transfert du film de CNT à la surface d'une électrode. En effet, une fois le volume souhaité filtré et après séchage du dépôt obtenu, le filtre est récupéré pour passer à l'étape de transfert. Afin d'obtenir des films de nanotubes possédant une taille et une forme identique, un emporte-pièce d'un diamètre de 5 mm est utilisé (Figure 41).

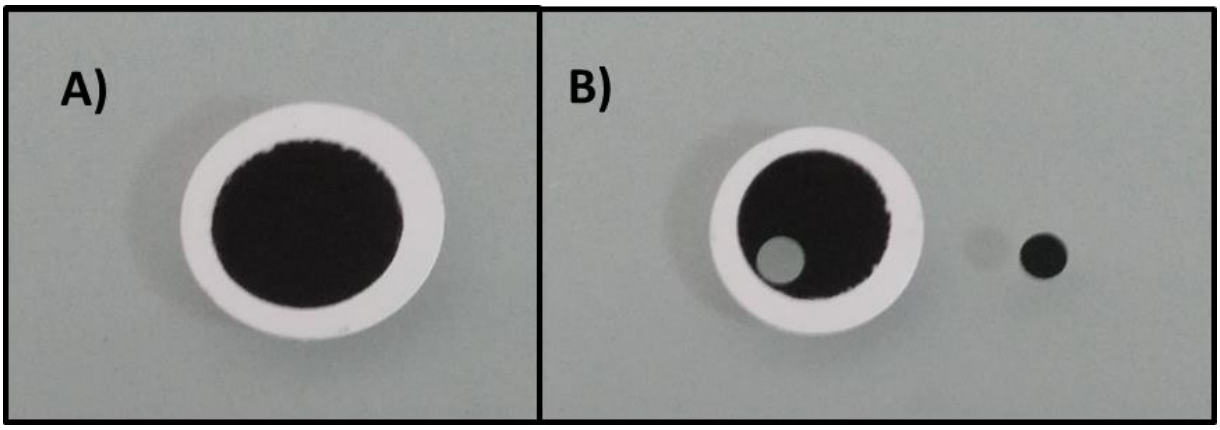


Figure 41: photos du film de CNT à la surface du filtre de cellulose avant (A) et après (B) découpe de la partie désirée à l'aide d'un emporte-pièce.

Après découpage, le filtre est déposé sur l'électrode de façon à ce que la face portant les CNT soit en contact avec le matériau d'électrode, à savoir du carbone vitreux dans ce cas. La cellulose est ensuite dissoute par différents lavages à l'acétone. Il s'agit là de l'étape critique de cette méthode de dépôt de films de CNT. Il faut s'assurer qu'aucune trace de cellulose ne persiste à la surface de l'électrode tout en s'assurant que le film de CNT ne se désagrège pas sous l'action du rinçage et reste adsorbé sur l'électrode. Le matériau d'électrode utilisé étant du carbone vitreux lors de ces travaux, l'adhésion du film de CNT est assurée par des interactions faibles, notamment les interactions de type π-π.

Durant ces travaux, différents volumes de solution ont été filtrés, à savoir 100, 300 et 500 mL. Le but de cette manœuvre étant d'évaluer l'influence du volume filtré sur l'épaisseur du film de nanotubes obtenu dans un premier temps, puis de déterminer par les caractérisations électrochimiques quelle épaisseur de film est la plus apte à répondre aux attentes liées à la conception d'un biocapteur.

La masse de nanotubes de carbone déposée par filtration des différents volumes a également été calculée. Pour cela, le filtre de cellulose a été pesé à l'aide d'une balance de précision après et avant la filtration. De plus, celui-ci a été mis à séché durant la nuit à 30°C pour s'assurer d'éliminer l'eau absorbée par le filtre.

Les masses calculées sont ainsi de 56, 194 et 357 $\mu g.cm^{-2}$ pour des volumes filtrés de 100, 200 et 500 mL respectivement. On peut voir que l'évolution de la masse déposée n'est pas linéaire en fonction du volume filtré. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que plus la

quantité de nanotubes déposée est importante, plus les pores du filtre de cellulose se trouvent obstrués. Ainsi, les CNT vont être de plus en plus retenus à la surface du filtre au cours de la filtration.

Enfin, pour un volume filtré supérieur à 500 mL, l'épaisseur du film obtenu devient trop grande et l'adhésion entre celui-ci et l'électrode de carbone vitreux n'est plus assurée. En effet, pour des grandes épaisseurs, le film se détache de la surface ou se désagrège, c'est pourquoi ce travail s'est limité à des volumes filtrés compris entre 0 et 500 mL.

2. Caractérisation structurale

Afin de déterminer les propriétés de ce matériau et de croiser les différents résultats obtenus pour s'assurer de leur validité, les films de nanotubes ont été caractérisés à l'aide de différentes techniques. De plus, une étude complète a été réalisée en caractérisant ce matériau à l'échelle macroscopique (micromètre) en plus des caractérisations classiques à l'échelle nanométrique. En effet, les propriétés peuvent être différentes selon l'échelle choisie. Par exemple, l'état de surface, pris localement à l'échelle nanométrique, peut fortement varier selon si l'on caractérise une zone très rugueuse ou à l'inverse une zone très homogène. Une étude menée sur une zone plus large permet de moyenner les différents paramètres observés afin de donner un résultat pouvant parler pour l'ensemble de l'échantillon.

a) Caractérisation par microscopie laser

La première série de caractérisation a été réalisée par microscopie optique laser à l'aide d'un microscope à balayage laser confocal Keyence Vega. Cet appareil permet d'imager les films de nanotubes et d'en déterminer l'épaisseur mais aussi la rugosité. Il s'agit d'un microscope optique équipé d'un (ou plusieurs) laser qui sonde en chaque point la profondeur de la surface et permet ainsi d'obtenir une cartographie de la hauteur de l'échantillon observé. Afin de permettre l'observation de ceux-ci, les films minces de CNT ont été préalablement déposés sur un substrat d'or par la technique de dissolution de la cellulose exposée plus tôt dans ce manuscrit.

La microscopie laser est une technique de choix pour l'observation de films minces car elle permet de réaliser des clichés selon un grand angle à l'inverse des techniques de caractérisation couramment utilisées pour étudier les structures nanométriques (AFM, MEB). En effet il a été décidé dans un premier temps de caractériser l'ensemble du matériau, en observant son état de surface, sa rugosité et son épaisseur. C'est pourquoi une technique permettant d'observer de larges zones (plusieurs centaines de micromètres) semblait adaptée pour démarrer cette étude avant de passer à l'échelle nanométrique.

Un grossissement de 50 a donc été choisi pour réaliser la cartographie en trois dimensions de ces différents films. Pour chaque épaisseur, correspondant à un volume filtré de 100, 300 et 500 mL, deux types de clichés ont été réalisés. Le premier est pris sur une zone homogène du film et permet de remonter, à l'aide du logiciel, à la valeur de la rugosité (Figure 42-A). Le second est lui pris à la limite entre le substrat et le film de nanotubes. Ce dernier est utilisé pour déterminer l'épaisseur du film (Figure 42-B). Pour cela, un profil d'épaisseur moyen est

réalisé sur l'ensemble du cliché. Ensuite, par différenciation entre l'épaisseur du substrat et celle du film de CNT, il est possible de déterminer l'épaisseur du film seul.

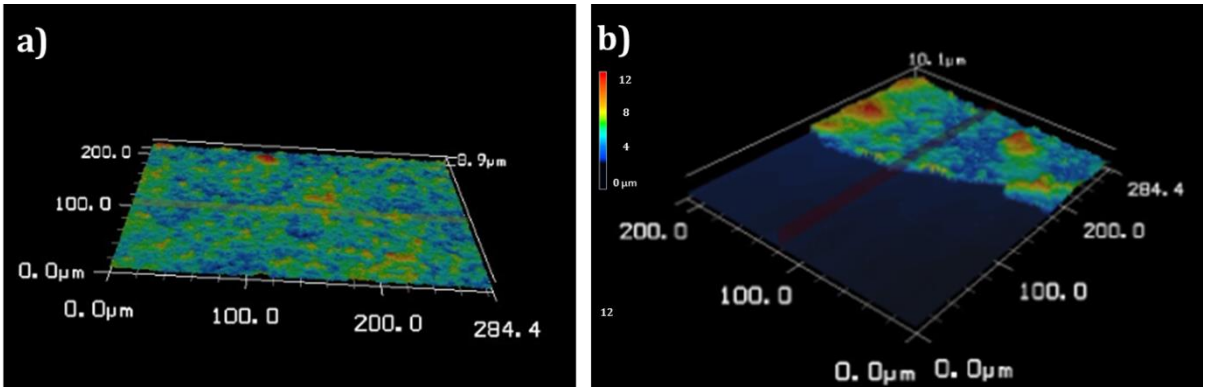


Figure 42: Cartographie en hauteur de la surface des films de nanotubes pour sur une zone homogène (A) et à la limite substrat/film (B). Clichés obtenus à l'aide microscope à balayage laser confocal Keyence Vega à un grossissement de 50

Les clichés présentés sur la Figure 43 représentent la cartographie en hauteur de la surface des films de nanotubes pour 100 (A), 300 (B) et 500 (C) mL de solution filtrée. L'image (D) correspond quant à elle à la vue en 3 dimensions de la surface de l'échantillon. La zone à l'intérieur du cercle étant la zone de l'échantillon au sein de laquelle le calcul de la rugosité a été réalisé.

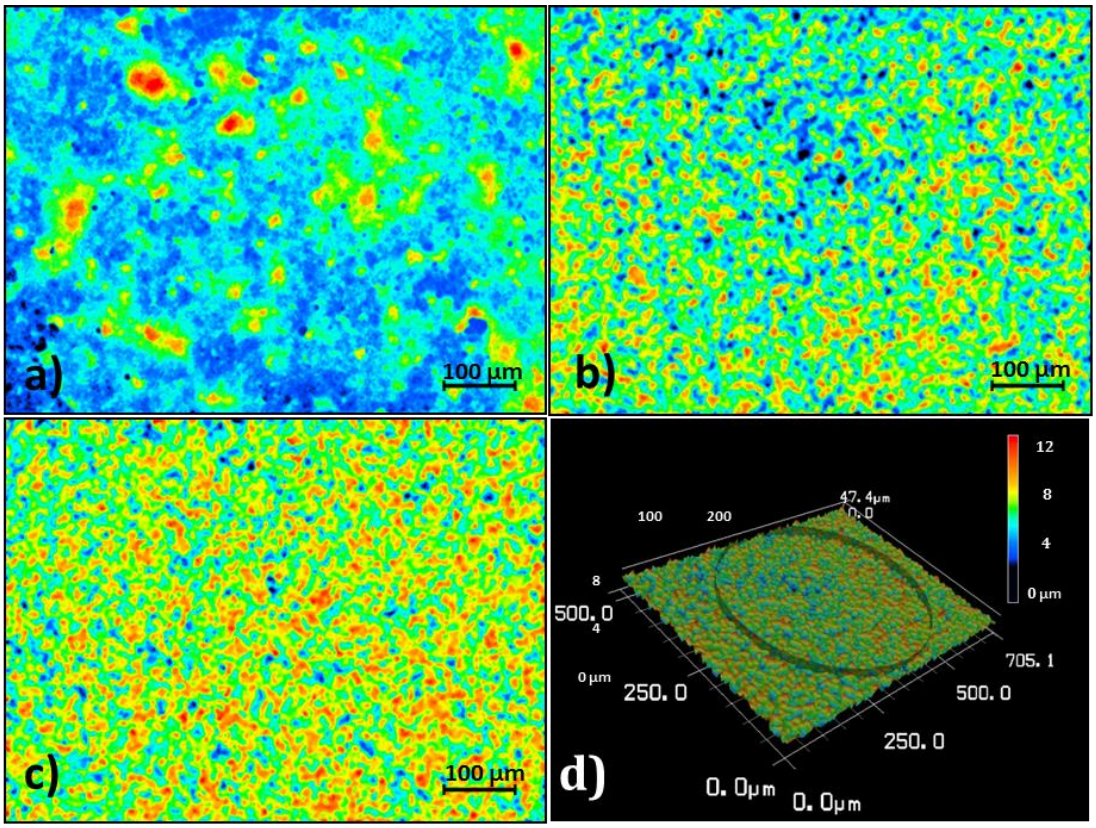


Figure 43: Cartographie en hauteur de la surface des films de nanotubes pour 100 (A), 300 (B) et 500 (C) mL filtrés. Clichés obtenus à l'aide microscope à balayage laser confocal Keyence Vega à un grossissement de 50. D) Image 3D de la surface du film de CNT (500 mL).

Si l'on compare les trois images de cartographie obtenue pour les trois différentes épaisseurs, on peut voir que plus le volume filtré augmente, plus le film obtenu semble homogène. En effet, pour un volume filtré de 100 mL, la cartographie révèle des îlots formés par des amas de nanotubes et de larges zones vides où le substrat est apparent. Cela signifie que ce volume n'est pas suffisant pour former une couche homogène de CNT lors de la filtration. Les nanotubes se sont simplement agrégés sous l'impulsion des interactions faibles existant entre les CNT, formant des agrégats non connectés entre eux.

Lorsque l'on augmente le volume à 300 mL, les zones où le substrat est encore apparent semblent fortement diminuées et une structure poreuse de nanotubes interconnectés commence à prendre forme. Ce type d'évolution peut s'apparenter à un phénomène de nucléation/croissance. En effet, les agrégats formés lors de la filtration du volume de 100 mL vont servir par la suite comme base pour la croissance du film. On obtient alors un film relativement rugueux, formé de zones creuses et d'îlots d'hauteurs plus importantes, correspondant aux points de nucléation initialement créés.

Enfin, lors de la filtration de 500 mL de suspension de CNT, le substrat n'est que très peu apparent et la surface du film semble s'être homogénéisée. Les zones creuses sont effectivement moins prononcées, celles-ci étant comblées par l'apport supplémentaire de matières, diminuant de ce fait la différence de hauteur préalablement constatée avec les points de nucléations. On obtient ainsi un film mince de CNT possédant une structure poreuse constituée d'un assemblage de nanotubes interconnectés.

Les valeurs de rugosité calculées corroborent ces observations avec des valeurs de Ra égales à 1,4, 1,2 et 0,8 µm pour des volumes filtrés de 100, 300 et 500 mL respectivement. La rugosité Ra est l'écart moyen arithmétique du profil. Elle correspond en pratique à la moyenne des valeurs absolues des écarts entre le profil et une ligne moyenne de ce profil. La surface au-dessus de la ligne moyenne est par définition égale à la surface au-dessous de la ligne (voir Figure 44).

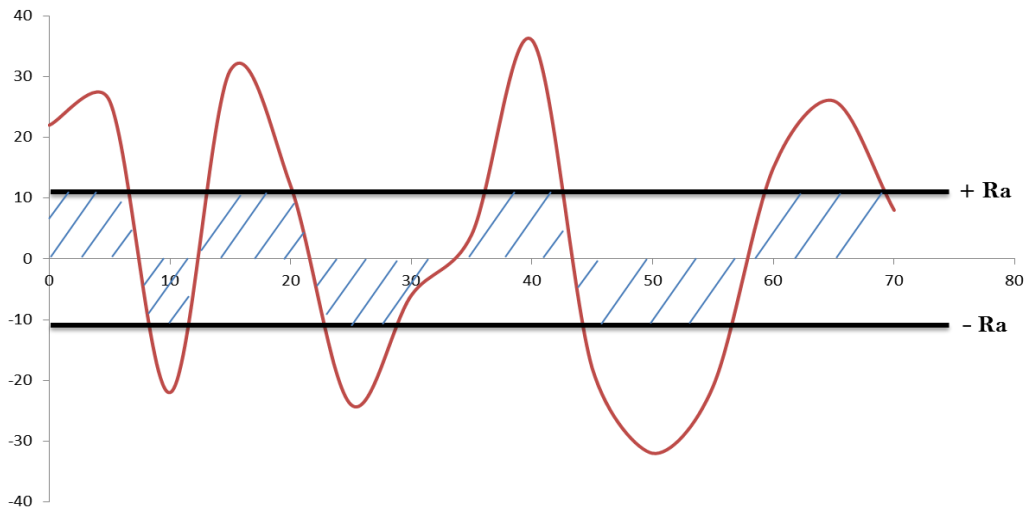


Figure 44: Représentation schématique de la moyenne arithmétique RA.

Concernant la caractérisation de l'épaisseur des différents films, comme indiqué précédemment, celle-ci a été déterminée à l'interface entre le film et le substrat. Pour minimiser l'impact d'un éventuel effet de bords, qui peut induire un surplus de matière et donc une augmentation de l'épaisseur du film lors de la découpe de celui-ci à l'aide de l'emporte-pièce, les mesures ont été réalisées en différents points. Les valeurs déterminées correspondent ainsi à la moyenne de cinq valeurs prisent sur les bords et au centre de l'échantillon.

La Figure 45 ci-dessous montre les clichés obtenus pour les différentes épaisseurs ainsi que les profils de hauteur calculés. Les films de nanotubes formés possédant une certaine rugosité, l'épaisseur est de ce fait calculée sur l'ensemble de la zone observée afin d'obtenir une valeur moyennée, moins soumise à la rugosité.

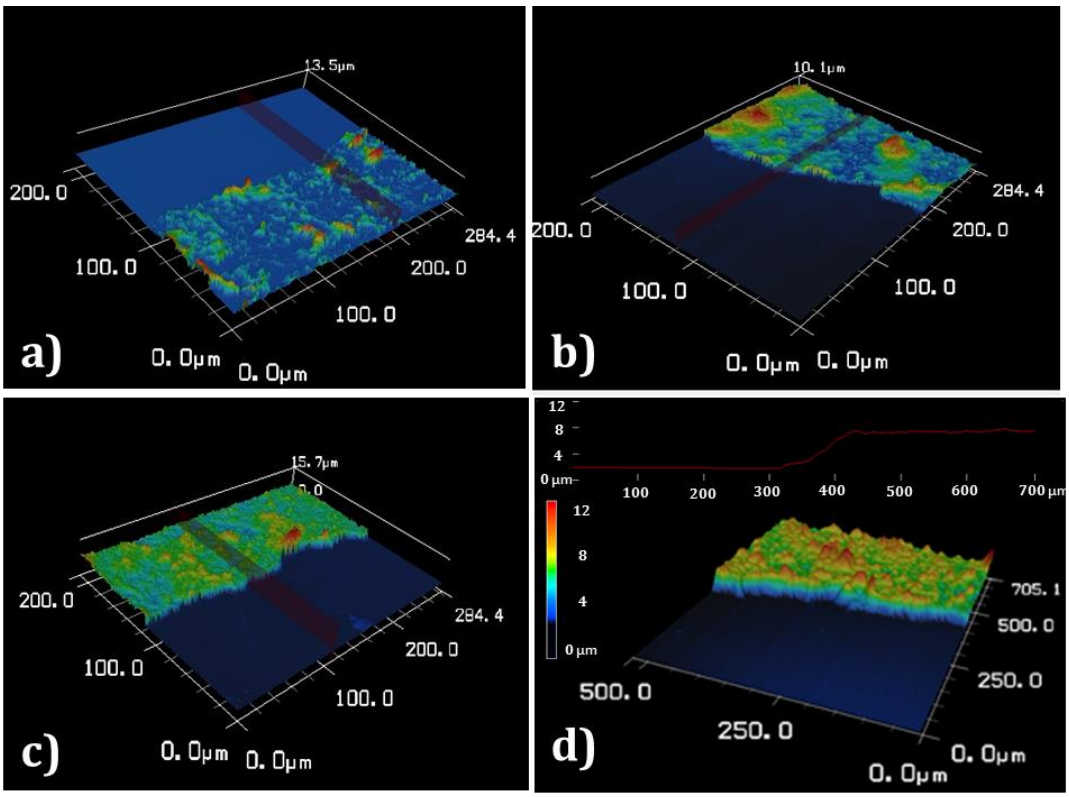


Figure 45 : Vue en 3D des films de nanotubes pour 100 (A), 300 (B) et 500 (C) mL filtrés à la limite substrat/films. D) Détermination de l'épaisseur de l'échantillon.

Ces clichés ont permis de déterminer des épaisseurs de 1.6, 2.6 et 4.0 µm pour des films de CNT obtenus par filtration de 100, 300 et 500 mL respectivement. Comme pour la rugosité, on peut constater que l'évolution de l'épaisseur n'est pas linéaire en fonction du volume filtré. En effet le phénomène de « nucléation-croissance » présenté plus haut entre aussi en jeu concernant l'augmentation de l'épaisseur. C'est pourquoi celle-ci suit la même évolution que la rugosité et la quantité de matière déposée et n'augmente donc pas de façon linéaire.

Les différents paramètres déterminés à l'aide de la microscopie laser ont été rassemblés dans le Tableau 2. Les marges d'erreur (Relative Standard Deviation) ont été indiquées pour l'épaisseur des films. Cette marge d'erreur est d'autant plus grande que l'est la rugosité. En effet, plus la rugosité est grande, plus l'épaisseur va varier selon la zone où est effectuée la mesure et donc la déviation va elle aussi augmenter.

La reproductibilité des films est donc liée à cette grandeur. Pour son calcul, chaque épaisseur a été caractérisée sur trois échantillons différents. Parallèlement aux analyses précédentes, les deux films les plus épais semblent être plus reproductibles avec un pourcentage de distribution de ± 7 % et ± 8% pour 500 et 300 mL respectivement. En revanche, la différence est plus grande pour le film obtenu après 100 mL de filtration (± 22%). Le fait que les agrégats de CNT à cette épaisseur puissent être formés au hasard peut expliquer cette plus grande marge d'erreur.

Tableau 2: valeurs des différents paramètres déterminés à l'aide de la microscopie laser.

Volume filtré / mL	Masse déposée / $\mu g.cm^{-2}$	Epaisseur ± SD / µm (± *RSD)*	Rugosité (Ra*)* / µm
100	56	1,6 ± 0,4 (± 22%)	1,4
300	194	2,6 ± 0,2 (± 8%)	1,2
500	357	4,0 ± 0,3 (± 7%)	0,8

b) Caractérisation par microscopie à force atomique

Une étude des différents films a également été réalisée par microscopie à force atomique (AFM). L'AFM permet elle aussi une caractérisation de l'état de surface et de l'épaisseur des films de nanotubes. Cependant, cette étude se fait à une échelle bien plus localisée que celle utilisée avec la microscopie laser. Durant ces travaux, deux différents modes ont été utilisés : le mode contact et le mode friction.

Lors de l'utilisation du mode contact, le levier muni de la pointe sonde vient appuyer sur la surface de l'échantillon à analyser. En déplacement le levier, la pointe va donc suivre la morphologie du matériau et permettre une analyse 3D de celui-ci. Pour cela, la force entre l'échantillon et la pointe est maintenue constante en changeant simplement la hauteur de l'échantillon dans l'appareil de mesure. La variation de la hauteur donne ainsi la hauteur de la surface à l'endroit étudié. Cependant, ce type de mesure est limité par l'épaisseur de l'échantillon. En effet, si les différences en termes de hauteur sont trop importantes, la pointe ne pourra pas suivre efficacement la surface du matériau et les valeurs indiquées sont alors incorrectes. C'est pourquoi ce mode a seulement été utilisé pour imager la surface de l'échantillon et non pour en déterminer l'épaisseur puisque celle-ci est de l'ordre de plusieurs micromètres d'après les mesures réalisées par microscopie laser.

La Figure 46 montre la cartographie en 2D et en 3D des échantillons obtenues à partir de 100, 300 et 500 mL. Le traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel Gwyddion.

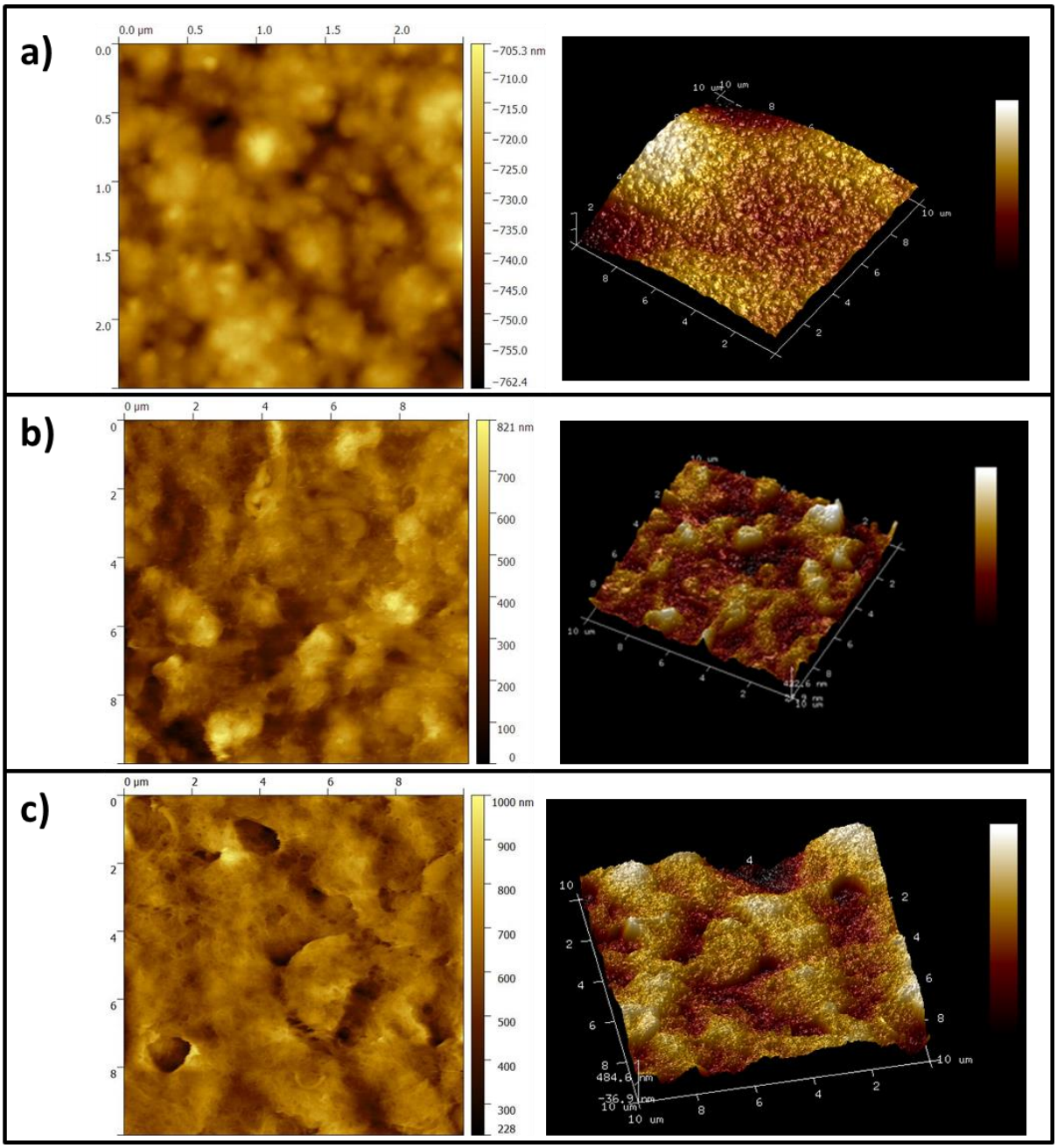


Figure 46: Cartographie en 2D et en 3D de l'échantillon obtenu à partir de 100 mL (a), 300 mL (b) et 500 mL (c), images réalisées à l'aide d'un microscope à force atomique.

Ces images montrent qu'une structure poreuse en trois dimensions est obtenue, celle-ci étant constituée d'un réseau de nanotubes interconnectés entre eux. Le film obtenu pour 100 mL de solution filtrée donne cependant une image différente où il est difficile d'observer cette structure poreuse. La surface n'est en effet que partiellement recouverte pour cette épaisseur et l'observation par AFM a donc été compliquée pour ce film. Pour ce qui est des paramètres des différents films, la rugosité reste importante localement, avec une succession de vallées et de crêtes, créant ainsi de fortes variations d'épaisseur. Les trois rugosités Ra déterminées à l'aide du logiciel Gwyddion sont cependant légèrement inférieures à celles déterminées à l'aide du microscope laser avec des valeurs de 0,3 , 0,8 et 0,9 µm pour des films de CNT obtenus par filtration de 100, 300 et 500 mL respectivement. Ceci peut s'expliquer par le fait

que ce matériau possède une grande épaisseur, de l'ordre de plusieurs micromètres. Or la pointe de l'AFM reste en surface de l'échantillon et ne va pas sonder en profondeur les cavités existantes. Ainsi, la différence entre les creux et les crêtes en termes de hauteur est faussée. De plus, la caractérisation par AFM se fait sur une petite zone de l'échantillon et donc les valeurs relevées ne sont pas représentatives de l'ensemble du matériau lorsque celui-ci possède une forte rugosité. Cette technique de caractérisation est donc un complément à la microscopie laser pour imager l'état de surface des films de nanotubes mais ne permet pas de déterminer avec précision des paramètres précis tels que la rugosité.

Le second mode utilisé pour cette étude est le mode friction. Comme dit précédemment, ce mode a été utilisé pour permettre de déterminer l'épaisseur du film mince afin de corroborer ou non les valeurs obtenues par microscopie laser. Dans ce mode, la pointe va venir au contact de l'échantillon et appliquer une force sur celui-ci tout en suivant un mouvement de va-et-vient. Celle-ci va ainsi gratter l'échantillon et creuser un sillon jusqu'à atteindre le substrat d'or. Cette technique est donc destructive puisqu'elle va altérer fortement la structure de l'échantillon analysé en retirant des morceaux du film. De plus, si le matériau caractérisé possède une surface trop rigide, il est possible que la pointe ne puisse pas creuser l'échantillon et casse sous l'effet des forces de frictions. L'échantillon doit également suffisamment adhéré à son substrat sous peine de se détacher lors de la manipulation.

Les films de nanotubes mis au point possèdent une grande épaisseur et une surface relativement rigide, ce qui rend l'utilisation du mode friction sur ceux-ci délicate. Ce type de caractérisation a tout de même pu être réalisé pour l'échantillon obtenu à partir de 500 mL seulement. En effet, les deux autres films n'étaient pas suffisamment adsorbés sur la surface du substrat d'or pour permettre une observation par friction. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 47 ci-dessous.

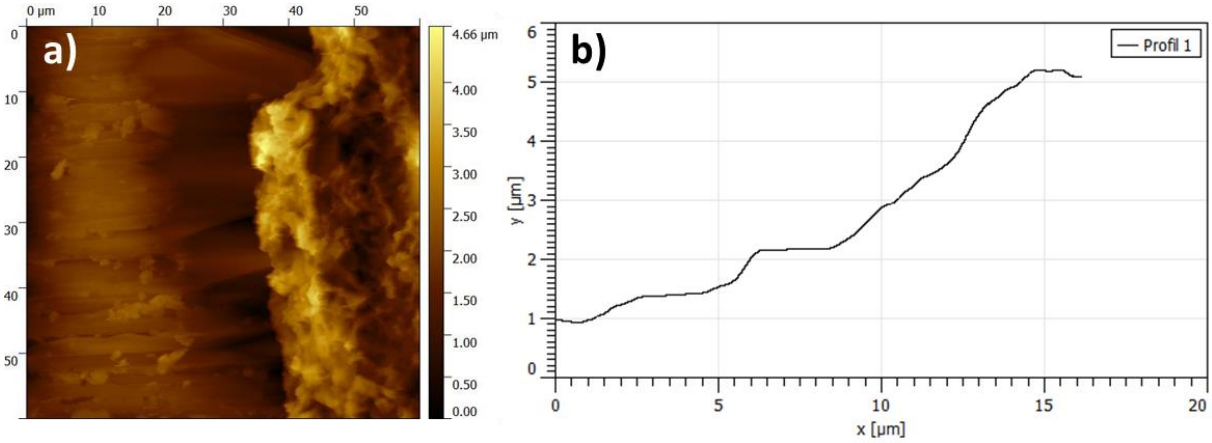


Figure 47: a) Image du film de nanotubes obtenue par utilisation du mode friction ; b) Profil de hauteur calculé à partir de l'image a) et du logiciel Gwyddion b).

L'image a) de la Figure 47 a été obtenue par utilisation du mode friction. La partie gauche de l'image correspond au substrat d'or et la partie droite au film de CNT. Pour calculer l'épaisseur de l'échantillon, un profil de hauteur moyen a donc été utilisé (Figure 47-b), débutant lorsque la pointe sonde est au contact de la surface du matériau, avant le début du

processus de friction, pour terminer à la surface du substrat après expérience. On peut voir que l'épaisseur initiale est de 5,2 µm et que celle-ci diminue progressivement au cours de la manipulation pour atteindre une valeur finale de 1 µm. Cette valeur correspond à celle de l'épaisseur du disque d'or utilisé comme substrat au cours de la caractérisation. Il y a donc confirmation que le film de nanotubes a bien été gratté jusqu'à atteindre le support. Par différence, une épaisseur de 4,2 µm est obtenue pour le film de CNT réalisé après filtration de 500 mL de suspension. Ces résultats rejoignent donc ceux obtenus par microscopie laser puisqu'une épaisseur de 4,0 µm ± 0,3 µm avait été mesurée à l'aide de cet instrument.

c) Caractérisation par microscopie électronique à balayage

Des analyses par microscope électronique à balayage (MEB) ont aussi été menées sur les films de nanotubes de carbone. A l'image de la microscopie à force atomique, cette technique permet d'analyser la structure du film et d'observer la porosité de celui-ci. Elle ne permet cependant pas d'extraire des paramètres structuraux tels que l'épaisseur ou la rugosité du matériau. La Figure 48 présente deux clichés pris à deux grossissements différents et mettant en évidence le caractère poreux de la structure formée par filtration des CNT. Ces images ont été prise à l'aide d'un microscope Ultra 55 FESEM basé sur une colonne GEMENI® FESEM après avoir déposé les films sur du Scotch double-face graphitique, lui-même collé sur un plot en cuivre afin d'améliorer la conductivité de l'ensemble.

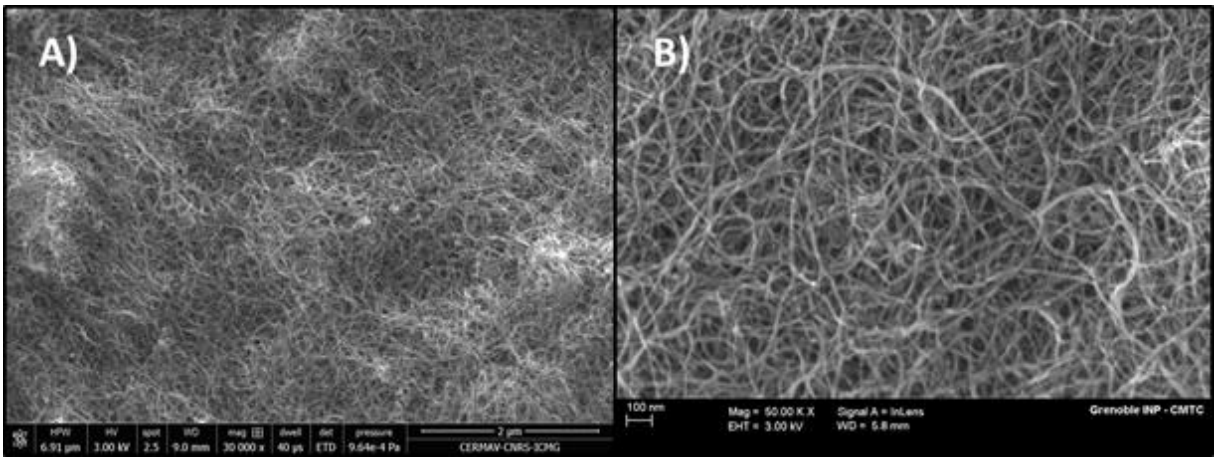


Figure 48: Images obtenues par microscopie électronique à balayage à partir de l'observation de films minces de nanotubes de carbone à un grossissement de x30000 (A) et x50000 (B).

Les deux images prises à un grand angle (x30000 (A) et x50000 (B)) montrent l'enchevêtrement de CNT dont sont constitués les films minces. La porosité de la structure est apparente sur ces clichés, confirmant donc les observations faites préalablement par utilisation de l'AFM. De plus ces images permettent d'observer l'homogénéité des dépôts dans leur structuration ainsi que la manière dont sont connectés les nanotubes entre eux. Les films présentent ainsi le même arrangement que celui visible sur la Figure 48 sur l'ensemble du dépôt. Enfin, ces observations mettent en évidence une forme macroscopique composée de CNT, orientés de manière aléatoire, et interconnectés mécaniquement entre eux sous l'effet de la filtration.

d) Caractérisation par spectroscopie Raman

Comme précisé au sein de l'étude bibliographique, la spectroscopie Raman est une méthode de caractérisation optique permettant d'analyser la structure et la pureté des nanotubes de carbone. Elle met donc en jeu les propriétés optiques des CNT.

En effet, les CNT, et les matériaux carbonés en général, présentent des bandes distinctes en Raman. L'hybridation des carbones sp^2 induit ainsi un pic caractéristique à environ 1550 cm^{-1}. On parle de bande G. Cependant, lorsque l'arrangement hexagonal des carbones est altéré, par oxydation ou fonctionnalisation, les carbones sont alors hybridés sous la forme sp^3 et possèdent une fréquence et donc une bande différente, appelée bande D. En observant le rapport G/D, il est ainsi possible d'obtenir des informations sur l'hybridation des carbones constituants nos nanotubes, et donc d'en déduire leur structure et leur pureté. C'est le travail qui a été mené sur les différents films de nanotubes synthétisés afin d'observer les différences de structure entre les CNT commerciaux et les CNT incorporés dans les films minces ainsi que l'éventuelle influence de l'épaisseur des films sur la structure ou les propriétés des nanotubes. Les spectres Raman obtenus pour les trois épaisseurs différentes sont représentés au sein de la Figure 49.

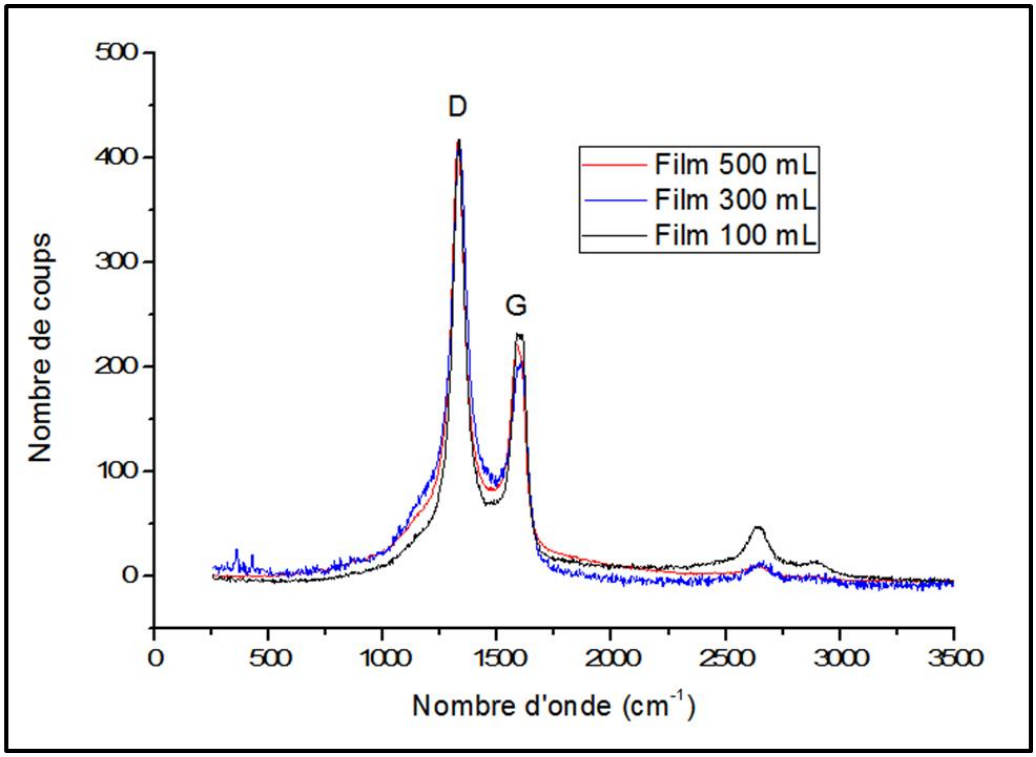


Figure 49: Spectres Raman des différents films de CNT.

Ces spectres montrent que le rapport des signaux G/D conserve des valeurs similaires autour de 0,55 quel que soit l'épaisseur du film caractérisé. Une légère différence au niveau de la bande G est tout de même visible mais la variation n'est pas suffisamment importante pour être significative. Ce résultat indique que la quantité de nanotubes filtrés n'influence pas la répartition en carbone sp^2 ou sp^3. Il est cependant important de noter qu'un tel rapport indique que les CNT présents au sein de la structure poreuse en 3D qui constitue les films de

nanotubes présente majoritairement des carbones hybridés sp^3. Ceci traduit donc une forte proportion de défauts et de lacunes au sein de l'arrangement hexagonal des CNT.

Plusieurs hypothèses peuvent être apportées pour expliquer cette observation. Tout d'abord, les nanotubes utilisés sont de type multifeuillets. Il est donc possible au sein d'un même MWCNT d'avoir des feuillets présentant de nombreux défauts et d'autre proposant un arrangement idéal constitué de carbone sp^2. Le nanotube conserve alors ses propriétés tout en ayant un rapport G/D proche de 0,5. Ensuite, le traitement par ultrasons nécessaire à la dispersion des CNT dans l'eau peut induire des changements au niveau structurel. En effet, les nanotubes peuvent se rompre par vibration, créant ainsi des lacunes dans leur arrangement. C'est pourquoi un spectre Raman des nanotubes commerciaux, non traités et sous forme de poudre, a été réalisé afin de comparer la structure de ceux-ci avec les CNT des films minces. La comparaison de ces deux spectres est présentée au sein de la Figure 50.

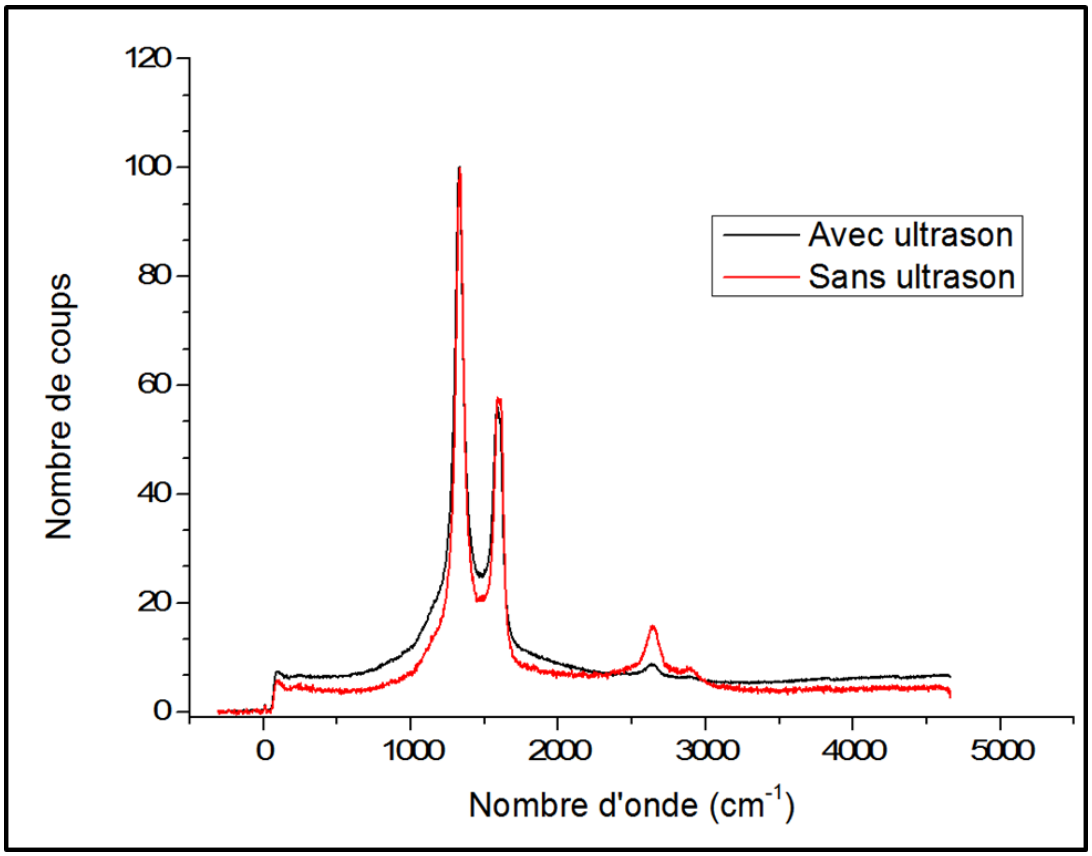


Figure 50: Spectres Raman des films de CNT avant et après avoir été soumis à un bain d'ultrason.

Comme le montre ce graphique, le fait d'exposer les CNT à un bain d'ultrasons durant 30 min ne semble pas affecter la distribution en carbone sp^2 ou sp^3 puisque le rapport des bandes D et G reste constant. Ainsi, même si les ultrasons permettent de disperser les nanotubes, ils ne créent cependant pas de défauts supplémentaires au sein de la structure de ces derniers. Ceci peut s'expliquer par la grande résistance mécanique propre aux CNT mais aussi par le fait que les plus gros amas de nanotubes sont éliminés par sédimentation lors de la réalisation de la suspension. Or ces amas sont constitués des CNT ayant le plus subis de fractures sous l'action des ultrasons et sont donc les plus à même de porter des défauts.

e) Détermination de la conductivité

Suites aux observations réalisées par spectroscopie Raman, une étude pour déterminer la conductivité des CNT a été menée. Au vue de la grande proportion de lacunes présente au sein des films exprimée par le rapport des bandes D/G, la conductivité peut effectivement être impactée et donc compromettre l'utilisation de ces films quant à leur incorporation dans un biocapteur électrochimique. L'intérêt premier des films de nanotubes étant la favorisation du transfert électronique et la grande surface spécifique qu'ils offrent.

La conductivité des trois différents films de nanotubes a ainsi été déterminée par le biais d'un multimètre et de la méthode 4 pointes. Cette méthode permet, par mesure du courant en fonction de la tension, de remonter à la valeur de la résistivité à l'aide de la formule suivante et donc au final à la valeur de la conductivité:

$$\rho = 2\pi s \frac{t/s}{2\ln(2)} \frac{V}{I} = \frac{\pi}{\ln(2)} t \frac{V}{I} = 4{,}532 t \frac{V}{I}$$

Où ρ correspond à la résistivité électrique (Ω.cm), t à l'épaisseur du film (cm), V le potentiel (V) et I le courant mesuré (A). Cette expression est vraie seulement pour les films minces possédant une épaisseur (t) inférieure à la distance comprise entre les pointes (s) servant pour la mesure (voir Figure 51). Si l'épaisseur est négligeable par rapport aux autres dimensions, il est ainsi possible de construire un modèle bidimensionnel de la conductivité et d'appliquer la relation.

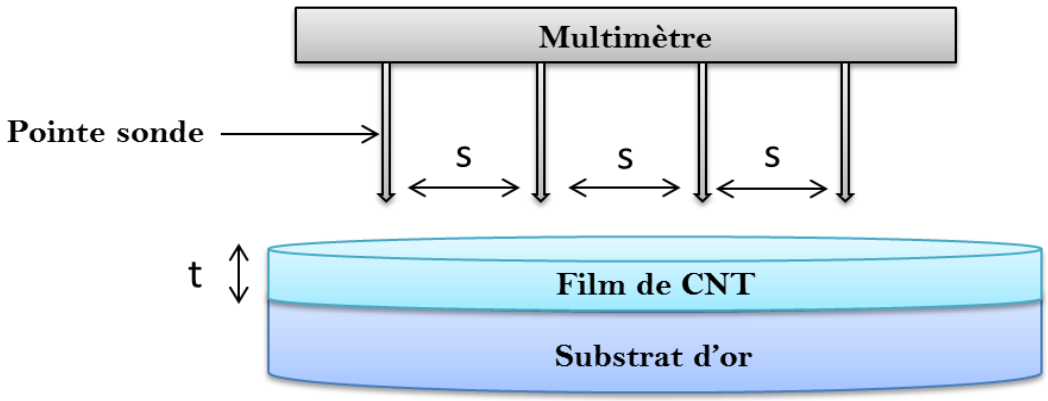


Figure 51: Représentation schématique de la mesure par la méthode 4 pointes à l'aide d'un multimètre.

Les mesures ont donc été réalisées après formation du film (par filtration sur filtre de cellulose) et dépôt de celui-ci sur substrat d'or. L'épaisseur des différents films ayant été déterminée préalablement, par microscopie laser et par microscopie à force atomique, permet donc de calculer la valeur de la conductivité de nos films.

Les CNT étant des semi-conducteurs, la mesure de conductivité a été réalisée à différents potentiels. Ceci permet de s'assurer que la conductivité mesurée a bien été prise dans la bande conductrice du matériau et non dans les gammes de valeurs où l'échantillon est isolant. La conductivité suit normalement une évolution linéaire en fonction du potentiel imposé dans la bande conductrice du matériau. Cette relation a donc été utilisée pour valider les mesures faites.

Les résultats obtenus pour le film obtenu à partir de 500 mL de solution filtrée ont été rapportés au sein du Tableau 3 et de la Figure 52.

Tableau 3 : Paramètres déterminés à l'aide de la méthode 4 pointes et d'un multimètre.

Potentiel (mV)	Courant (µA)	Résistance (Ohm)	Résistivité (ohm.cm)	Conductivité ($S.cm^{-1}$)
100	79	1266	2,29E+00	0,44
1000	782	1279	2,32E+00	0,43
2000	1611	1241	2,25E+00	0,44
3000	2487	1206	2,19E+00	0,46

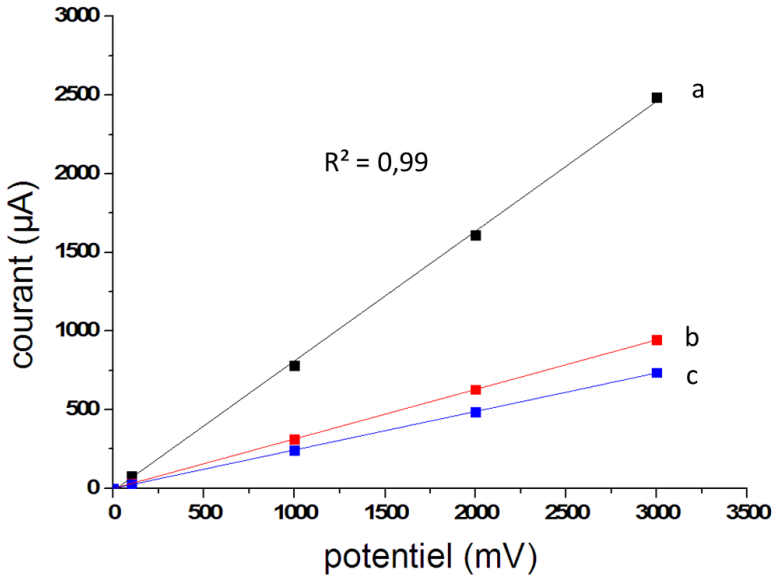


Figure 52: Courbe d'étalonnage de l'intensité du courant en fonction du potentiel pour le film de CNT de 4 µm (a), de 2,6 µm (b) et 1,6 µm (c).

Dans la gamme de potentiel choisie, entre 0 et 3 V, la conductivité, notée σ, de l'échantillon possède une valeur moyenne de 0,44 $S.cm^{-1}$. La courbe de tendance obtenue sur la Figure 52

montre bien la relation linéaire reliant le potentiel appliqué à la conductivité, assurant donc la validité des mesures. Pour ce qui est des deux autres épaisseurs, les valeurs de conductivité observées sont de 0,20 et 0,26 $S.cm^{-1}$ pour les films de 100 et 300 mL respectivement (Figure 53).

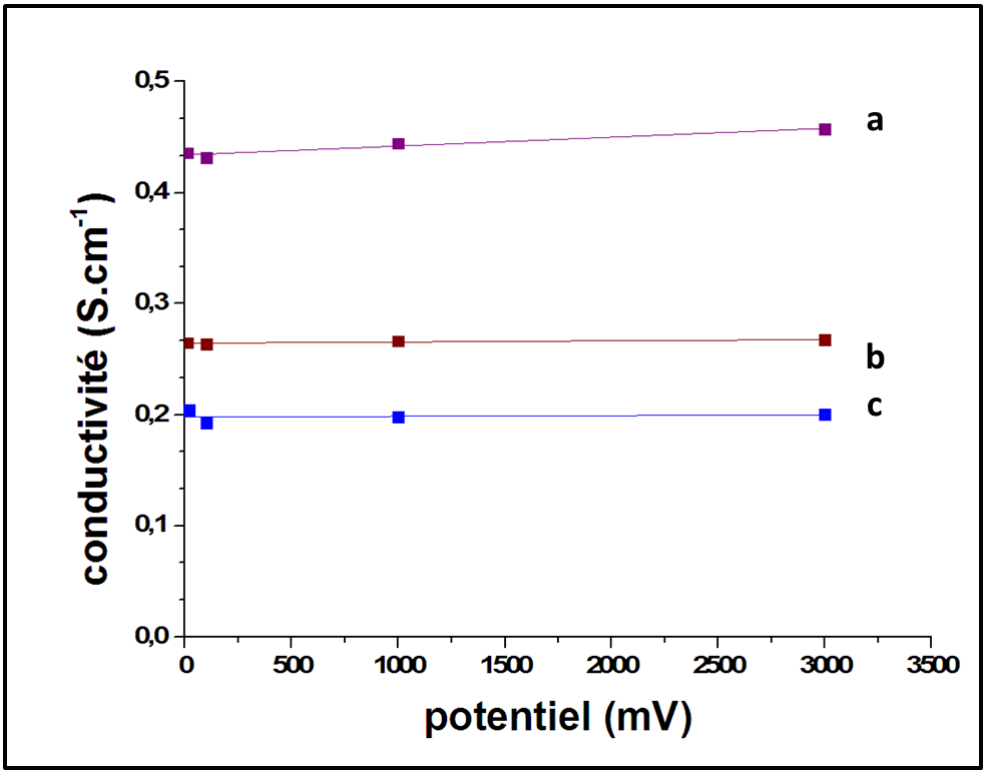


Figure 53: Courbe d'étalonnage de la conductivité en fonction du potentiel pour le film de CNT de 4 (a), 2,6 (b) et 1,6 µm (c).

Encore une fois, l'évolution de ces valeurs n'est pas linéaire par rapport à la quantité de nanotubes filtrés. Ce comportement rejoint donc celui des autres paramètres caractérisés précédemment. En effet, pour le film le plus fin, la surface n'est pas totalement recouverte de CNT, comme le montre les images de microscopie laser, et le film obtenu n'est donc pas homogène. Ceci influe donc sur la conductivité puisque les nanotubes ne sont pas tous interconnectés entre eux, expliquant les valeurs plus faibles pour les deux premières épaisseurs. A l'inverse, le film de 500 mL présente une surface et une structure plus homogènes, constituées d'un réseau de CNT. Cette structure permet donc une meilleure conduction du courant, résultant en une forte augmentation de la conductivité par rapport aux deux films plus fins.

Enfin, il est important de noter que la valeur mesurée de 0,43 $S.cm^{-1}$ correspond à un matériau possédant une bonne conductivité et est en accord , bien qu'inférieure, avec les valeurs rapportées dans la littérature concernant la conductivité des MWCNT (50-100 $S.cm^{-1}$)[234]. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les valeurs de la littérature s'applique à un film de CNT ayant subi une compression, ce qui n'est pas le cas dans ces travaux. Le film obtenu est donc plus dense et la conductivité plus importante. En comparaison, celle du disque d'or utilisé comme substrat est 34.10^4 $S.cm^{-1}$. L'argent, qui est un des métaux les plus

conducteurs, possède pour sa part une conductivité de 63.10^4 $S.cm^{-1}$ [235]. L'écart est relativement important car les valeurs sont données pour des films d'or et d'argent métalliques purs et également car il s'agit de matériaux parmi les plus conducteurs du monde.

Les matériaux sont ainsi classés en trois grandes familles en fonction de leur conductivité avec tout d'abord les métaux ($\sigma > 10^3$ $S.cm^{-1}$), les semi-conducteurs (10^{-6} $S.cm^{-1} < \sigma < 10^3$ $S.cm^{-1}$) et les matériaux isolants ($\sigma < 10^{-6}$ $S.cm^{-1}$). Les films de nanotubes obtenus lors de ce travail, particulièrement le plus épais, semblent donc posséder une très bonne conductivité, les plaçant parmi la famille des matériaux semi-conducteurs, et ceci malgré les lacunes présentes au sein de leur structure. Ceci peut s'expliquer par le fait que les nanotubes utilisés sont de type multifeuillets, et que ceux-ci conservent donc leur propriété conductrice malgré les défauts grâce à la présence de plusieurs couches.

3. Caractérisation électrochimique

A la vue de ces résultats, les films de nanotubes semblent être des candidats intéressants pour être intégrés dans la conception de biocapteurs électrochimiques. En effet, la structure poreuse nanostructurée constituant ces films est un matériau de choix pour être utilisée comme matrice support pour l'immobilisation de molécules biologiques de par la grande surface spécifique qu'elle offre. De plus, les mesures de conductivité ont montré que ces films présentent d'excellentes propriétés conductrices pour favoriser le transfert électronique entre l'électrode et une sonde redox. Enfin, le caractère poreux du matériau facilite également la diffusion des ions à travers la structure.

Cependant, avant d'être utilisé dans la conception d'un biocapteur, ces films ont été testés électrochimiquement afin de contrôler plusieurs facteurs. Tout d'abord, il faut s'assurer que les films adhèrent correctement à la surface des électrodes de carbone vitreux et permettent effectivement un transfert électronique. Il faut de plus déterminer quelle sonde redox est la plus adaptée pour être utilisée avec ce matériau. Enfin, pour des applications dans le domaine des biocapteurs, il faut que la signature électrochimique du matériau soit reproductible entre deux films différents.

Ces différents facteurs ont été investigués à travers différentes mesures mettant en jeu des techniques telles que la voltampérométrie cyclique ou encore la spectroscopie d'impédance électrochimique et seront détaillées au sein de ce chapitre.

a) Détermination de la sonde redox

Avant de caractériser les CNT par électrochimie, différentes sondes redox ont été testées afin de déterminer laquelle assure le meilleur transfert électronique. Pour cela, des caractérisations en voltampérométrie cyclique et en spectroscopie d'impédance électrochimique ont été menées à l'aide de trois sondes redox : l'hydroquinone, le couple du Ruthénium hexaamine $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ et le couple hexacyanoferrate (III) / hexacyanoferrate (II) $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

Les mesures électrochimiques ont été réalisées à l'aide d'une cellule électrochimique conventionnelle à trois électrodes avec pour électrolyte une solution de tampon phosphate à pH = 7,0 (0,05 mol L^{-1}). Un fil de platine a été utilisé comme contre-électrode et une électrode

au calomel saturée en KCl (SCE) a servi d'électrode de référence. Toutes les mesures ont été faites par utilisation d'un potentiostat Autolab 100 et ont été enregistrées à l'aide du logiciel NOVA. Les concentrations des sondes ont été fixées à 5.10^{-3} mol.L^{-1} dans le tampon phosphate.

Des sondes de charges différentes ont été choisies afin de connaître l'influence de ce paramètre concernant la diffusion des espèces au sein du film de nanotubes. Au pH où l'étude a été réalisée (pH = 7,0), les CNT sont chargés négativement. En effet, les fonctions oxygénées (acides carboxyliques, alcools…) qui sont présentes majoritairement à la surface des parois des nanotubes présentent une charge négative à ce pH. Une sonde redox chargée positivement sera donc théoriquement favorisée par rapport à une sonde chargée négativement, qui elle sera repoussée par les charges négatives déjà présentes à la surface des nanotubes.

Les voltampérométries cycliques correspondant aux trois sondes évoquées précédemment sont rapportées au sein de la Figure 54. Ces CV ont été réalisées après avoir déposé un film de CNT, obtenu par filtration de 500 mL de suspension, à la surface d'électrodes de carbone vitreux.

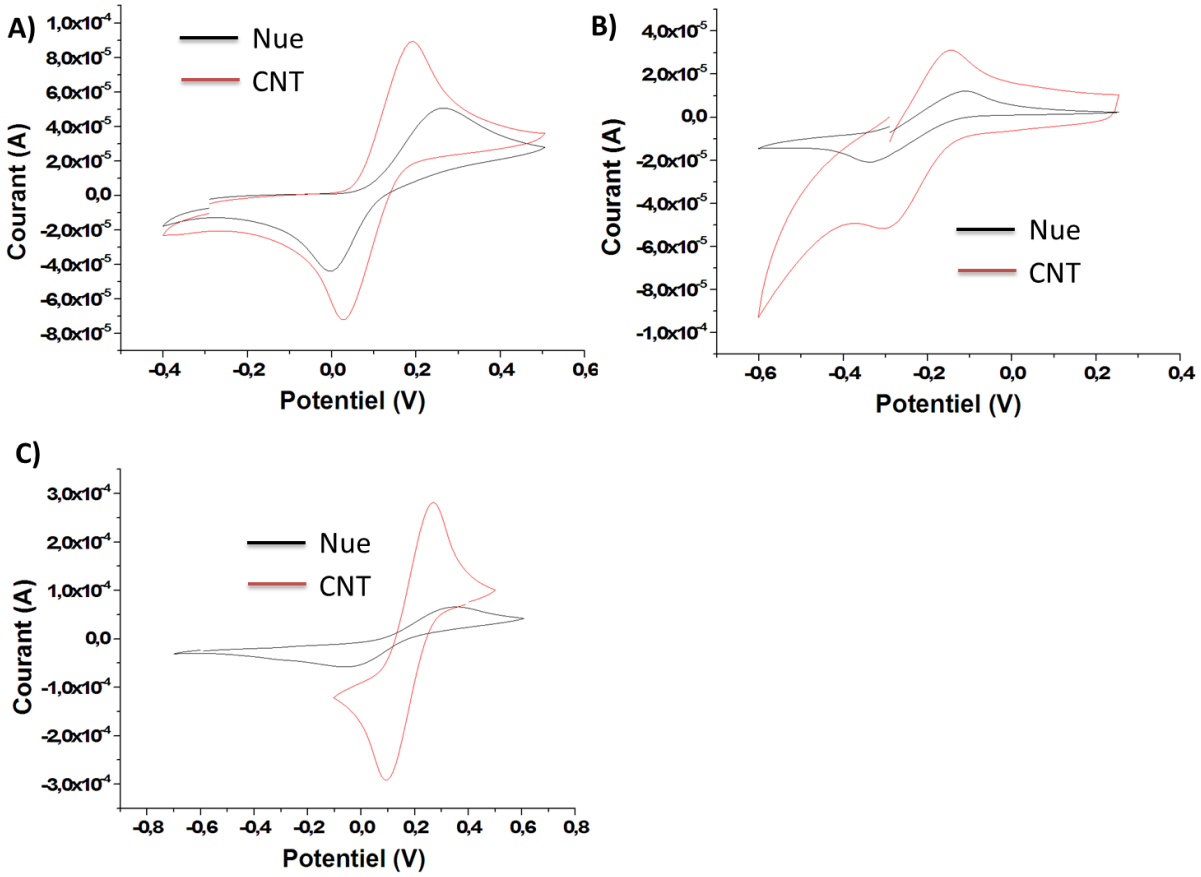


Figure 54: Voltampérogrammes cycliques obtenus à partir de l'utilisation de différentes sondes redox avec A) Hydroquinone; B) $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$; C) $[Fe(CN)_6]^{3-}$ à une concentration de 5.10^{-3} mol.L^{-1}, vb : 100 mv.s^{-1}.

Ces voltammogrammes montrent que pour les trois sondes testées, le film de nanotubes permet une augmentation du courant de pics par rapport au courant observé en utilisant une électrode de carbone vitreux classique. Le décalage de potentiel (ΔEp) entre le pic d'oxydation et le pic de réduction est également diminué grâce à l'utilisation de CNT. Il semble également que la sonde permettant l'obtention d'un signal bien défini et aillant la plus forte intensité soit le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

En effet, le courant de pic cathodique est égal à $-2{,}90\times10^{-4}$ A pour cette sonde contre $-7{,}20\times10^{-5}$ A et $-5{,}20\times10^{-5}$ A par utilisation d'hydroquinone et de ruthénium respectivement. De plus c'est également pour cette sonde que la différence de potentiel est la plus faible entre les deux pics redox avec une valeur de ΔEp = 0,120 V (ΔEp = 0,160 V pour l'hydroquinone).

L'utilisation de la spectroscopie d'impédance permet d'obtenir des informations complémentaires sur le système afin de valider les observations faîtes par CV. C'est pourquoi les trois sondes ont été testées en EIS. Pour cela, le système a été caractérisé en se plaçant au potentiel d'équilibre du couple de la sonde testée et en utilisant une vitesse de rotation de l'électrode de 2000 rotation par minute (rpm) afin de fixer la couche de diffusion. Les différents diagrammes de Nyquist résultant de ces expériences sont présentés ci-dessous (Figure 55).

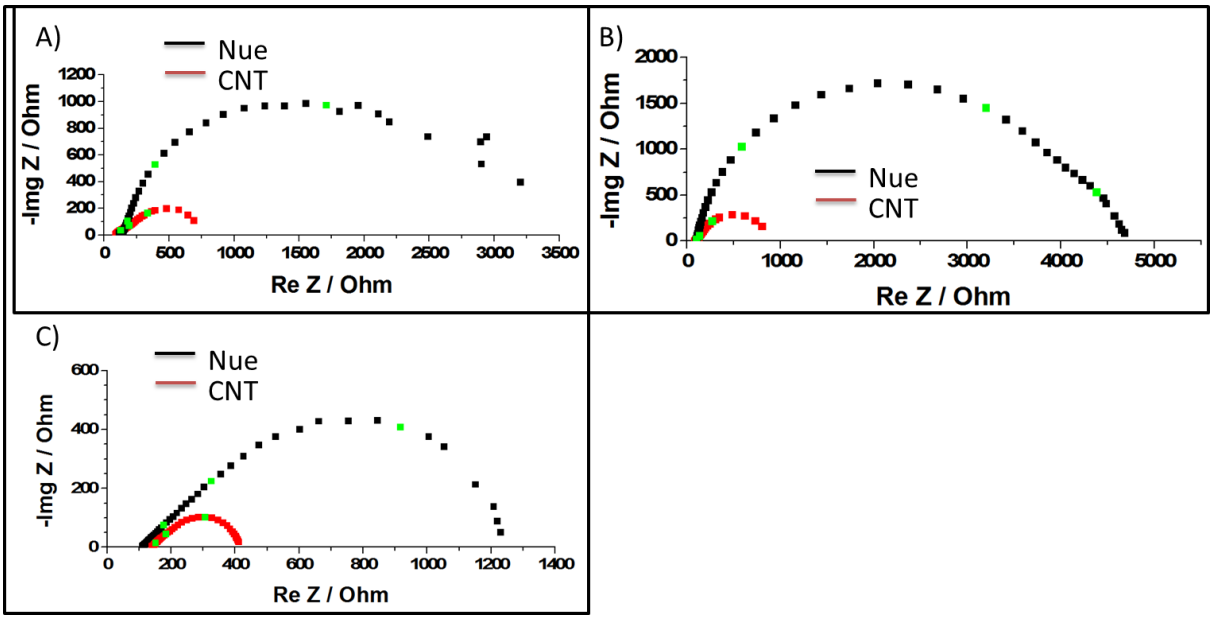


Figure 55: Diagrammes de Nyquist obtenus à partir de l'utilisation de différentes sondes redox avec A) Hydroquinone; B) $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ C) $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Fréquences : 91,6 ; 11,4 ; 1,3 Hz.

La première observation qu'il est possible de tirer de ces diagrammes est que la présence du film de nanotubes diminue l'impédance mesurée quel que soit la sonde utilisée. Concernant les valeurs d'impédance obtenue sur l'électrode nue, il semblerait que le couple $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ soit le moins efficace avec un module d'impédance à 0,2 Hz (dernier point de la courbe) égale à 4683 ohms contre 1232 ohms pour le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ et 3232 ohms pour l'hydroquinone.

Une fois le film de CNT déposé, d'une épaisseur de 4 µm pour chacune des électrodes, les valeurs diminuent jusqu'à 791, 411 et 689 ohms pour respectivement le couple $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$, le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ et l'hydroquinone. Les spectres obtenus pour l'hydroquinone sont cependant peu reproductibles et sont mal définis à plus basse fréquence.

Au vue de ces résultats, le choix de la sonde électrochimique pour la suite des travaux mettant en jeu des films de CNT s'est porté sur le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ puisque celui-ci permet d'obtenir de très faibles valeurs d'impédance et des spectres bien définis et ceci malgré le fait qu'il possède une charge négative.

Comme étudié par Papakonstantinou et al.[236], il existe différentes explications pour ce phénomène qui a déjà été observé entre le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ et les CNT. Premièrement, la présence de fonctions oxygénés à la surface des parois des nanotubes rend les nanotubes plus hydrophiles, permettant ainsi un meilleur contact entre les molécules au sein de la solution aqueuse et la surface des CNT. De plus, il a été montré que la présence d'oxygène au sein de la structure des nanotubes influence grandement les propriétés électriques de ceux-ci. Un nanotube semi-conducteur peut ainsi avoir un comportement de nanotube métallique selon l'influence de l'oxygène sur sa densité électronique[237,238]. Enfin, la cinétique de réaction à l'électrode pour le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ est également influencée par la quantité de bords de nanotubes exposés et liés à des carbones sp^2 [(239)]. Or les nanotubes utilisés présentent de nombreux défauts, comme le montrent les études structurales réalisées, notamment la spectroscopie Raman. De nombreux bords apparents existent donc et permettent une amélioration de la cinétique de réaction du couple ferri/ferrocyanure.

Tous ces paramètres améliorent le transfert électronique et la réaction cinétique du couple redox à l'électrode et peuvent donc être une explication des résultats observés par électrochimie. La suite des études de ce système, notamment l'allure du spectre obtenue par impédance, est présentée dans le chapitre suivant.

b) Réponse électrochimique

Basé sur les résultats précédents, le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ a donc été choisi comme sonde électrochimique pour la suite des travaux présentés dans ce manuscrit mettant en jeu des CNT. Afin d'approfondir les propriétés électrochimiques de ceux-ci, une série de caractérisations a été menée sur les trois films de nanotubes d'épaisseurs différentes. Le but étant d'identifier le film permettant d'obtenir le biocapteur le plus performant.

Pour cela, le film doit offrir non seulement une bonne surface spécifique pour permettre l'adhésion des biorécepteurs, facteur caractérisé par les mesures effectuées précédemment dans la partie caractérisation structurale, mais aussi faciliter le transfert électronique. Ceci se traduit en électrochimie par des courants de pics plus importants, par rapport à l'électrode nue, en CV, et par des valeurs de résistances de transfert de charge faibles en impédance.

Les trois films ont donc été caractérisés électrochimiquement par voltampérométrie cyclique et par EIS après dépôts sur des électrodes de carbone vitreux. La voltampérométrie a été réalisée en utilisant comme sonde redox une solution de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ à 0,1 mol L^{-1} PB (pH 7.0). La Figure 56-A montre clairement que l'intensité du courant électrochimique augmente

lorsque l'épaisseur du film déposé augmente. En effet, le courant de pic cathodique est égal à $-4{,}6\times10^{-5}$, $-1{,}33\times10^{-4}$ et $-2{,}90\times10^{-4}$ A pour des épaisseurs de 1,6, 2,6 et 4,0 µm, respectivement.

Pour l'épaisseur la plus fine (1,6 µm), le courant de pic est très proche de celui obtenu à l'aide de l'électrode de carbone vitreux nue (4.33×10^{-5} A). Ce résultat est en accord avec les études structurales et les mesures de conductivité menées. Cela confirme donc que pour cette épaisseur, la surface est très faiblement recouverte par les nanotubes, conduisant ainsi à une faible augmentation de l'intensité du courant et donc du transfert électronique. Cependant, contrairement à l'électrode nue (ΔEp = 0,413 V), le signal redox obtenu est réversible quel que soit l'épaisseur du film de CNT (ΔEp = 0,140 V pour 1,6 µm; ΔEp = 0,120 V pour 2,6 µm and ΔEp = 0,120 V pour 4,0 µm). Il y a donc bien une augmentation de la surface électrochimique de l'électrode et un transfert d'électrons facilité.

Pour ce qui est des épaisseurs plus importantes (2,6 et 4,0 µm), l'intensité du courant de pic augmente fortement avec des valeurs de $-1{,}33\times10^{-4}$ et $-2{,}90\times10^{-4}$ A par rapport à l'électrode nue. Ceci étant encore une fois en accord avec les observations précédentes. Effectivement, pour ces épaisseurs, les caractérisations préalables ont montré que les nanotubes forment une structure 3D poreuse permettant à la fois la diffusion des espèces en solution jusqu'à l'électrode mais aussi le transfert électronique qui est assuré par les propriétés conductrices des CNT.

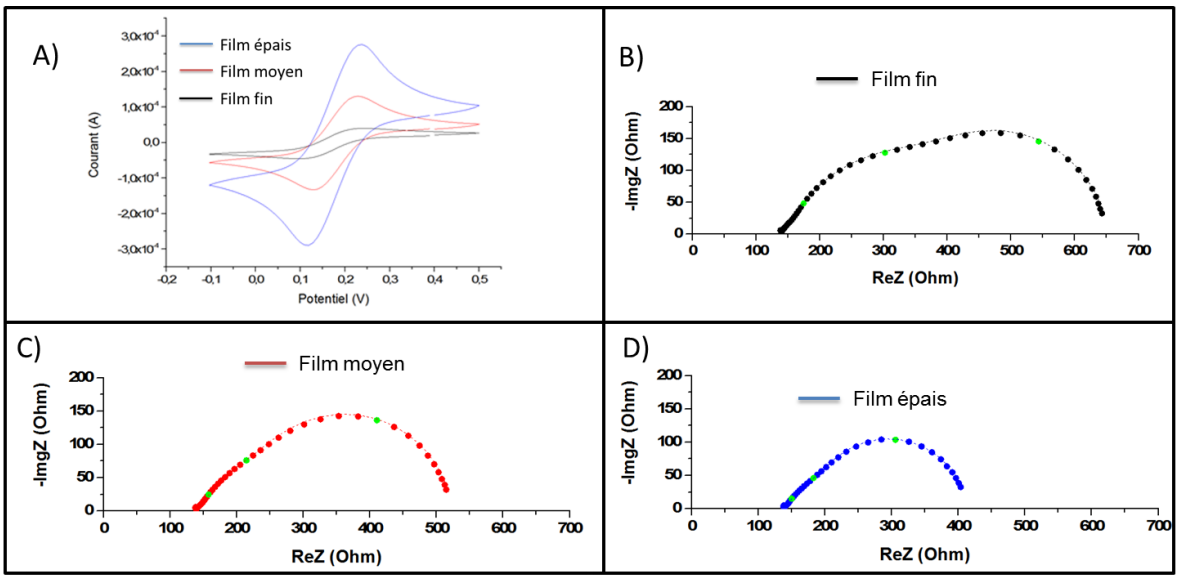


Figure 56: A) Voltampérogrammes cycliques obtenus pour les films de CNT de 1,6 ; 2,6 et 4,0 µm en présence de la sonde $[Fe(CN)_6]^{3-}$ à 0,1 mol L^{-1} PB (pH 7.0) entre -0,1 et 0,5 V à une vitesse de balayage de 0,1 mV.s^{-1}. Diagrammes de Nyquist obtenus pour les films de CNT de 1,6 (B) ; 2,6 (C) et 4,0 µm (D) en présence du couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ à 0,1 mol L^{-1} PB (pH 7.0) à un potentiel appliqué de 0,2 V et une vitesse de rotation de 2000 rpm. Fréquences : 91,6 ; 11,4 ; 1,3 Hz.

Les mesures d'impédance confirment elles aussi ces conclusions. Ces mesures ont été faites en appliquant un potentiel de 0,2 V vs SCE, et en utilisant le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ à 5.10^{-3} mol.L^{-1} dans 0,1 M de PB (pH 7.0). La figure 56-B montre ainsi que l'impédance du système

décroit en fonction de l'augmentation de l'épaisseur du film de CNT. Dans le Tableau 4, les valeurs obtenues à basses fréquences (0,2 Hz) sont indiquées pour chaque épaisseur.

Différents paramètres peuvent être extraits de ces mesures. Le demi-cercle à haute fréquence visible sur le diagramme de Nyquist correspond ainsi au transfert électronique en parallèle d'une capacité de double couche. La boucle à basse fréquence est quant à elle attribuée à l'impédance de Warburg dans le cas d'une couche δ limitant la diffusion. Elle traduit donc la diffusion de la sonde redox au sein du matériau.

Les spectres d'impédance ont ainsi été décrits en utilisant un circuit équivalent composé de la résistance ohmique de la solution et du film (R1), de la résistance du transfert de charge, R2, en série avec l'impédance de Warburg (Ws), elle-même mise en parallèle d'un élément de phase constante, CPE (Figure 57)[240,241]. Cet élément a été choisi plutôt qu'une capacité de double couche classique afin de prendre en compte l'inhomogénéité de la surface, traduite par la rugosité Ra calculée auparavant. L'impédance de Warburg prend quant à elle en compte la diffusion de la sonde redox à travers le matériau.

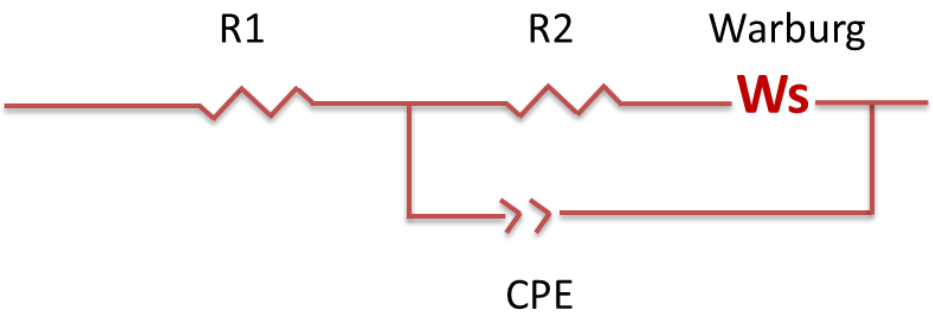


Figure 57: Représentation schématique du circuit équivalent du système électrochimique.

Pour remonter à la valeur de la capacité de double couche à partir de CPE, la formule suivante a été appliquée :

$$C_{DC} = CPE^{n} * R_2^{((\frac{1}{n})-1)}$$

Où C_{DC} représente la valeur de la capacité de double couche en Farad, CPE celle de l'élément de phase constant et R_2 la résistance de transfert de charge en ohm. Le facteur n est quant à lui un paramètre lié à la géométrie du demi-cercle dans la représentation de Nyquist et est compris entre 0 et 1. Si n est égal à 1, alors le CPE devient en théorie un condensateur classique, C[242].

Les courbes de corrélation calculées à partir de ces éléments sont représentées sur la Figure 56 (courbes en pointillé). On peut voir que la corrélation obtenue entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées à l'aide du modèle électrique est très bonne (R^2 = 0,98). L'ensemble des paramètres calculés est répertorié dans le Tableau 4 avec: la résistance de transfert de charge R_2, la capacité de double couche C_{DC} (obtenue d'après les valeurs de CPE) et enfin l'impédance de Warburg Ws.

Tableau 4: Paramètres déterminés par corrélation des spectres d'impédance, calculés à partir du circuit équivalent présenté au sein de la Figure 57.

	GCE / CNT		
Epaisseur du film	1,6 µm	2,6 µm	4,0 µm
$I_{p,cath}$ /A	$-4,6.10^{-5}$	$-1,33.10^{-4}$	$-2,90.10^{-4}$
$Z_{0.2\ Hz}$ / ohm	674	527	404
R_2 / ohm	264 ± 4	98 ± 2	39 ± 1
C_{DC} / µF	38.3 ± 0.6	70 ± 2	92 ± 2
Ws / ohm	240 ± 4	277± 5	230 ± 4

Si la résistance de diffusion reste du même ordre de grandeur pour les différents films de CNT, la résistance de transfert électronique diminue pour sa part grandement lorsque l'épaisseur augmente. De plus, pour la plus forte épaisseur, les deux boucles du spectre d'impédance, correspondant à la résistance de transfert et à l'impédance de Warburg, sont quasiment confondues, confirmant donc que le transfert électronique est facilité par les films de nanotubes. En effet, le transfert électronique étant trop rapide et sa valeur étant relativement faible par rapport à celle de la résistance de diffusion (39 ohms contre 230 ohms pour le film le plus épais), le demi-cercle apporté par la contribution de R_2 est donc recouvert par celui traduisant la résistance de diffusion. C'est pourquoi le diagramme de Nyquist ne présente pas deux demi-cercles distincts mais bien une seule boucle, résultant des deux contributions et présentant donc une courbure déformée.

Concernant la capacité de double couche, les valeurs obtenues sont particulièrement élevées mais sont en accord avec le fait que l'interface électrochimique disponible est très importante grâce à la présence des CNT en surface. La capacité de double couche possède habituellement une valeur de l'ordre de 20 $\mu F.cm^{-2}$ en milieu aqueux[243–245]. Dans le cadre de ce système, une surface électroactive de 4,6 cm² (92 µF / 20 µF) est donc estimée pour le film de 4 µm d'épaisseur. En prenant en compte la surface du carbone vitreux qui est de 0,07cm^2 (3 mm de diamètre), la surface active du matériau est ainsi multipliée 66 fois grâce à la présence des nanotubes et au caractère poreux de la structure. Pour ce qui est des films d'une épaisseur de 2,6 et 1,6 µm, des surfaces électroactives de 3,5 et 1,9 cm² ont été déterminées respectivement.

Conclusion

Suite aux différentes caractérisations réalisées sur les films de nanotubes d'épaisseurs variées, nous avons conclu que le film possédant une épaisseur de 4,0 µm semblait être le plus adapté pour l'intégration de ce matériau dans la construction d'un biocapteur.

En effet, ce film présente les meilleures propriétés en termes de conductivité, de reproductibilité ou encore de transfert électronique par rapport à des films d'épaisseurs inférieures. C'est pourquoi il sera utilisé par la suite comme le film optimal lors de la réalisation de biocapteurs.

Nous avons également pu constater que la couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ semble être le plus indiqué pour être utilisé comme sonde redox en présence de nanotubes de carbone.

B. Conception et caractérisation d'un film de nanobâtonnets de WS_2

Une seconde famille de matériaux novateurs, à base de dichalcogénures de métaux de transition, et plus précisément de disulfure de tungstène (WS_2), a également été étudiée en vue d'être intégrée dans la conception de biocapteurs.

Suite à une collaboration avec le professeur Lellouche, de l'université de Bar-Ilan (Israël), différents échantillons de ce matériau ont été reçus pour être analysés structurellement et électrochimiquement. Présentés initialement comme étant des nanotubes, trois variétés de ce matériau possédant divers types de fonctionnalisations ont été étudiées (Figure 58)[233]. La première est simplement constituée d'un arrangement d'atome de souffre et de tungstène, formant une structure de disulfure de tungstène non fonctionnalisé. La seconde a été modifiée à l'aide de fonctions acides carboxyliques afin de former une couche hydrophile en surface du matériau en plus d'introduire une fonction réactive. Enfin la dernière variété a été fonctionnalisée par des fonctions thiophènes, formant ainsi une coquille nucléophile en surface. De plus ces unités thiophènes sont polymérisables.

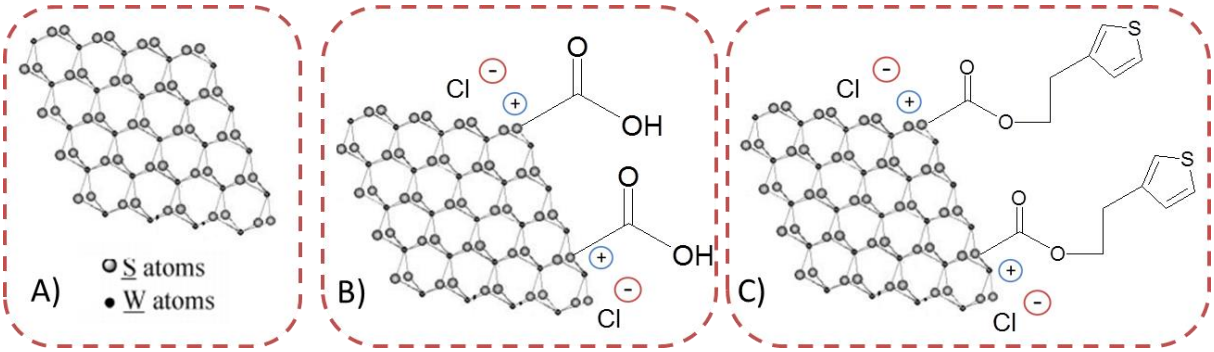


Figure 58: Représentation schématique de la structure des trois différents types de matériau à base de disulfure de tungstène avec A) WS_2 non fonctionnalisés; B) WS_2 fonctionnalisés par des acides carboxyliques et C) WS_2 fonctionnalisés par une fonction thiophène.

Ces trois espèces ont été caractérisées de la même manière que l'ont été les films de CNT présentés dans le chapitre précédent. Ainsi, une technique de formation de couche mince de disulfure de tungstène, légèrement différente de celle utilisée pour les CNT, a été mise au point.

Les films ainsi formés ont ensuite été observés structurellement et électrochimiquement par différentes techniques d'analyse dans le but d'être intégrés dans la conception de biocapteurs. Ces matériaux étant jusqu'alors inconnus au sein du laboratoire, une attention particulière a été portée sur l'étude de leur propriété de semi-conducteur et sur leur réponse électrochimique.

1. Méthode de réalisation de films de nanobâtonnets de WS_2

Le matériau étant initialement sous forme de fines particules, deux approches ont été suivies pour réaliser des couches minces de ce dernier afin de pouvoir les intégrer dans la construction d'une architecture d'électrode.

La première est calquée sur la technique de réalisation des films minces de CNT. Le même protocole a donc été suivi avec en premier lieu la dispersion de 5 mg des différentes variétés de WS_2 par sonication (30m), puis la filtration du surnageant de la solution réalisée sur un filtre de cellulose après 24h de repos.

La seconde prend, quant à elle, en compte la solubilité des particules inorganiques de WS_2 en milieu aqueux. En effet, celle-ci est bien supérieure à celle des nanotubes de carbone. Il est donc possible de réaliser une suspension de ces particules de disulfure de tungstène dans l'eau sans avoir recourt à la sonication et en utilisant une quantité plus importante de matières. Pour cela, 15 mg de poudre sont dispersés par agitation mécanique dans 1 L d'eau distillée. La solution est laissée reposer une heure pour permettre la sédimentation d'éventuels agrégats. Le surnageant est ensuite récupéré pour procéder à la filtration.

Comme le montre la Figure 59, la solubilité des différentes particules n'est pas la même de par leur fonctionnalisation respective (teintes différentes dues à la présence plus ou moins importante de particules en suspension). En effet, la présence d'une coquille de fonctions carboxyliques permet une meilleure solubilisation dans l'eau des particules de WS_2 par rapport à celles ne présentant pas de fonctionnalisation. Ces différences de solubilité induiront donc une différence dans la quantité de matière filtrée par la suite.

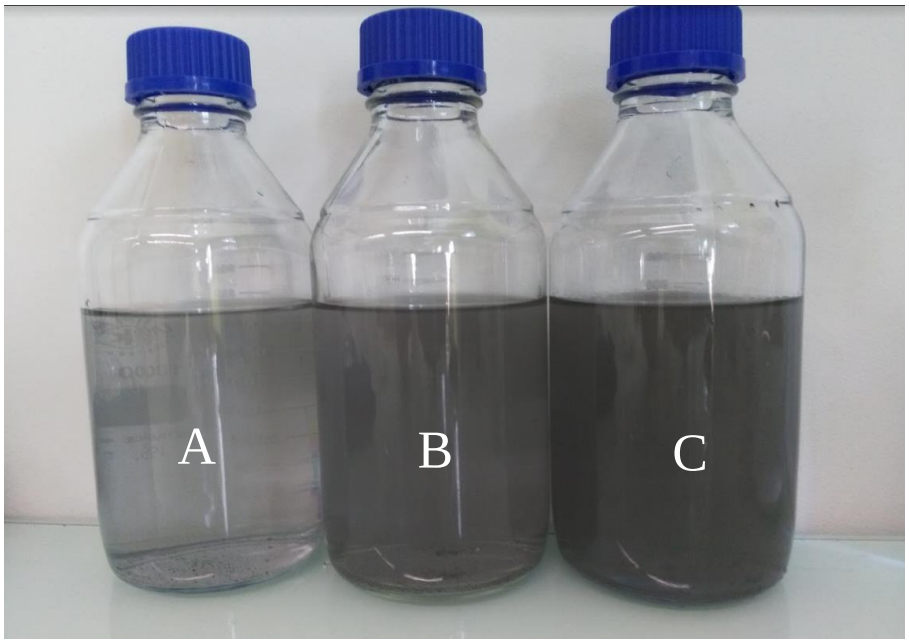


Figure 59: Photographie des particules de disulfure de tungstène en suspension dans l'eau ; A) sans fonctionnalisation, B) fonctionnalisés par des groupes thiophène et C) fonctionnalisés avec des fonctions acides carboxyliques.

L'image montre, comme attendu, que les WS_2 fonctionnalisés par des acides carboxyliques présentent une meilleure solubilité dans l'eau que les deux autres types de particules (teinte plus foncée). Cette fonctionnalisation permet donc effectivement l'enrobage des particules par une coquille hydrophile. Le matériau à base de WS_2 fonctionnalisés par une fonction thiophène semble également être plus soluble que les WS_2 non fonctionnalisés. Cela peut venir de la présence des atomes d'oxygène présents au sein de la structure (Figure 58-C).

Pour les deux approches, le volume filtré est différent (500 mL avec ultrason, 250 mL pour la suspension par agitation mécanique). A l'inverse la technique de dépôt des films sur la surface de l'électrode de carbone vitreux par dissolution de la cellulose est gardée constante pour les deux méthodes. Il est important de noter que ces films de disulfure de tungstène sont beaucoup moins stables que les films de nanotubes de carbone. Ainsi ils se désagrègent facilement sous l'action du lavage à l'acétone. Leur transfert à la surface d'électrode doit donc se faire avec une attention d'autant plus grande et des lavages doux (rinçage à l'aide de pipette pasteur).

2. Caractérisation structurale

Comme dans le cas des CNT, plusieurs caractérisations structurales ont été réalisées. Les premières, obtenues par microscopie électronique à balayage, visaient à déterminer la structure de ce matériau (nanoparticules, nanotubes etc…) par analyse des poudres avant modification. En effet, peu de caractérisations avaient été menées sur ces échantillons et leur structure n'était donc pas clairement établie. La suite des analyses a été conduite directement sur les matériaux sous forme de films minces afin de déterminer l'épaisseur, la conductivité et la reproductibilité de ceux-ci.

a) Caractérisation par microscopie électronique à balayage

L'analyse MEB a donc dans un premier temps été réalisée sur les échantillons bruts, toujours sous forme de particules, et non sur les films minces. Les trois différentes variétés de WS_2 ont été observées afin de déterminer si la fonctionnalisation du matériau engendrait une quelconque modification de sa structure. Les particules ont été, au préalable, recouvertes d'une couche de palladium afin d'assurer la conductivité de ceux-ci et permettre leur observation par microscopie électronique à balayage. Les clichés pris à différents grossissements (x5000 et x20000) sont présentés ci-dessous (Figure 60).

Ces premières images montrent tout d'abord que le matériau n'est pas synthétisé sous forme de nanotube mais plutôt sous forme de nano-bâtonnet. En effet, il ne présente pas une structure creuse de type tubulaire et semble plutôt constitué d'un enroulement lamellaire de feuillets de WS_2. Cette structure lamellaire est caractérisée par la présence de résidus à la surface et aux extrémités des bâtonnets qui laissent penser que ceux-ci sont formés de différentes couches de WS_2 (cercles rouges sur la Figure 60). Pour ce qui est de leur dimension, ces nano-bâtonnets sont de longueurs variables, entre 1 et 10 µm, et possèdent un diamètre de 100 à 200 nm. Enfin, ils ne présentent pas d'arrangement particulier entre eux, et sont donc disposés de façon aléatoire au sein du matériau.

Concernant les fonctionnalisations, elles ne semblent pas influer la structure du matériau puisque celui-ci garde les mêmes dimensions en termes d'épaisseur, de longueur et de diamètre.

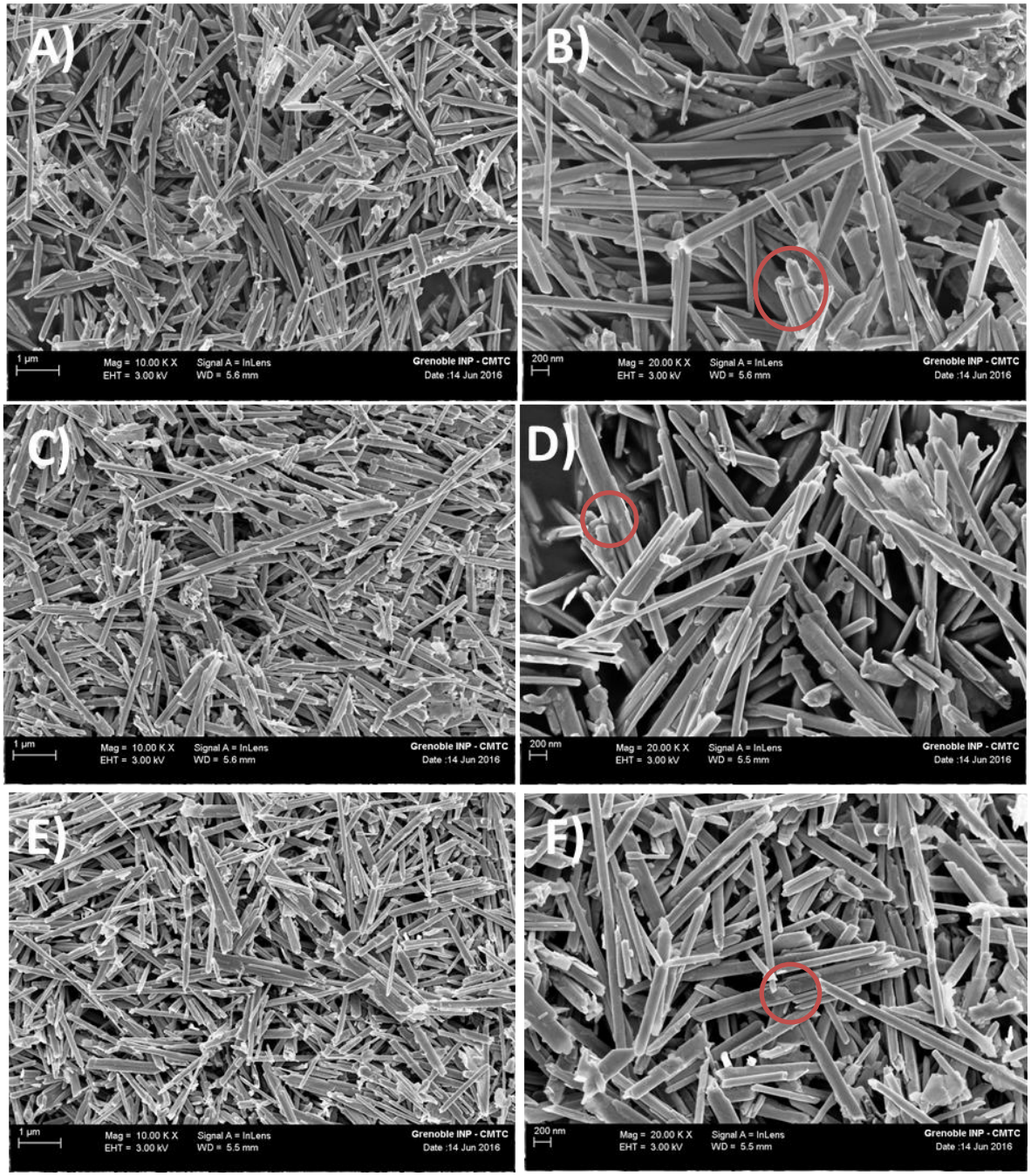


Figure 60: clichés réalisés par microscopie électronique à balayage à un grossissement de x10000 et x20000 sur des échantillons non traité de disulfure de tungstène non fonctionnalisé (A ; B), fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques (C ; D) et fonctionnalisés par des groupements thiophènes (E ; F).

Des clichés ont également été faits sur les nanobatônnets après que ceux-ci aient été soumis à un bain d'ultrasons (10 min) afin de déterminer l'impact de ce traitement sur la structure des bâtonnets. En effet ne connaissant pas la résistance mécanique de ces composés, une longue exposition à des ultrasons peut entrainer des cassures ou des modifications de la forme du

matériau. Les images A et B de la Figure 61 montrent ainsi le matériau avant traitement et simplement mis en solution dans l'eau et les images C et D, le matériau ayant été soumis aux ultrasons.

On peut voir sur ces clichés que l'usage d'ultrason s'avère ne pas détériorer les nanobatônnets puisqu'ils conservent leur dimension et leur arrangement d'origine. De plus on retrouve encore une fois la formation lamellaire avec la présence de plusieurs couches à l'intérieur d'un nanobatônnet.

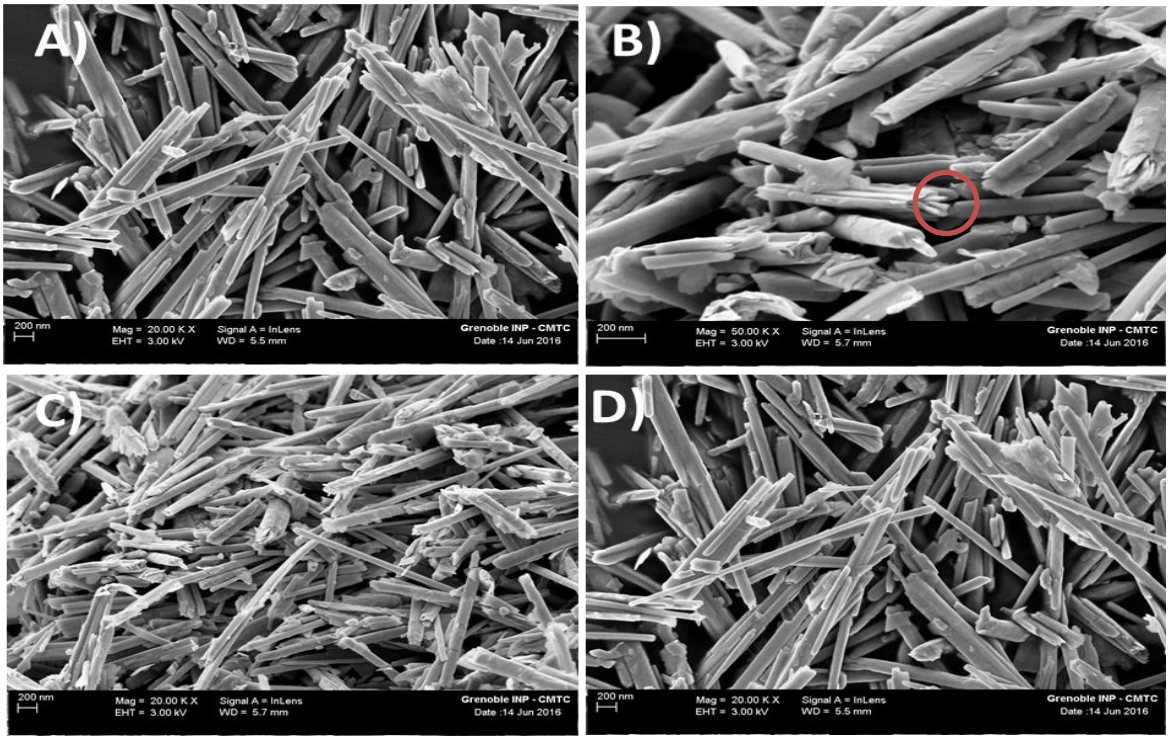


Figure 61: clichés réalisés par microscopie électronique à balayage à un grossissement de x20000 et x50000 sur des échantillons de disulfure de tungstène fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques avant (A ; B) et après sonication (C ; D).

La dernière partie de l'étude de ces composés par usage du MEB porte sur la caractérisation des films minces réalisés après filtration de la suspension dans l'eau des différentes variétés de WS_2. L'intérêt est ici de déterminer l'arrangement selon lequel les nanobâtonnets s'organisent pour former le film. Dans les clichés présentés précédemment ceux-ci ne possèdent aucun arrangement déterminé et sont répartis de façons aléatoires sans connexion entre eux.

Sur les clichés présentés dans la Figure 62, la disposition des bâtonnets indiquent la présence de deux formes sous laquelle ils s'agglomèrent. La première (cliché A) montre la formation d'une structure poreuse en trois dimensions, constituée de nanobâtonnets interconnectés entre eux contre le montre l'image B. La seconde configuration du matériau se présente comme un agglomérat d'une multitude de bâtonnets, formant des pelotes de plusieurs dizaines de micromètres pour les plus importantes à seulement 7-8 µm pour les plus fines. La première

structure semble cependant être majoritaire avec la présence de larges zones de ce type et forme donc la plus grande partie de la structure des films minces réalisés.

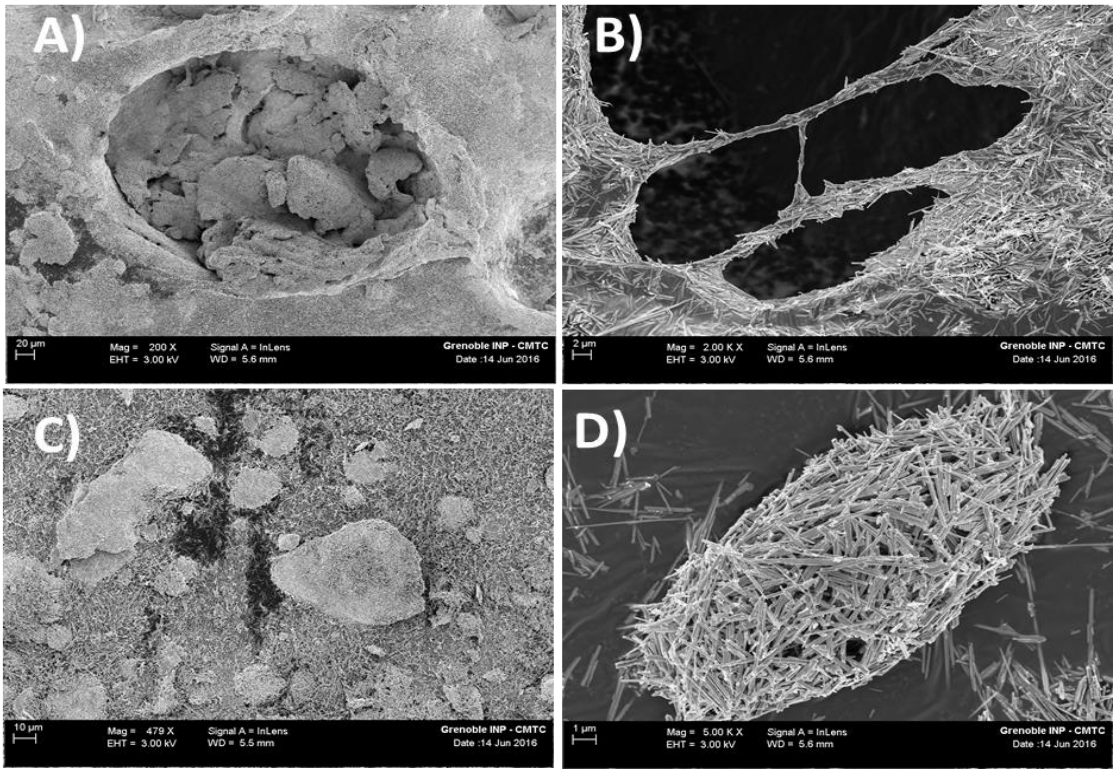


Figure 62: clichés réalisés par microscopie électronique à balayage à un faible grossissement sur des échantillons de disulfure de tungstène fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques et mis sous forme de films minces.

Suite à ces observations, la technique de réalisation de films minces sans utilisation d'ultrasons a été privilégiée. En effet cette technique permet la réalisation d'un plus grand nombre de films (volume filtré moins important) et est également plus simple en mettre en œuvre. La suite des caractérisations et des différentes expériences menées sur les nanobâtonnets de WS_2 ont donc toutes été faites sur ce type de films.

b) Caractérisation par microscopie laser

La seconde caractérisation structurale a été réalisée par microscopie laser. Comme dans le cas des CNT, cette étude visait à déterminer l'épaisseur et la morphologie de surface des différents films de WS_2 formés à partir des trois variétés du matériau. Les films ont préalablement été déposés sur substrat d'or afin de permettre leur caractérisation.

La Figure 63 présente l'étude concernant la rugosité et la morphologie de surface des films de disulfure de tungstène fonctionnalisés par des fonctions acides carboxyliques. Les clichés réalisés pour les deux autres types de nanobâtonnets ne sont pas montrés mais les paramètres déterminés pour les trois types de films sont reportés dans le Tableau 5.

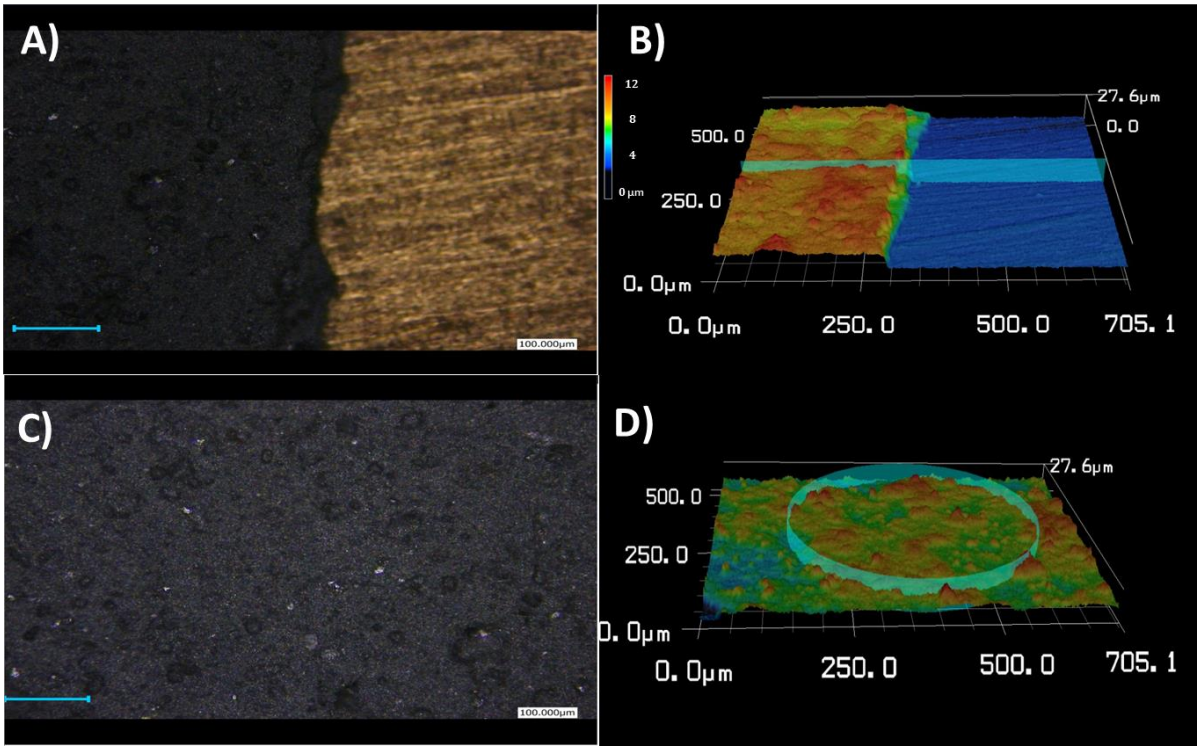


Figure 63: Clichés réalisés par microscopie laser sur un film de WS_2 fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques avec A) une vue 2D à la limite film-substrat ; B) la cartographie 3D à la limite film substrat ; C) la vue 2D à la surface du film et D) la cartographie 3D à la surface du film.

Pour ce qui est de l'épaisseur, celle-ci a été déterminée de la même façon que l'a été celle des nanotubes de carbone, c'est-à-dire par différence entre l'épaisseur du substrat et celle de l'échantillon. La rugosité a elle été calculée sur une large zone de l'échantillon (Figure 63-C/D). Les résultats correspondant au calcul de l'épaisseur mais aussi de la rugosité Ra ainsi que la reproductibilité des films (RSD) sont compilés au sein du Tableau 5. Pour chaque type de matériau, les résultats correspondent à la moyenne calculée à partir de trois échantillons.

Tableau 5 : Paramètres structuraux déterminés par microscopie laser pour les différents matériaux à base de disulfure de tungstène obtenus par filtration de 250 mL de solution (Epaisseur du film, rugosité Ra et reproductibilité).

Type de matériau	WS_2	WS_2-Thiophène	WS_2-COOH
Epaisseur du film	3,7 µm	5,0 µm	6,2 µm
Rugosité Ra	± 0,8 µm	± 0,4 µm	± 0,6 µm
RSD	± 9 %	± 5 %	± 6 %

Les valeurs d'épaisseur des films correspondent aux observations faîtes au niveau de la solubilité des différentes particules dans l'eau. En effet, les films faits à partir des bâtonnets fonctionnalisés par les groupements acides carboxyliques ou thiophènes permettent la formation de films plus épais (6,2 et 5,0 µm respectivement) que les films à base de WS_2 purs.

Concernant la rugosité des films, les films obtenus à partir de disulfure de tungstène fonctionnalisés possèdent une rugosité relativement faible de l'ordre de 10% par rapport à l'épaisseur du film (± 0,6 µm et ± 0,4 µm pour WS_2-COOH et WS_2-Thiophène). A l'inverse, celle du film de WS_2 est plus élevée avec une valeur de ± 0,8 µm. Le fait que ce dernier film soit beaucoup moins épais que les deux autres peut expliquer cette rugosité plus importante. En effet, la quantité de matière déposée lors de la filtration sur la membrane de cellulose étant plus faible, la porosité est sans doute plus importante sur ce film que sur les deux autres, d'où une rugosité plus élevée.

c) Caractérisation par spectroscopie Raman

A l'image du travail réalisé sur les CNT, une étude par spectroscopie Raman a été menée sur les différents échantillons de WS_2. Pour cela, ces derniers ont été déposés sur un substrat d'or avant d'être analysés. La Figure 64 ci-dessous montre le spectre obtenu pour le film de WS_2 non fonctionnalisé.

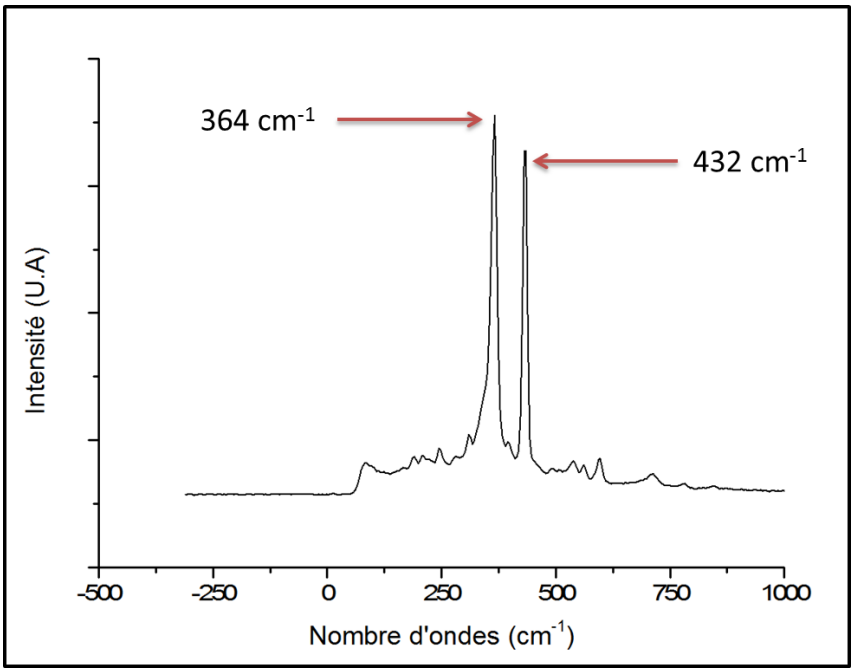


Figure 64: Spectre Raman obtenu pour le film de WS_2 non fonctionnalisé.

Les pics visibles à 364 et 432 cm-1 correspondent d'après la littérature aux orbitales E_{2g} et A_{1g} caractéristiques de la structure du WS_2 [246,247]. Ils confirment donc la composition du matériau. Des spectres ont également été réalisés sur les films porteurs des fonctions acides carboxyliques et thiophènes mais celles-ci n'ont pas pu être observées par Raman, les spectres obtenus présentant le même profil que celui obtenu pour le film de WS_2 non fonctionnalisé.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la couche de molécules enrobant les nanobâtonnets, résultant de leur fonctionnalisation, est très mince. Or, l'exposition des échantillons à un rayonnement laser semble altérer le matériau (diminution de l'intensité des pics durant la manipulation). La couche de fonctions acides carboxyliques ou thiophènes a donc pu être détruite avant d'être caractérisée.

d) Mesure de conductivité

La conductivité des films a été mesurée à l'aide de la méthode quatre pointes présentée auparavant. Une étude préalable a montré que le disulfure de tungstène est un matériau semi-conducteur dans une gamme de potentiel autour de 3V. Cependant ce potentiel est trop élevé pour être appliqué en électrochimie (oxydation de l'eau). C'est pourquoi lors de cette étude, le matériau a été testé dans une gamme plus basse, entre 0 et 2V afin de déterminer sa conductivité dans un domaine exploitable en électrochimie.

Les courbes résultantes de ces analyses, menées sur les trois variétés de WS_2, sont présentées sur la Figure 65.

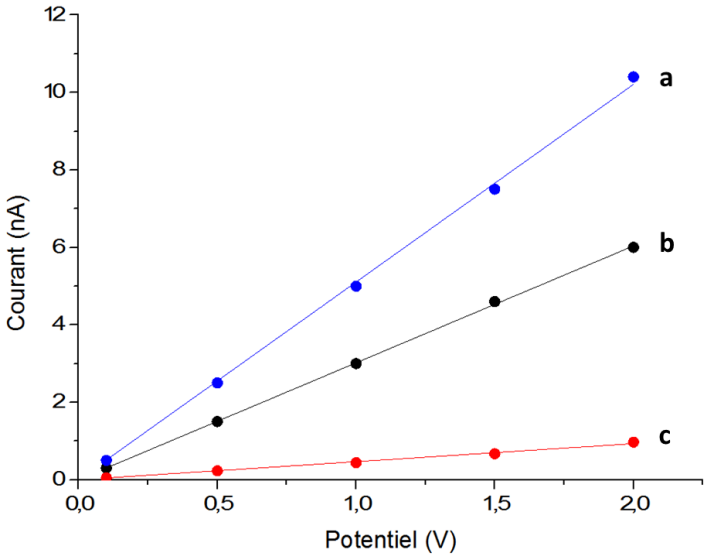


Figure 65: Courbes présentant l'évolution du courant en fonction du potentiel appliqué pour les films minces réalisés à partir de nanobâtonnets disulfure de tungstène non fonctionnalisé (a), fonctionnalisés par des groupements thiophènes (b) et fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques (c).

Le courant obtenu sur la gamme de potentiel étudié est très faible (nA), à titre de comparaison les CNT présentaient pour leur part un courant d'environ 800 µA pour un potentiel appliqué de 1V. De plus les valeurs de résistance correspondantes sont, elles, de l'ordre de plusieurs millions d'ohm. Malgré le fait qu'il appartienne à la famille des semi-conducteurs, ce matériau peut donc être considéré comme étant non-conducteur dans la plage de potentiel étudié, avec des valeurs de conductivité de $1{,}7.10^{-06}$; $1{,}6.10^{-07}$ et $2{,}2.10^{-06}$ $S.cm^{-1}$ pour les nanobâtonnets disulfure de tungstène non fonctionnalisé, fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques et fonctionnalisés par des groupements thiophènes respectivement.

3. Caractérisation électrochimique

Malgré le fait que ce matériau ne soit pas conducteur dans la plage de potentiel électrochimique, des caractérisations électrochimiques ont tout de même été menées sur celui-ci. En effet, en dépit de leur manque de conductivité, ce matériau garde un intérêt certain pour leur utilisation comme matrice pour l'immobilisation de biomolécules. La grande surface spécifique offerte par les nanobâtonnets, la structure poreuse des films minces permettant la

diffusion d'espèces en leur sein ou encore la présence de fonctions réactives à leur surface sont des avantages certains dans la réalisation de biocapteur. De plus leur réponse électrochimique n'étant pas connue, les différents films ont été analysés en présence de solvant organique, dans l'eau mais aussi en présence de différentes sondes électrochimiques pour étudier leur comportement. Enfin, dans l'optique d'une utilisation du matériau dans la conception de biocapteurs, différentes cibles d'intérêt tels que le catéchol, l'urée ou encore l'aspartame ont été testées.

a) Caractérisation en milieu organique

Les nanobâtonnets ont tout d'abord été caractérisés en milieu organique dans l'acétonitrile. Pour cela, une solution de CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} de Tetrabutylammonium Perchlorate (TBAP) a été réalisée. La caractérisation a été faite en voltampérométrie cyclique en utilisant une cellule électrochimique conventionnelle à trois électrodes avec une électrode Ag^+/Ag utilisée en tant qu'électrode de référence, un fil de platine utilisé comme contre-électrode et une électrode de carbone vitreux modifiée par les films de WS_2 comme électrode de travail.

Afin de connaître leur réponse électrochimique dans ce milieu, une large gamme de potentiel a été balayée, entre -2V et +1 V à une vitesse de balayage de 0,1 V/S et la solution a été dégazée sous argon avant chaque mesure. Les voltampérogrammes correspondants sont présentés au sein de la Figure 66 ci-dessous.

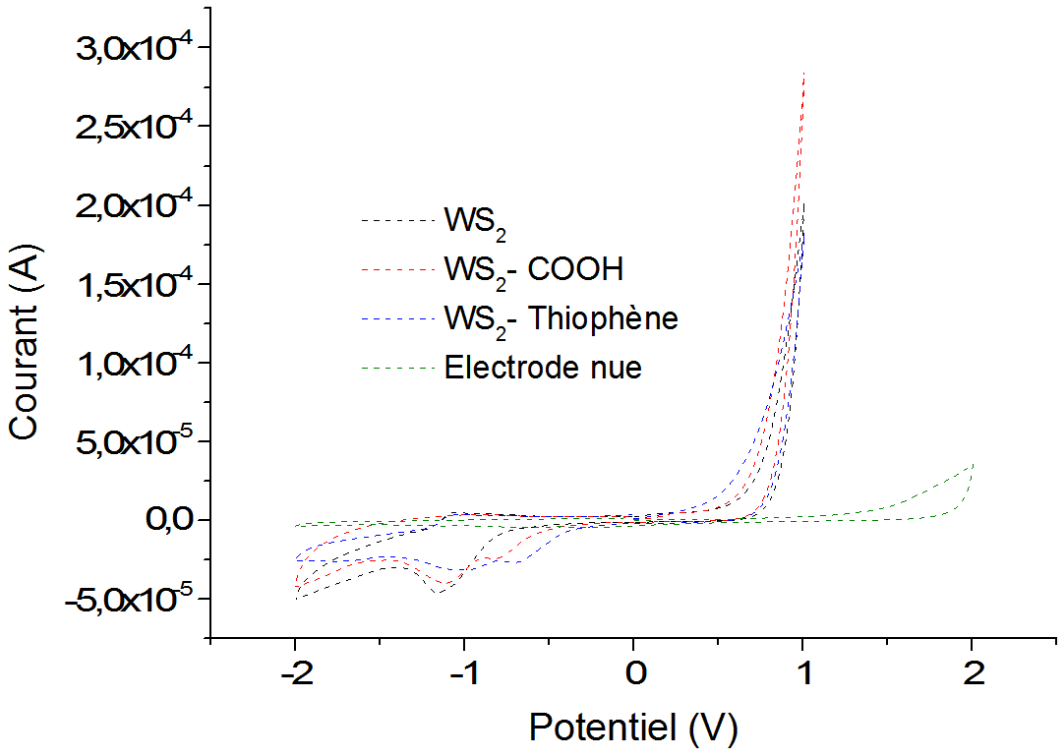


Figure 66: Voltampérogrammes cycliques dans CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} TBAP sur différentes couches de disulfure de tungstène déposées sur électrode de carbone vitreux et sur une électrode de carbone vitreux nue, vb = 100 mV.s^{-1}

Les courbes de voltampérométrie cyclique des différents films proposent une allure similaire entre les trois matériaux. La présence de deux pics de réduction peut ainsi être observée, le premier aux alentours de -0,6 V et le second aux alentours de -1,2 V. De plus, un pic d'oxydation est également visible pour les trois espèces à un potentiel supérieur à 0,8 V. Les pics anodiques présentent cependant de légères variations en termes de potentiel et d'intensité. C'est pourquoi une étude a été réalisée sur les trois différents films de WS_2 en réalisant différentes CV dans plusieurs gammes de potentiel et en opérant plusieurs cycles pour suivre l'évolution des pics observés.

La Figure 67 présente les voltampérogrammes réalisés à partir des WS_2-COOH et des WS_2-Thiophène pour des valeurs de potentiel comprises entre -2 et +2 V (Figure 67-A/C) et entre -2 et 0 V (Figure 67-B/D). Le comportement des WS_2 non fonctionnalisés étant très similaire à ceux des WS_2-COOH, leur voltampérogrammes ne sont pas présentés ici.

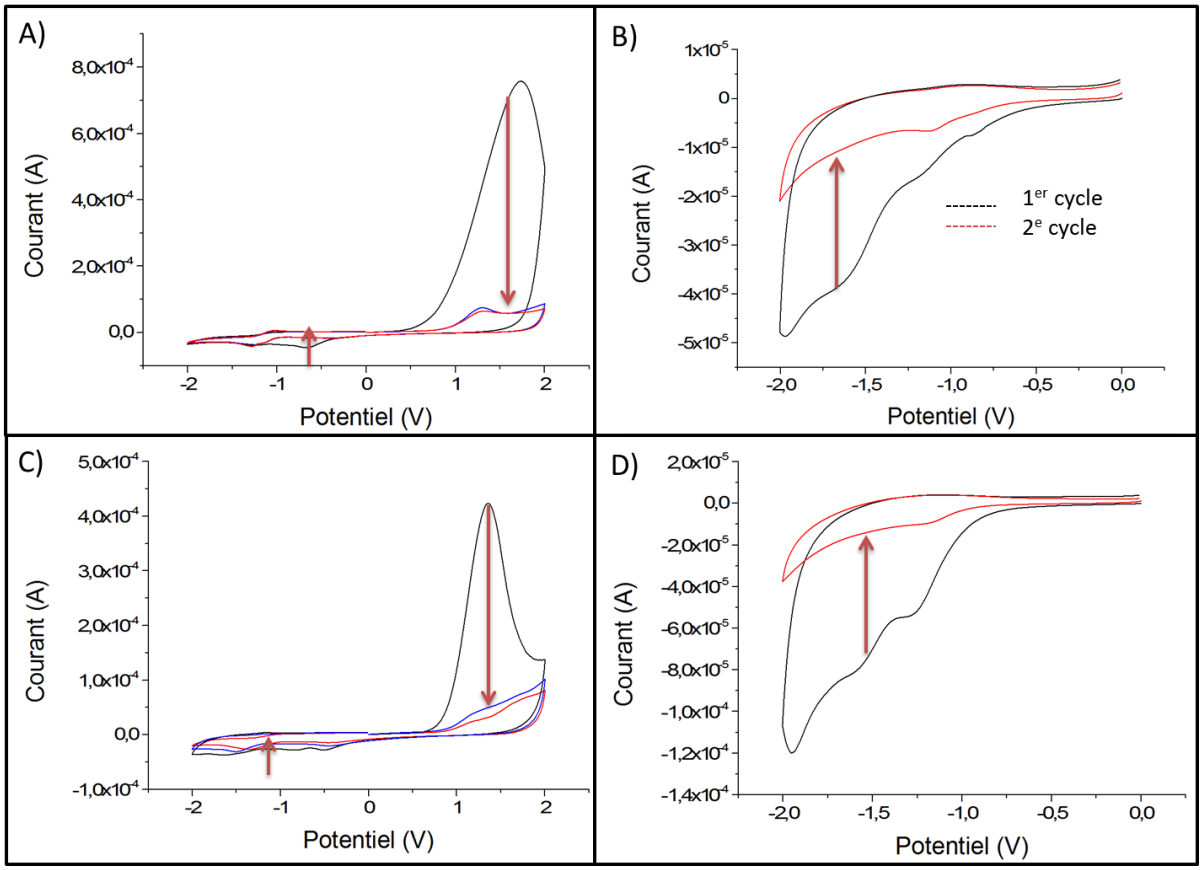


Figure 67: Voltampérogrammes cycliques dans CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} TBAP sur A) et B) une couche de disulfure de tungstène fonctionnalisée par des groupements acides carboxyliques déposée sur électrode de carbone vitreux ; C) et D) une couche de disulfure de tungstène fonctionnalisée par des groupements thiophène déposée sur électrode de carbone vitreux , vb = 100 mV.s^{-1}.

Le premier voltampérogramme montre l'évolution du comportement électrochimique après trois cycles réalisés entre -2 V et +2 V du film de WS_2-COOH. Le pic anodique présent à 1,3 V décroit fortement après le premier cycle, passant d'une valeur de 7,6.10^{-4} à 7,0.10^{-5} A lors du second cycle. Il semble se stabiliser lors des cycles suivants. Ce pic d'oxydation peut être associé, selon Pumera et al.[248], à l'oxydation irréversible du matériau conduisant à l'obtention

d'un composé de formule WO_4^{2-}. Le second voltampérogramme (Figure 67-B) se focalise lui sur le suivi du comportement des pics de réduction présents à des potentiels négatifs. Ces signaux semblent être eux aussi éliminés après le premier cycle (peu de variation par la suite). Il pourrait donc s'agir de résidus de différents composés ayant pu s'adsorber à la surface du matériau lors de leur synthèse ou une désorption de l'hydrogène présent au sein du matériau suivant le mécanisme de Volmer–Heyrovsky[249]. Les matériaux à base de WS_2 non fonctionnalisés et de WS_2-COOH ne possèdent donc pas de réponse électrochimique en milieu organique lors de leur analyse par CV.

Pour ce qui est des WS_2-Thiophène, le même comportement est observé avec la diminution du pic lié à l'oxydation des nano-bâtonnets ou à celui lié à la présence de résidus hydrogénés lors du premier cycle. Cependant, on observe également l'apparition d'un signal en oxydation à 1,4 V et en réduction à -1,3 V à partir du 2e ou 3e cycle (Figure 68). Ces signaux augmentent pour les premiers cycles appliqués sur ce film puis restent stable au cours des suivants. Il pourrait donc traduire l'apparition d'un polymère formé par la polymérisation des thiophènes. En effet le potentiel nécessaire à l'activation de la polymérisation des thiophène est relativement haut (1,2 à 1,4 V)[250,251] ce qui correspondrait donc avec le signal observé à 1,4 V. Le fait que le signal cesse de croître rapidement peut s'expliquer par le fait qu'une faible partie des fonctions thiophènes soit accessible. En effet, après le 5e cycle il n'y a plus d'augmentation du signal, traduisant le fait que la polymérisation ne peut plus se poursuivre par manque de monomères.

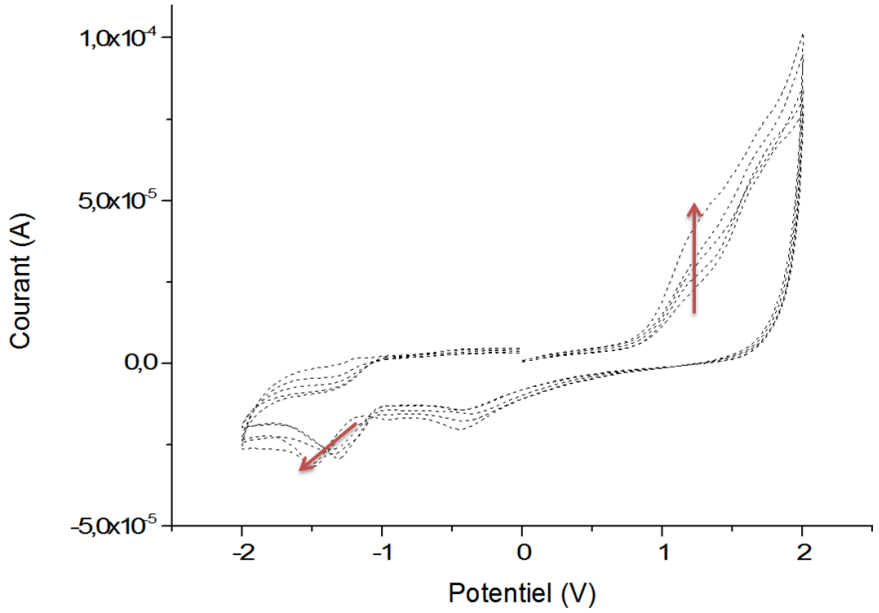


Figure 68: Polymérisation par voltampérométrie cyclique dans CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} TBAP sur une couche de disulfure de tungstène fonctionnalisée par des groupements thiophène déposée sur électrode de carbone vitreux , vb = 100 mV.s^{-1}.

b) Caractérisation en milieu aqueux

Le comportement électrochimique des nanobâtonnets de WS_2 a aussi été observé en milieu aqueux dans du tampon phosphate pH 7,0 à 0,1 mol.L^{-1}. La Figure 69 montre les voltampérogrammes obtenus après un et deux cycles pour l'électrode de carbone vitreux nue (Figure 69-A) et pour les différents films de WS_2 avec une couche de WS_2 non fonctionnalisée ((Figure 69-B); une couche WS_2 fonctionnalisée par des groupements acides carboxyliques (Figure 69-C) et une couche de disulfure de tungstène fonctionnalisée par des groupements thiophène (Figure 69-D). Les potentiels indiqués sont mesurés par rapport à une électrode au calomel saturée en KCl.

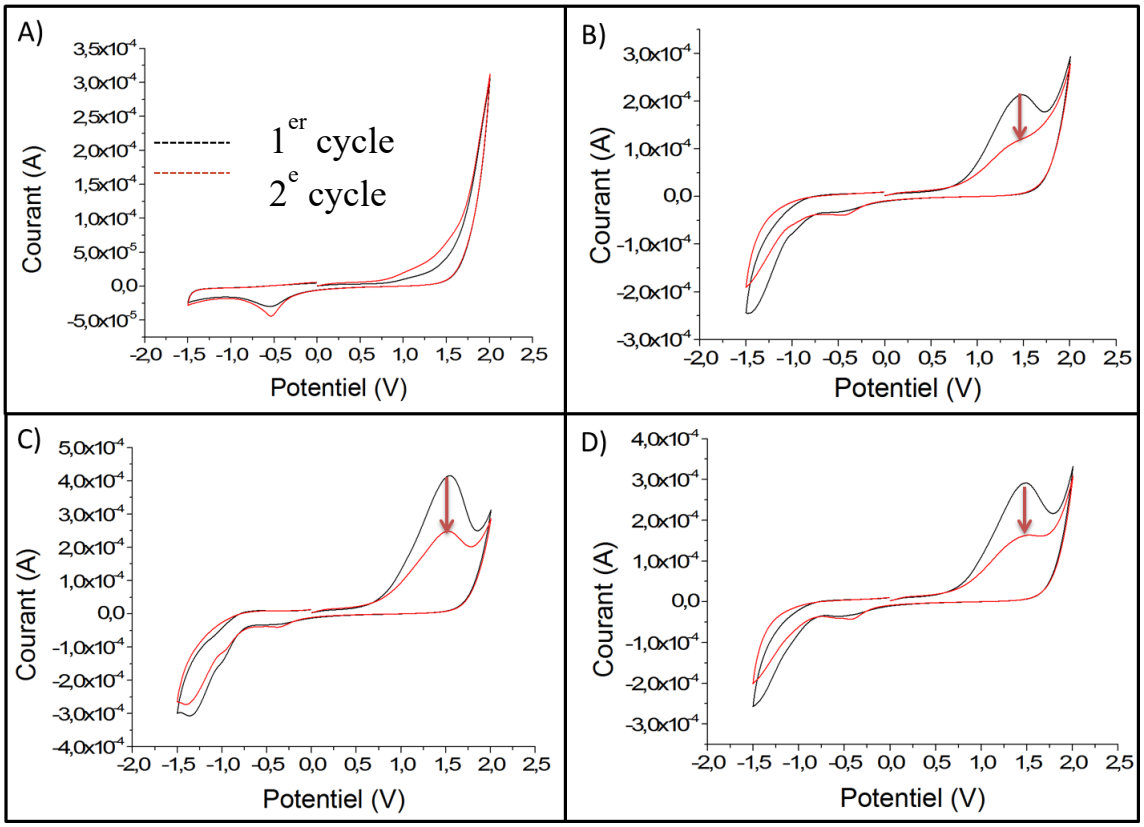


Figure 69: Voltampérogrammes cycliques dans tampon phosphate pH 7,0 sur A) l'électrode de carbone vitreux nue ; B) une couche de disulfure de tungstène non fonctionnalisée déposée sur électrode de carbone vitreux ; C) une couche de disulfure de tungstène fonctionnalisée par des groupements acides carboxyliques déposée sur électrode de carbone vitreux et D) une couche de disulfure de tungstène fonctionnalisée par des groupements thiophène déposée sur électrode de carbone vitreux , vb = 100 mV.s^{-1}.

Ces courbes montrent un comportement similaire pour les trois variétés de films. La diminution du pic anodique à 1,5 V correspond à l'oxydation irréversible du matériau à la surface et à l'intérieur de la structure poreuse des différents films. Pour ce qui est du pic présent en réduction à -0,5 V, ce dernier est également présent lorsque la CV est réalisée sur l'électrode de carbone vitreux nue, il ne provient donc pas des films de WS_2 mais plutôt du matériau d'électrode initial ou du tampon utilisé. Les films ne semblent donc pas être actif électrochimiquement et seule une légère augmentation du courant capacitif est observée.

c) Caractérisation en présence de sonde électrochimiques et en présence de cibles d'intérêt

La dernière partie de l'étude électrochimique menée sur les films de WS_2 a consisté à observer leur réponse vis-à-vis de différentes sondes électrochimiques mais aussi de différentes cibles présentant un intérêt en vue de la conception d'un biocapteur.

Les sondes ayant été testées dans un premier temps sont le couple $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ ainsi que la sonde redox $[Fe(CN)_6]^{3-}$ à 5.10^{-3} mol.L^{-1} dans du tampon phosphate pH 7 0,1 mol.L^{-1}. La Figure 70 montre la réponse des différents films de WS_2 ainsi que celle de l'électrode de carbone vitreux nue pour chacune de ces sondes. Les potentiels indiqués sont mesurés par rapport à une électrode au calomel saturée.

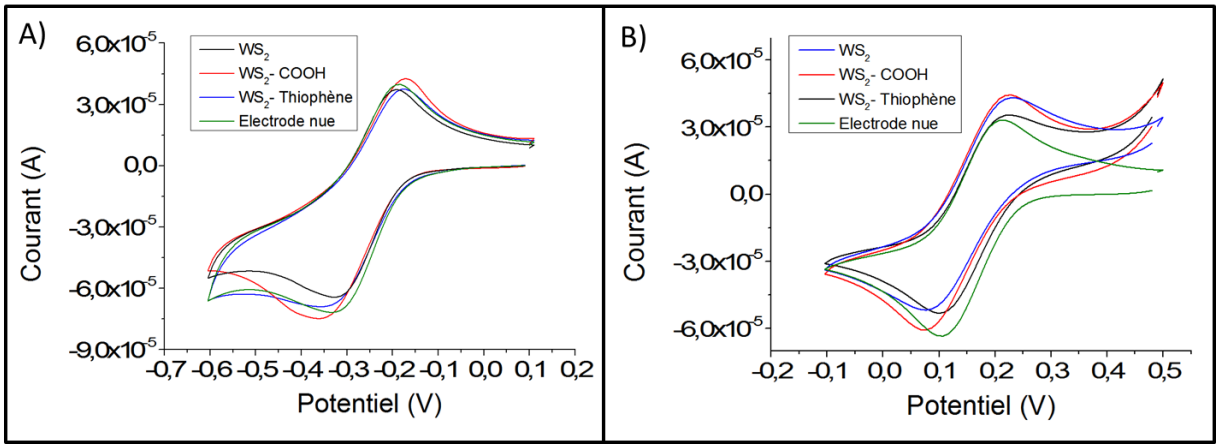


Figure 70: Voltampérogrammes cycliques dans tampon phosphate pH 7,0 sur l'électrode de carbone vitreux nue et sur différents films de disulfure de tungstène déposés sur une électrode de carbone vitreux en présence de la sonde redox $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ (A) et de la sonde redox $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (B), vb = 100 mV.s^{-1}.

Ces deux voltampérogrammes montrent qu'il est possible d'observer le transfert électronique des deux sondes redox testées par utilisation des films de WS_2. Cependant, ces films ne semblent pas augmenter ou diminuer le courant faradique, avec des valeurs de courant de pics stables entre l'électrode nue et l'électrode recouverte d'un film dans le cas du couple $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ ou par utilisation de la sonde $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Il n'y a donc pas de passivation de l'électrode par les différents films de WS_2 même si celui-ci n'améliore pas le transfert d'électron. Ces deux couples pourront donc être utilisés par la suite pour la réalisation d'un biocapteur mettant en jeu ce type de film.

Concernant les caractérisations réalisées en présence de différentes cibles d'intérêt, les meilleurs résultats ont été obtenus en présence de catéchol. Comme l'indique la littérature, l'oxydation du catéchol présente un pic réversible à un potentiel de 0,3 V en présence d'une électrode de carbone vitreux[252]. La réponse des électrodes, modifiées ou non, a donc été testée dans une gamme de potentiel permettant d'observer ce pic, afin de suivre l'évolution de l'intensité de ceux-ci. La Figure 71 montre les différentes voltampérométries cycliques réalisées en présence de catéchol pour l'électrode nue, l'électrode recouverte d'un film de WS_2 et l'électrode recouverte d'un film de WS_2-COOH.

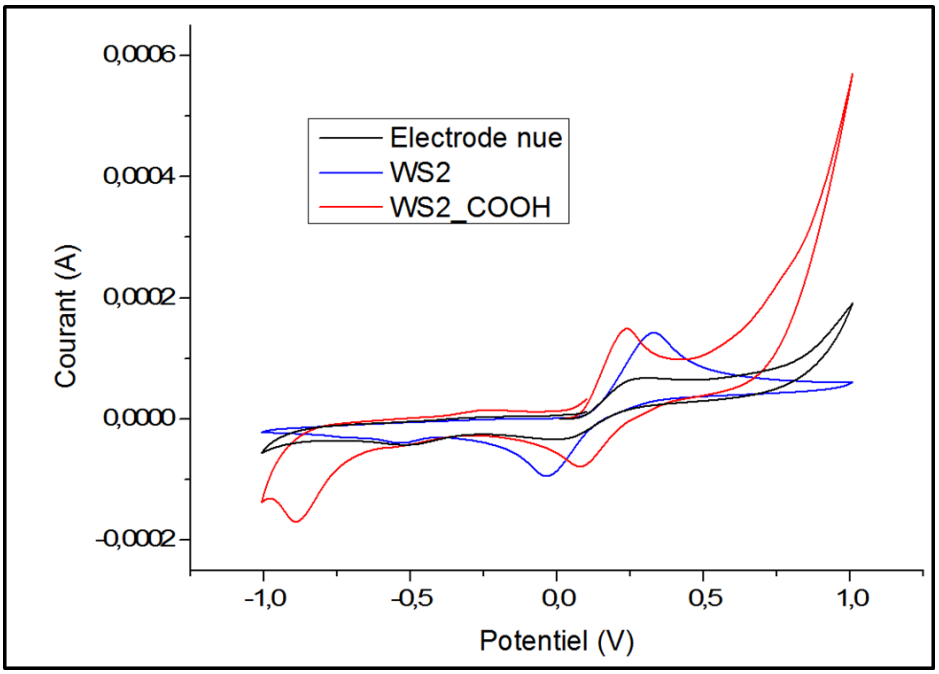


Figure 71: Voltampérogrammes cycliques dans tampon phosphate pH 7,0 sur l'électrode de carbone vitreux nue et sur différents films de disulfure de tungstène déposés sur une électrode de carbone vitreux en présence de catéchol (5.10^{-3} mol.L^{-1}), vb = 100 mV.s^{-1}.

Comme le montre ces voltampérogrammes, la présence des films de WS_2 augmente l'intensité des pics correspondant à l'oxydation du catéchol avec des valeurs de $6,5.10^{-5}$, $1,43.10^{-4}$ et $1,45.10^{-4}$ A pour l'électrode nue, l'électrode recouverte d'un film de WS_2 et l'électrode recouverte d'un film de WS_2-COOH respectivement.

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté une méthode permettant d'obtenir des films minces de nano-bâtonnets de WS_2 pouvant être transféré à la surface d'électrodes de carbone vitreux et ceci de manière contrôlée et reproductible.

Une étude structurale et électrochimique a également été menée afin de déterminer les différents paramètres propres à chacun des films formés (épaisseur, rugosité, conductivité…). Les premiers résultats ont montré que ce matériau n'est pas conducteur dans la plage de potentiel électrochimique Nous avons aussi pu déterminer que ces films ne présentent pas d'activité propre en électrochimie. Les pics observés par voltampérométrie cyclique étant principalement dus à la désorption de l'hydrogène présent au sein de la structure poreuse du film et à l'oxydation irréversible du matériau.

Ces films restent tout de même intéressant en vue d'une utilisation dans la conception d'un biocapteur puisqu'ils ne passivent pas la surface de l'électrode et peuvent être mis à profit pour permettre l'immobilisation de matériel biologique de par la présence de fonctions terminales suite à leur fonctionnalisation. Les nano-bâtonnets possédant une fonction acide carboxylique semble ainsi très intéressant dans cette optique puisqu'ils peuvent être utilisés dans des réactions d'amidation.

Chapitre III :

Biocapteur impédancemétrique pour la détection de l'anticorps de la toxine du Cholera

III. BIOCAPTEUR IMPEDANCEMETRIQUE POUR LA DETECTION DE L'ANTICORPS DE LA TOXINE DU CHOLERA 107

A. Construction de l'édifice moléculaire 111

1. Dépôt du film de nanotubes de carbone..... 111
2. Electropolymérisation d'un film de pyrrole-NTA 111
3. Immobilisation de la toxine du choléra..... 113
4. Caractérisation électrochimique de l'assemblage 115

B. Détection de l'anticorps anti-toxine du Choléra 118

1. Détection de l'anticorps spécifique à la toxine du choléra 118
2. Incubation des anticorps non-spécifiques 121

Suite au travail préalablement mené sur la formation de films minces de nanotubes de carbone, un biocapteur pour la détection des anticorps de la toxine du choléra a été réalisé en intégrant ces derniers dans l'architecture moléculaire du système.

La toxine du choléra est un système déjà largement décrit dans la littérature. L'intérêt de ces travaux fut donc la réalisation d'un système performant, permettant d'atteindre une limite de détection inférieure à celles déjà décrites dans la littérature, ainsi qu'une gamme de linéarité plus importante. Le second point étant d'appliquer par la suite ce modèle à la détection de molécules d'intérêt plus novatrices.

Bien qu'une légère diminution des cas fût rapportée en 2015 et malgré des traitements améliorés, le choléra demeure encore de nos jours un problème de santé majeur à travers le monde[253]. C'est pourquoi le développement de dispositifs de détection rapides, fiables et hautement sensibles présente un intérêt certain dans le but d'identifier rapidement les cas émergents dans les zones à haut risque afin d'assurer une prise en charge rapide des patients. A l'heure actuelle, les tests permettant de fournir un tel diagnostic, pour la détection du choléra, reposent principalement sur la reconnaissance d'un composant caractéristique de la bactérie du choléra donnant lieu à une transduction par immunochromatographie ou par fluorescence directe[254].

Cependant, ce type de capteurs souffre d'un manque de sensibilité et de spécificité. Leur faible coût de production ainsi que leur facilité d'utilisation en font tout de même des capteurs intéressants pour être utilisés dans des environnements à ressources limitées[255]. Il existe également des outils de diagnostics cliniques classiques, permettant une détection plus fiable et plus sensible de la maladie. Ce type de dispositifs s'avère malheureusement bien plus coûteux et le temps de diagnostic est généralement beaucoup plus long, de plus ils requièrent l'utilisation d'un laboratoire d'analyse et ne sont donc pas réalisables dans les zones les plus reculées.

Dans ce contexte, les biocapteurs représentent un outil intéressant pour la détection de ce type de pathologie, étant basés sur une transduction rapide et sensible mettant en jeu des récepteurs biologiques spécifiques à l'analyte correspondant[256]. Cette spécificité, assurée par la reconnaissance entre l'anticorps et l'antigène dans le cas d'une pathologie virale, permet d'analyser des milieux hautement complexes comme le sang ou d'autres fluides physiologiques et permet donc une détection en condition réelle sans traitement préalable de l'échantillon [257,258]. De plus, comme vu précédemment, les biocapteurs électrochimiques peuvent être miniaturisés afin d'être utilisés sous forme d'appareils portables faciles d'utilisation[259].

Concernant la détection d'anticorps, d'antigène ou d'ADN, une configuration plus sophistiquée est nécessaire car l'événement de reconnaissance (hybridation ou immunoréaction) ne conduit pas directement à l'obtention d'un signal électrochimique. Ainsi une étape de marquage est souvent nécessaire lorsque la détection est assurée par des méthodes électrochimiques classiques (voltampérométrie cyclique, chronoampérométrie etc..), rendant la conception du biocapteur plus délicate. C'est pourquoi la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) offre un avantage évident par rapport aux autres méthodes de détection électrochimiques car

aucune procédure de marquage n'est nécessaire[260]. En effet, l'immobilisation de biomatériaux à la surface de l'électrode et la reconnaissance entre le biorécepteur et son analyte modifient directement la résistance totale du système[261]. Cette modification de la résistance peut être quantifiée pour des concentrations allant jusqu'à la gamme du femtomolaire[78]. De plus, l'EIS permet de représenter le système sous forme de composants électriques par utilisation d'un circuit électrique équivalent. Ce circuit peut alors être utilisé afin d'obtenir de nombreuses informations sur le système.

Comme dit précédemment, des CNT ont été incorporés dans la construction de ce biocapteur afin d'augmenter encore la sensibilité et d'abaisser la limite de détection du système, les nanomatériaux permettant d'immobiliser une quantité accrue de biorécepteurs à la surface de l'électrode[262]. De plus, parmi les différents nanomatériaux présentés au sein du chapitre I.C, les nanotubes de carbone font partis des meilleurs candidats pour être intégrer dans la conception d'un tel dispositif de détection. Ceci s'explique par la bonne conductivité qu'ils possèdent, la grande surface spécifique qu'ils offrent et enfin par les différents protocoles de fonctionnalisation déjà existants pouvant être mis à contribution pour permettre l'immobilisation de différents types de biorécepteurs[263,264]. Cependant, l'utilisation de CNT dans des biocapteurs reposant sur une détection par EIS est très peu décrite dans la littérature en comparaison de biocapteurs ampérométriques[265]. De plus, la plupart des exemples limitent l'utilisation des CNT en tant que matériau composite, par incorporation dans des matrices de polymères notamment, ce qui réduit clairement la surface spécifique que peut apporter ce genre de matériau[266–269]. Une des raisons expliquant le fait qu'ils soient peu utilisés en impédance pourrait être que les dépôts de CNT, réalisés par la technique classique de drop-casting, sont peu reproductibles. En effet, lorsque de tels dépôts sont formés à la surface d'une électrode leur morphologie n'est que peu ou pas contrôlée. Elle dépend notamment de la vitesse d'évaporation du solvant, qui est un paramètre difficilement contrôlable. Or une légère différence de morphologie conduit à une variation importante des résistances de transfert d'électrons et donc à une mauvaise reproductibilité.

Dans ces travaux, le principe de formation de couches de CNT reproductibles, présenté dans le chapitre II.A.1, a été utilisé pour remédier à ce problème. Le dispositif de mesure conçu repose ainsi sur l'intégration de films de CNT, offrant une surface spécifique importante en plus d'un transfert électronique rapide. Ces films sont alors utilisés comme matrice pour l'immobilisation de biorécepteurs, ici la toxine du choléra. L'immobilisation a été assurée à travers l'utilisation d'un système développé auparavant au laboratoire, mettant en jeu un film électrogénéré de poly-pyrrole NTA. Ce film permet en effet d'immobiliser à sa surface, par le biais de la formation d'un complexe de cuivre, différents types de protéines possédant des fonctions biotines[78]. La détection a quant à elle été réalisée par spectroscopie d'impédance. Les différentes étapes impliquées dans la construction de ce biocapteur, ainsi que les résultats obtenus seront détaillés dans ce chapitre.

A. Construction de l'édifice moléculaire

1. Dépôt du film de nanotubes de carbone

Comme les différentes caractérisations structurales l'ont montré au préalable, le meilleur film mince de CNT, que cela soit en termes de conductivité ou de reproductibilité, semble être celui obtenu après filtration de 500 mL de suspension et possédant une épaisseur de 4,0 µm. L'étude a malgré tout été conduite dans un premier temps sur les trois épaisseurs de films différentes afin de déterminer laquelle est le plus apte pour être utilisée en complément d'un film de poly-pyrrole NTA.

2. Electropolymérisation d'un film de pyrrole-NTA

L'intégration d'un film de poly-pyrrole NTA dans la conception de ce biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra présente plusieurs intérêts. Tout d'abord, il s'agit d'un film perméable et possédant une forte porosité, permettant ainsi la diffusion de la sonde redox à travers sa structure. De plus, l'utilisation de ce film conduit à l'enrobage de la couche de CNT par le polymère, diminuant ainsi l'adsorption non-spécifique qui est très présente lors de l'utilisation de nanotubes de par leur forte affinité pour divers composés. Enfin, ce polymère permet d'introduire la fonction NTA à la surface de l'électrode. Or c'est cette fonction qui va permettre par la suite l'immobilisation de la toxine du choléra et donc donner sa spécificité au système vis-à-vis de la cible étudiée.

La formation de la couche de polymère à la surface du film de nanotubes de carbone a été réalisée par électrochimie. En effet, le monomère de pyrrole-NTA, dont la structure est représentée au sein de la Figure 72-A, possède un groupement pyrrole (en vert sur l'illustration) qui peut être activé par électrochimie pour conduire à l'électropolymérisation de celui-ci. La Figure 72-B illustre quant à elle la réponse électrochimique du monomère de pyrrole-NTA[118]. La caractérisation du monomère a été réalisée par CV en milieu organique dans une solution de CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} $LiClO_4$. Cette solution a été acidifiée par de l'acide perchlorique ($HClO_4$) afin de permettre la solubilisation du monomère. Sur le voltampérogramme obtenu, un pic anodique irréversible correspondant à l'oxydation irréversible du pyrrole est observé de 0,8 V à 1,0 V vs. Ag^+/Ag.

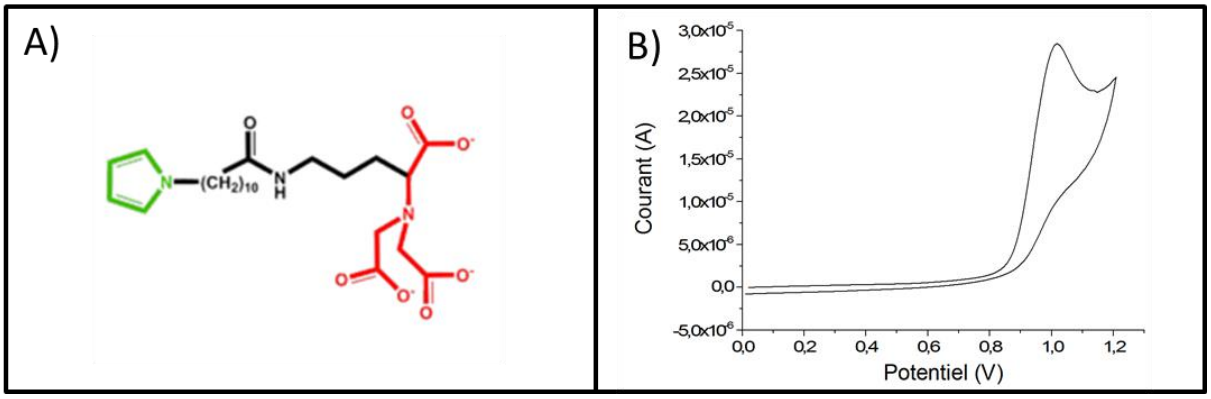


Figure 72: A/ Structure du monomère de pyrrole-NTA ; B/ Voltampérogramme obtenu pour une solution de monomère pyrrole-NTA (2.10^{-3} mol.L-1) dans CH_3CN + $LiClO_4$ 0,1 mol.L^{-1} sur électrode de carbone vitreux (Ø = 3 mm), vb = 100 mV.s^{-1}.

Afin de contrôler la reproductibilité et l'épaisseur de la couche de polymère formée, l'électropolymérisation a été faite par chronopotentiométrie (application d'un courant constant et suivi de l'évolution du potentiel). Cette technique électrochimique permet de contrôler la charge imposée au système et donc de contrôler la quantité de polymère formée. Pour ce système, une charge correspondant à 2,5 mC.cm^{-2} a été appliquée (Qréelle= 0,18 mC pour une électrode de Ø = 3 mm) en présence 5.10^{-3} mol.L^{-1}de monomère dans CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} $LiClO_4$. Une cellule électrochimique conventionnelle à trois électrodes a été utilisée pour ces mesures avec une électrode Ag^+/Ag utilisée en tant qu'électrode de référence, un fil de platine utilisé comme contre-électrode et une électrode de carbone vitreux modifiée par les films de CNT comme électrode de travail.

La courbe de chronopotentiométrie présentée ci-dessous (Figure 73-A), montre que la polymérisation se fait jusqu'à un potentiel maximum de 0,71 V. C'est-à-dire juste au pied de la vague d'oxydation afin de limiter la suroxydation du polymère. La Figure 73-B présente les voltampérogrammes obtenus avant et après polymérisation dans une solution de CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} $LiClO_4$ exempte de monomère.

Ces deux courbes montrent une augmentation significative du courant capacitif entre le scan réalisé avant polymérisation et celui réalisé après polymérisation. En effet, le courant passe d'une valeur de 0,7 µA à une valeur de 24,3 µA pour un potentiel de 0,3 V vs $Ag^{+/}$Ag. Cette augmentation atteste donc de la présence d'un polymère à la surface de l'électrode.

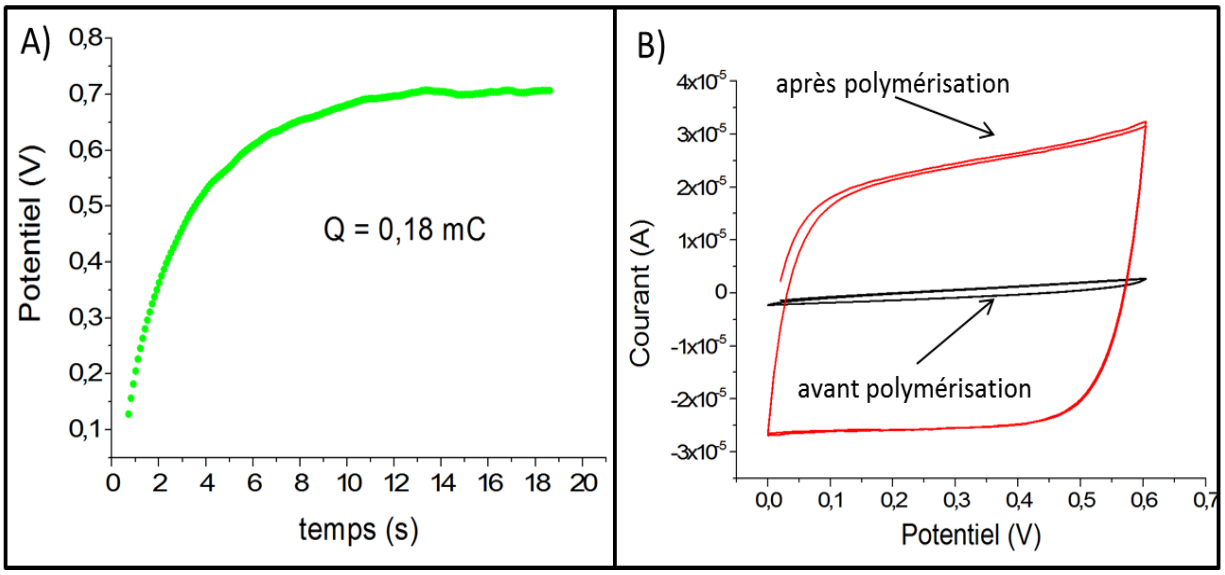


Figure 73: A) Courbe obtenue par chronopotentiométrie (Q= 2,5 mC.cm^{-2}, t = 18 s) lors de la polymérisation du pyrrole-NTA dans une solution contenant 5.10^{-3} mol.L^{-1} du monomère pyrrole-NTA dans CH_3CN + $LiClO_4$ 0,1 mol.L^{-1} sur électrode de carbone vitreux (Ø = 3 mm). B) Caractérisation par voltampérométrie cyclique du poly-(pyrrole-NTA) dans une solution de CH_3CN + $LiClO_4$ 0,1 mol.L^{-1} exempte de monomère avant et après polymérisation; vb = 100 mV.s $^{-1}$.

3. Immobilisation de la toxine du choléra

Après avoir électrogénéré le film de poly-pyrrole NTA à la surface de l'électrode, cette fonction peut être utilisée pour immobiliser un biorécepteur portant une fonction biotine. Cette immobilisation repose sur la formation d'un complexe de cuivre, entre le groupement NTA et le centre métallique dans un premier temps puis entre le cuivre et la fonction biotine par la suite (Figure 74-A).

Pour cela, l'électrode recouverte par le polymère est tout d'abord immergée pendant 20 min dans une solution de chlorure de cuivre ($CuCl_2$) à 10^{-2} mol.L^{-1} dans du tampon acétate 0,1 mol.L^{-1} pH 4,8. L'électrode est ensuite rincée par différents lavages à l'aide d'une solution de chlorure de sodium de concentration 0,5 mol.L^{-1} afin d'éliminer les traces de cuivre non complexé pouvant encore être présentes à la surface de l'électrode.

Enfin la toxine du choléra, marquée par une fonction biotine, est immobilisée à son tour par complexation avec le centre métallique de cuivre. Comme dit précédemment, le cuivre possède une grande affinité pour les fonctions histidines et biotines, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une toxine préalablement marquée pour s'assurer de la réalisation de ce complexe. La Figure 74-B représente la structure de la sous-unité de la toxine du choléra utilisée dans ce travail, à savoir la sous-unité B.

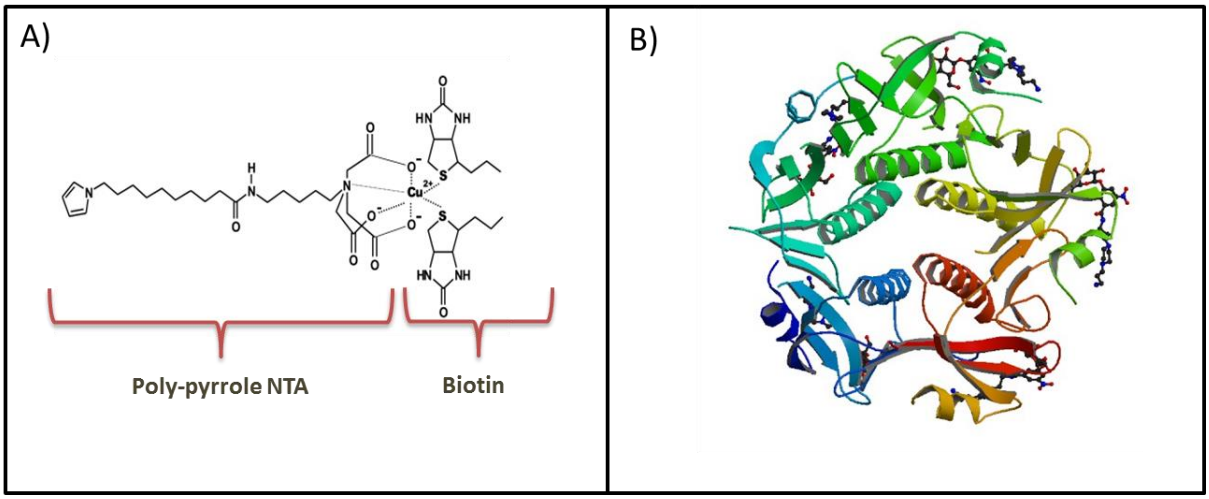


Figure 74: A/ représentation schématique de la formation du complexe de cuivre avec les fonctions NTA du polymère et les fonctions biotines de la toxine. B/ Représentation en trois dimensions des 5 sous-unités B de la toxine du choléra.

La toxine du choléra est en effet une protéine constituée de deux sous-unités. La première, la sous-unité A, possède une masse molaire de 28 kDa et est située au centre de la protéine. La seconde, la sous-unité B qui est présente sous la forme d'un agrégat de 5 fragments disposés en périphérie, a quant à elle une masse molaire totale de 56 kDa[270,271]. La sous-unité A est responsable de l'activité enzymatique de la toxine, alors que les 5 sous-unités B sont en charge de la reconnaissance envers le substrat et donc de la liaison de la toxine à la paroi cellulaire de la molécule ciblée. C'est pourquoi, dans ce travail, la sous-unité B a été choisie pour être immobilisé à la surface de l'électrode afin de permettre la reconnaissance entre l'antigène et l'anticorps. En effet, les anticorps produits par l'organisme sont dirigés contre

cette sous-unité et ont pour but d'empêcher la reconnaissance entre la toxine et sa cible. De plus, cette sous-unité n'est pas virulente (pas d'activité enzymatique) et peut donc être manipulée sans danger.

L'incubation de la sous-unité B de la toxine du choléra se fait par dépôt de 20 µL à la surface de l'électrode d'une solution à 0,5 $mg.mL^{-1}$ de la toxine du choléra dans une solution de Bovine Serum Albumine (BSA) / Phosphate Sodium Buffer (PBS) 1 % (Poids/Volume). L'électrode est laissée à incuber 30 min à 4°C avant d'être rincée avec une solution tampon afin d'éliminer les traces de toxine non immobilisée. Le rôle de la BSA est ici de bloquer les sites d'attache non-utilisés afin de limiter par la suite les interactions non-spécifiques.

La dernière étape de la conception du biocapteur est finalement l'incubation de différentes concentrations d'anticorps de la toxine du choléra et leur détection par électrochimie. Cette incubation est réalisée par dépôt de 50 µL de solution contenant les différentes concentrations d'anticorps. Cette partie ainsi que les résultats obtenus par électrochimie seront développés plus en détail dans la suite de ce chapitre. L'ensemble des étapes impliquées dans la construction du biocapteur est résumé au sein de la Figure 75.

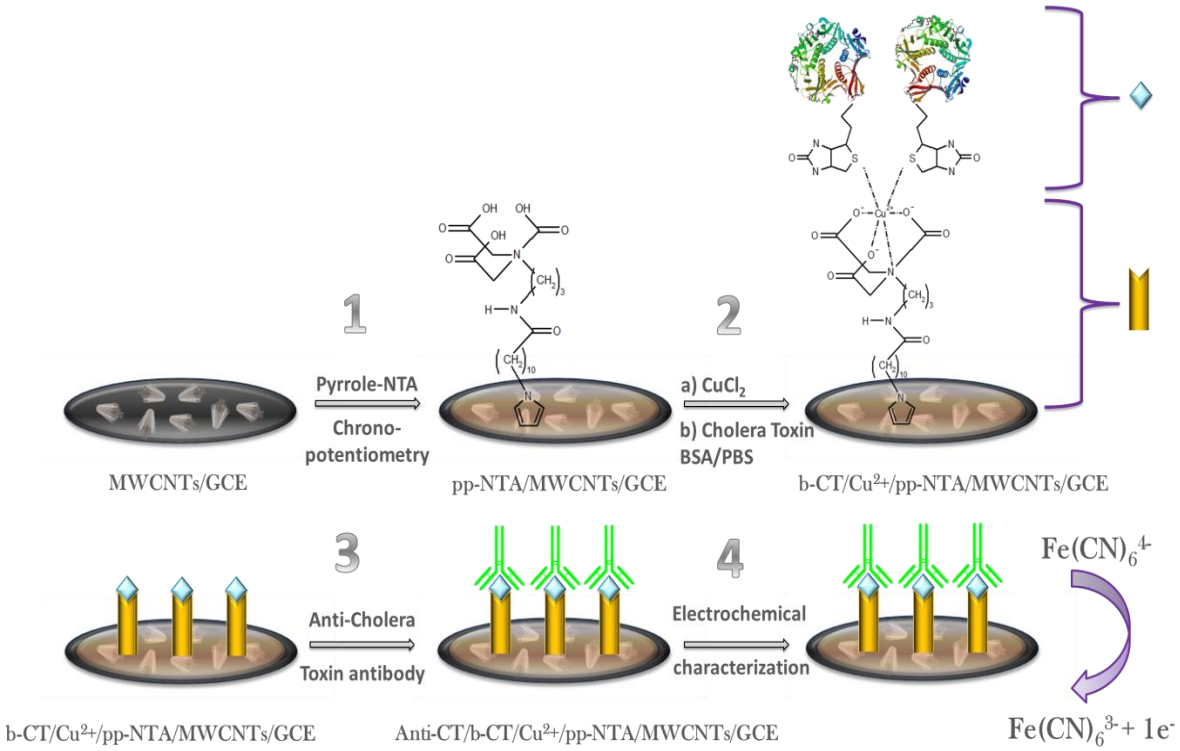


Figure 75: Représentation schématique des différentes étapes de la conception du biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra.

4. Caractérisation électrochimique de l'assemblage

Avant de procéder à la détection des anticorps pour la toxine du choléra et de tester les performances du biocapteur mis en place, des caractérisations électrochimiques ont été réalisées pour chaque étape de la construction de celui-ci et ce pour les trois différentes épaisseurs de films de CNT.

Pour ces analyses, deux méthodes ont été choisies à savoir la CV et la EIS. Comme précédemment, une cellule électrochimique conventionnelle à trois électrodes a été utilisée avec un fil de platine servant de contre-électrode et une électrode au calomel saturée (SCE) servant d'électrode de référence. Le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ a été choisi comme sonde redox (5.10^{-3} mol.L^{-1} dans du tampon phosphate à pH = 7,0).

Les données expérimentales, correspondant aux étapes de polymérisation et d'immobilisation de la toxine, sont résumées dans le Tableau 6 et la Figure 76 montre les résultats obtenus par voltamétrie cyclique et par EIS à l'aide du film de CNT épais (4,0 µm). L'extrapolation des courbes d'impédance et le calcul des différents paramètres ont été faits par utilisation du circuit électrique équivalent présenté auparavant (Figure 57).

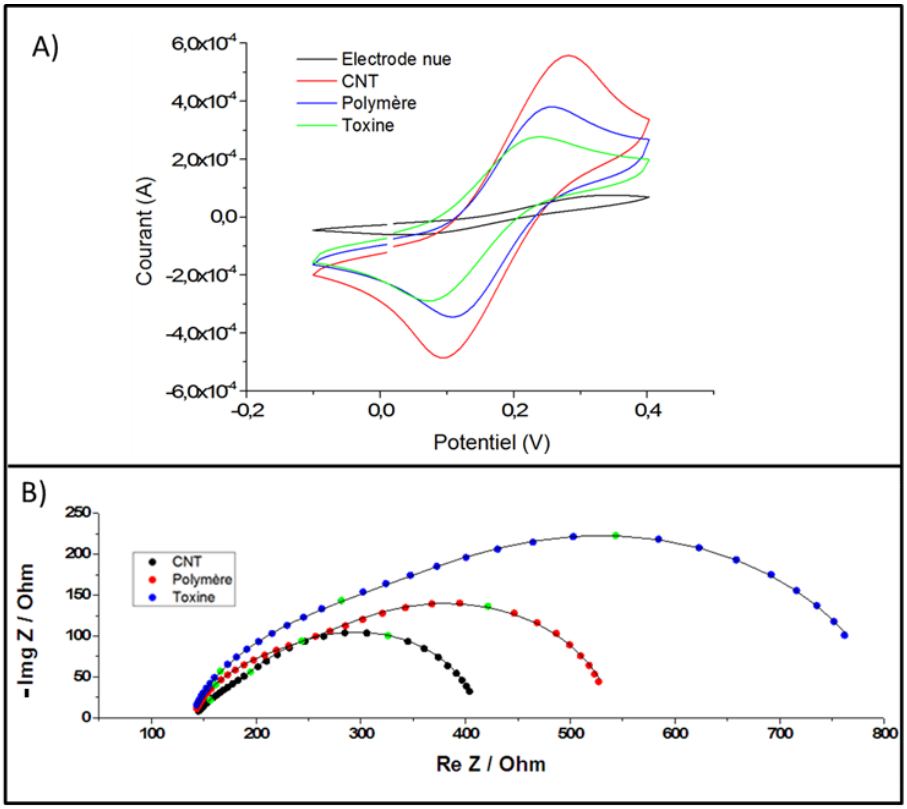


Figure 76: Mesures électrochimiques sur GCE revêtue d'un film de CNT 4,0 µm avant l'électropolymérisation, après la génération d'une couche de poly-pyrrole NTA et après l'ancrage de la toxine du choléra. A) Voltammogrammes cycliques utilisant du $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (5.10^{-3} mol.L^{-1}) dans une solution de 0,1 mol L^{-1} PB, pH = 7,0. vb =100 mV.s^{-1}. B) Diagrammes de Nyquist effectués à 0,2 V par rapport à SCE par utilisation de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5.10^{-3} mol.L^{-1}) dans une solution de 0,1 mol L^{-1} PB comme sonde redox, pH = 7,0. Les données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Les points mis en évidence en vert ont été pris à des fréquences de 51,2 ; 7,4 et 1,07 Hz.

Pour rappel, le demi-cercle à haute fréquence du diagramme de Nyquist correspond à la résistance de transfert de charge (R_{CT}) en parallèle de la capacité de double couche (C_{DC}). La boucle à basse fréquence est, elle, attribuée à l'impédance de Warburg (R_{diff}). L'extrapolation des spectres obtenue à l'aide du circuit équivalent est représentée par les lignes noires sur la Figure 76-B. Une bonne correspondance entre les points expérimentaux et les courbes d'extrapolation peut être observée. Le Tableau 6 montre les valeurs obtenues grâce à ces spectres: résistance du transfert de charge, capacité double couche (calculée à partir de la valeur du CPE) et résistance de diffusion.

Après l'électropolymérisation du pyrrole-NTA, les courants de pic, anodique et cathodique, visibles sur les différents voltampérogrammes subissent une forte diminution d'intensité passant de $-2{,}90\times10^{-4}$ A à $-1{,}90\times10^{-4}$ A pour le pic cathodique (calculé pour le film de CNT de 4,0 µm). Une augmentation du ΔE est également observée traduisant un fort décalage des pics. Enfin, l'impédance totale du système augmente quant à elle lors de la formation de la couche de polymère. Dans le Tableau 6, l'impédance aux basses fréquences (0,2 Hz) est donnée pour chaque épaisseur. Ces phénomènes sont attendus puisque les répulsions électrostatiques entre les groupes carboxylates du film de poly-pyrrole NTA et la sonde redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ sont élevées. En effet ces deux espèces présentent une charge totale négative à pH 7,0.

Concernant l'analyse des spectres d'impédance, la résistance du transfert de charge augmente plus fortement que la résistance de Warburg, qui exprime la résistance de diffusion, démontrant que le transfert d'électrons est réduit alors que l'épaisseur de la couche limite de diffusion reste similaire. Ceci est en accord avec l'analyse faite précédemment concernant la répulsion des charges.

Après l'immobilisation de la toxine du choléra biotinilée (CTB), une nouvelle diminution des courants de pics est observée, en parallèle d'une nouvelle augmentation de la résistance totale du système. La sous-unité B de la toxine a un poids moléculaire de 11,6 kDa (56 kDa pour l'agrégat formé par les 5 fragments) et un point isoélectrique de 7,8, ce qui signifie que la couche protéique est chargée positivement à pH = 7,0 [272]. Cette charge permet donc d'améliorer la diffusion de la sonde redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ à travers la couche formée par la toxine. C'est pourquoi la diminution de l'intensité des courants de pics est moins prononcée que lors de la polymérisation.

L'analyse des diagrammes de Nyquist montre que la résistance de transfert de charge augmente légèrement par rapport à la résistance de diffusion démontrant ainsi que le transfert électronique reste similaire à celui observé après la polymérisation. A l'inverse, l'épaisseur de la couche de diffusion augmente fortement lors de l'ancrage des protéines à la surface de l'électrode. Ceci traduit la gêne stérique engendrée par l'immobilisation de la toxine après complexation avec le cuivre. En effet, la présence d'une protéine ayant un poids moléculaire élevé va rendre la diffusion de la sonde redox à travers les différentes couches plus difficile et ce malgré le fait qu'elle possède une charge positive.

La présence du polymère et de la toxine du choléra affecte également la capacité de double couche à l'interface, démontrant la présence des deux espèces sur les dépôts CNT. Une

diminution de la capacité est observée lors de la polymérisation puis de l'immobilisation de la toxine avec des valeurs respectivement de 70 et 59 µF. Cette diminution traduit le fait que le polymère ainsi que la toxine ont recouvert les CNT, entraînant ainsi une modification de l'interface entre la solution et les nanotubes. C'est cette modification qui est exprimée par la diminution du courant capacitif propre aux CNT.

Comme indiqué précédemment, la quantité de polymère est identique pour les trois films de CNT. De ce fait, le film généré sur le film de nanotubes le plus épais est théoriquement plus fin et plus étiré que les deux autres. En effet, le film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm possède une surface spécifique beaucoup plus importante d'après les observations réalisées précédemment. Les données récoltées par électrochimie vont également dans ce sens. En effet, la couche de polymère pour le film de CNT épais possède la plus faible valeur d'impédance (804 Ω à 0,2 Hz) ainsi qu'une plus grande capacité de double couche (70 µF). Il possède donc une surface spécifique plus importante que les deux autres polymères. Cette surface peut par la suite être utilisée pour l'immobilisation d'une quantité plus élevée de biorécepteurs. Cela devrait conduire à une augmentation des performances du biocapteur lors de la détection des anticorps de la toxine du choléra (plus grande sensibilité et plus grande gamme de détection).

Tableau 6: Tableau rassemblant les valeurs des courants cathodiques obtenues par voltampérométrie cyclique (Ip_{cath}), les valeurs du module d'impédance à 0,2 Hz ($Z_{0,2Hz}$) et les valeurs des éléments composant le circuit équivalent (R_{CT}, C_{DL}, R_{diff}) obtenues par extrapolation des courbes d'impédance et ce pour chaque épaisseur des films de CNT (1,6, 2,6 et 4,0 µm) et pour les différentes étapes de construction du biocapteur (après le dépôt de CNT, après polymérisation et après incubation de la toxine du choléra).

	CNT			Polymère			Toxine		
Épaisseur du film de CNT	**1,6 µm**	**2,6 µm**	**4,0 µm**	**1,6 µm**	**2,6 µm**	**4,0 µm**	**1,6 µm**	**2,6 µm**	**4,0 µm**
Ip_{cath} /A	**$-4,6\times10^{-5}$**	**$-1,33\times10^{-4}$**	**$-2,90\times10^{-4}$**	**$-3,0\times10^{-5}$**	**$-9,5\times10^{-5}$**	**$-1,90\times10^{-4}$**	**$-1,1\times10^{-5}$**	**$-8,1\times10^{-5}$**	**$-1,39\times10^{-4}$**
$Z_{0.2Hz}$ / Ohm	**674**	**527**	**404**	**2025**	**1310**	**527**	**2372**	**1853**	**804**
R_{CT} / Ohm	**264 ± 4**	**98 ± 2**	**39 ± 1**	**1610 ± 30**	**800 ± 20**	**147 ± 3**	**1630 ± 30**	**880 ± 20**	**258 ± 4**
$C_{DC}a$ / µF	**38,3 ± 0,6**	**70 ± 2**	**92 ± 2**	**38,8 ± 0,6**	**45 ± 0,7**	**70 ± 2**	**27,9 ± 0,6**	**30,6 ± 0,6**	**59 ± 1**
R_{diff} / Ohm	**240 ± 4**	**277± 5**	**230 ± 4**	**307 ± 5**	**380 ± 6**	**256 ± 4**	**665 ± 10**	**900 ± 20**	**414 ± 7**

B. Détection de l'anticorps anti-toxine du Choléra

1. Détection de l'anticorps spécifique à la toxine du choléra

Une fois la toxine du choléra immobilisée à la surface de l'électrode, le biocapteur a été testée pour la détection de l'anticorps contre la toxine du choléra (anti-CT). Pour cela, différentes concentrations d'anticorps ont été incubées à la surface de l'électrode pendant 30 minutes par dépôt d'une goutte de 50 µL contenant des concentrations croissantes d'anticorps dans du tampon phosphate (pH 7,0). Des mesures d'impédance ont été effectuées pour chaque concentration d'anti-CT. La sensibilité et la linéarité du biocapteur ont été caractérisées dans une gamme allant de 10^{-13} à 10^{-5} g.mL^{-1}. Entre chaque étape d'incubation, les électrodes ont été rincées plusieurs fois à l'aide d'une solution à 0,1 mol.L^{-1} de tampon phosphate (pH 7,0).

Les mesures d'impédance permettent de visualiser une augmentation de l'impédance générale du système en fonction de l'augmentation des concentrations d'anti-CT sur toute la gamme étudiée (10^{-13} à 10^{-5} g.mL^{-1}) pour les films de CNT d'une épaisseur de 2,6 et 4,0 µm (Figure 77). En revanche, concernant le film de CNT de 1,6 µm, l'impédance augmente seulement entre 10^{-13} et 10^{-9} g.mL^{-1} et reste constante à des concentrations d'anti-CT supérieures. La Figure 77 montre également les courbes obtenues par extrapolation des données expérimentales en utilisant comme modèle le circuit électrique équivalent présenté auparavant. Ces données correspondent à l'utilisation du film épais de CNT le plus épais pour lequel une meilleure sensibilité est constatée.

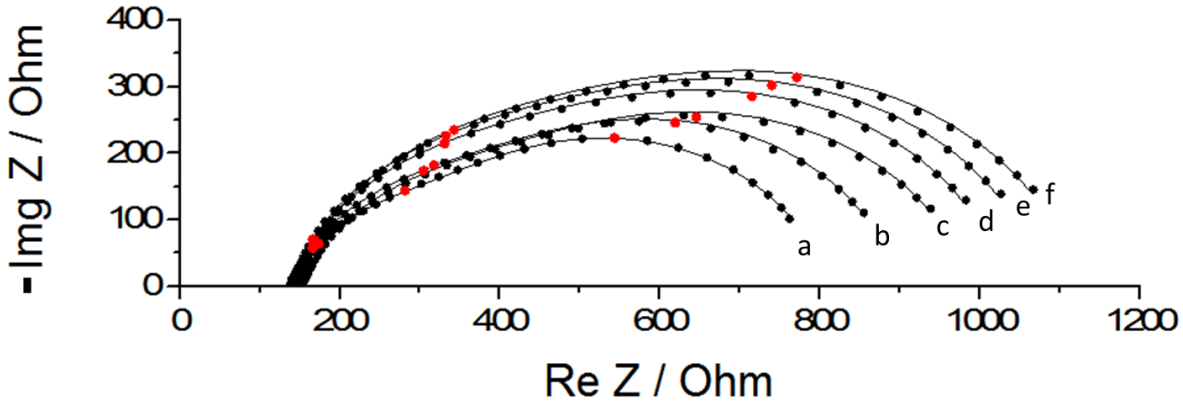


Figure 77: Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm et après l'ancrage de la CTB (a) et après incubation de l'anti-CT à différentes concentrations: (b) 10^{-13} g.mL^{-1}; (C), 10^{-11} g.mL^{-1}; (D) 10^{-9} g.mL^{-1}; (E) 10^{-7} g.mL^{-1}; (F) 10^{-5} g.mL^{-1}. Des données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Conditions expérimentales similaires à celles présentées au sein de la Figure 76. Les points mis en évidence en rouge ont été pris à des fréquences de 51,2 ; 7,4 et 1,07 Hz.

Concernant les différents paramètres déterminés par utilisation du circuit électrique équivalent, il est possible d'observer une forte augmentation de la résistance de transfert de charge par rapport à celle constatée pour la résistance de Warburg. Dans le même temps, la capacité de double couche ne subit pour sa part qu'une légère diminution. En effet, les calculs menés sur les différents paramètres montrent que la résistance du transfert de charge subie une augmentation de 98% entre l'immobilisation de la toxine et l'ajout de la dernière

concentration d'anticorps. Pour ce qui est de la résistance de diffusion, l'augmentation relevée est seulement de 11% et enfin la diminution de la capacité à double couche est de l'ordre de 13%. Étant donné que l'évolution de la résistance de transfert de charge semble être prédominante par rapport aux autres paramètres (plus forte augmentation), ce paramètre a été utilisé pour tracer le graphique représenté sur la Figure 78-A. Ce dernier représente la variation normalisée de la résistance du transfert de charge en fonction du logarithme de la concentration en anti-CT et ceci pour chacune des différentes épaisseurs des films de CNT. La normalisation a été calculée en fonction de la résistance de transfert de charge entre l'étape d'incubation de la toxine et la détection des anticorps et selon la formule suivante :

$$\frac{R_{CT}(Anti-CT) - R_{CT}(CTB)}{R_{CT}(CTB)}$$

Ce traitement des données expérimentales a permis de révéler que le film de CNT possédant la plus grande épaisseur (4,0 µm) offre les meilleurs résultats concernant la détection des différentes concentrations d'anti-CT.

En utilisant ces données, une courbe d'étalonnage a pu être réalisée en traçant l'évolution de la résistance du transfert de charge (R_{CT}) en fonction du logarithme de la concentration en anti-CT (Figure 78-B). Une évolution linéaire en échelle semi-logarithmique est constatée entre 10^{-13} et 10^{-5} g.mL^{-1}, avec une très bonne sensibilité de 24,7 ± 0,4 Ω par ordre de grandeur qui démontre l'efficacité de l'immunocapteur conçu (R^2 = 0,995).

Ce type de biocapteurs d'affinité, reposant sur la reconnaissance entre un biorécepteur et sa cible, est généralement décrit à l'aide du modèle de l'isotherme d'adsorption de Langmuir. Pour ce modèle, les sites de liaisons doivent être non interactifs et identiques entre eux. La réponse du système est alors directement proportionnelle à la concentration de la cible (pour des faibles concentrations). Or il a été montré dans la littérature que la réponse du capteur peut également suivre une évolution semi-logarithmique et donc être désaccord avec le modèle de Langmuir. Ainsi, Bart et al. ont décrit en 2005 un nouveau modèle, l'isotherme de Temkin, qui propose pour sa part une augmentation de l'impédance du système en fonction du logarithme de la concentration de l'espèce ciblée[273]. Ce modèle prend ainsi en considération une énergie de liaison hétérogène entre la cible et le biorécepteur, c'est-à-dire des sites de liaisons différents les uns des autres[274]. En raison de la morphologie des dépôts de CNT, ce modèle semble donc être approprié pour le système décrit dans ce travail.

La Figure 78 représente également le module d'impédance obtenue pour une fréquence de 0,2 Hz selon le logarithme de la concentration. Une relation linéaire a été obtenue dans la même plage de concentration avec une sensibilité presque identique (pente = 25,6 ± 0,4 Ω par ordre de grandeur) mais avec un coefficient de corrélation inférieur (R^2 = 0,975). A une fréquence de 0,2 Hz, le module d'impédance comprend la résistance du transfert de charge ainsi que la résistance de diffusion. Comme les pentes sont similaires pour les deux paramètres exposés, elles confirment que la résistance de diffusion varie très faiblement avec la concentration d'anticorps en comparaison de la résistance de transfert de charge.

Enfin, il est important de noter que chacun des paramètres présentés a été déterminé en moyennant les valeurs obtenues sur 3 électrodes différentes. En effet, l'ensemble du processus de construction du biocapteur ainsi que la détection des différentes concentrations d'anticorps ont été répétées 3 fois, comprenant donc la préparation de la dispersion de CNT, la filtration des différents volumes et le transfert du film à la surface de l'électrode. Ceci a permis de déterminer l'écart-type relatif portant sur l'ensemble des données recueillies par EIS. L'incertitude ainsi calculée est de seulement 3,6%, démontrant la fiabilité de cette méthode de préparation.

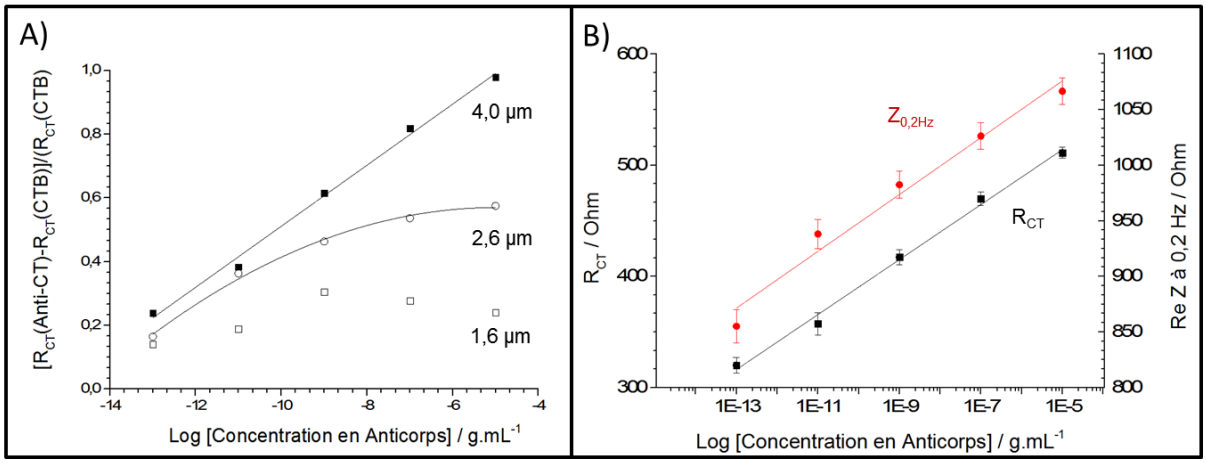


Figure 78: A) Courbes d'étalonnage présentant la variation normalisée en fonction de la concentration en anticorps de la toxine du choléra (échelle logarithmique) obtenues par extrapolation des données expérimentales pour les trois épaisseurs de films de CNT ; B) Valeurs de la résistance du transfert de charge (a) et valeurs du module de l'impédance à 0,2 Hz (b), dernier point du spectre, en fonction de la concentration en anticorps de la toxine du choléra (échelle logarithmique). Les données expérimentales (points) ainsi que la régression linéaire (lignes) en résultant sont présentées. Régressions linéaires: (a) pente = 24,7 ± 0,4 Ω par ordre de grandeur; R^2 = 0,995; (b) pente = 25,6 ± 0,4 Ω par ordre de grandeur; R^2 = 0,975. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la Figure 76.

Par utilisation de ce biocapteur, la limite de détection atteinte est de 10^{-13} g.mL^{-1}. Des concentrations plus faibles ont été testées sans qu'une augmentation de la résistance mesurée par EIS ne soit perceptible. Dans la littérature, la limite de détection d'anti-CT obtenue par spectrométrie conventionnelle en appliquant la méthode de test ELISA est de 10^{-9} g.mL^{-1}, soit donc une différence de 4 ordres de grandeur par rapport aux résultats présentés dans ce travail[275]. De plus, pour ce qui est de la détection d'anti-CT, les biocapteurs électrochimiques présentés dans la littérature possèdent des gammes de linéarité plus courtes que la plage présentée ici. Un ancien travail réalisé au laboratoire par Singh et al., reposant sur l'utilisation de nanoparticules magnétiques incorporées dans une structure 3D de CNT, offre notamment une gamme de linéarité comprise entre 10 et 200 ng.mL^{-1} pour la détection de l'anticorps de de la toxine du choléra[276]. Toujours au laboratoire, Ionescu et al obtiennent pour leur part une très bonne gamme de linéarité comprise entre 1 et 200 µg.mL^{-1} avec une limite de détection de 50 ng.mL^{-1} par utilisation d'un biocapteur ampérométrique mettant en jeu le système strepavidine/biotine pour l'immobilisation de la toxine du choléra[277]. Wenjua et al. atteignent eux une limite de détection 0.2 µg.mL^{-1} avec une linéarité entre 0 et 8 µg.mL^{-1} à l'aide d'un système analogue à celui présenté dans ces travaux et basé sur l'électropolymérisation d'un

film de pyrène-NTA et l'immobilisation de la toxine du choléra par utilisation d'un complexe de ruthénium[278].

Les différences en termes de sensibilité et de linéarité, entre la littérature et le travail présenté ici, peuvent être expliquées par l'intégration des nanotubes de carbone dans l'architecture du biocapteur. En effet, ces composés permettent de diminuer l'impédance totale des électrodes modifiées tout en augmentant la surface spécifique à la surface de l'électrode, conduisant par la suite à l'immobilisation d'une plus grande quantité de biorécepteurs et donc à une meilleure détection lors de la reconnaissance antigène-anticorps.

2. Incubation des anticorps non-spécifiques

Enfin, afin de démontrer la spécificité du système, différents anticorps non-spécifiques à la toxine du choléra ont été testés. En effet, malgré la spécificité théoriquement assurée par la reconnaissance entre le biorécepteur et son substrat, la nature et la structure mêmes des protéines peuvent conduire à la formation de liaisons non spécifique à la surface des CNT[279]. Or, ce type d'interférences impacte fortement les performances du capteur dans des milieux complexes comme le sérum ou le sang. C'est pourquoi deux différents anticorps (l'anticorps contre la toxine de la dengue, D-AB et l'anticorps contre la rage, IgG-AB) ont été testés pour observer la présence ou non de telles interférences. La Figure 79 représente les diagrammes de Nyquist correspondant à l'incubation de ces deux anticorps en utilisant la couche de CNT de 4,0 µm d'épaisseur. Trois concentrations (10^{-11} g.mL^{-1}, 10^{-9} g.mL^{-1} et 10^{-7} g.mL^{-1}) ont été testées dans une solution de tampon phosphate 0,1 mol.L^{-1} à pH 7, 0.

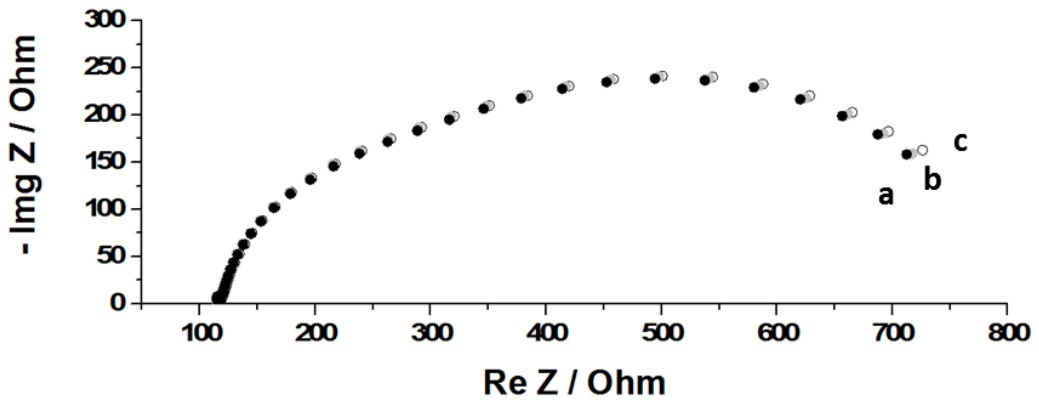


Figure 79: Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm après incubation de la toxine de la dengue (a) et après incubation de l'anticorps de la toxine de la dengue à différentes concentrations (10^{-11} g.mL^{-1}, 10^{-9} g.mL^{-1} et 10^{-7} g.mL^{-1}) (b), de l'anticorps de la toxine de la rage à différentes concentrations (10^{-11} g.mL^{-1}, 10^{-9} g.mL^{-1} et 10^{-7} g.mL^{-1}) (c). Conditions expérimentales similaires à celles présentées au sein de la Figure 76.

Comme le montre ces diagrammes, la valeur de l'impédance ne semble pas varier quel que soit l'anticorps ou la concentration testés. Les valeurs d'impédance à 0,2 Hz montrent une très faible augmentation de 3,0, 3,8 et 4,4%, pour les concentrations de 10^{-11} g.mL^{-1}, 10^{-9} g.mL^{-1} et 10^{-7} g.mL^{-1} respectivement. Dans le cas de l'anticorps spécifique, pour des concentrations équivalentes, des augmentations de 22,6, 28,9 et 34,7% avaient été déterminées. La présence du film de polymère à la surface de la couche de CNT ainsi que la présence de la toxine du choléra semblent donc assurer la spécificité du système étudié.

Conclusion

A travers ce travail, nous présentons une procédure efficace et fiable pour l'intégration de couches minces de nanotubes de carbone dans la conception d'un biocapteur compétitif pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra. Nous avons montré que la présence de ces surfaces nanostructurées permet l'obtention d'un système hautement sensible et possédant une large gamme linéaire de détection. En effet, une fois optimisé ce système a fourni une gamme linéaire en échelle logarithmique exceptionnelle de 8 ordres de grandeur (10^{-13} à 10^{-5} g.mL^{-1}) et possédant une sensibilité de 24,7 ± 0,4 Ω par ordre de grandeur. Cette configuration présente ainsi un intérêt certain pour la conception de biocapteurs impédancemétriques.

Nous souhaitons ainsi par la suite tester cette architecture pour la détection de molécules d'intérêt, pour la détection de l'anticorps de la dengue notamment ou celle de polluants, mais aussi évaluer sa fiabilité lors de son utilisation dans des milieux complexes comme le sang ou le plasma sanguin.

Chapitre IV :

Biocapteur impédancemétrique pour la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue

IV. BIOCAPTEUR IMPEDANCEMETRIQUE POUR LA DETECTION DE L'ANTICORPS DE LA TOXINE DE LA DENGUE 123

A. Construction de l'édifice moléculaire 128

B. Caractérisation de l'édifice moléculaire 130

C. Détection de l'anticorps du virus de la Dengue..... 135

1. Mesure en milieu tamponné..... 135
2. Mesure en présence de plasma sanguin bovin 136
3. Courbes d'étalonnage..... 138

Suite aux travaux réalisés quant à la réalisation d'un biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra, un second biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue a été réalisé en prenant comme modèle l'architecture décrite précédemment.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère la dengue comme un défi mondial majeur en matière de santé publique dans les pays tropicaux et subtropicaux. En effet, les estimations les moins alarmistes indiquent que cette maladie présente entre 50 et 100 millions de nouveaux cas chaque année[280,281]. De plus, si la dengue était auparavant majoritairement recensée sur le continent asiatique, de nouvelles études ont révélé que l'infection se propage mondialement avec plusieurs cas découverts en Europe, et en particulier en France et en Croatie, ou encore en Afrique[282,283]. Ainsi, les derniers rapports indiquent que la dengue affecte aujourd'hui plus de 100 pays et, en raison du fait que la maladie est transmise par les moustiques, celle-ci se propage rapidement. De plus, une certaine proportion d'infections peut également se transformer en formes plus sévères, à savoir la dengue hémorragique et la dengue avec syndrome de choc. Ces deux formes sont associées à des taux de mortalité très élevés. En 2010, près de 2,4 millions de cas sévères ont ainsi été signalés. C'est pourquoi de nouveaux efforts ont été faits pour faire face au problème soulevé par cette infection [284]. Une des premières réponses pouvant être apportée consiste à surveiller et détecter de manière fiable les premiers symptômes de la maladie. En effet, une détection au stade précoce de l'infection permet d'améliorer la rapidité et l'efficacité de la réponse médicale apportée et ainsi limiter la propagation du virus[285].

À l'heure actuelle, différentes techniques existent et sont utilisées pour détecter les cas d'infection dus au virus de la dengue, comprenant à la fois des tests en laboratoire et des études sur le terrain[286]. Ainsi, des tests commerciaux faciles d'utilisations et offrant une réponse rapide, mais aussi des kits de tests ELISA, sont d'ores et déjà disponibles[287]. Ces tests ne permettent pas cependant une détection quantitative et souffrent parfois d'un manque de sélectivité. C'est pourquoi aucune de ces solutions ne satisfait entièrement les attentes de l'utilisateur qui exigent généralement que le moyen de détection utilisé possède un coût d'utilisation et de production réduits, une bonne sélectivité, un temps de réponse rapide et une utilisation facile à mettre en place pour des études sur le terrain notamment.

Dans ce contexte, le développement de biocapteurs électrochimiques présente une alternative intéressante pour répondre à ces attentes. En effet, ce type de capteur, comme vu précédemment, offre une forte sélectivité, une sensibilité élevée permettant d'atteindre de très basses limites de détection et peut être miniaturisé afin d'être utilisé dans des appareils portables. De plus, contrairement à la plupart des capteurs colorimétriques ou à fluorescence, les biocapteurs électrochimiques permettent de quantifier les molécules ciblées, indiquant de ce fait le stage de l'infection auquel se trouve le patient[280].

Dans le cas de la dengue, il existe deux stratégies pour détecter les cas infectieux. Le premier se base directement sur la détection de la toxine (l'antigène) de la dengue et le second se base lui sur la détection de la réponse immunitaire de l'organisme du patient, à savoir la production d'anticorps[288].

La plupart des travaux décrits dans la littérature utilisent la première stratégie[289–293]. Pour ce type de système, l'anticorps est immobilisé à la surface du transducteur électrochimique et la détection se fait par reconnaissance de l'antigène. A l'heure actuelle, le capteur le plus abouti utilisant cette stratégie est celui proposé par Sinawang et al.[294]. Ils utilisent pour cela un biocapteur électrochimique à flux latéral mettant en jeu une structure de type « sandwich » avec la présence d'une électrode nanostructurée et de nanoparticules d'or capables de se lier à la molécule ciblée (Figure 80). La détection est réalisée par EIS et CV.

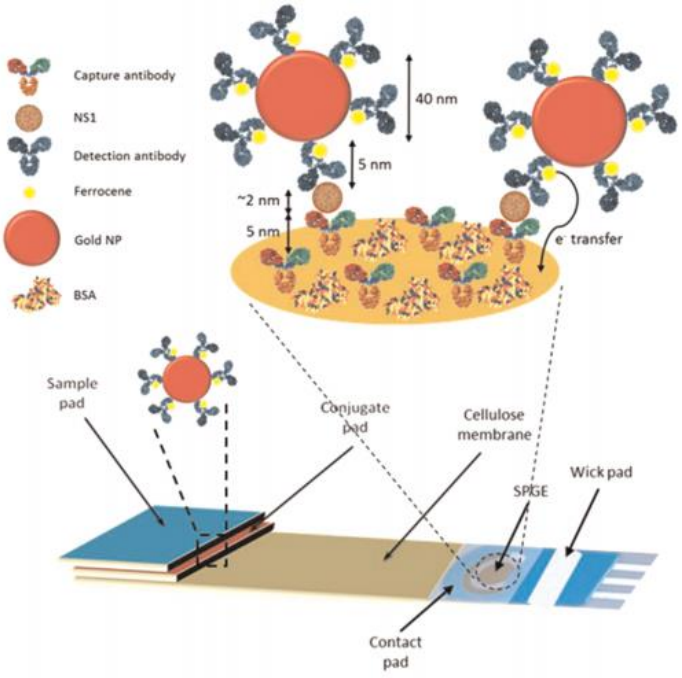


Figure 80: Représentation schématique du biocapteur électrochimique à flux latéral. Reproduit de [294].

A l'inverse, dans ce travail, la stratégie adoptée s'appuie sur l'immobilisation de l'antigène, la glycoprotéine NS1 du virus de la dengue, et donc sur la reconnaissance de l'anticorps (anticorps IgM contre le virus de la dengue). Cette stratégie a été préférentiellement choisie car elle se révèle plus facile à mettre en place. Pour la détection des anticorps, il existe très peu d'exemples dans la littérature. Fang X. et al. ont tout de même réalisé un biocapteur basé sur l'utilisation d'un film de titanate de barium et de strontium, synthétisé par voix sol-gel, afin de permettre l'immobilisation de la toxine de la dengue[295]. La détection se faisant par la suite par EIS. Le comportement de leur système en présence d'interférents n'a par contre pas été testé.

Comme présenté au cours des travaux basés sur la détection des anticorps de la toxine du choléra, la spectroscopie d'impédance électrochimique, couplé à l'intégration de nanotubes de carbone dans l'architecture moléculaire, permet une détection sans marquage de la molécule cible, basée sur la variation de la capacitance et de la résistance de transfert d'électrons[78,261]. C'est pourquoi les travaux présentés ici reprennent ces deux concepts de base afin de procéder à la détection des anticorps de la toxine de la dengue.

Cependant, à l'inverse de la toxine du choléra, la toxine de la dengue n'est pas disponible commercialement sous une forme marquée par une fonction biotine. C'est pourquoi certaines

modifications ont dû être apportées par rapport au travail précédemment. Une nouvelle approche pour l'immobilisation de la toxine a donc été étudiée pour répondre à cette problématique, basée elle aussi sur l'électropolymérisation d'un film de pyrrole à la surface d'une couche de CNT.

Enfin, bien que de nombreuses études dans le cadre du développement de biocapteurs soient confinées à une étude contrôlée, par exemple dans une solution tampon, les analyses dans un environnement complexe, en particulier dans des liquides physiologiques tels que le sang ou le plasma, permettent d'évaluer le biocapteur dans des conditions réelles, proches de celles rencontrées sur le terrain[296,297]. En effet, le virus peut être détecté dans le sérum et le plasma sanguin pendant 4 à 5 jours après le début de la maladie.

C'est pourquoi, dans ce travail, des couches de CNT d'épaisseurs contrôlées ont été formées et fonctionnalisées avec la glycoprotéine NS1 du virus de la dengue NS1 afin de permette la détection, fiable et hautement sensible, de l'anticorps du virus de la dengue NS1 dans un environnement complexe. Pour cela, ce biocapteur a été testé en présence de solutions de plasma sanguin bovin exposé à la partie non virulente de la toxine de la dengue.

A. Construction de l'édifice moléculaire

La première étape de la conception du biocapteur pour la détection de l'anticorps de la dengue a consisté, comme dans le cas du biocapteur précédent, à former et le déposer une couche de CNT à la surface d'une électrode de carbone vitreux d'un diamètre de 3 mm.

Le film de CNT a été déposé en utilisant la même technique que celle présentée dans le chapitre II.A, mettant en jeu la filtration d'une suspension de CNT sur un filtre de cellulose puis le dépôt de ce film par dissolution de la membrane de cellulose à l'aide d'une succession de lavage à l'acétone. Le film utilisé dans ce travail possède une épaisseur de 4,0 µm.

Une fois le film déposé, un film de polypyrrole est électrogénéré à la surface de la couche de CNT afin de permettre l'immobilisation des biorécepteurs, ici la toxine de la dengue, et de diminuer l'adsorption non-spécifique pouvant se produire à la surface des nanotubes. Cependant, le polymère utilisé ici est différent du polymère utilisé dans le cas du travail mené concernant la détection de l'anticorps de la toxine du choléra.

En effet, la toxine de la dengue utilisée dans ce travail ne présente pas de marquage par une fonction biotine ou par une fonction histidine. La fonction NTA terminale du précédent polymère ne peut donc pas être utilisée pour immobiliser spécifiquement cette toxine. C'est pourquoi un autre polymère a été choisi, présentant lui une fonction terminale N-hydroxysuccinimido 11-(pyrrol-1-yl) undecanoate (NHS).

Cette fonction est largement décrite dans la littérature du fait qu'elle permette la formation de liaison covalente par réaction d'amidation. La réaction entre les acides carboxyliques portés par la fonction NHS et l'amine de la toxine conduit par la suite à l'immobilisation de la protéine selon le processus présenté au sein de la Figure 81.

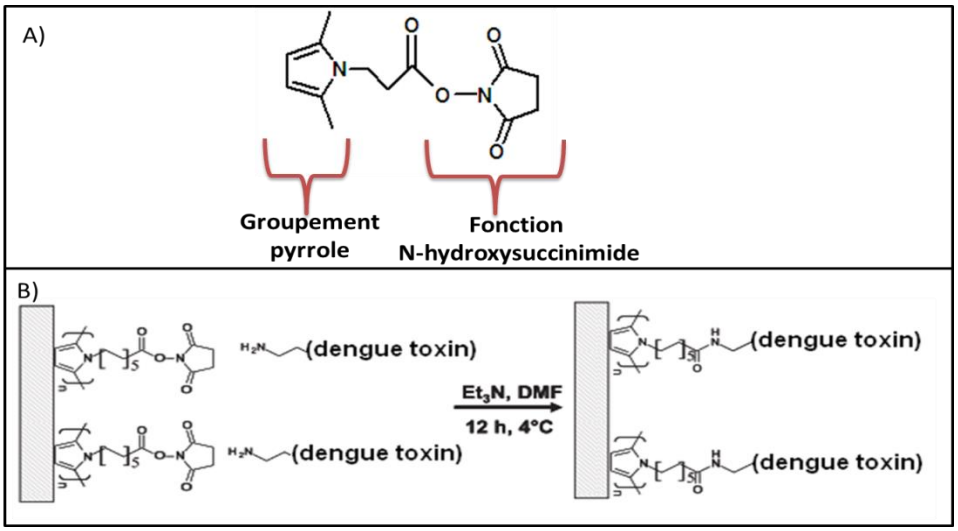


Figure 81: A) Structure du monomère de pyrrole NHS. B) Schéma réactionnel conduisant à l'immobilisation de la toxine de la dengue par réaction d'amidation avec la fonction NHS portée par le film polymère.

Pour permettre son utilisation, le film de poly-pyrrole NHS a été électrogénéré par voltampérométrie cyclique. Pour cela, le monomère est solubilisé (2.10^{-3} mol.L^{-1}) dans une solution de CH_3CN + 0,1 mol.L^{-1} de tetrabutylammonium perchlorate (TBAP). Le polymère est électrogénéré en réalisant 15 cycles entre 0 et 0,85 V / Ag/Ag$^+$ à une vitesse de balayage de 0,1 V.s^{-1}. Cette polymérisation se traduit par l'apparition d'un signal réversible à environ 0,3 V (Figure 82-A). Ce pic correspond à l'oxydation réversible du poly-pyrrole et permet donc de suivre l'évolution de la croissance du polymère. La Figure 82-B montre quant à elle les voltampérogrammes réalisés dans une solution exempte de monomère avant et après polymérisation. L'augmentation du courant capacitif entre les deux courbes présentées traduit la formation d'un film faiblement conducteur à la surface de l'électrode.

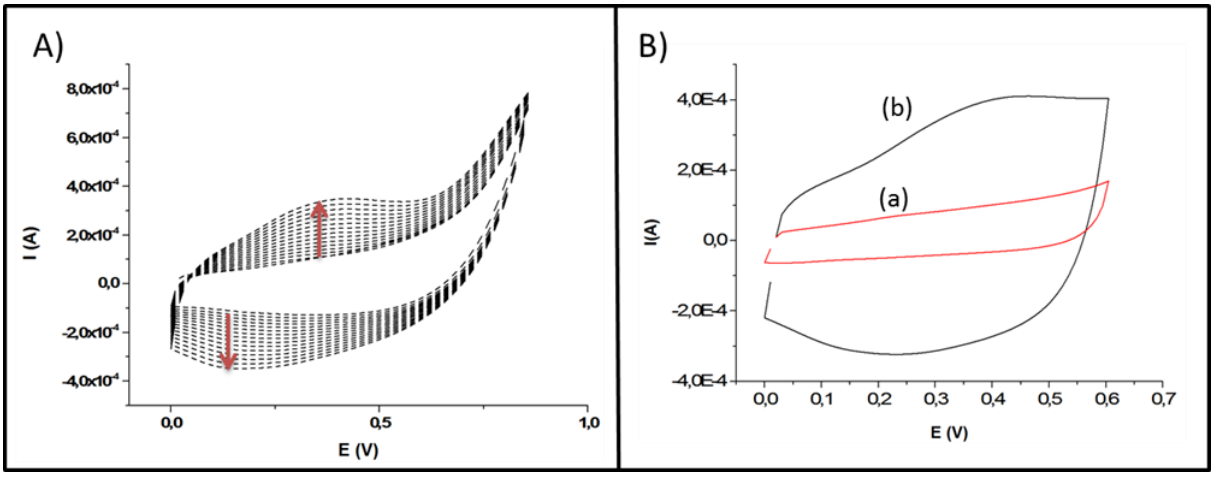


Figure 82: A) Courbe obtenue par voltampérométrie cyclique (15 scans entre 0 et 0,85 V à 100 mV.s^{-1}) lors de la polymérisation du pyrrole-NHS dans une solution contenant 5.10^{-3} mol.L^{-1} du monomère pyrrole-NHS dans CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L^{-1} sur électrode de carbone vitreux (Ø = 3 mm). B) Caractérisation par voltampérométrie cyclique du film de poly-(pyrrole-NHS) dans une solution de CH_3CN + $LiClO_4$ 0,1 mol.L^{-1} exempte de monomère avant (a) et après polymérisation (b); vb = 100 mV.s $^{-1}$.

Une fois le polymère formé, la toxine est immobilisée selon le processus expliqué précédemment. La réaction d'amidation se fait par incubation des électrodes à l'aide d'une solution contenant l'agent d'activation, l'EDC, ainsi que la protéine (5 mg de la glycoprotéine NS1 du virus de la dengue 2 dans 250 µL de solution de PBS avec 5 mg d'EDC). L'électrode est laissée à incuber pendant 12h à une température de 4°C. Les électrodes de carbone vitreux résultantes sont ensuite soigneusement lavées par rinçage à l'aide d'une solution de PBS.

Le film de polymère obtenu pour ces travaux est bien plus épais que celui obtenu pour celui obtenu lors de la polymérisation du pyrrole-NTA dans les travaux précédents. Cette différence est due à la technique de polymérisation utilisée. Dans le cas de la polymérisation par CV, celle-ci est moins contrôlée et le grand nombre de scans (15) implique donc la génération d'une couche de polymère épaisse.

B. Caractérisation de l'édifice moléculaire

Des caractérisations électrochimiques ont été menées pour chacune des étapes impliquées dans la conception de ce biocapteur.

La première série de caractérisation a été réalisée par voltampérométrie cyclique entre 0 et 0,4 V à une vitesse de balayage de 0,1 $V.s^{-1}$ (conditions expérimentales similaires à celles présentées pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra). La tendance générale qui ressort de ces mesures est une diminution du courant de pic en fonction de l'augmentation du nombre de différentes couches à la surface de l'électrode (Figure 83). Ce phénomène traduit la difficulté croissante pour la sonde électrochimique d'atteindre la surface de l'électrode au fur et à mesure que l'épaisseur du matériel immobilisé augmente (gène stérique). Une diminution du ΔEp est également constatée lors de l'ajout successif des différentes couches.

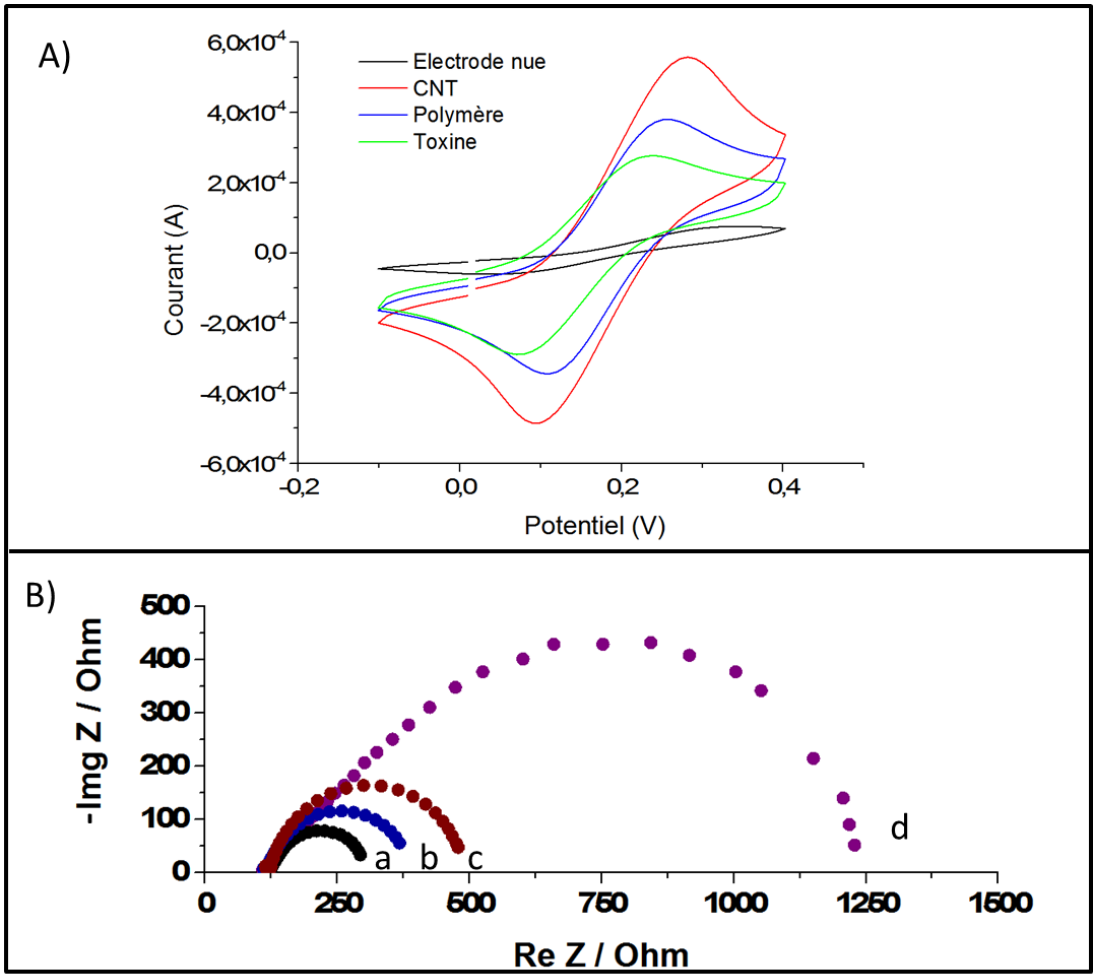


Figure 83: Mesures électrochimiques sur GCE revêtue d'un film de CNT d'épaisseur 4,0 µm avant l'électropolymérisation, après la génération d'une couche de poly-pyrrole NHS et après l'ancrage de la toxine de la dengue. A) Voltampérogrammes cycliques utilisant du $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (5.10^{-3} mol L^{-1}) dans une solution de 0,1 $mol.L^{-1}$ PB, pH = 7,0. vb =100 $mV.s^{-1}$. B) Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm (a), après polymérisation (b), après incubation de la toxine de la dengue (c) et pour l'électrode nue (d) à un potentiel de 0,2 V par rapport à SCE par utilisation de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5.10^{-3} $mol.L^{-1}$) dans une solution de 0,1 $mol.L^{-1}$ PBS, pH = 7,4.

La seconde série de caractérisation a été réalisée par EIS en présence du couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ et à un potentiel de 0,2 V (conditions expérimentales similaires à celles présentées pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra). Les diagrammes de Nyquist correspondant à chacune des étapes de la construction du biocapteur ainsi que celui de l'électrode nue sont présentés sur la Figure 83-B. La difference entre le spectre correspondant à l'électrode de carbone vitreux seule et celui de l'électrode recouverte d'un film de CNT montre que la résistance du transfert d'électrons diminue fortement lorsque celle-ci est recouverte d'un film de nanotubes de carbone.

Cette différence est également visible en CV et se traduit par l'augmentation du courant de pic (passage de $-5{,}47.10^{-5}$ A à $-4{,}8.10^{-4}$ A). Cela confirme que les nanotubes de carbone jouent un rôle essentiel dans le transfert d'électronique.

A l'inverse, une augmentation de l'impédance du système est observée lors des étapes de polymérisation et d'immobilisation de la toxine de la dengue. Cette augmentation vient du fait que l'épaisseur totale des différentes couches déposées à la surface de l'électrode augmente à chacune des étapes de construction. L'augmentation est d'autant plus grande lors de l'immobilisation de la toxine du fait de la forte masse molaire de celle-ci. En effet, cette glycoprotéine a un poids moléculaire de 40 kDa, ce qui peut expliquer cette augmentation de la résistance en raison de la forte contrainte stérique générée. Toutes les données expérimentales mesurées à partir de ces deux caractérisations sont rapportées dans le Tableau 7.

Tableau 7: Tableau rassemblant les valeurs des courants cathodiques obtenues par voltampérométrie cyclique (Ip_{cath}), les valeurs du module d'impédance à 0,1 Hz ($Z_{0,1Hz}$) et les valeurs du ΔEp pour les différentes étapes de construction du biocapteur (après le dépôt de CNT, après polymérisation et après incubation de la toxine de la dengue).

Modified electrode	GCE	GCE / CNT	GCE / CNT / poly(pyrrole-NHS)	GCE / CNT / poly(pyrrole-NHS) / Dengue Virus NS1
$I_{p,cath}$ /A	$-5{,}47.10^{-5}$	$-4{,}8.10^{-4}$	$-3{,}4.10^{-4}$	$-2{,}9.10^{-4}$
ΔEp / V	0.3	0.18	0.14	0.15
$Z_{0,1Hz}$ / Ohm	1232	293,5	368,5	478,2

Comme réalisé précédemment pour le biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra, il est possible d'utiliser un circuit électrique équivalent pour représenter le comportement de ce système. Cependant, l'allure des spectres d'impédance obtenus à partir de la couche de CNT lors de ces seconds travaux est très différente de celle observée lors des travaux sur le choléra (Figure 84). Cette différence est due à un changement de lots de CNT induisant une différence de propriétés électrochimiques.

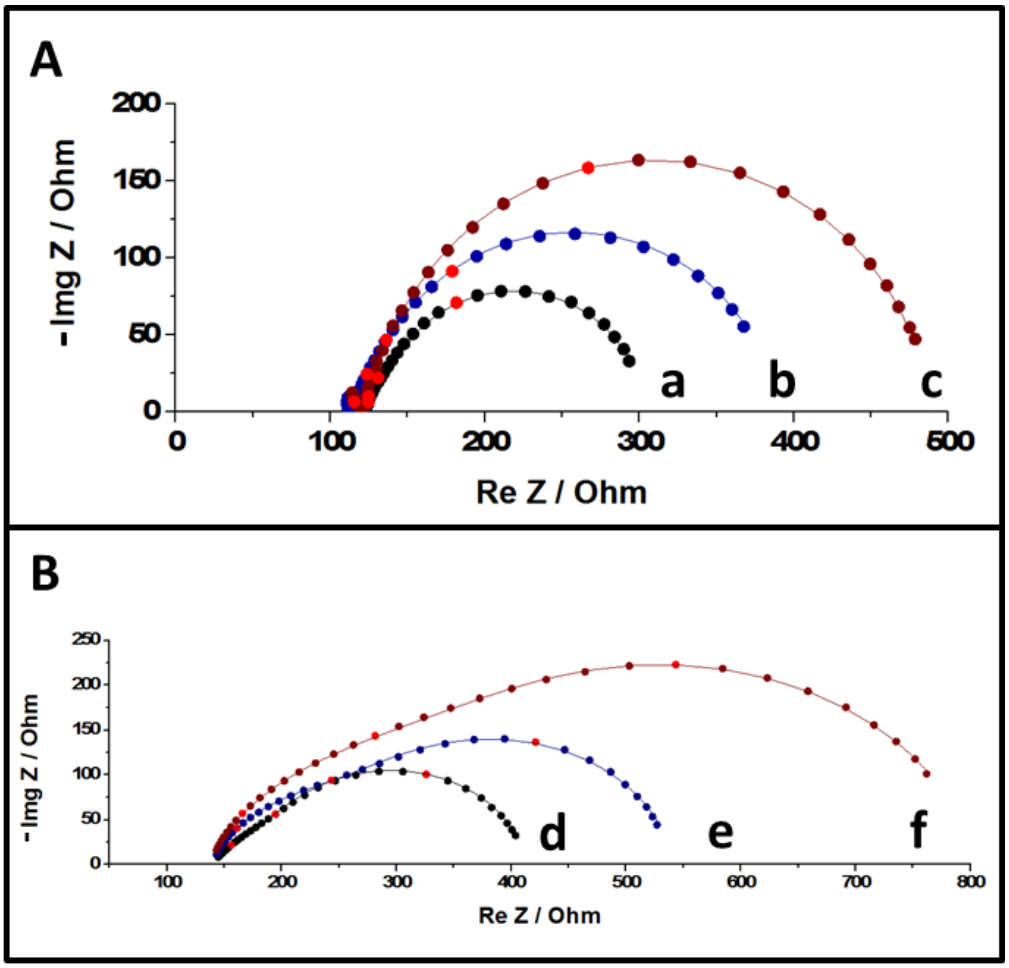


Figure 84: A) Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm (a), après polymérisation (b) et après incubation de la toxine de la dengue (c). B) Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm (d), après polymérisation (e) et après incubation de la toxine du choléra (f). Les points mis en évidence en rouge ont été pris à des fréquences de 51,2 ; 7,4 et 1,07 Hz.

D'après ces spectres, il semblerait que le transfert électronique soit beaucoup plus rapide dans le cas des travaux sur la dengue. En effet, le premier demi-cercle normalement observable et traduisant la résistance du transfert électronique semble avoir totalement disparu devant la boucle représentant, elle, la résistance de Warburg. La déconvolution des spectres a tout de même été réalisée une première fois à l'aide du même circuit équivalent que celui utilisé dans le cadre des travaux sur le choléra. Cependant, les résultats obtenus ainsi n'ont pas été concluants. En effet, la résistance de transfert de charge était très faible et son incertitude trop grande pour avoir une réelle signification.

De plus, afin d'identifier la cause de cette différence, plusieurs caractérisations ont été menées (MEB, Raman, microscopie laser, AFM, conductivité…). La seule de ces techniques permettant d'observer une différence entre les deux lots de CNT, hormis l'électrochimie, est la conductivité.

En effet, comme le montre la Figure 85, la conductivité, mesurée à partir de la méthode 4 pointes, est de l'ordre de 1,01 $S.cm^{-1}$ dans le cas des CNT utilisés pour le travail sur la dengue contre 0,43 $S.cm^{-1}$ pour ceux sur le choléra. Le nouveau lot de nanotubes est donc beaucoup plus conducteur que le premier utilisé et permet ainsi un meilleur transfert électronique.

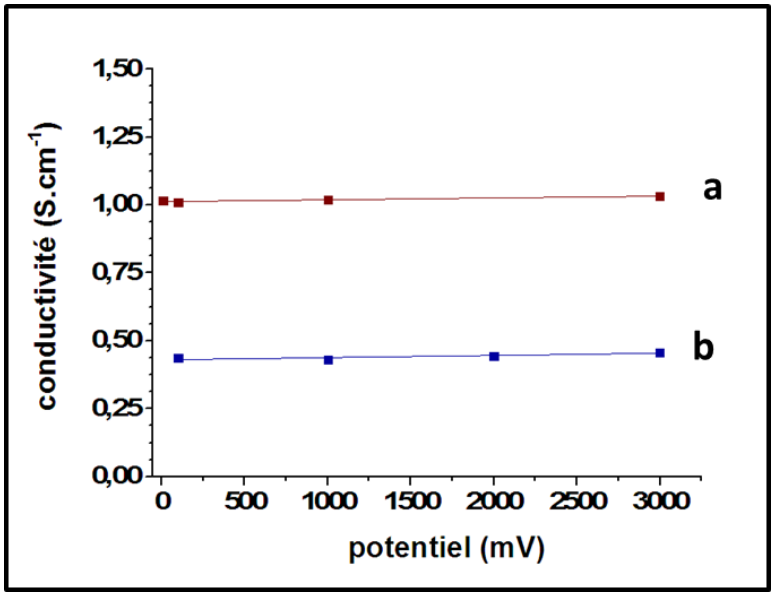


Figure 85: Courbe d'étalonnage de la conductivité en fonction du potentiel pour des films de CNT d'une épaisseur de 4 µm issus de deux lots différents avec a) le film utilisé lors du travail sur la dengue et b) le film utilisé lors du travail sur le choléra.

Comme observée sur les diagrammes de Nyquist précédents, cette différence influe donc sur l'allure des spectres obtenus par impédance. C'est pourquoi il a été choisi de modifier le circuit électrique équivalent utilisé afin d'obtenir un modèle décrivant mieux le système étudié. La résistance du transfert électronique étant très faible devant la résistance de Warburg, et la déconvolution n'étant de ce fait pas possible, cet élément a donc été retiré. Le nouveau circuit électrique équivalent utilisé pour ce biocapteur est représenté au sein de la Figure 86. Les éléments présents sont R_1, la résistance de la solution, la capacité de double couche, C_{DC}, et la résistance de Warburg, Ws. Une capacité pure est utilisée pour ce circuit car l'inhomogénéité de la surface est ici supportée par l'impédance de diffusion.

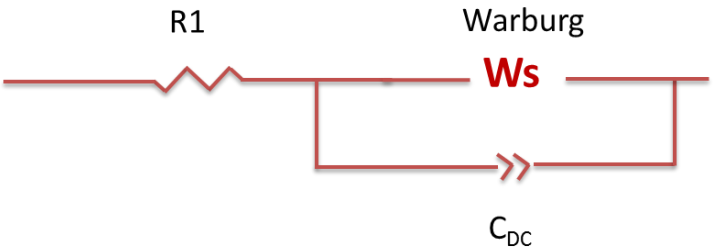


Figure 86 : représentation schématique du circuit électrique équivalent utilisé.

A l'aide de ce circuit, différents paramètres ont pu être déterminés lors des trois étapes de construction du biocapteur (formation du film de CNT, polymérisation et immobilisation de la toxine) et ont été consignés au sein du Tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Tableau rassemblant les valeurs des courants cathodiques obtenues par voltampérométrie cyclique (Ip_{cath}), les valeurs du module d'impédance à 0,2 Hz ($Z_{0,2Hz}$) et les valeurs des éléments composant le circuit équivalent (R_1, C_{DC}, R_{diff}) obtenues par extrapolation des courbes d'impédance et ce pour les différentes étapes de construction du biocapteur (après le dépôt de CNT, après polymérisation et après incubation de la toxine de la dengue) ainsi que pour le film de CNT utilisé lors des travaux sur le choléra.

	CNT (cholera)	CNT (dengue)	Polymère	Toxine
Ip_{cath} /A	$-2,90\times10^{-4}$	$-4,8.10^{-4}$	$-3,4.10^{-4}$	$-2,9.10^{-4}$
$Z_{0.1Hz}$ / Ohm	404 ± 2	276,6± 2	338,5 ± 2	459,6± 2
C_{DC} / µF	92 ± 2	660 ± 20	610 ± 20	300 ± 10
R_{diff} / Ohm	230 ± 4	180 ± 3	273 ± 5	366 ± 6

Les deux premières colonnes de ce tableau permettent de comparer les valeurs des composants électriques des films de CNT, obtenus par utilisation du circuit électrique équivalent, pour les deux systèmes étudiés, à savoir le capteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra et celui pour la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue. Une forte différence au niveau des valeurs du module de l'impédance à 0,2 Hz et de la capacité de double couche peut être notée avec une capacité de 92 µF dans le cas du choléra contre 660 µF dans le cas de la dengue. Cette différence rejoint donc les observations réalisées précédemment par mesure de conductivité et montre que les CNT utilisés dans le cas de la dengue permettent l'obtention d'une surface active électrochimique bien plus grande. Cette observation est également traduite par la diminution de la résistance de diffusion (230 ohms contre 180 ohms pour les travaux sur la dengue).

Concernant le biocapteur pour la détection de l'anticorps de la dengue en lui-même, une diminution de la capacité de double couche peut être observée pour chaque étape impliquée dans la construction du biocapteur. La première a lieu lors du recouvrement des CNT par la couche de polymère de pyrrole-NHS. Cette variation (de 660 à 620 µF) est due à la diminution de la surface active de l'électrode lors de la formation du polymère.

Une seconde diminution, plus importante (de 610 à 300 µF), a lieu lors de l'ancrage de la toxine à la surface de l'électrode. Comme dans le cas des travaux sur le choléra, cette forte diminution traduit la gêne stérique engendrée par l'immobilisation d'une molécule à fort poids moléculaire (48 kDa dans le cas de la toxine de la dengue[299,300]) et donc la forte modification de la surface active en résultant.

Concernant la résistance de diffusion, déterminée à partir des éléments composants le Warburg, celle-ci augmente lors des différentes étapes de formation du système. La première augmentation est constatée lors de l'introduction du film de poly-pyrrole-NHS qui, en plus de diminuer la surface active des CNT, introduit une fonction ester et donc induit une répulsion entre la surface de l'électrode et le couple $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ utilisé comme sonde redox et chargé négativement.

L'immobilisation de la toxine conduit elle aussi à une augmentation de la résistance. Celle-ci, en plus de son fort poids moléculaire, possède un point isoélectrique de 5,7[301]. Elle est donc chargée négativement à un pH de 7,4 et crée donc une nouvelle répulsion entre la toxine et la sonde redox, augmentant de ce fait la résistance de diffusion.

C. Détection de l'anticorps du virus de la Dengue

1. Mesure en milieu tamponné

Une fois les caractérisations de l'édifice moléculaire effectuées, le biocapteur a été incubé avec différentes concentrations de l'anticorps de la toxine de la dengue en solution dans du PBS 0,1 mol.L^{-1} à pH = 7,4. Une large gamme de concentrations a été testée variant de 1.10^{-12} g.mL^{-1} à 1.10^{-5} g.mL^{-1}.

Pour chacune des concentrations, une mesure impédancemétrique a été effectuée à un potentiel de 0,2 V avant que l'électrode ne soit rincée à l'aide de la solution tampon puis incubée de nouveau par une concentration croissante d'anticorps. Les diagrammes de Nyquist résultant de ces mesures sont présentés au sein de la Figure 87. L'incubation a été réalisée en déposant une goutte de 75 µL de la solution d'anticorps à la surface de l'électrode pendant 30 min à 4°C. L'électrode est rincée avec la solution tampon avant de procéder à la mesure électrochimique.

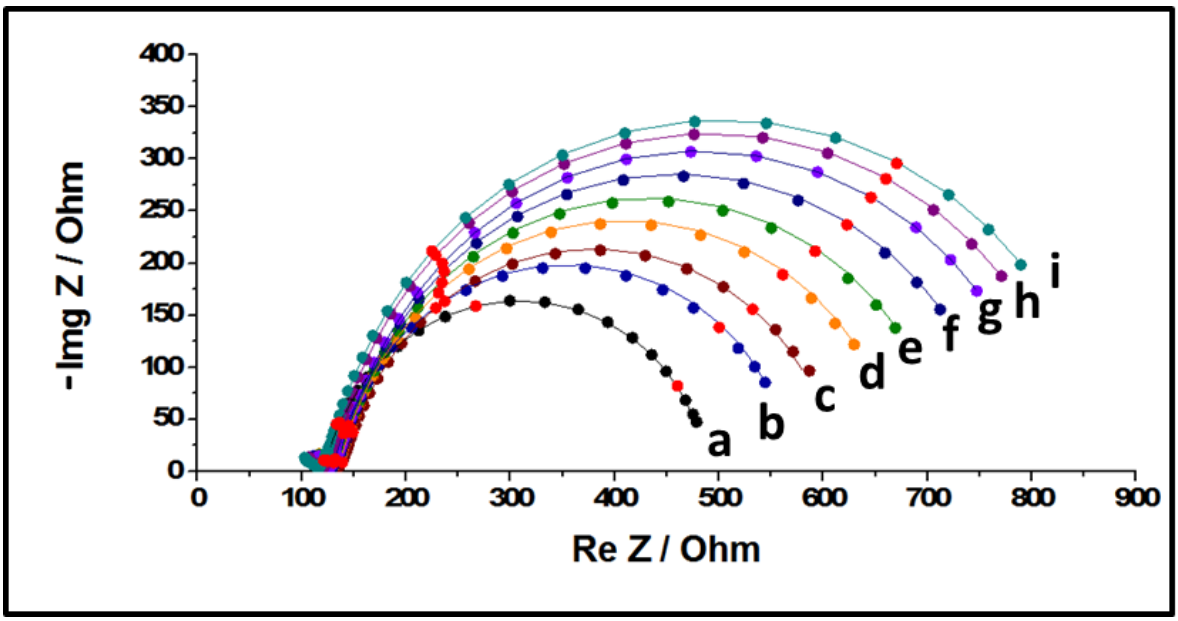


Figure 87: Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm et après l'ancrage de la toxine de la dengue (a) et après incubation de l'anticorps de la toxine de la dengue à différentes concentration dans une solution de PBS à 0,1 mol.L^{-1} pH 7,4: (b) 10^{-12} g.mL^{-1}; (c), 10^{-11} g.mL^{-1}; (d) 10^{-10} g.mL^{-1} ; (e) 10^{-9} g.mL^{-1}; (f) 10^{-8} g.mL^{-1}; (g) 10^{-7} g.mL^{-1}; (i) 10^{-6} g.mL^{-1} et (i) 10^{-5} g.mL^{-1}. Des données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Conditions expérimentales similaires à celles présentées au sein de la Figure 83. Les données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Les points mis en évidence en rouge ont été pris à des fréquences de 51,2 ; 7,4 ; 1,07 et 0,2 Hz.

Ces diagrammes de Nyquist montrent une augmentation croissante de l'impédance du système en fonction de l'augmentation de la concentration en anticorps sur la gamme de concentration testée. De plus, une bonne corrélation peut être observée entre les données expérimentales et les courbes obtenues à partir de l'utilisation du circuit électrique équivalent permettant ainsi d'extraire différents paramètres tels que la capacité de double couche et la résistance de diffusion du système (Tableau 9).

Tableau 9: Tableau rassemblant les valeurs du module d'impédance à 0,1 Hz ($Z_{0,1Hz}$) et les valeurs des éléments composant le circuit équivalent (C_{DC}, R_{diff}) obtenues par extrapolation des courbes d'impédance et ce pour la toxine seule ainsi que pour les différentes concentrations d'anticorps de la toxine de la dengue en milieu tamponné.

[Anti-Dengue] / g.mL^{-1}	toxine	1.10^{-12}	1.10^{-11}	1.10^{-10}	1.10^{-9}	1.10^{-8}	1.10^{-7}	1.10^{-7}	1.10^{-6}
C_{DC}a / µF	300 ± 10	440 ± 13	421 ± 13	436 ± 13	403 ± 12	402 ± 12	384 ± 11	391 ± 12	381 ± 11
R_{diff} / Ohm	366 ± 6	438 ± 13	469± 14	536 ± 16	584 ± 17	633 ± 19	676 ± 20	715 ± 21	744 ± 22
$Z_{0.1Hz}$ / Ohm	478	544	587	629	669	712	748	771	789

Deux tendances ressortent de l'étude de ces données. La première étant une diminution de la capacité de double couche en fonction de la concentration en anticorps, la seconde l'augmentation de la résistance de diffusion. Ces deux paramètres ont été par la suite utilisés pour le tracer des courbes d'étalonnage (voir chapitre IV.C.3).

2. Mesure en présence de plasma sanguin bovin

Afin d'observer le comportement du dispositif de détection en condition réelle, une série de mesure a été menée en présence de plasma sanguin bovin. Pour cela, les anticorps de la toxine de la dengue ont été directement dissouts au sein du plasma et non pas dans une solution tampon comme présentée dans le paragraphe précédent. Une gamme de concentrations similaire a été testée (1.10^{-12} g.mL^{-1} à 1.10^{-5} g.mL^{-1}) dans le plasma. Les diagrammes de Nyquist résultant de ces différentes caractérisations sont visibles au sein de la Figure 88.

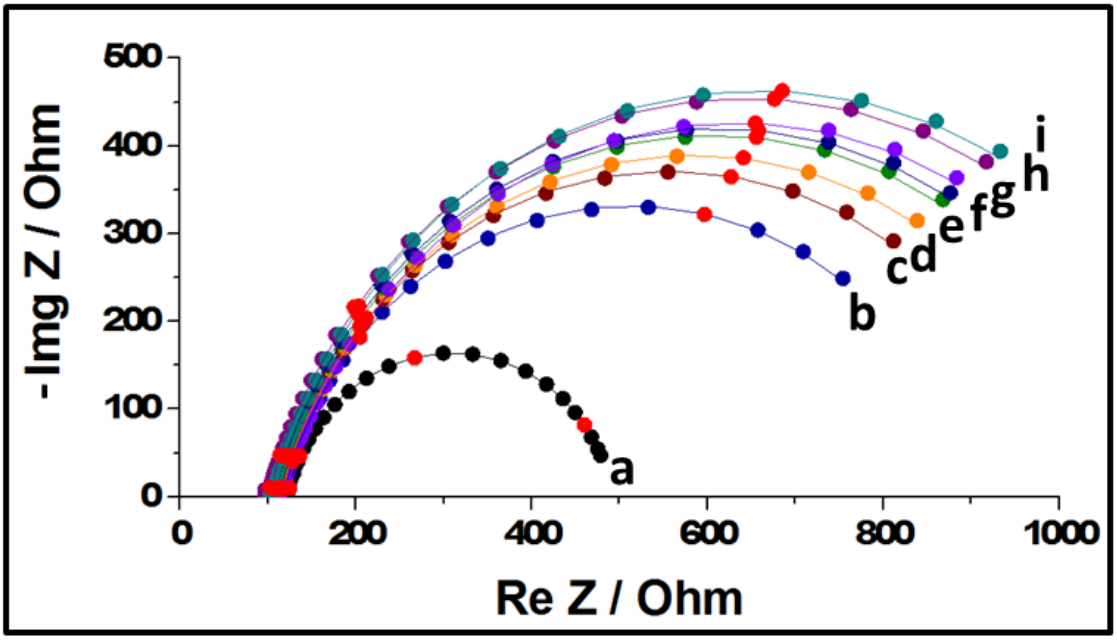


Figure 88: Diagrammes de Nyquist obtenus pour l'électrode modifiée avec un film de CNT d'une épaisseur de 4,0 µm et après l'ancrage de la toxine de la dengue (a) et après incubation de l'anticorps de la toxine de la dengue à différentes concentrations dans du plasma sanguin bovin: (b) 10^{-12} g.mL^{-1}; (c), 10^{-11} g.mL^{-1}; (d) 10^{-10} g.mL^{-1} ; (e) 10^{-9} g.mL^{-1}; (f) 10^{-8} g.mL^{-1}; (g) 10^{-7} g.mL^{-1}; (h) 10^{-6} g.mL^{-1} et (i) 10^{-5} g.mL^{-1}. Des données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Conditions expérimentales similaires à celles présentées au sein de Figure 83. Les données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Les points mis en évidence en rouge ont été pris à des fréquences de 51,2 ; 7,4 ; 1,07 et 0,2 Hz.

Comme dans le cas des mesures faites au sein du milieu tamponné, les mesures en présence de plasma sanguin conduisent à une augmentation de l'impédance du système en fonction de la concentration en anticorps. Le circuit électrique équivalent permet également une bonne corrélation des données expérimentales et donc la détermination des différents paramètres (Tableau 10). Cependant, il peut être noté que l'impédance observée est plus importante dans le cas d'une incubation des anticorps en présence de plasma que dans le cas des mesures en milieu tamponné.

Tableau 10: Tableau rassemblant les valeurs du module d'impédance à 0,1 Hz ($Z_{0,1Hz}$) et les valeurs des éléments composant le circuit équivalent (C_{DC}, R_{diff}) obtenues par extrapolation des courbes d'impédance et ce pour la toxine seule ainsi que pour les différentes concentrations d'anticorps de la toxine de la dengue en présence de plasma sanguin.

[Anti-Dengue] / g.mL^{-1}	toxine	1.10^{-12}	1.10^{-11}	1.10^{-10}	1.10^{-9}	1.10^{-8}	1.10^{-7}	1.10^{-6}	1.10^{-5}
C_{DC}a / µF	300 ± 10	439 ± 13	411 ± 12	405 ± 12	390 ± 12	387 ± 12	368 ± 11	373 ± 11	377 ± 11
R_{diff} / Ohm	366 ± 6	772 ± 23	864± 26	914 ± 27	961 ± 29	979 ± 29	998 ± 30	1053 ± 32	1073 ± 32
$Z_{0.1Hz}$ / Ohm	479	754	812	840	866	878	884	918	932

Cette différence se fait principalement lors de la première incubation en présence de plasma, c'est-à-dire entre la mesure réalisée sur la toxine immobilisé et l'incubation à une concentration de 1.10^{-12} g.mL^{-1} en anticorps. En effet, lors de celle-ci, la valeur du module de l'impédance à 0,1 Hz passe de 479 à 754 ohms dans le plasma contre seulement 478 à 544 ohms dans le cas de la première incubation en milieu tamponné.

Cette augmentation traduit une adsorption non spécifique de molécules présentes au sein du plasma à la surface de l'électrode. Ce phénomène semble cependant se produire seulement lors de la première incubation. En effet, cette forte augmentation n'est plus visible pour les concentrations suivantes et l'évolution de la résistance semble uniquement due à la reconnaissance entre l'antigène et l'anticorps. Cela signifie que les sites où l'adsorption non spécifique est possible sont bloqués dès la première incubation, permettant par la suite une reconnaissance spécifique des anticorps de la dengue. Pour confirmer cela, une incubation du plasma seul, sans anticorps, a été faite. Une augmentation de l'impédance, de l'ordre de 13%, a été observée et correspond donc à l'adsorption non-spécifique du plasma à la surface de l'électrode.

Enfin, comme dans le cas des travaux en milieu tamponné, l'évolution de la résistance de diffusion ainsi que de la capacité de double couche en fonction de la concentration en anticorps ont conduit à l'obtention de courbes d'étalonnage présentées au sein du chapitre suivant.

3. Courbes d'étalonnage

En utilisant les données présentées au sein des Tableau 9 et Tableau 10, différentes courbes ont pu être tracées. La première présente l'augmentation de la résistance de diffusion, R_{diff}, en fonction de la concentration en anticorps de la toxine de la dengue en milieu tamponné et en présence de plasma sanguin (Figure 89-A). La seconde présente pour sa part la diminution de la capacité de double couche toujours en fonction de la concentration en anticorps et pour les deux milieux (Figure 89-B).

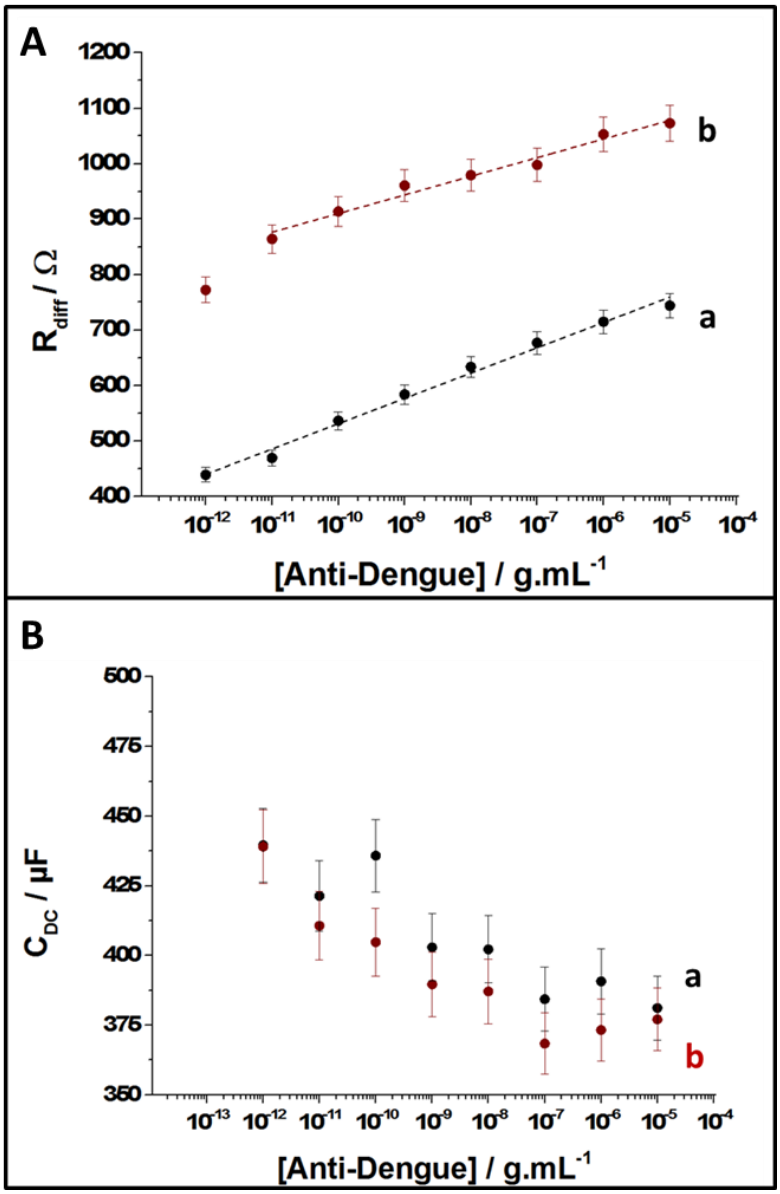


Figure 89: A) Courbes d'étalonnage présentant la variation de la résistance de diffusion en fonction de la concentration en anticorps de la toxine de la dengue (échelle logarithmique) dans une solution tampon (a) et dans du plasma sanguin bovin (b). Les données expérimentales (points) ainsi que la régression linéaire (lignes) en résultant sont présentées. Régressions linéaires: (a) pente = 45,7 ± 1,7 Ω par ordre de grandeur; R^2 = 0,990; (b) pente = 39,5 ± 3,8 Ω par ordre de grandeur; R^2 = 0,939. B) Courbes d'étalonnage présentant la variation de la capacité de double couche en fonction de la concentration en anticorps de la toxine de la dengue (échelle logarithmique) dans une solution tampon (a) et dans du plasma sanguin bovin (b)

La première série de mesure, réalisée dans le milieu tamponné, permet d'obtenir une courbe d'étalonnage entre 10^{-12} et 10^{-5} g.mL^{-1} représentant une évolution linéaire en échelle semi-logarithmique de la résistance de diffusion en fonction de la concentration en anticorps. La sensibilité observée pour cette gamme de concentration est de 45,7 ± 1,7 Ω avec un facteur de corrélation (R^2) de 0,990.

Pour ce qui est de la série en présence de plasma sanguin bovin, un ordre de grandeur est perdu lors du tracé de la courbe d'étalonnage avec une gamme linéaire comprise entre 10^{-11} et

10^{-5} g.mL^{-1} (échelle semi-logarithmique). La sensibilité est également légèrement inférieure avec une valeur de 39,5 ± 3,8 Ω par ordre de grandeur, tout comme le facteur de corrélation $R^2 = 0,939$.

Ces légères différences s'expliquent par la présence du plasma et par l'adsorption non spécifique qu'il engendre. De plus, comme expliqué précédemment, les valeurs de résistance sont plus élevées pour les incubations réalisées dans le plasma avec des valeurs comprises entre 772 et 1073 ohms contre seulement 438 et 743 ohms pour le tampon.

Concernant la capacité de double couche, le tracé de son évolution en fonction de la concentration en anticorps ne permet pas la réalisation d'une courbe d'étalonnage. Une tendance peut tout même être observée avec la diminution de la capacité lors de l'augmentation de la concentration traduisant une diminution de la surface active de l'électrode. De plus, les valeurs obtenues sont très proches pour les deux séries de mesures.

Pour ce qui est des performances de ce capteur, une limite de détection de 1.10^{-12} g.mL^{-1} est obtenue en milieu tamponné et de 1.10^{-11} g.mL^{-1} en présence de plasma avec des gammes de linéarité en échelle semi-logarithmique comprises respectivement entre 10^{-12} et 10^{-5} g.mL^{-1} et entre 10^{-11} et 10^{-5} g.mL^{-1}. Concernant les données de la littérature, les différents travaux rapportés procèdent généralement non pas à la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue, mais à la détection de la protéine antigène en elle-même.

Silva et al. obtiennent par exemple une limite de détection de $1,5.10^{-8}$ g.mL^{-1} pour une gamme de linéarité comprise entre 4.10^{-8} g.mL^{-1} et 6.10^{-7} g.mL^{-1} en utilisant une électrode sérigraphiée modifiée par des groupements thiophène[290]. Cette même équipe a également travaillé sur la détection de la toxine de la dengue en modifiant une électrode à l'aide d'un film de nanotubes de carbone et d'un film de poly-allylamine[289]. Ils obtiennent alors une gamme linéaire comprise entre 1.10^{-7} g.mL^{-1} et $2,5.10^{-6}$ g.mL^{-1}, pour une limite de détection de $3,5.10^{-8}$ g.mL^{-1}. Ces gammes de concentration permettent une détection rapide de la pathologie à un stade précoce de l'infection. De plus, ces capteurs ont été testé en présence de plasma et conservent une bonne sensibilité et une bonne sélectivité.

Sinawang et al. ont eux réussi à un obtenir une très bonne limite de détection de 5.10^{-10} g.mL^{-1} à l'aide d'un dispositif portable pour une gamme de linéarité allant de 1.10^{-9} à 25.10^{-9} g.mL^{-1}. Ce capteur possède également une bonne spécificité puisqu'aucune détection n'a été observée lors des tests de contrôles[294].

Ainsi, les résultats rapportés ici se présentent comme une très bonne alternatives pour la détection de l'anticorps de la dengue puisqu'une très bonne limite de détection est atteinte, couplée à une large gamme de linéarité. Enfin, l'intérêt de ces travaux repose également sur la capacité à pouvoir utiliser ce système de détection en conditions réelles au sein de plasma sanguin.

Conclusion

Suite aux travaux menés concernant la détection de l'anticorps de la toxine du choléra, le protocole a été adapté pour permettre la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue. Malgré quelques problèmes dus à un changement de lot de nanotubes de carbone, et les différences en termes de réponses électrochimiques résultant de ce changement, un capteur compétitif a été réalisé. Une limite de détection de 10^{-12} g.mL^{-1} a ainsi pu être obtenue sur une très bonne gamme de concentration avec une linéarité en échelle semi-logarithmique observée entre 10^{-12} à 10^{-5} g.mL^{-1}.

Enfin, la nouveauté majeure de ce projet, comparé à celui mené sur le choléra, est la réalisation de tests en conditions réelles. En effet, des caractérisations ont été menées en présence de plasma sanguin bovin et ont conduit à l'obtention de très bons résultats avec une linéarité en échelle semi-logarithmique comprise entre 10^{-11} à 10^{-5} g.mL^{-1} pour une sélectivité de 39,5 ± 3,8 Ω par ordre de grandeur (R^2 = 0,939).

Ce projet présente donc un réel intérêt pour la réalisation de biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue en conditions réelles.

Chapitre V :

Biocapteur pour la détection du catéchol et de la dopamine

V. BIOCAPTEUR POUR LA DETECTION DU CATECHOL ET DE LA DOPAMINE 143

A. Construction de l'édifice moléculaire 147

B. Détection du catéchol 148

1. Mesures par chronoampérométrie 148
2. Exploitation des résultats 149

C. Détection de la dopamine 156

1. Mesures par ampérométrie 156
2. Interprétation des résultats : 157

Le dernier travail présenté au sein de ce manuscrit porte sur l'intégration des nanobâtonnets de disulfure de tungstène dans la conception d'un biocapteur pour la détection du catéchol et de la dopamine.

Le catéchol (CA) est un dérivé répandu du phénol et est largement utilisé dans divers domaines tels que la médecine, les teintures et ou encore la photographie[302]. C'est pourquoi des traces de ce composé peuvent être trouvées dans l'environnement. Or, le catéchol possède un faible taux de dégradation et est surtout considéré comme un polluant à forte toxicité. En effet, il est très nocif pour le corps humain en raison de sa biotoxicité et des irritations cutanées qu'il peut engendrer[303]. Ainsi, de nombreuses techniques pour la détection de ce composé ont été développées au cours des dernières années afin de répondre à la demande croissante pour l'obtention d'une méthode fiable de détection du catéchol. Parmi celles-ci, il est possible de retrouver notamment la chromatographie en phase gazeuse[304], la chimioluminescence[305], la spectrométrie de masse[306] ou encore la spectrométrie UV[307]. Cependant, le coût de ces méthodes, comme vu précédemment, reste élevé et leur réalisation requiert généralement un long laps de temps. C'est pourquoi, par rapport à ces méthodes, l'approche électrochimique présente de nombreux avantages, à savoir l'économie de temps, la simplicité de la manipulation et la baisse du coût de réalisation.

La dopamine (DA) est quant à elle un neurotransmetteur qui joue un rôle important en tant que messager chimique extracellulaire dans les systèmes cardiovasculaire, rénal, hormonal et nerveux. Ainsi, elle est au centre de la transmission du signal cellulaire et a donc une forte influence sur le comportement chez l'homme. De plus, des concentrations anormales de DA dans les fluides biologiques, par exemple l'urine, le plasma sanguin ou encore le liquide extracellulaire du système nerveux central, peuvent être l'indicateur de plusieurs maladies telles que la schizophrénie ou les maladies de Huntington et de Parkinson[308,309]. La mise au point de techniques de détection permettant une mesure sensible et sélective des concentrations de DA au sein du corps humain est donc très importante pour le diagnostic de ces maladies et le suivi des patients.

En effet, en raison de la concentration de l'ordre du nano-molaire au sein des fluides biologiques[310], la détection de la DA nécessite une sensibilité élevée. De plus, les espèces interférentes telles que l'acide ascorbique ou l'acide urique sont très présentes dans les divers fluides corporels, c'est pourquoi une bonne sélectivité est exigée[311]. Actuellement, la dopamine peut être détectée par différentes méthodes avec notamment l'électrophorèse capillaire[312], la chromatographie liquide haute performance[313], la spectroscopie de masse[314] et enfin l'électrochimie[315,316]. Cependant, ces techniques sont souvent coûteuses et lourdes à mettre en place et ne permettent pas à l'heure actuelle un suivi en temps réel de ces maladies neurodégénératives. La conception d'un biocapteur électrochimique sans marqueur, facile d'utilisation et offrant une bonne sensibilité présente un intérêt certain pour la détection de la DA.

Dans cette optique, l'intégration de nanomatériaux dans la réalisation d'un tel dispositif s'avère particulièrement intéressante afin de diminuer le seuil de détection tout en conservant une bonne sensibilité. De plus, ils peuvent être utilisés comme support pour permettre

l'immobilisation du matériel biologique ciblé à travers diverses fonctionnalisations et ainsi assurer une bonne sélectivité par le biais de la reconnaissance entre le biorécepteur et son analyte[317,318].

Dans ce travail, un film de WS_2 porteur de fonctions acides carboxyliques a ainsi été intégré dans la conception du biocapteur afin de permettre l'immobilisation de la polyphénol oxydase à la surface de l'électrode de carbone vitreux. En effet, la présence de cette fonction va permettre la formation d'une liaison covalente entre la protéine et le film par utilisation d'un intermédiaire réactionnel, conduisant à terme à l'immobilisation de l'enzyme.

La polyphénol oxydase (PPO), ou tyrosinase, est une enzyme capable d'oxyder les groupements phénols et donc les composés tels que le catéchol et la dopamine. Son site actif consiste en une paire d'atomes de cuivre couplés entre eux. Ces atomes de cuivre, CuA et CuB, lesquels sont chacun coordonnés par trois résidus d'histidine, constituent ainsi le site où se déroule l'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et son substrat phénolique (Figure 90)[319].

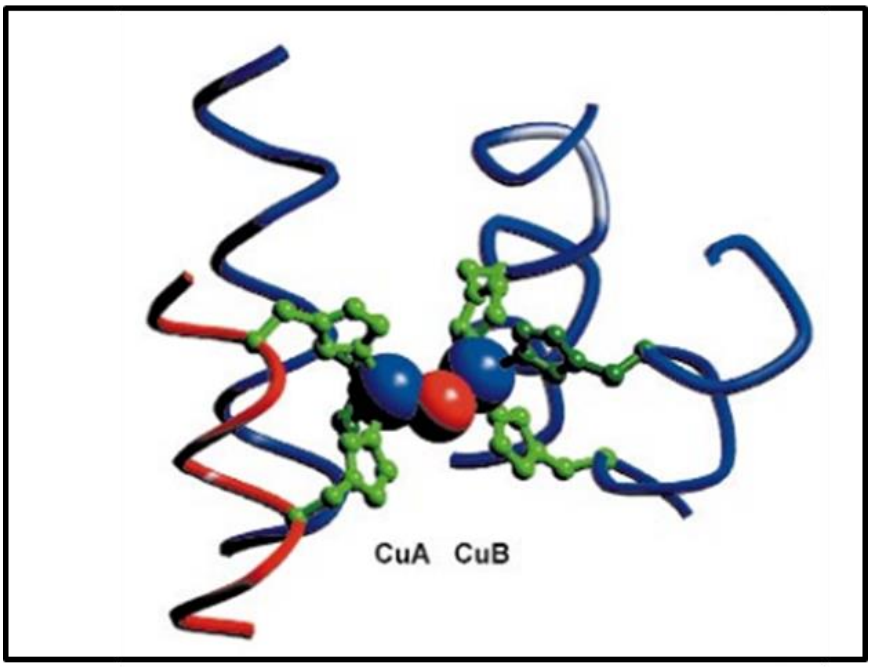


Figure 90: Représentation schématique du site actif de la tyrosinase. Reproduit de [319].

A. Construction de l'édifice moléculaire

La première étape de la construction de ce biocapteur consiste donc à déposer le film de de WS_2 à la surface de l'électrode pour permettre par la suite l'immobilisation de la PPO.

Pour cela, le film de WS_2, obtenu par la filtration de 250 mL d'une suspension de nano-bâtonnets sur un filtre de cellulose, est tout d'abord connecté à la surface de l'électrode de carbone vitreux en utilisant le procédé décrit dans la partie II.B.1. Cette technique conduit ainsi à l'obtention d'un film de WS_2-COOH d'une épaisseur de 6,2 µm pouvant être utilisé comme support pour l'immobilisation de protéines.

L'immobilisation est réalisée en suivant le schéma réactionnel présenté au sein de la Figure 91. Ce procédé implique l'utilisation de chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), qui sert ici d'agent d'activation[298]. L'électrode, recouverte du film de WS_2, est premièrement mise en présence d'une solution d'EDC à 20.10^{-3} mol.L^{-1} (PBS pH 7,4) afin de permettre l'activation des groupements acides carboxyliques. La fonction NHS est ensuite introduite par dépôt d'une goutte d'une solution à 10.10^{-3} mol.L^{-1} (PBS pH 7,4) à la surface de l'électrode. Celle-ci est laissée à incuber pendant 12 heures à 4°C. Cette étape a pour but de permettre la formation d'un intermédiaire réactionnel sensible aux amines. Enfin, après réaction, l'électrode est rincée à l'aide de la solution tampon avant de procéder à l'incubation de la PPO pendant 12 heures à 4°C par dépôt de 75 µL d'une solution à 0,3 mg.mL^{-1}. La présence de fonctions amines au sein de la protéine va conduire à une réaction d'amidation entre celles-ci et les intermédiaires réactionnels présents à la surface de l'électrode, permettant l'immobilisation de l'enzyme par formation d'une liaison covalente. L'électrode est alors de nouveau rincée à l'aide de la solution tampon avant de procéder aux différentes analyses électrochimiques.

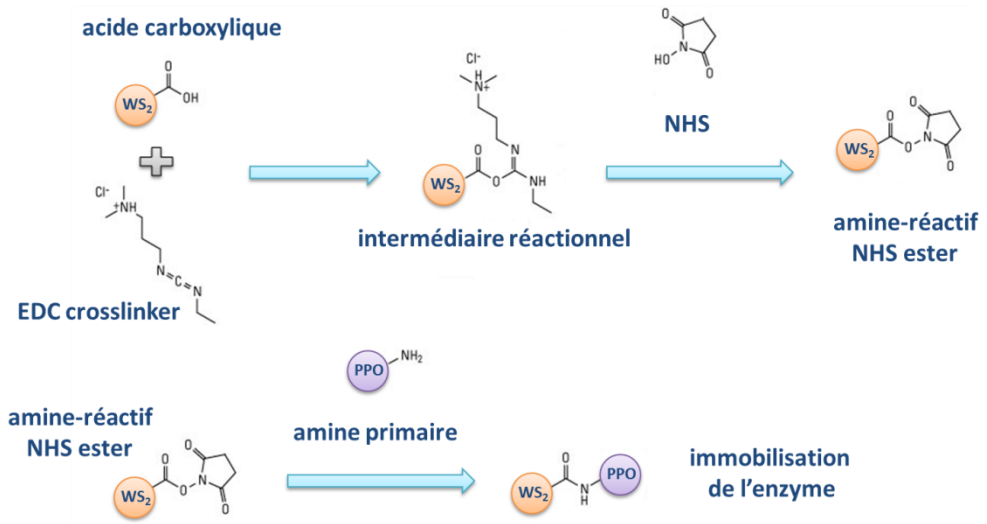


Figure 91: Schéma réactionnel conduisant à l'immobilisation de la polyphénol oxydase à la surface de nanobâtonnets de WS_2 fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques.

Une fois cette étape conclue, le biocapteur peut être utilisé pour la détection de la cible souhaitée.

B. Détection du catéchol

1. Mesures par chronoampérométrie

Les premiers essais réalisés à l'aide de ce système ont porté sur la détection de différentes concentrations de catéchol. La PPO est en effet capable d'oxyder le catéchol en ortho-quinone. La détection est ensuite assurée par la réduction de ce produit de la réaction enzymatique à l'électrode à un potentiel de -0,2 V / SCE.

Cette réduction induisant un échange électronique, il est alors possible de suivre électrochimiquement l'évolution de l'intensité du courant afin d'en déduire la concentration en catéchol (Figure 92).

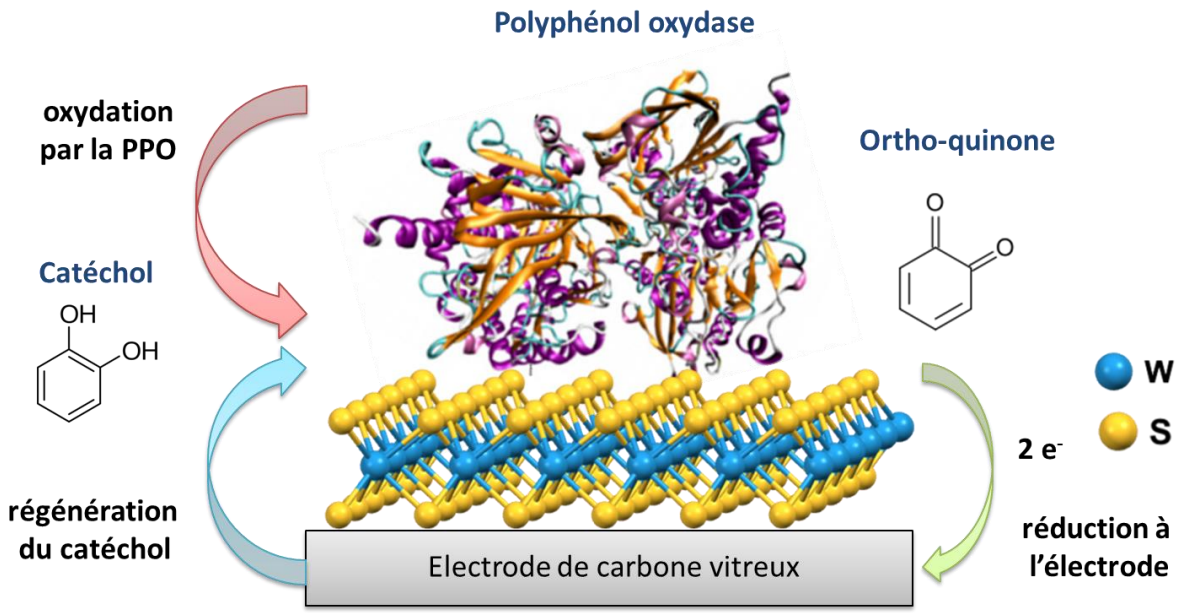


Figure 92: Représentation schématique du principe de fonctionnement du biocapteur pour la détection de catéchol.

Une technique de choix pour suivre l'évolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration en analyte est la chronoampérométrie. Cette méthode consiste à appliquer une tension constante au cours du laps de temps désiré tout en enregistrant les variations de courant observées ou non lors de l'ajout de l'analyte en solution.

Pour réaliser un tel suivi, différents solutions de catéchol ont été préparées afin d'obtenir une gamme de concentration variant de 0,01 µmol.L^{-1} à 5 µmol.L^{-1} dans PBS 0,1 mol.L^{-1} à pH 7,4. Les différents ajouts de catéchol sont réalisés après stabilisation du courant. En effet, suite aux précédentes injections, un certain laps de temps, lié à l'activité de l'enzyme et à la diffusion des espèces, est nécessaire pour retrouver une valeur stationnaire du courant mesuré. Les concentrations indiquées ont quant à elles été calculées par rapport au volume et à la concentration en catéchol déjà présents au sein de la cellule électrochimique lors de l'ajout. Les résultats obtenus par chronoampérométrie pour la détection du catéchol sont reportés au sein de la Figure 93.

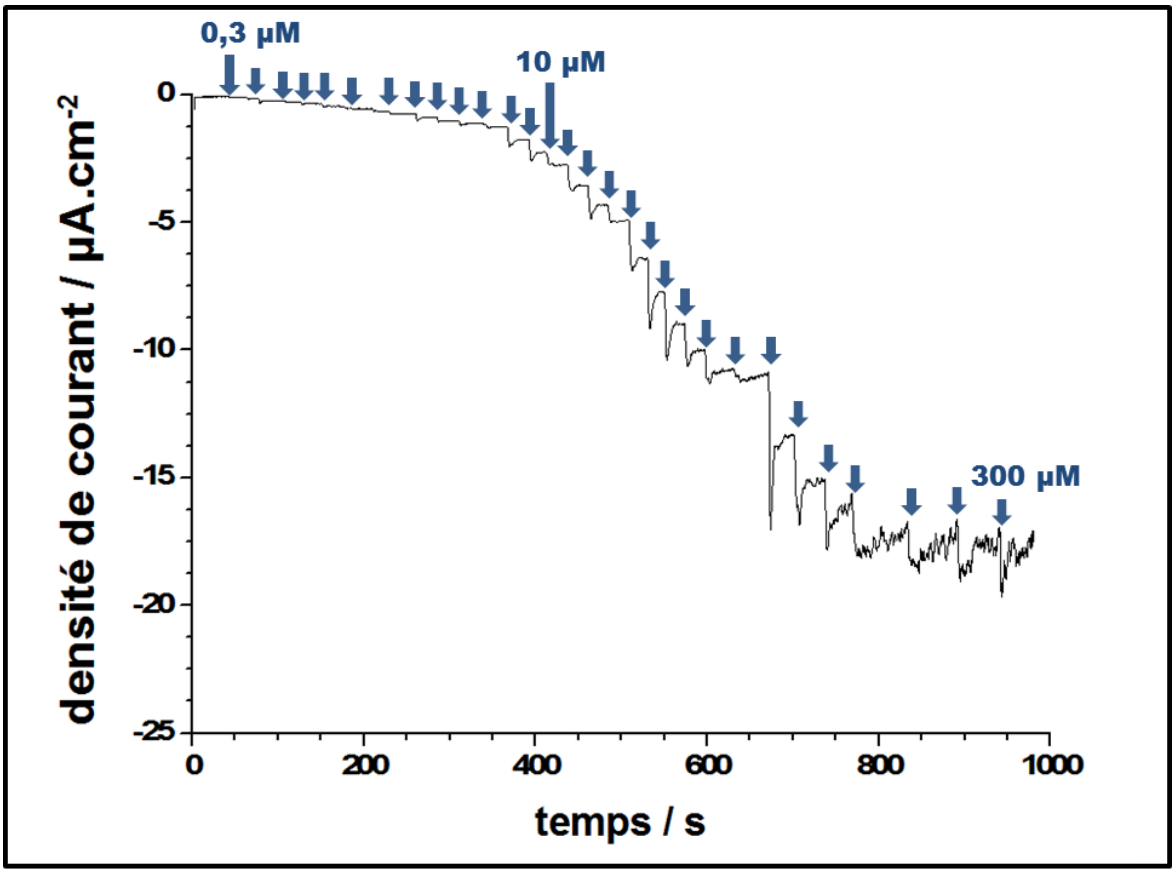


Figure 93: Réponse ampérométrique de l'électrode de carbone vitreux recouverte d'un film de WS_2-COOH et après immobilisation de la PPO en présence de différentes concentrations de catéchol (0,3 à 300 µmol.L^{-1}) dans PBS 0,1 mol.L^{-1} pH 7,4 à un potentiel de - 0,2 V et sous agitation.

La courbe obtenue montre que le courant résultant de l'oxydation du catéchol par la PPO semble tendre vers un plateau à environ -17 µA.cm^{-2}. En effet, la forme de cette courbe est régie par une cinétique de Michaelis-Menten liée à la quantité d'enzymes immobilisées. Ce plateau traduit donc la saturation en substrat des enzymes immobilisées à la surface de l'électrode. De plus, il est possible de déterminer la constante de Michaelis-Menten liée à cette enzyme. Cette constante traduit l'affinité de l'enzyme envers son substrat. Elle s'exprime en mol.L^{-1} et sa valeur est propre à chaque enzyme ainsi qu'à la nature du substrat.

2. Exploitation des résultats

Pour déterminer cette constante, il est donc nécessaire d'utiliser l'équation de Michaelis-Menten présentée ci-dessous :

$$V_r = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Où Vr représente la vitesse initiale de la réaction, V_{max} la vitesse maximale de la réaction traduisant une saturation de l'enzyme[S] la concentration en substrat et K_M la constante de

Michaelis-Menten de l'enzyme utilisée qui est égale à $V_{max}/2$ et est dépendante de la température ainsi que du pH.

Cette équation est basée sur un modèle enzymatique simplifié mettant en jeu différentes étapes de réaction. La première traduit la formation d'un complexe, ES, entre l'enzyme et son substrat. Une fois ce complexe formé, l'enzyme va exprimer son activité catalytique et transformer son substrat en un produit P. Cette étape conduit également à la régénération de l'enzyme à son état initiale, E.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} P + E$$

Les paramètres k_1 (sens direct) et k_{-1} (sens indirect) sont les constantes cinétiques de la première étape, et k_2 (non réversible), celui de la seconde étape

L'interprétation graphique de l'équation de Michaelis-Menten donne une réponse de type hyperbolique (Figure 94). En effet, lorsque la concentration en substrat est suffisante pour saturer l'enzyme, la vitesse de la réaction devient indépendante de la quantité de substrat fournie et atteint ainsi une valeur limite.

$$V_{max} = k_2 \, [E]_{tot}$$

A l'inverse, quand la concentration en substrat est faible devant K_M, l'ordre de la réaction est directement dépendant de la concentration et la vitesse de réaction suit donc une évolution linéaire en fonction de [S]. La vitesse initiale de la réaction enzymatique s'écrit alors :

$$V_r = k_2 \, [ES]$$

Et la concentration totale en enzyme est exprimée par la relation :

$$[E]_{tot} = [E] + [ES]$$

Enfin, la constante de Michaelis-Menten, K_M, s'exprime pour sa part en fonction des différentes constantes cinétiques régissant la réaction enzymatique mentionnée auparavant :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

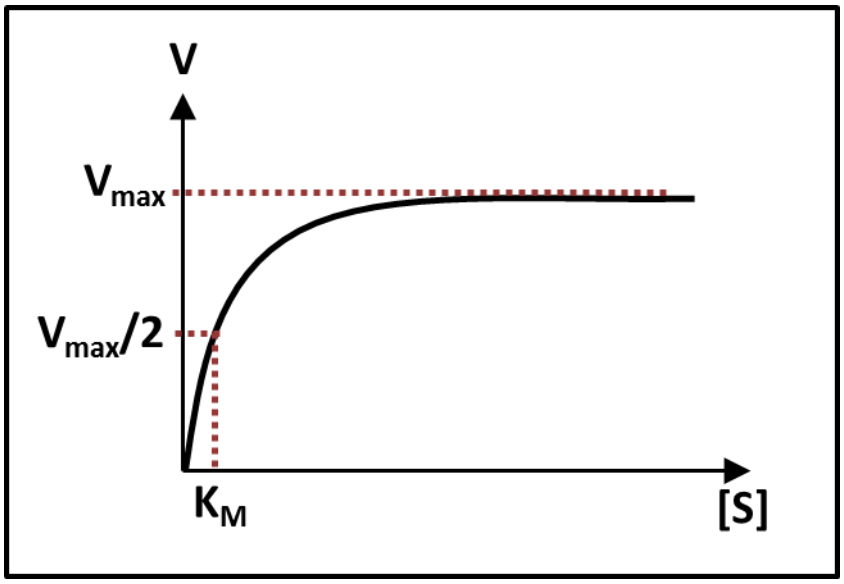


Figure 94: Interprétation graphique de l'équation de Michaelis-Menten traduisant l'évolution de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

En inversant cette loi, la relation de Michaelis-Menten donne lieu à l'obtention de la droite de Lineweaver-Burk d'équation suivante :

$$\frac{1}{V_r} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}[S]}$$

En traçant la droite découlant de cette équation, il est alors possible de déterminer les paramètres V_{max} et K_M graphiquement. En effet, $1/V_{max}$ correspond à l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées et K_M peut alors être calculée à partir de la pente de la droite (Figure 95).

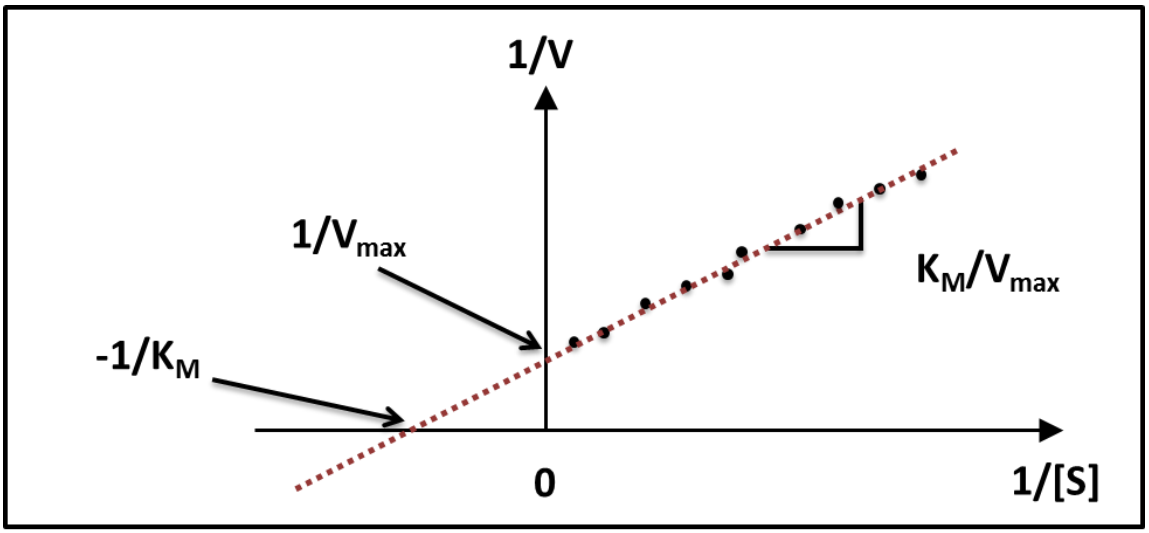


Figure 95: Interprétation graphique de la relation de Lineweaver-Burk traduisant l'évolution de l'inverse de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration en substrat et permettant la détermination graphique des différents paramètres.

Il est également possible d'exprimer directement l'intensité du courant en fonction de la concentration en substrat en prenant en compte un facteur de correction permettant de passer de l'expression de la vitesse de réaction, exprimée dans l'équation de Michaelis-Menten, à la suivante :

$$I = \alpha_{corr} \frac{zFV_{max}[S]}{K_M + [S]} = \frac{I_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Avec I étant l'intensité du courant en ampère, α_{corr} le facteur de correction, z le nombre d'électrons échangées et F la constante de Faraday (96 485 A.s.mol^{-1}).

Ainsi, à partir des données recueillies à l'aide de la Figure 93, il est possible de tracer une courbe montrant l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en substrat (Figure 96-A). Cette première courbe ne possède pas parfaitement un comportement de type Michaelis-Menten. En effet, le tracé de la courbe d'ajustement ne correspond pas exactement aux valeurs expérimentales. Cette différence semble être due à une saturation trop rapide de l'enzyme, puisque si les points obtenus à partir des concentrations les plus fortes sont retirés de la courbe, la corrélation entre les valeurs d'ajustement et expérimentales est grandement améliorée avec un R^2 de 0,998 (Figure 96-B). Enfin, l'utilisation de la droite de Lineweaver-Burk permet de déterminer les différents paramètres (K_M, V_{max}…) du système (Figure 96-C).

Le tracé de la droite de Lineweaver-Burk conduit à l'obtention de l'équation de droite suivante :

$$y = 0{,}0793 + 4{,}1784x$$

De cette équation, il est possible de déterminer la constante de Michaelis-Menten apparente (K_{Mapp}) ainsi que la densité de courant maximum (I_{max}). Le K_{Mapp} est ici utilisé pour prendre en compte le fait que l'enzyme n'est pas en solution mais immobilisée à la surface de l'électrode. La constante déterminée ne représente donc pas exactement le K_M de l'enzyme. En effet, dans le cas d'une enzyme immobilisée, il faut également considérer l'environnement de celles-ci, et donc l'accès au site actif de l'enzyme, ainsi que le transport de masse du substrat. Les valeurs suivantes ont été obtenues :

i_{max} = 12,6 µA.cm^{-2} K_{Mapp} = 52,7 µmol.L^{-1}

Par ajustement de la courbe présentée sur la Figure 96-B, une densité de courant maximum (i_{max}) de 24 µA.cm^{-2} a pu être déterminé pour une valeur de K_{Mapp} de 97 µmol.L^{-1}. Les valeurs restent donc du même ordre de grandeur pour les deux techniques, malgré une légère différence.

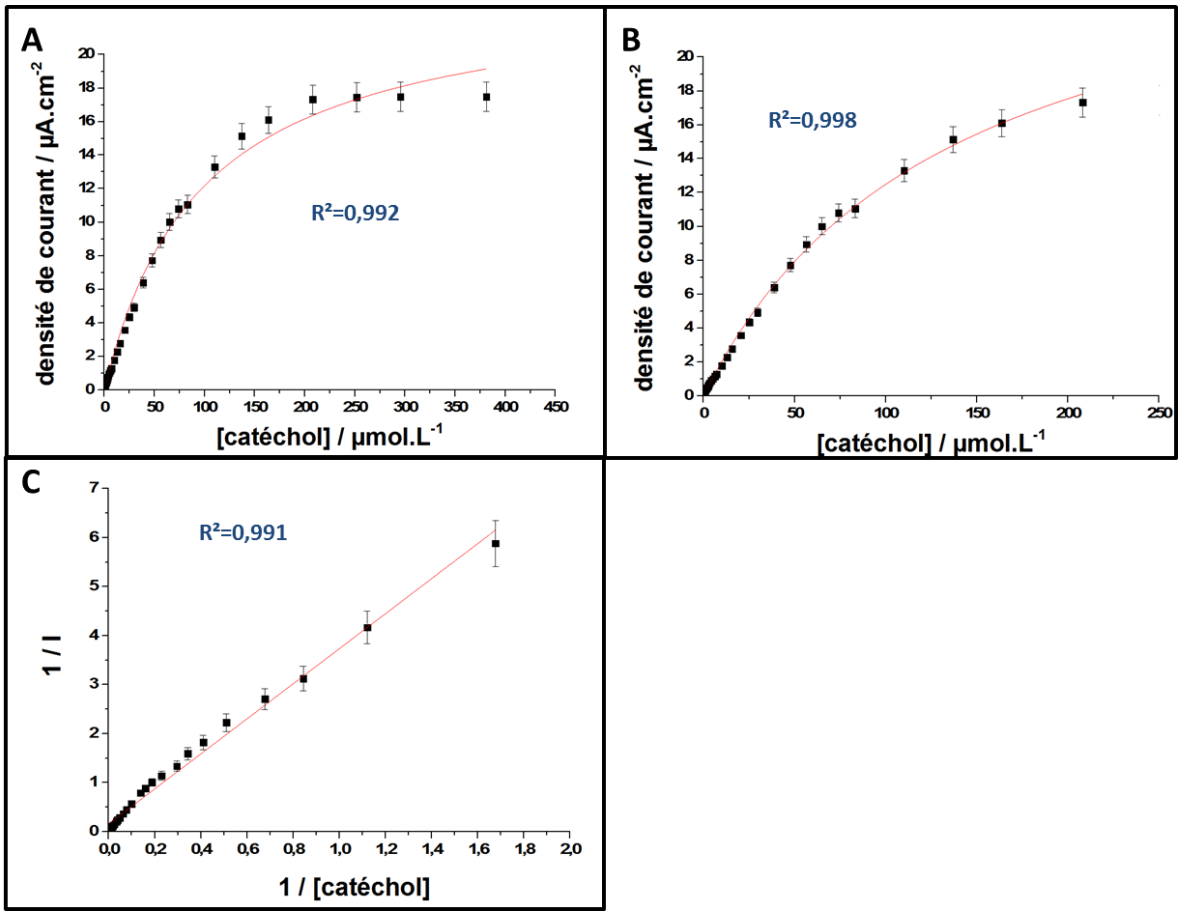


Figure 96: Courbe d'étalonnage montrant l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en catéchol (point noir) ainsi que la courbe théorique obtenue à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten (pointillé) de 0,3 µmol.L^{-1} à 300 µmol.L^{-1} (A) et de 0,6 µmol.L^{-1} à 208 µmol.L^{-1} (B). Les données ont été obtenues par chronoampérométrie à un potentiel E = -0,2 V / SCE dans PBS 0,1 mol.L^{-1} à pH 7,4. C) Droite de Lineweaver-Burk.

La valeur obtenue pour le K_{Mapp} est ainsi inférieure à celle du K_M de l'enzyme libre en solution qui est de 300 µmol.L^{-1} pour le catéchol[320], ce qui signifie que l'affinité est plus grande dans le cas des enzymes immobilisées. Or, l'affinité de l'enzyme est théoriquement plus grande lorsque celle-ci est libre en solution. Cependant, ce comportement rejoint celui observé par différents groupes auparavant[321,322].

Pour expliquer ce phénomène, il faut remonter à l'étape 2 de la cinétique enzymatique :

$$ES \xrightarrow{k_2} P + E$$

Ecrite de cette manière, cette étape ne fait apparaître que la transformation du substrat en produit. Elle ne prend donc pas en compte le co-substrat de la réaction enzymatique, à savoir le dioxygène, qui dans le cas de cette réaction permet la régénération de l'enzyme. En ajoutant ce co-substrat dans l'expression de k_2, la relation permettant le calcul du K_{Mapp} devient la suivante :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2°[co - substrat]}{k_1}$$

Ainsi, la valeur du K_{Mapp} est directement dépendante de la concentration en co-substrat et donc de la quantité d'enzymes greffées à la surface de l'électrode. En effet, l'enzyme consommant le dioxygène lors de sa régénération, elle influe sur sa concentration. Or l'utilisation de nanomatériaux augmente considérablement la quantité d'enzymes immobilisées ainsi que la quantité de co-substrat consommée.

De ce fait, durant le fonctionnement du biocapteur, le catéchol ainsi que le dioxygène vont rapidement être consommés. L'apport en dioxygène étant limité par la diffusion, un gradient de concentration peut donc s'installer entre la solution et l'enzyme. La concentration en co-substrat au niveau de l'enzyme est alors plus faible que celle en solution et entraine une diminution du K_{Mapp}.

Concernant les performances de ce biocapteur, la gamme de linéarité s'étend entre 0,6 µmol.L^{-1} et 78 µmol.L^{-1} avec un bon facteur de corrélation de 0,996 (Figure 97). La sensibilité du biocapteur pour ces concentrations est de 10,5 µA.mmol^{-1}.L.

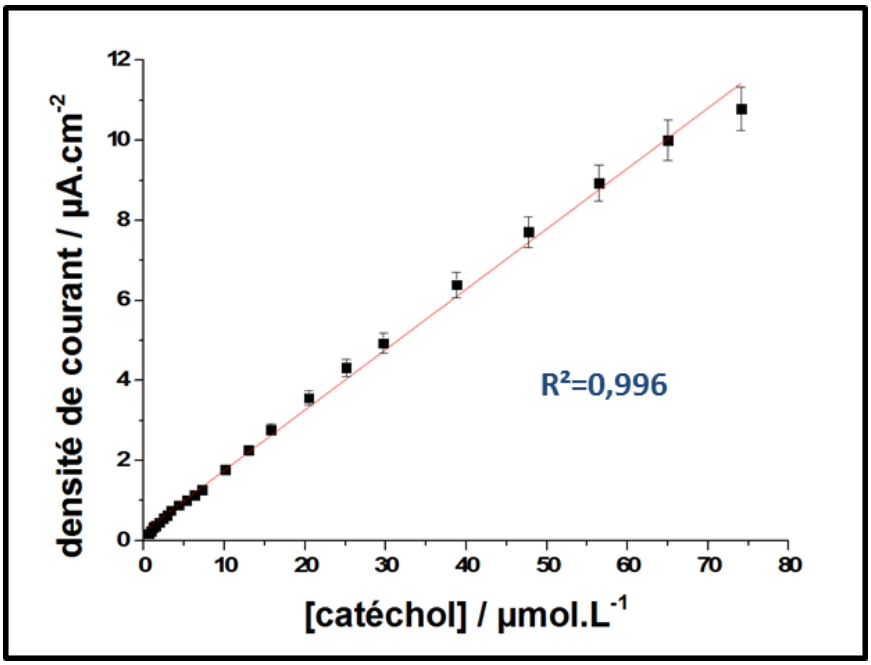


Figure 97: Courbe d'étalonnage montrant l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en catéchol entre 0,6 µmol.L^{-1} et 78 µmol.L^{-1}.

La gamme de linéarité et la limite de détection (0,3 µmol.L^{-1}) sont similaires à celles trouvées au sein de la littérature (Tableau 11). Ceci peut s'expliquer par la présence des nano-bâtonnets de disulfure de tungstène qui permet une grande immobilisation d'enzyme à la surface de l'électrode et donc l'obtention d'un système compétitif. La densité de courant limite ainsi que la sensibilité restent cependant relativement faibles par rapport à d'autres travaux, notamment ceux de Bujduveanu et al qui obtiennent une sensibilité de 2500 µA.mmol^{-1}.L contre 10,5 µA.mmol^{-1}.L pour ce travail.

Tableau 11: Comparaison de différents biocapteurs pour la détection du catéchol par utilisation de la tyrosinase en fonction de différents paramètres (courant maximum, linéarité, sensibilité et la valeur de la constance de Michaelis-Menten apparente).

	Système utilisé	K_{Mapp} / µmol.L^{-1}	I_{max} / µA	Linéarité / µmol.L^{-1}	Sensibilité / µA.mmol^{-1}.L
Ce travail	Nano-bâtonnet de WS_2-COOH + GCE	62,5 ± 10	16,25 ± 4	0,6–78	10,5 ± 0,2
Mei et al.[323]	rGO–PdCu Nanocage + GCE (laccase)	-	40	500–1155	12,65
Karim et al.[324]	Nanoparticule d'or + screen printed carbon electrode	-	35	0,01–80	13720
Zhou et al.[325]	Mesoporous carbon nitride + GCE	11,07	-	0,0500–12,5	650
Bujduveanu et al.[318]	CNT + $CaCO_3$ nanoparticules + GCE	7	39	-	2500
Sethuraman et al.[326]	PEDOT-rGO + GCE	30,48	92	0,04–62	-

Concernant la reproductibilité de ce biocapteur, les résultats présentés sont basés sur les valeurs obtenus à l'aide de deux différentes électrodes. Les valeurs données dans le tableau ainsi que les barres d'erreurs sont donc issues de la moyenne de ces deux systèmes. Il peut également être noté que la gamme de linéarité ainsi que la sensibilité sont identiques pour les deux électrodes.

Cependant d'autres tests doivent être menés afin de s'assurer de la fiabilité du système d'une part, mais aussi afin de déterminer la spécificité du système vis-à-vis de la cible.

C. Détection de la dopamine

1. Mesures par ampérométrie

Les seconds tests ont porté sur la détection de la dopamine par chronoampérométrie. Cette détection s'est faite en utilisant le même édifice moléculaire et les mêmes conditions que ceux présentés pour la détection du catéchol. En effet, la PPO permet d'oxyder la dopamine en dopamine-o-quinone (Figure 98). Ce produit est ensuite réduit à l'électrode à un potentiel de –0,2 V / SCE et permet donc le suivi de cette réaction enzymatique.

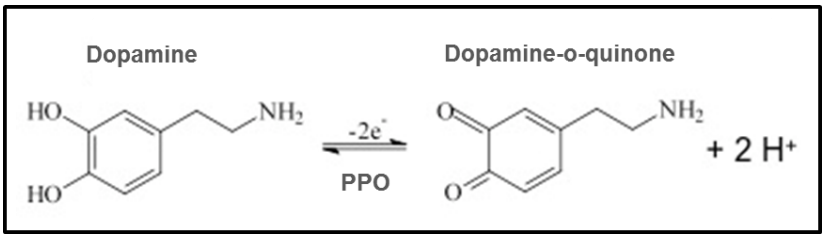


Figure 98: Représentation schématique du principe de fonctionnement du biocapteur pour la détection de la dopamine.

La gamme de concentration testée pour cette étude est de 0,5 µmol.L^{-1} à 137 µmol.L^{-1} dans PBS 0,1 mol.L^{-1} à pH 7,4. Les différents ajouts de dopamine sont réalisés après stabilisation du courant et sous agitation. La Figure 99 montre la réponse ampérométrique de l'électrode modifiée suite à ces différents ajouts.

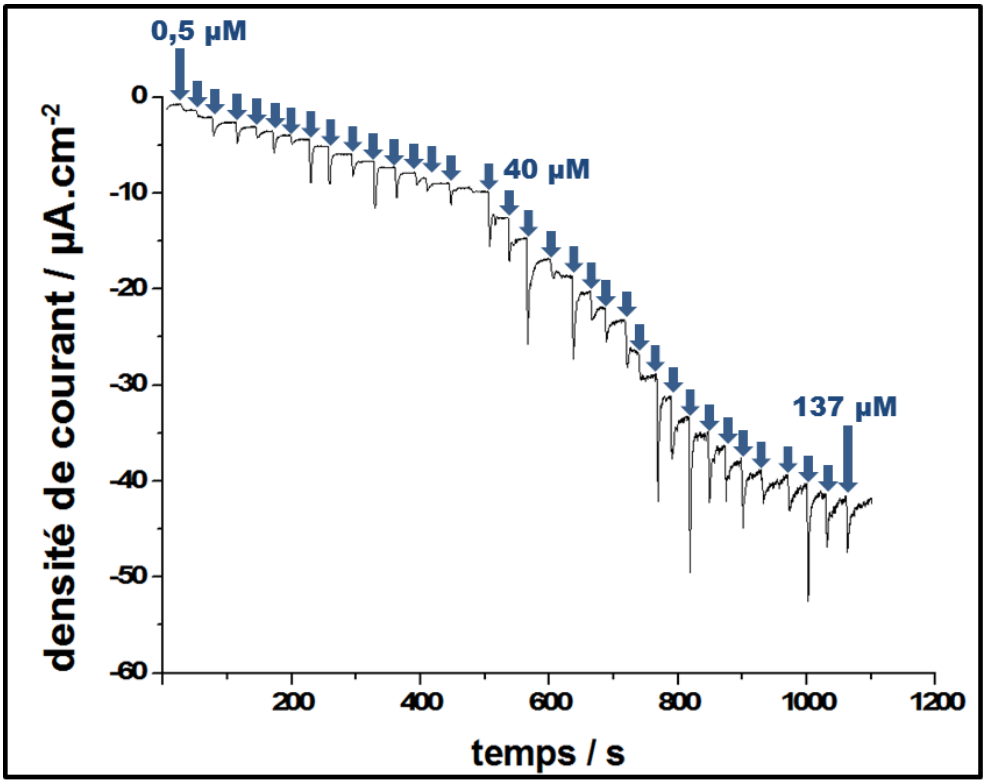


Figure 99: Réponse ampérométrique de l'électrode de carbone vitreux recouverte d'un film de WS_2-COOH et après immobilisation de la PPO en présence de différentes concentrations de dopamine (0,5 à 137 µmol.L^{-1}) dans PBS 0,1 mol.L^{-1} à un potentiel de - 0,2 V et sous agitation.

La réaction d'oxydation de la dopamine par la PPO semble une nouvelle fois être régie par une cinétique de Michaelis-Menten. La densité de courant observée est cependant plus élevée que celle relevée lors de la détection du catéchol avec un courant maximum de 41 µA.cm^{-2} pour la dopamine contre 17,5 µA.cm^{-2} pour le catéchol. De plus le signal est mieux défini avec la présence d'un bruit moins important pour cette seconde étude.

2. Interprétation des résultats :

Comme dans le cas du catéchol, une courbe d'étalonnage montrant l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en dopamine, et la droite de Lineweaver-Burk en résultant, ont été tracées (Figure 100). L'équation obtenue à partir de celle-ci est la suivante :

$$y = 0{,}6714x + 0{,}0352$$

Avec K_{Mapp} = 19,07 µmol.L^{-1} et i_{max} = 28,4 µA.cm^{-2}

Encore une fois le K_{Mapp} calculé expérimentalement est plus faible que le K_M de l'enzyme libre (K_M = 2,2 mmol.L^{-1})[327] pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment pour le catéchol.

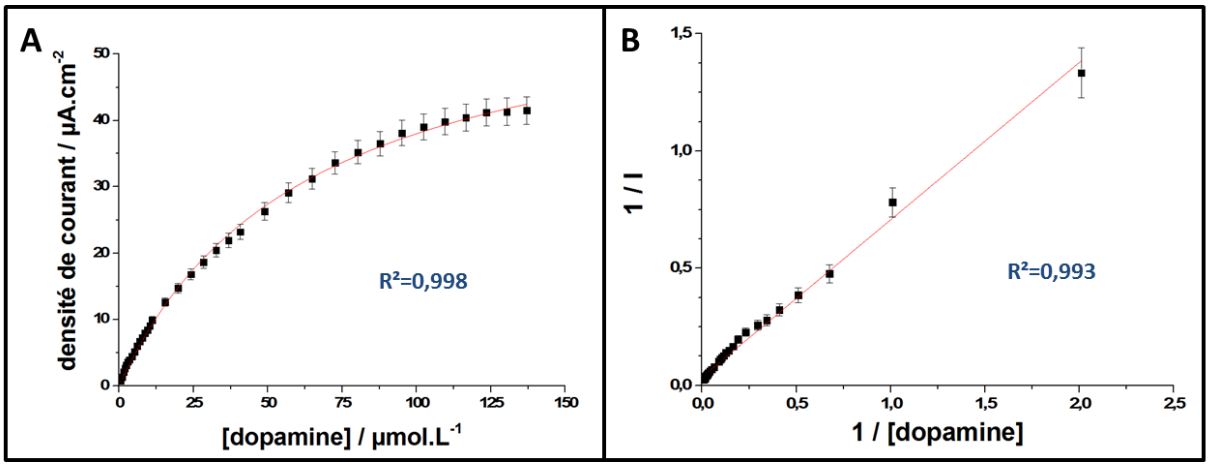


Figure 100: A) Courbe d'étalonnage montrant l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en dopamine de 0,5 µmol.L^{-1} à 137 µmol.L^{-1} (point noir) ainsi que la courbe théorique obtenue à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten (pointillé). Les données ont été obtenues par chronoampérométrie à un potentiel E = - 0,2 V / SCE dans PBS 0,1 mol.L^{-1} à pH 7,4. B) Droite de Lineweaver-Burk.

La Figure 100-A montre également le tracé de la courbe d'ajustement, obtenue à partir de l'équation de Michaelis-Menten, pour la détection de la dopamine. Un très bon facteur de corrélation est observé sur l'ensemble de la gamme de concentrations testée (R^2 = 0,998). Le K_{Mapp}, calculé à partir de $i_{max}/2$ est de 29 µmol.L^{-1} et reste donc du même ordre de grandeur que celui déterminé à partir de la droite de Limeweaver-Burk. Par ajustement de la courbe, une densité de courant maximale de 62 µA.cm^{-2} a également pu être calculée.

Concernant la partie linéaire de la courbe, elle s'étend sur une gamme de concentration variant de 0,5 à 33 µmol.L^{-1}. La sensibilité du biocapteur sur cette partie est quant à elle de 48 µA.mmol^{-1}.L.

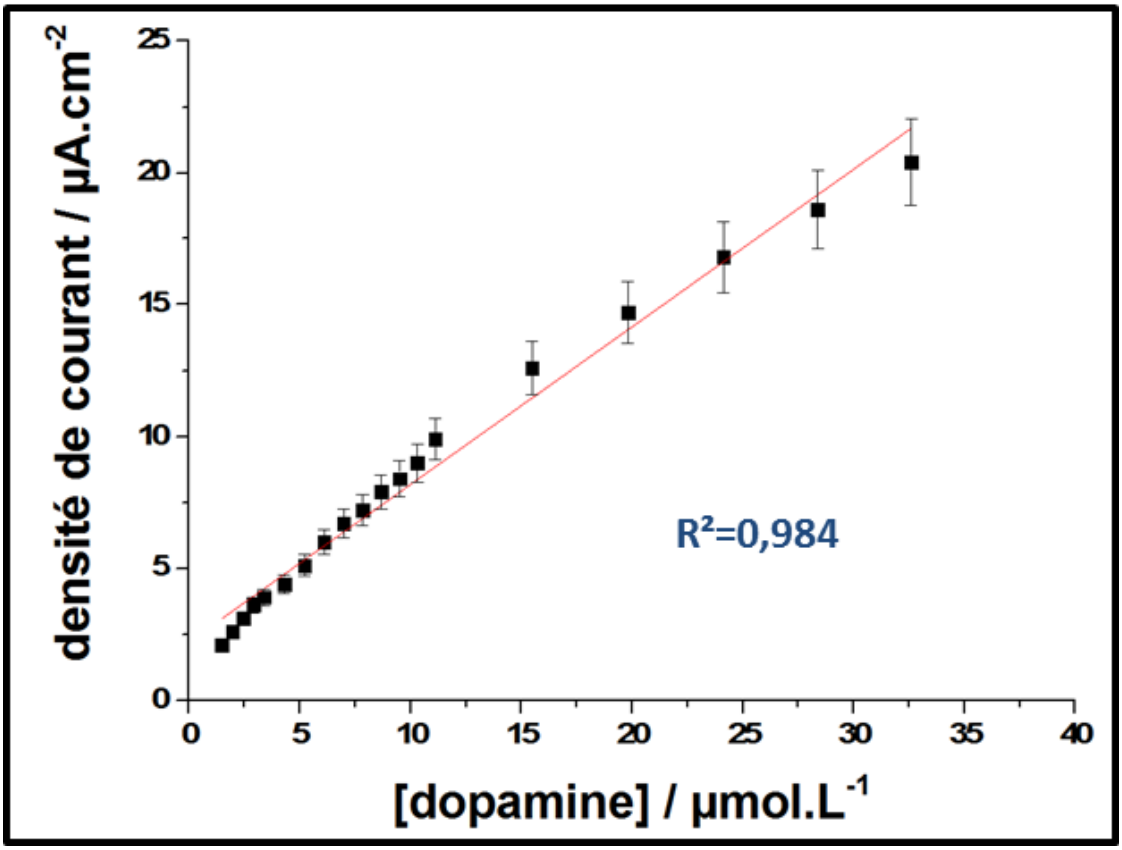


Figure 101: Courbe d'étalonnage montrant l'évolution de la densité de courant en fonction de la concentration en dopamine entre 1,5 µmol.L^{-1} et 33 µmol.L^{-1}.

Ce capteur présente également une bonne reproductibilité puisque ces résultats ont été validés à l'aide de trois électrodes différentes. Les valeurs données au sein du Tableau 12 correspondent donc à la moyenne des différents paramètres calculés et les barres d'erreur ont été déterminées à partir de ces trois électrodes.

Le Tableau 12 ci-dessous répertorie ainsi différents résultats portant sur la détection de la dopamine par utilisation de la tyrosinase. Il permet de comparer les performances du biocapteur présenté dans ce manuscrit avec ceux issus de la littérature selon différents critères tels que la sensibilité, la linéarité, le courant maximum obtenu et le K_{Mapp} calculé.

Le biocapteur présenté dans ces travaux se place très bien parmi ceux présents dans la littérature avec une valeur de i_{max} de 35 ± 9 µA et une sensibilité de 43 ± 5 µA.mmol^{-1}.L ; là où les travaux présentés dans la littérature possèdent généralement un courant inférieure et une sensibilité comprise entre 1 et 80 µA.mmol^{-1}.L (122 µA.mmol^{-1}.L pour Florescu et al.). Concernant la détermination du K_{Mapp} par utilisation de la droite de Lineweaver-Burk, celle-ci possède une très bonne valeur de 19,5 ± 0,5 µmol.L^{-1} contre 11,1 µmol.L^{-1} pour les travaux de Lete et al. qui obtiennent ainsi une des meilleures constantes de la littérature.

Enfin, la linéarité du capteur reste assez bonne comparée à celles présentes dans la littérature avec deux ordres de grandeurs pour ces travaux contre jusqu'à 5 ordres de grandeurs pour ceux de Canbay et al. (0,05-100 µmol.L^{-1}).

Tableau 12: Comparaison de différents biocapteurs pour la détection de la dopamine par utilisation de la tyrosinase en fonction de différents paramètres (courant maximum, linéarité, sensibilité et la valeur de la constance de Michaelis-Menten apparente).

	Système utilisé	K_{Mapp} / µmol.L^{-1}	I_{max} / µA	Linéarité / µmol.L^{-1}	Sensibilité / µA.mmol^{-1}.L
Ce travail	Nano-bâtonnet de WS_2-COOH + GCE	19,5 ± 0,5	35 ± 9	1,5–33	43 ± 5
Bujduveanu et al. [318]	CNT + $CaCO_3$ nanoparticules + GCE	30	7,7	0,015-30	250
Canbay et al.[328]	CNT + Nafion + cysteamine + électrode d'or	-	9	0,05-100	82
Wang et al.[329]	SiO_2nanoparticule + acide phytique + GCE (laccase)	-	0,2	0,99-103,1	-
Lete et al.[330]	CNT + PEDOT + électrode d'or	11.1	-	100-500	2,7
Florescu et al.[331]	cobalt (II)-porphyrine + électrode d'or	92	10,8	2-30	122

Comme le montre ce tableau, plusieurs groupes utilisent des CNT, qui comme vu précédemment, sont de bons semi-conducteurs à l'inverse des nano-bâtonnets de disulfure de tungstène, ce qui peut expliquer les différences de performance observées.

Enfin, contrairement à ce qui était attendu, le capteur réalisé présente une meilleure réponse envers la dopamine qu'envers le catéchol. Or, l'enzyme libre a une meilleure affinité pour le catéchol, traduite par la valeur du K_M, que pour la dopamine (0,3 mmol.L^{-1} contre 2,2 mmol.L^{-1}). C'est pourquoi un comportement inverse était attendu, le catéchol étant un substrat naturel de l'enzyme. Bujduveanu et al. observent d'ailleurs ce phénomène[318]. Cette différence doit donc être due à la présence des nano-bâtonnets de WS_2. Cependant, cette observation ne permet pas à elle-seule de comprendre le rôle exact de ce matériau dans les résultats observés.

Conclusion

L'incorporation des nano-bâtonnets de disulfure de tungstène fonctionnalisés par des groupements acides carboxyliques dans la réalisation de dispositif de détection a conduit à l'obtention de deux biocapteurs.

Le premier concerne la détection du catéchol et possède une bonne linéarité et une bonne limite de détection. Le système repose sur l'immobilisation de la PPO, permettant l'oxydation du catéchol, à la surface des nano-bâtonnets de WS_2 et donc sur l'augmentation de la surface active grâce à ce nanomatériau.

Le second porte lui sur la détection de la dopamine, par utilisation de la même architecture moléculaire, est possède également de bonnes valeurs de sensibilité et de K_{Mapp}.

Cependant, malgré ces bons résultats, ces travaux nécessitent encore un temps d'optimisation afin d'améliorer la reproductibilité des mesures mais aussi la gamme de linéarité des deux biocapteurs qui restent relativement faibles en comparaison des valeurs de la littérature.

Conclusion Générale

L'objectif de ces travaux de thèse fut d'intégrer différents nanomatériaux dans la conception et la réalisation de biocapteurs sensibles et reproductibles pour la détection sans marquage de différentes cibles d'intérêt. Pour cela, plusieurs nanomatériaux ont été mis à contribution et ont conduit à la réalisation de trois biocapteurs pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra, de l'anticorps de la toxine de la dengue et enfin de la dopamine.

Au préalable de ces travaux de recherche, une étude bibliographique a été menée et est présentée au sein du chapitre I. Cette étude propose une revue des différentes familles de biocapteurs déjà existantes, présentant les spécificités et les limites de chacune ainsi que les paramètres clés qui définissent un biocapteur. Un intérêt particulier a ensuite été porté sur les différentes techniques permettant l'immobilisation de matériel biologique à la surface de différents matériaux. Enfin, cette étude bibliographique a également mis l'accent sur l'intégration de nanomatériaux dans la conception de tel système de détection avec entre autres l'usage des différentes formes de matériaux carbonés mais aussi celui d'une toute nouvelle famille de nanomatériaux, à savoir les dichalcogénures de métaux de transition.

Le second chapitre s'est quant à lui porté sur la réalisation de couches minces de nanomatériaux et leur transfert à la surface d'électrode de carbone vitreux. Il présente ainsi une technique novatrice, mettant en jeu un processus de filtration à l'aide d'une membrane de cellulose, permettant la réalisation de films de CNT reproductibles et d'épaisseurs contrôlées. Ce chapitre s'accompagne d'une étude structurale et électrochimique détaillée des films ainsi formée à l'aide de nombreuses méthodes de caractérisations.

La deuxième partie de ce chapitre fût consacrée à l'adaptation de ce procédé pour la réalisation de films minces de nano-bâtonnets de disulfure de tungstène. Ce matériau étant novateur et peu connu au sein du laboratoire, une attention particulière a été portée aux différentes caractérisations menées sur ce dernier afin de déterminer les propriétés des trois variétés de nano-bâtonnets de WS_2 ayant été fournies par le professeur Lelouch dans le cadre d'une collaboration.

Le troisième chapitre de ce manuscrit est dédié à la conception d'un biocapteur pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra. Le principe de ce biocapteur repose sur l'intégration de CNT dans la construction de celui-ci afin d'augmenter la surface spécifique de l'électrode et de permettre un transfert électronique rapide. Ceci est fait dans le but d'obtenir de meilleurs sensibilités et de meilleurs limites de détection que les systèmes actuellement disponibles. Une fois déposé à la surface de l'électrode, ces nanotubes ont ensuite été recouverts d'une couche de poly-pyrrole-NTA électrogénérée par chronopotentiométrie. L'introduction de ce polymère, et plus particulièrement de la fonction NTA terminale qu'il porte, a permis l'immobilisation de la toxine du choléra à travers la formation d'un complexe de cuivre par complexation de la fonction NTA et de la fonction biotine de la toxine du choléra. Les performances de ce biocapteur ont finalement été testées par incubation successives de différentes concentrations d'anticorps spécifiques à la toxine du choléra recouvrant une gamme de concentration comprise entre 10^{-13} à 10^{-5} $g.mL^{-1}$. La mesure de la détection a été assurée par spectroscopie d'impédance électrochimique en présence du couple $Fe(CN_6)3^{-/4-}$, jouant ici le rôle de sonde redox, dans une solution de tampon phosphate.

L'architecture moléculaire mis en place dans ce travail a conduit à l'obtention d'un biocapteur particulièrement performant atteignant une limite de détection de 10^{-13} g.mL^{-1} en plus d'une très bonne linéarité recouvrant 8 ordres de grandeurs pour une sensibilité de 24,7 ± 0,4 Ω par unité logarithmique. Ces différents paramètres ont pu être extraits par l'utilisation d'un circuit électrique équivalent permettant de transcrire l'architecture moléculaire utilisée sous forme de composants électriques. De plus, une bonne spécificité a été observée pour ce système. En effet, aucune adsorption non spécifique ni aucune reconnaissance entre le biorécepteur et un substrat n'ont été observées après incubation de deux types d'anticorps non-spécifiques à la toxine du choléra.

Le quatrième chapitre s'intéresse à l'adaptation du protocole présenté pour la détection de l'anticorps du choléra à la détection de l'anticorps de la toxine de la dengue. Comme dans le cas précédemment décrit, ce capteur s'appuie sur l'utilisation d'un film mince de CNT comme support pour l'immobilisation du matériel biologique, à savoir la toxine de la dengue. Cette toxine ne présentant pas de fonction biotine, comme ce fût le cas pour la toxine du choléra, une nouvelle approche a été utilisée pour permettre son immobilisation. Pour cela, un polymère de pyrole-NHS a été formé à la surface des nanotubes par voltampérométrie cyclique. Une fois généré, ce polymère est mis à contribution afin de réaliser une réaction d'amidation conduisant à l'ancrage du biorécepteur. Cette réaction met en jeu un procédé bien connu et largement décrit dans la littérature conduisant à la formation d'une liaison covalente entre la fonction NHS du film et une amine primaire de la toxine à l'aide d'un agent d'activation, le N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide.

La validité de ce système et ses performances ont par la suite été mesurées par spectrométrie d'impédance électrochimique, avec encore une fois l'utilisation du couple $Fe(CN_6)3^{-/4-}$ comme sonde redox. Cependant, à l'inverse des travaux sur le choléra, les incubations des différentes concentrations d'anticorps ne sont pas seulement effectuées en milieu tamponné mais aussi en présence de plasma sanguin bovin afin d'observer le comportement du système en condition proche du réel.

Au final, ce biocapteur offre de très bonnes performances avec une gamme de linéarité comprise entre 10^{-12} et 10^{-5} g.mL^{-1} en milieu tamponné et entre 10^{-11} et 10^{-5} g.mL^{-1} en présence de plasma sanguin. La sensibilité est également plus importante en milieu tamponné (45,7 ± 1,7 Ω par unité logarithmique) mais reste tout de même très bonne dans le plasma (de 39,5 ± 3,8 Ω par unité logarithmique). Pour ce travail, un circuit équivalent simplifié a été utilisé par rapport au précédent. Cette différence s'explique par un changement de lot de CNT qui a conduit à une différence de conductivité rendant le transfert électronique trop rapide pour pouvoir être observé.

Le cinquième et dernier chapitre s'oriente pour sa part vers l'utilisation des nano-bâtonnets dans la conception d'un biocapteur pour la détection de deux cibles d'intérêt, la dopamine et le catéchol. Afin de permettre l'immobilisation de la polyphénol oxydase, une enzyme capable d'oxyder les groupements phénols, le choix a été fait d'utiliser les nano-bâtonnets de WS_2 modifiés par des fonctions acides carboxyliques plutôt que ceux n'étant pas fonctionnalisés ou portant une fonction thiophène. Ce choix s'explique par le fait que les

groupements COOH peuvent être utilisés pour réaliser une réaction de couplage en présence de EDC/NHS et conduire au final à l'immobilisation de la toxine par réaction d'amidation comme présentée précédemment. La détection dans le cas de ces travaux est assurée par chronoampérométrie à un potentiel de -0,2 V / SCE pour le catéchol et pour la dopamine.

Pour le catéchol, la gamme de linéarité s'étend ainsi de 0,6 µmol.L^{-1} à 78 µmol.L^{-1} avec une sensibilité de l'ordre de 10,5 µA.mmol^{-1}.L. De plus, il est possible de déterminer le K_{Mapp} de l'enzyme vis-à-vis du catéchol en utilisant la droite de Lineweaver-Burk. Une constante de Michaelis-Menten apparente de 62,5 µmol.L^{-1} est ainsi obtenue pour ce système. Cette constante est inférieure à la constante de l'enzyme libre en solution (0,3 mmol.L^{-1}), ce qui traduit le fait que la présence des nano-bâtonnets permet l'immobilisation d'une grande quantité d'enzyme et une bonne détection des espèces à l'électrode.

Le second substrat, la dopamine, permet quant à lui d'obtenir une linéarité entre 1,5 et 33 µmol.L^{-1}. La sensibilité du biocapteur sur cette partie est de 43 µA.mmol^{-1}.L pour un K_{Mapp} égal à 19,5 µmol.L^{-1} qui reste encore une fois bien inférieur au K_M de l'enzyme libre en solution (2,2 mmol.L^{-1}).

En conclusion, les différents travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent l'intérêt que peut apporter l'utilisation de nanomatériaux dans le domaine des biocapteurs. Ceux-ci permettent en effet, en profitant de la grande surface spécifique qu'ils offrent, d'atteindre des limites de détection très faibles mais aussi de très bonnes sensibilités.

Evidemment, les différents systèmes présentés dans ce manuscrit peuvent encore être optimisés pour obtenir de meilleures performances. Concernant les biocapteurs pour la détection de l'anticorps de la toxine du choléra et celui pour l'anticorps de la dengue, des tests en présence de sang, humain ou animal, pourraient apporter une plus-value au concept et démontrer leur fiabilité. De plus, dans le cas de la dengue, la miniaturisation du système peut être envisagée afin de réaliser un appareil portatif pour une utilisation directement sur le terrain.

Pour ce qui est du capteur à catéchol et à dopamine, plusieurs paramètres peuvent être optimisés dans le but d'augmenter la gamme de linéarité vis-à-vis des deux substrats. La spécificité du capteur n'a également pas encore été testée et reste à déterminer.

Références bibliographiques

(1) Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M. Towards Integrated and Sensitive Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review of Recent Progress. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 151–160.

(2) Fan, X.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J. D.; Sun, Y. Sensitive Optical Biosensors for Unlabeled Targets: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *620*, 8–26.

(3) Frew, J. E.; Hill, H. A. O. Electrochemical Biosensors. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 933A – 944A.

(4) Ramanathan, K.; Danielsson, B. Principles and Applications of Thermal Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 417–423.

(5) Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121–131.

(6) Perumal, V.; Hashim, U. Advances in Biosensors: Principle, Architecture and Applications. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 1–15.

(7) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; Leddy, J.; Zoski, C. G. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; wiley New York, 1980; Vol. 2.

(8) Gronow, M. Biosensors. *Trends Biochem. Sci.* **1984**, *9*, 336–340.

(9) Bentley, A.; Atkinson, A.; Jezek, J.; Rawson, D. M. Whole Cell Biosensors — Electrochemical and Optical Approaches to Ecotoxicity Testing. *Toxicol. In Vitro* **2001**, *15*, 469–475.

(10) Ziegler, C. Cell-Based Biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 552–559.

(11) Schroeder, H. W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S41–S52.

(12) Willner, I.; Zayats, M. Electronic Aptamer-Based Sensors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6408–6418.

(13) Bossi, A.; Bonini, F.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S. A. Molecularly Imprinted Polymers for the Recognition of Proteins: The State of the Art. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1131–1137.

(14) Blanco-López, M. C.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 36–48.

(15) Newman, R. H.; Fosbrink, M. D.; Zhang, J. Genetically Encodable Fluorescent Biosensors for Tracking Signaling Dynamics in Living Cells. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3614–3666.

(16) Morris, M. C. Fluorescent Biosensors — Probing Protein Kinase Function in Cancer and Drug Discovery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 1387–1395.

(17) Feng, X.; Liu, L.; Wang, S.; Zhu, D. Water-Soluble Fluorescent Conjugated Polymers and Their Interactions with Biomacromolecules for Sensitive Biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2411-2419.

(18) Feng, F.; Tang, Y.; Wang, S.; Li, Y.; Zhu, D. Continuous Fluorometric Assays for Acetylcholinesterase Activity and Inhibition with Conjugated Polyelectrolytes. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8028–8032.

(19) Liu, H.; Xu, S.; He, Z.; Deng, A.; Zhu, J.-J. Supersandwich Cytosensor for Selective and Ultrasensitive Detection of Cancer Cells Using Aptamer-DNA Concatamer-Quantum Dots Probes. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3385–3392.

(20) Singh, M.; Holzinger, M.; Tabrizian, M.; Winters, S.; Berner, N. C.; Cosnier, S.; Duesberg, G. S. Noncovalently Functionalized Monolayer Graphene for Sensitivity Enhancement of Surface Plasmon Resonance Immunosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2800–2803.

(21) Weaver, J. C.; Cooney, C. L.; Fulton, S. P.; Schuler, P.; Tannenbaum, S. R. Experiments and Calculations Concerning a Thermal Enzyme Probe. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **1976**, *452*, 285–291.

(22) Johansson, Å.; Lundberg, J.; Mattiasson, B.; Mosbach, K. The Application of Immobilized Enzymes in Flow Microcalorimetry. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1973**, *304*, 217–221.

(23) Kirchner, P.; Oberländer, J.; Friedrich, P.; Berger, J.; Rysstad, G.; Keusgen, M.; Schöning, M. J. Realisation of a Calorimetric Gas Sensor on Polyimide Foil for Applications in Aseptic Food Industry. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *170*, 60–66.

(24) Tuantranont, A.; Wisitsora-at, A.; Sritongkham, P.; Jaruwongrungsee, K. A Review of Monolithic Multichannel Quartz Crystal Microbalance: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *687*, 114–128.

(25) Ogi, H. Wireless-Electrodeless Quartz-Crystal-Microbalance Biosensors for Studying Interactions among Biomolecules: A Review. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2013**, *89*, 401–417.

(26) Wang, L.; Wei, Q.; Wu, C.; Hu, Z.; Ji, J.; Wang, P. The Escherichia Coli O157:H7 DNA Detection on a Gold Nanoparticle-Enhanced Piezoelectric Biosensor. *Sci. Bull.* **2008**, *53*, 1175–1184.

(27) Upadhyayula, V. K. K. Functionalized Gold Nanoparticle Supported Sensory Mechanisms Applied in Detection of Chemical and Biological Threat Agents: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *715*, 1–18.

(28) Hong, S.-R.; Jeong, H.-D.; Hong, S. QCM DNA Biosensor for the Diagnosis of a Fish Pathogenic Virus VHSV. *Talanta* **2010**, *82*, 899–903.

(29) García-Martinez, G.; Bustabad, E. A.; Perrot, H.; Gabrielli, C.; Bucur, B.; Lazerges, M.; Rose, D.; Rodriguez-Pardo, L.; Fariña, J.; Compère, C.; *et al.* Development of a Mass Sensitive Quartz Crystal Microbalance (QCM)-Based DNA Biosensor Using a 50 MHz Electronic Oscillator Circuit. *Sensors* **2011**, *11*, 7656–7664.

(30) Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *102*, 29–45.

(31) Wang, J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Sens. Update* **2002**, *10*, 107–119.

(32) Yoo, E.-H.; Lee, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* **2010**, *10*, 4558–4576.

(33) Severinghaus, J. W.; Bradley, A. F. Electrodes for Blood pO_2 and pCO_2 Determination. *J. Appl. Physiol.* **1958**, *13*, 515-518.

(34) Lakard, B.; Herlem, G.; Lakard, S.; Antoniou, A.; Fahys, B. Urea Potentiometric Biosensor Based on Modified Electrodes with Urease Immobilized on Polyethylenimine Films. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1641–1647.

(35) Hernández, R.; Vallés, C.; Benito, A. M.; Maser, W. K.; Xavier Rius, F.; Riu, J. Graphene-Based Potentiometric Biosensor for the Immediate Detection of Living Bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 553–557.

(36) Afkhami, A.; Bagheri, H.; Shirzadmehr, A.; Khoshsafar, H.; Hashemi, P. A Potentiometric Sensor for Cd^{2+} Based on Carbon Nanotube Paste Electrode Constructed from Room Temperature Ionic Liquid, Ionophore and Silica Nanoparticles. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 2176–2185.

(37) Shirzadmehr, A.; Afkhami, A.; Madrakian, T. A New Nano-Composite Potentiometric Sensor Containing an Hg2+-Ion Imprinted Polymer for the Trace Determination of Mercury Ions in Different Matrices. *J. Mol. Liq.* **2015**, *204*, 227–235.

(38) Israr, M. Q.; Sadaf, J. R.; Asif, M. H.; Nur, O.; Willander, M.; Danielsson, B. Potentiometric Cholesterol Biosensor Based on ZnO Nanorods Chemically Grown on Ag Wire. *Thin Solid Films* **2010**, *519*, 1106–1109.

(39) Psychoyios, V. N.; Nikoleli, G.-P.; Tzamtzis, N.; Nikolelis, D. P.; Psaroudakis, N.; Danielsson, B.; Israr, M. Q.; Willander, M. Potentiometric Cholesterol Biosensor Based on ZnO Nanowalls and Stabilized Polymerized Lipid Film. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 367–372.

(40) Qlark, L. C. J. Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. *ASAIO J.* **1956**, *2, 41-48*.

(41) Updike, S. J.; Hicks, G. P. The Enzyme Electrode. *Nature* **1967**, *214*, 986–988.

(42) Gunasingham, H.; Tan, C. B. Platinum-Dispersed Nafion Film Modified Glassy Carbon as an Electrocatalytic Surface for an Amperometric Glucose Enzyme Electrode. *The Analyst* **1989**, *114*, 695-698.

(43) Bélanger, D.; Brassard, E.; Fortier, G. Enhancement of Response by Incorporation of Platinum Microparticles into a Polypyrrole-Glucose Oxidase Electrode. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *228*, 311–315.

(44) Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *330*, 123–138.

(45) Wang, J.; Lin, Y.; Chen, L. Organic-Phase Biosensors for Monitoring Phenol and Hydrogen Peroxide in Pharmaceutical Antibacterial Products. *The Analyst* **1993**, *118*, 277-280.

(46) Karyakin, A. A.; Gitelmacher, O. V.; Karyakina, E. E. A High-Sensitive Glucose Amperometric Biosensor Based on Prussian Blue Modified Electrodes. *Anal. Lett.* **1994**, *27*, 2861–2869.

(47) Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A. O.; Aston, W. J.; Higgins, I. J.; Plotkin, E. V.; Scott, L. D. L.; Turner, A. P. F. Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 667–671.

(48) Jönsson, G.; Gorton, L. An Amperometric Glucose Sensor Made by Modification of a Graphite Electrode Surface with Immobilized Glucose Oxidase and Adsorbed Mediator. *Biosensors* **1985**, *1*, 355–368.

(49) D'Costa, E. J.; Higgins, I. J.; Turner, A. P. F. Quinoprotein Glucose Dehydrogenase and Its Application in an Amperometric Glucose Sensor. *Biosensors* **1986**, *2*, 71–87.

(50) Saby, C.; Mizutani, F.; Yabuki, S. Glucose Sensor Based on Carbon Paste Electrode Incorporating Poly(ethylene Glycol) -Modified Glucose Oxidase and Various Mediators. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 33–39.

(51) Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Electrochemical Biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747-1763.

(52) Scognamiglio, V. Nanotechnology in Glucose Monitoring: Advances and Challenges in the Last 10 Years. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *47*, 12–25.

(53) Vaddiraju, S.; Tomazos, I.; Burgess, D. J.; Jain, F. C.; Papadimitrakopoulos, F. Emerging Synergy between Nanotechnology and Implantable Biosensors: A Review. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1553–1565.

(54) Deng, S.; Jian, G.; Lei, J.; Hu, Z.; Ju, H. A Glucose Biosensor Based on Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Immobilized on Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 373–377.

(55) Zhu, Z.; Garcia-Gancedo, L.; Flewitt, A. J.; Xie, H.; Moussy, F.; Milne, W. I. A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene. *Sensors* **2012**, *12*, 5996–6022.

(56) Yin, H.; Ai, S.; Shi, W.; Zhu, L. A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Gold Nanoparticles–silk Fibroin Modified

Glassy Carbon Electrode and Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase. *Sens. Actuators B Chem.* **2009**, *137*, 747–753.

(57) Xiang, C.; Zou, Y.; Sun, L.-X.; Xu, F. Direct Electrochemistry and Enhanced Electrocatalysis of Horseradish Peroxidase Based on Flowerlike ZnO–gold nanoparticle–Nafion Nanocomposite. *Sens. Actuators B Chem.* **2009**, *136*, 158–162.

(58) Xu, J.-Z.; Zhu, J.-J.; Wu, Q.; Hu, Z.; Chen, H.-Y. An Amperometric Biosensor Based on the Coimmobilization of Horseradish Peroxidase and Methylene Blue on a Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 219–224.

(59) Wang, L. A Novel Hydrogen Peroxide Sensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Colloidal Au Modified ITO Electrode. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 225–229.

(60) Lei, C.; Hu, S.; Shen, G.; Yu, R. Immobilization of Horseradish Peroxidase to a Nano-Au Monolayer Modified Chitosan-Entrapped Carbon Paste Electrode for the Detection of Hydrogen Peroxide. *Talanta* **2003**, *59*, 981–988.

(61) Ionescu, R.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Gheber, L.; Marks, R. Comparison between the Performances of Amperometric Immunosensors for Cholera Antitoxin Based on Three Enzyme Markers☆. *Talanta* **2005**, *66*, 15–20.

(62) Portaccio, M.; Di Tuoro, D.; Arduini, F.; Lepore, M.; Mita, D. G.; Diano, N.; Mita, L.; Moscone, D. A Thionine-Modified Carbon Paste Amperometric Biosensor for Catechol and Bisphenol A Determination. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2003–2008.

(63) Cavalcanti, I. T.; Silva, B. V. M.; Peres, N. G.; Moura, P.; Sotomayor, M. D. P. T.; Guedes, M. I. F.; Dutra, R. F. A Disposable Chitosan-Modified Carbon Fiber Electrode for Dengue Virus Envelope Protein Detection. *Talanta* **2012**, *91*, 41–46.

(64) Bonora, P. L.; Deflorian, F.; Fedrizzi, L. Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Tool for Investigating Underpaint Corrosion. *Electrochimica Acta* **1996**, *41*, 1073–1082.

(65) Macdonald, D. D. Reflections on the History of Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electrochimica Acta* **2006**, *51*, 1376–1388.

(66) He, Z.; Wagner, N.; Minteer, S. D.; Angenent, L. T. An Upflow Microbial Fuel Cell with an Interior Cathode: Assessment of the Internal Resistance by Impedance Spectroscopy †. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 5212–5217.

(67) Mueller, J. T.; Urban, P. M. Characterization of Direct Methanol Fuel Cells by Ac Impedance Spectroscopy. *J. Power Sources* **1998**, *75*, 139–143.

(68) Springer, T. E. Characterization of Polymer Electrolyte Fuel Cells Using AC Impedance Spectroscopy. *J. Electrochem. Soc.* **1996**, *143*, 587-599.

(69) Mauracher, P.; Karden, E. Dynamic Modelling of Lead/acid Batteries Using Impedance Spectroscopy for Parameter Identification. *J. Power Sources* **1997**, *67*, 69–84.

(70) Tröltzsch, U.; Kanoun, O.; Tränkler, H.-R. Characterizing Aging Effects of Lithium Ion Batteries by Impedance Spectroscopy. *Electrochimica Acta* **2006**, *51*, 1664–1672.

(71) Chen, C. .; Liu, J.; Amine, K. Symmetric Cell Approach and Impedance Spectroscopy of High Power Lithium-Ion Batteries. *J. Power Sources* **2001**, *96*, 321–328.

(72) Katz, E.; Willner, I. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 913–947.

(73) Ebrahimi, A.; Dak, P.; Salm, E.; Dash, S.; V. Garimella, S.; Bashir, R.; A. Alam, M. Nanotextured Superhydrophobic Electrodes Enable Detection of Attomolar-Scale DNA Concentration within a Droplet by Non-Faradaic Impedance Spectroscopy. *Lab. Chip* **2013**, *13*, 4248–4256.

(74) Lin, K.-C.; Kunduru, V.; Bothara, M.; Rege, K.; Prasad, S.; Ramakrishna, B. L. Biogenic Nanoporous Silica-Based Sensor for Enhanced Electrochemical Detection of Cardiovascular Biomarkers Proteins. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2336–2342.

(75) Berggren, C.; Bjarnason, B.; Johansson, G. Capacitive Biosensors. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 173–180.

(76) Suni, I. I. Impedance Methods for Electrochemical Sensors Using Nanomaterials. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 604–611.

(77) Lisdat, F.; Schäfer, D. The Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy for Biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555-1567.

(78) Baur, J.; Gondran, C.; Holzinger, M.; Defrancq, E.; Perrot, H.; Cosnier, S. Label-Free Femtomolar Detection of Target DNA by Impedimetric DNA Sensor Based on Poly(pyrrole-Nitrilotriacetic Acid) Film. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1066–1072.

(79) Ozkan, D.; Kara, P.; Kerman, K.; Meric, B.; Erdem, A.; Jelen, F.; Nielsen, P. E.; Ozsoz, M. DNA and PNA Sensing on Mercury and Carbon Electrodes by Using Methylene Blue as an Electrochemical Label. *Bioelectrochemistry* **2002**, *58*, 119–126.

(80) Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B.; Ozsoz, M. Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 219–223.

(81) Kharitonov, A. B.; Alfonta, L.; Katz, E.; Willner, I. Probing of Bioaffinity Interactions at Interfaces Using Impedance Spectroscopy and Chronopotentiometry. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *487*, 133–141.

(82) C. Rodriguez, M.; Kawde, A.-N.; Wang, J. Aptamer Biosensor for Label-Free Impedance Spectroscopy Detection of Proteins Based on Recognition-Induced Switching of the Surface Charge. *Chem. Commun.* **2005**, *0*, 4267–4269.

(83) Protsailo, L. V.; Fawcett, W. R. Studies of Electron Transfer through Self-Assembled Monolayers Using Impedance Spectroscopy. *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 3497–3505.

(84) Li, G.; Li, X.; Wan, J.; Zhang, S. Dendrimers-Based DNA Biosensors for Highly Sensitive Electrochemical Detection of DNA Hybridization Using Reporter Probe DNA Modified with Au Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3281–3287.

(85) Fu, Y.; Yuan, R.; Xu, L.; Chai, Y.; Liu, Y.; Tang, D.; Zhang, Y. Electrochemical Impedance Behavior of DNA Biosensor Based on Colloidal Ag and Bilayer Two-Dimensional Sol–gel as Matrices. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, *62*, 163–174.

(86) Gondran, C.; Orio, M.; Rigal, D.; Galland, B.; Bouffier, L.; Gulon, T.; Cosnier, S. Electropolymerized Biotinylated Poly (pyrrole–viologen) Film as Platform for the Development of Reagentless Impedimetric Immunosensors. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 311–314.

(87) Huang, J.; Yang, G.; Meng, W.; Wu, L.; Zhu, A.; Jiao, X. An Electrochemical Impedimetric Immunosensor for Label-Free Detection of Campylobacter Jejuni in Diarrhea Patients' Stool Based on O-Carboxymethylchitosan Surface Modified Fe3O4 Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1204–1211.

(88) Meini, N.; Farre, C.; Chaix, C.; Kherrat, R.; Dzyadevych, S.; Jaffrezic-Renault, N. A Sensitive and Selective Thrombin Impedimetric Aptasensor Based on Tailored Aptamers Obtained by Solid-Phase Synthesis. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *166*, 715–720.

(89) Abdolahad, M.; Taghinejad, M.; Taghinejad, H.; Janmaleki, M.; Mohajerzadeh, S. A Vertically Aligned Carbon Nanotube -Based Impedance Sensing Biosensor for Rapid and High Sensitive Detection of Cancer Cells. *Lab. Chip* **2012**, *12*, 1183–1190.

(90) Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511.

(91) Haderlein, S. B.; Weissmahr, K. W.; Schwarzenbach, R. P. Specific Adsorption of Nitroaromatic Explosives and Pesticides to Clay Minerals. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 612–622.

(92) Keis, K.; Lindgren, J.; Lindquist, S.-E.; Hagfeldt, A. Studies of the Adsorption Process of Ru Complexes in Nanoporous ZnO Electrodes. *Langmuir* **2000**, *16*, 4688–4694.

(93) J, P.; B, O. Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. *Biochemistry (Mosc.)* **1983**, *22*, 1621–1630.

(94) Seredych, M.; Bandosz, T. J. Adsorption of Dibenzothiophenes on Nanoporous Carbons: Identification of Specific Adsorption Sites Governing Capacity and Selectivity. *Energy Fuels* **2010**, *24*, 3352–3360.

(95) Senda, M.; Delahay, P. *Electrode Processes with Specific or Non-Specific Adsorption: Faradaic Impedance and Rectification*; TR45; Louisiana state univ Baton Rouge, 1961.

(96) Decher, G.; Hong, J.-D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process, 1 Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles on Charged Surfaces. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, *46*, 321–327.

(97) Mousty, C. Sensors and Biosensors Based on Clay-Modified Electrodes—new Trends. *Appl. Clay Sci.* **2004**, *27*, 159–177.

(98) Zuo, G.; Li, X.; Zhang, Z.; Yang, T.; Wang, Y.; Cheng, Z.; Feng, S. Dual-SAM Functionalization on Integrated Cantilevers for Specific Trace-Explosive Sensing and Non-Specific Adsorption Suppression. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 255501.

(99) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir--Blodgett to Self--Assembly*; Academic Press, 2013.

(100) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318*, 426–430.

(101) Kumaran, S.; Tran-Minh, C. Insecticide Determination with Enzyme Electrodes Using Different Enzyme Immobilization Techniques. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 949–954.

(102) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *Biotechniques* **2004**, *37*, 790–806.

(103) Albareda-Sirvent, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Configurations Used in the Design of Screen-Printed Enzymatic Biosensors. A Review. *Sens. Actuators B Chem.* **2000**, *69*, 153–163.

(104) Li, Y.-G.; Zhou, Y.-X.; Feng, J.-L.; Jiang, Z.-H.; Ma, L.-R. Immobilization of Enzyme on Screen-Printed Electrode by Exposure to Glutaraldehyde Vapour for the Construction of Amperometric Acetylcholinesterase Electrodes. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382*, 277–282.

(105) Betancor, L.; Luckarift, H. R. Bioinspired Enzyme Encapsulation for Biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 566–572.

(106) Gill, I.; Ballesteros, A. Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part 1): Sol–gel Encapsulated Biologicals. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 282–296.

(107) Sutter, M.; Boehringer, D.; Gutmann, S.; Günther, S.; Prangishvili, D.; Loessner, M. J.; Stetter, K. O.; Weber-Ban, E.; Ban, N. Structural Basis of Enzyme Encapsulation into a Bacterial Nanocompartment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 939–947.

(108) Caruso, F.; Trau, D.; Möhwald, H.; Renneberg, R. Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules. *Langmuir* **2000**, *16*, 1485–1488.

(109) Wang, Y.; Yan, Y.; Cui, J.; Hosta-Rigau, L.; Heath, J. K.; Nice, E. C.; Caruso, F. Encapsulation of Water-Insoluble Drugs in Polymer Capsules Prepared Using Mesoporous Silica Templates for Intracellular Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4293–4297.

(110) Lee, G. U.; Kidwell, D. A.; Colton, R. J. Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **1994**, *10*, 354–357.

(111) Grubmüller, H.; Heymann, B.; Tavan, P. Ligand Binding: Molecular Mechanics Calculation of the Streptavidin-Biotin Rupture Force. *Science* **1996**, 997–999.

(112) Dundas, C. M.; Demonte, D.; Park, S. Streptavidin–biotin Technology: Improvements and Innovations in Chemical and Biological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9343–9353.

(113) Zhu, M.; Gong, X.; Hu, Y.; Ou, W.; Wan, Y. Streptavidin-Biotin-Based Directional Double Nanobody Sandwich ELISA for Clinical Rapid and Sensitive Detection of Influenza H5N1. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 352.

(114) Wang, L.; Ma, W.; Chen, W.; Liu, L.; Ma, W.; Zhu, Y.; Xu, L.; Kuang, H.; Xu, C. An Aptamer-Based Chromatographic Strip Assay for Sensitive Toxin Semi-Quantitative Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3059–3062.

(115) Hyster, T. K.; Knörr, L.; Ward, T. R.; Rovis, T. Biotinylated Rh(III) Complexes in Engineered Streptavidin for Accelerated Asymmetric C–H Activation. *Science* **2012**, *338*, 500–503.

(116) Aravinda, C. L.; Cosnier, S.; Chen, W.; Myung, N. V.; Mulchandani, A. Label-Free Detection of Cupric Ions and Histidine-Tagged Proteins Using Single Poly(pyrrole)-NTA Chelator Conducting Polymer Nanotube Chemiresistive Sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1451–1455.

(117) Xu, H.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Spinelli, N.; Lopez, C.; Defrancq, E.; Cosnier, S. Label-Free Impedimetric Thrombin Sensor Based on Poly(pyrrole-Nitrilotriacetic Acid)-Aptamer Film. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 90–95.

(118) Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C. Electrogeneration of a Poly(pyrrole)-NTA Chelator Film for a Reversible Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752–5753.

(119) Park, I.-K.; von Recum, H. A.; Jiang, S.; Pun, S. H. Supramolecular Assembly of Cyclodextrin-Based Nanoparticles on Solid Surfaces for Gene Delivery. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2006**, *22*, 8478–8484.

(120) Granadero, D.; Bordello, J.; Pérez-Alvite, M. J.; Novo, M.; Al-Soufi, W. Host-Guest Complexation Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Adamantane–Cyclodextrin Inclusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 173–188.

(121) Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G. Immobilization of Proteins to a Carboxymethyldextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268–277.

(122) Puleo, D. A.; Kissling, R. A.; Sheu, M.-S. A Technique to Immobilize Bioactive Proteins, Including Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4), on Titanium Alloy. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2079–2087.

(123) Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775–1789.

(124) Corbet, J.-P.; Mignani, G. Selected Patented Cross-Coupling Reaction Technologies. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2651–2710.

(125) Roglans, A.; Pla-Quintana, A.; Moreno-Mañas, M. Diazonium Salts as Substrates in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4622–4643.

(126) Kodama, R. H. Magnetic Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *200*, 359–372.

(127) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.

(128) Baca, A. J.; Zhou, F.; Wang, J.; Hu, J.; Li, J.; Wang, J.; Chikneyan, Z. S. Attachment of Ferrocene-Capped Gold Nanoparticle/Streptavidin Conjugates onto Electrode Surfaces Covered with Biotinylated Biomolecules for Enhanced Voltammetric Analysis. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 73–80.

(129) Feng, Y.; Yang, T.; Zhang, W.; Jiang, C.; Jiao, K. Enhanced Sensitivity for Deoxyribonucleic Acid Electrochemical Impedance Sensor: Gold Nanoparticle/polyaniline Nanotube Membranes. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *616*, 144–151.

(130) Zhu, N.; Chang, Z.; He, P.; Fang, Y. Electrochemical DNA Biosensors Based on Platinum Nanoparticles Combined Carbon Nanotubes. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *545*, 21–26.

(131) Chan, W. C. W.; Nie, S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.

(132) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.

(133) Michael Holzinger; Alan Le Goff; Serge Cosnier. Synergetic Effects of Combined Nanomaterials for Biosensing Applications. *Sensors* **2017**, *17*, 1010-1015.

(134) Algar, W. R.; Tavares, A. J.; Krull, U. J. Beyond Labels: A Review of the Application of Quantum Dots as Integrated Components of Assays, Bioprobes, and Biosensors Utilizing Optical Transduction. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 1–25.

(135) Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. The Use of Luminescent Quantum Dots for Optical Sensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 207–218.

(136) Goldman, E. R.; Medintz, I. L.; Whitley, J. L.; Hayhurst, A.; Clapp, A. R.; Uyeda, H. T.; Deschamps, J. R.; Lassman, M. E.; Mattoussi, H. A Hybrid Quantum Dot−Antibody Fragment Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based TNT Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6744–6751.

(137) Danilenko, V. V. On the History of the Discovery of Nanodiamond Synthesis. *Phys. Solid State* **2004**, *46*, 595–599.

(138) Danilenko, VV. Synthesizing and Sintering of Diamond by Explosion. *Moscow: Energoatomizdat*, 2003.

(139) Dolmatov, V. Y. Detonation-Synthesis Nanodiamonds: Synthesis, Structure, Properties and Applications. *Russ. Chem. Rev.* **2007**, *76*, 339-360.

(140) Iakoubovskii, K.; Baidakova, M. V.; Wouters, B. H.; Stesmans, A.; Adriaenssens, G. J.; Vul', A. Y.; Grobet, P. J. Structure and Defects of Detonation Synthesis Nanodiamond. *Diam. Relat. Mater.* **2000**, *9*, 861–865.

(141) Huang, T. S.; Tzeng, Y.; Liu, Y. K.; Chen, Y. C.; Walker, K. R.; Guntupalli, R.; Liu, C. Immobilization of Antibodies and Bacterial Binding on Nanodiamond and Carbon Nanotubes for Biosensor Applications. *Diam. Relat. Mater.* **2004**, *13*, 1098–1102.

(142) Villalba, P.; Ram, M. K.; Gomez, H.; Kumar, A.; Bhethanabotla, V.; Kumar, A. GOX-Functionalized Nanodiamond Films for Electrochemical Biosensor. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31*, 1115–1120.

(143) Lam, R.; Ho, D. Nanodiamonds as Vehicles for Systemic and Localized Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 883–895.

(144) Mohan, N.; Chen, C.-S.; Hsieh, H.-H.; Wu, Y.-C.; Chang, H.-C. In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in Caenorhabditis Elegans. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3692–3699.

(145) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318*, 162–163.

(146) Prato, M. [60]Fullerene Chemistry for Materials Science Applications. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1097–1109.

(147) Guldi, D. M.; Marcaccio, M.; Paolucci, F.; Paolucci, D.; Ramey, J.; Taylor, R.; Burley, G. A. Fluorinated Fullerenes: Sources of Donor−Acceptor Dyads with [18]Trannulene Acceptors for Energy- and Electron-Transfer Reactions. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9723–9730.

(148) Sotiropoulou, S.; Gavalas, V.; Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N. A. Novel Carbon Materials in Biosensor Systems. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 211–215.

(149) Gavalas, V. G.; Chaniotakis, N. A. [60]Fullerene-Mediated Amperometric Biosensors. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *409*, 131–135.

(150) Afreen, S.; Muthoosamy, K.; Manickam, S.; Hashim, U. Functionalized Fullerene (C60) as a Potential Nanomediator in the Fabrication of Highly Sensitive Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 354–364.

(151) Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.

(152) Belin, T.; Epron, F. Characterization Methods of Carbon Nanotubes: A Review. *Mater. Sci. Eng. B* **2005**, *119*, 105–118.

(153) Kumar, M.; Ando, Y. Chemical Vapor Deposition of Carbon Nanotubes: A Review on Growth Mechanism and Mass Production. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 3739–3758.

(154) José-Yacamán, M.; Miki-Yoshida, M.; Rendón, L.; Santiesteban, J. G. Catalytic Growth of Carbon Microtubules with Fullerene Structure. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62*, 657–659.

(155) Che, J.; Çagin, T.; III, W. A. G. Thermal Conductivity of Carbon Nanotubes. *Nanotechnology* **2000**, *11*, 65-69.

(156) Sun, K.; Stroscio, M. A.; Dutta, M. Thermal Conductivity of Carbon Nanotubes. *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*, 074316.

(157) Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J.; Hiura, H.; Bennett, J. W.; Ghaemi, H. F.; Thio, T. Electrical Conductivity of Individual Carbon Nanotubes. *Nature* **1996**, *382*, 54–56.

(158) Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Avouris, P. *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications*; Springer Science & Business Media, 2003.

(159) Odom, T. W.; Huang, J.-L.; Kim, P.; Lieber, C. M. Atomic Structure and Electronic Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nature* **1998**, *391*, 62–64.

(160) Andrews, R.; Weisenberger, M. C. Carbon Nanotube Polymer Composites. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2004**, *8*, 31–37.

(161) Thostenson, E. T.; Chou, T.-W. Aligned Multi-Walled Carbon Nanotube-Reinforced Composites: Processing and Mechanical Characterization. *J. Phys. Appl. Phys.* **2002**, *35*, 77-80.

(162) Al-Saleh, M. H.; Sundararaj, U. A Review of Vapor Grown Carbon Nanofiber/polymer Conductive Composites. *Carbon* **2009**, *47*, 2–22.

(163) Wienecke, M.; Bunescu, M.-C.; Pietrzak, M.; Deistung, K.; Fedtke, P. PTFE Membrane Electrodes with Increased Sensitivity for Gas Sensor Applications. *Synth. Met.* **2003**, *138*, 165–171.

(164) Valentini, F.; Amine, A.; Orlanducci, S.; Terranova, M. L.; Palleschi, G. Carbon Nanotube Purification: Preparation and Characterization of Carbon Nanotube Paste Electrodes. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5413–5421.

(165) Nguyen, C. V.; Delzeit, L.; Cassell, A. M.; Li, J.; Han, J.; Meyyappan, M. Preparation of Nucleic Acid Functionalized Carbon Nanotube Arrays. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1079–1081.

(166) Hirsch, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1853–1859.

(167) Peng, H.; Reverdy, P.; N. Khabashesku, V.; L. Margrave, J. Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes with Organic Peroxides. *Chem. Commun.* **2003**, *0*, 362–363.

(168) Chen, Y.; Haddon, R. C.; Fang, S.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Lee, W. H.; Dickey, E. C.; Grulke, E. A.; Pendergrass, J. C.; Chavan, A.; *et al.* Chemical Attachment of Organic Functional Groups to Single-Walled Carbon Nanotube Material. *J. Mater. Res.* **1998**, *13*, 2423–2431.

(169) Holzinger, M.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Weiss, R.; Jellen, F. Sidewall Functionalization of Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4002–4005.

(170) Bahr, J. L.; Tour, J. M. Highly Functionalized Carbon Nanotubes Using in Situ Generated Diazonium Compounds. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3823–3824.

(171) Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A. Organic Functionalization of Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 760–761.

(172) Bahr, J. L.; Yang, J.; Kosynkin, D. V.; Bronikowski, M. J.; Smalley, R. E.; Tour, J. M. Functionalization of Carbon Nanotubes by Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts: A Bucky Paper Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6536–6542.

(173) Holzinger, M.; Abraham, J.; Whelan, P.; Graupner, R.; Ley, L.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Hirsch, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes with (R-)Oxycarbonyl Nitrenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8566–8580.

(174) Sun, Y.; Wilson, S. R.; Schuster, D. I. High Dissolution and Strong Light Emission of Carbon Nanotubes in Aromatic Amine Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5348–5349.

(175) Kong, J.; Dai, H. Full and Modulated Chemical Gating of Individual Carbon Nanotubes by Organic Amine Compounds. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2890–2893.

(176) Jönsson-Niedziolka, M.; Szot, K.; Rogalski, J.; Opallo, M. Pyrene Sulfonate Functionalised Single-Walled Carbon Nanotubes for Mediatorless Dioxygen Bioelectrocatalysis. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 1042–1044.

(177) Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3838–3839.

(178) Zhao, Y.-L.; Stoddart, J. F. Noncovalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1161–1171.

(179) Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E.; Schmidt, J.; Talmon, Y. Individually Suspended Single-Walled Carbon Nanotubes in Various Surfactants. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1379–1382.

(180) Kang, Y.; Taton, T. A. Micelle-Encapsulated Carbon Nanotubes: A Route to Nanotube Composites. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5650–5651.

(181) Hughes, M.; Chen, G. Z.; Shaffer, M. S. P.; Fray, D. J.; Windle, A. H. Electrochemical Capacitance of a Nanoporous Composite of Carbon Nanotubes and Polypyrrole. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1610–1613.

(182) Wang, J.; Musameh, M. Carbon-Nanotubes Doped Polypyrrole Glucose Biosensor. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 209–213.

(183) Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Xu, Z.; Dong, S. The Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase and Glucose Biosensor Based on Carbon Nanotubes/chitosan Matrix. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 984–988.

(184) Liu, Y.; Tang, J.; Chen, X.; Xin, J. H. Decoration of Carbon Nanotubes with Chitosan. *Carbon* **2005**, *43*, 3178–3180.

(185) Smith, B. W.; Monthioux, M.; Luzzi, D. E. Carbon Nanotube Encapsulated Fullerenes: A Unique Class of Hybrid Materials. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *315*, 31–36.

(186) Castro Neto, A. H. The Electronic Properties of Graphene. *Rev. Mod. Phys.* **2009**, *81*, 109–162.

(187) Lee, C.; Wei, X.; Kysar, J. W.; Hone, J. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science* **2008**, *321*, 385–388.

(188) Novoselov, K. S.; Fal′ko, V. I.; Colombo, L.; Gellert, P. R.; Schwab, M. G.; Kim, K. A Roadmap for Graphene. *Nature* **2012**, *490*, 192–200.

(189) Stankovich, S.; Dikin, D. A.; Dommett, G. H. B.; Kohlhaas, K. M.; Zimney, E. J.; Stach, E. A.; Piner, R. D.; Nguyen, S. T.; Ruoff, R. S. Graphene-Based Composite Materials. *Nature* **2006**, *442*, 282–286.

(190) Matsuo, Y.; Ueda, S.; Konishi, K.; Marco-Lozar, J. P.; Lozano-Castelló, D.; Cazorla-Amorós, D. Pillared Carbons Consisting of Silsesquioxane Bridged Graphene Layers for Hydrogen Storage Materials. *Int. J. Hydrog. Energy* **2012**, *37*, 10702–10708.

(191) Maruyama, J.; Akita, S.; Matsuo, Y.; Muramatsu, Y. Silica-Pillared Graphene Sheets with Iron–nitrogen Units as an Oxygen Reduction Catalyst. *Carbon* **2014**, *66*, 327–333.

(192) Ai, W.; Zhou, W.; Du, Z.; Du, Y.; Zhang, H.; Jia, X.; Xie, L.; Yi, M.; Yu, T.; Huang, W. Benzoxazole and Benzimidazole Heterocycle-Grafted Graphene for High-Performance Supercapacitor Electrodes. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 23439–23446.

(193) Chang, H.; Wu, H. Graphene-Based Nanocomposites: Preparation, Functionalization, and Energy and Environmental Applications. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 3483–3507.

(194) Wang, H.-X.; Zhou, K.-G.; Xie, Y.-L.; Zeng, J.; Chai, N.-N.; Li, J.; Zhang, H.-L. Photoactive Graphene Sheets Prepared by “click” Chemistry. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5747–5749.

(195) Fang, M.; Wang, K.; Lu, H.; Yang, Y.; Nutt, S. Single-Layer Graphene Nanosheets with Controlled Grafting of Polymer Chains. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1982–1992.

(196) Paulus, G. L. C.; Wang, Q. H.; Strano, M. S. Covalent Electron Transfer Chemistry of Graphene with Diazonium Salts. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 160–170.

(197) Koehler, F. M.; Stark, W. J. Organic Synthesis on Graphene. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2297–2306.

(198) Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1027–1036.

(199) Liu, Y.; Yu, D.; Zeng, C.; Miao, Z.; Dai, L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* **2010**, *26*, 6158–6160.

(200) Jung, J. H.; Cheon, D. S.; Liu, F.; Lee, K. B.; Seo, T. S. A Graphene Oxide Based Immuno-Biosensor for Pathogen Detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5708–5711.

(201) Wu, L.; Chu, H. S.; Koh, W. S.; Li, E. P. Highly Sensitive Graphene Biosensors Based on Surface Plasmon Resonance. *Opt. Express* **2010**, *18*, 14395–14400.

(202) Marie, X.; Urbaszek, B.; Amand, T. Les Dichalcogénures de Métaux de Transition, Nouveaux Matériaux Bidimensionnels. *Reflets Phys.* **2016**, 21–25.

(203) Teo, W. Z.; Chng, E. L. K.; Sofer, Z.; Pumera, M. Cytotoxicity of Exfoliated Transition-Metal Dichalcogenides (MoS2, WS2, and WSe2) Is Lower Than That of Graphene and Its Analogues. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20*, 9627–9632.

(204) Wang, Q. H.; Kalantar-Zadeh, K.; Kis, A.; Coleman, J. N.; Strano, M. S. Electronics and Optoelectronics of Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 699–712.

(205) Jariwala, D.; Sangwan, V. K.; Lauhon, L. J.; Marks, T. J.; Hersam, M. C. Emerging Device Applications for Semiconducting Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1102–1120.

(206) Chhowalla, M.; Shin, H. S.; Eda, G.; Li, L.-J.; Loh, K. P.; Zhang, H. The Chemistry of Two-Dimensional Layered Transition Metal Dichalcogenide Nanosheets. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 263–275.

(207) Ataca, C.; Şahin, H.; Ciraci, S. Stable, Single-Layer MX2 Transition-Metal Oxides and Dichalcogenides in a Honeycomb-Like Structure. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 8983–8999.

(208) Kalantar-zadeh, K.; Ou, J. Z.; Daeneke, T.; Strano, M. S.; Pumera, M.; Gras, S. L. Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides in Biosystems. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 5086–5099.

(209) Zeng, Z.; Yin, Z.; Huang, X.; Li, H.; He, Q.; Lu, G.; Boey, F.; Zhang, H. Single-Layer Semiconducting Nanosheets: High-Yield Preparation and Device Fabrication. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11093–11097.

(210) O'Neill, A.; Khan, U.; Coleman, J. N. Preparation of High Concentration Dispersions of Exfoliated MoS2 with Increased Flake Size. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 2414–2421.

(211) Tahir, M. N.; Natalio, F.; Therese, H. A.; Yella, A.; Metz, N.; Shah, M. R.; Mugnaioli, E.; Berger, R.; Theato, P.; Schröder, H.-C.; *et al.* Enzyme-Mediated Deposition of a TiO2 Coating onto Biofunctionalized WS2 Chalcogenide Nanotubes. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 285–291.

(212) Wilson, J. a.; Yoffe, A. d. The Transition Metal Dichalcogenides Discussion and Interpretation of the Observed Optical, Electrical and Structural Properties. *Adv. Phys.* **1969**, *18*, 193–335.

(213) Pumera, M.; Loo, A. H. Layered Transition-Metal Dichalcogenides (MoS2 and WS2) for Sensing and Biosensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *61*, 49–53.

(214) Kalantar-zadeh, K.; Ou, J. Z. Biosensors Based on Two-Dimensional MoS2. *ACS Sens.* **2016**, *1*, 5–16.

(215) Najmaei, S.; Yuan, J.; Zhang, J.; Ajayan, P.; Lou, J. Synthesis and Defect Investigation of Two-Dimensional Molybdenum Disulfide Atomic Layers. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 31–40.

(216) Yu, X.; Prévot, M. S.; Sivula, K. Multiflake Thin Film Electronic Devices of Solution Processed 2D MoS_2 Enabled by Sonopolymer Assisted Exfoliation and Surface Modification. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 5892–5899.

(217) Mihailovic, D. Inorganic Molecular Wires: Physical and Functional Properties of Transition Metal Chalco-Halide Polymers. *Prog. Mater. Sci.* **2009**, *54*, 309–350.

(218) Wang, T.; Zhu, R.; Zhuo, J.; Zhu, Z.; Shao, Y.; Li, M. Direct Detection of DNA below Ppb Level Based on Thionin-Functionalized Layered MoS2 Electrochemical Sensors. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12064–12069.

(219) Zhang, Y.; Zheng, B.; Zhu, C.; Zhang, X.; Tan, C.; Li, H.; Chen, B.; Yang, J.; Chen, J.; Huang, Y.; *et al.* Single-Layer Transition Metal Dichalcogenide Nanosheet-Based Nanosensors for Rapid, Sensitive, and Multiplexed Detection of DNA. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 935–939.

(220) Chao, J.; Zou, M.; Zhang, C.; Sun, H.; Pan, D.; Pei, H.; Su, S.; Yuwen, L.; Fan, C.; Wang, L. A MoS_2 –based System for Efficient Immobilization of Hemoglobin and Biosensing Applications. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 274005.

(221) Zeng, S.; Hu, S.; Xia, J.; Anderson, T.; Dinh, X.-Q.; Meng, X.-M.; Coquet, P.; Yong, K.-T. Graphene–MoS2 Hybrid Nanostructures Enhanced Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *207, Part A*, 801–810.

(222) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.

(223) Giessibl, F. J. Advances in Atomic Force Microscopy. *Rev. Mod. Phys.* **2003**, *75*, 949–983.

(224) Carpick, R. W.; Salmeron, M. Scratching the Surface: Fundamental Investigations of Tribology with Atomic Force Microscopy. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1163–1194.

(225) Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Jr, A. D. R.; Lyman, C. E.; Fiori, C.; Lifshin, E. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists*; Springer Science & Business Media, 2012.

(226) Reichelt, R. Scanning Electron Microscopy. In *Science of microscopy*; Springer, 2007; pp. 133–272.

(227) Williams, D. B.; Carter, C. B. The Transmission Electron Microscope. In *Transmission Electron Microscopy*; Springer, Boston, MA, 1996; pp. 3–17.

(228) Reimer, L. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*; Springer, 2013; Vol. 36.

(229) Fultz, B.; Howe, J. M. *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*; Springer Science & Business Media, 2012.

(230) Bumbrah, G. S.; Sharma, R. M. Raman Spectroscopy – Basic Principle, Instrumentation and Selected Applications for the Characterization of Drugs of Abuse. *Egypt. J. Forensic Sci.* **2016**, *6*, 209–215.

(231) Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*; John Wiley & Sons, 2013.

(232) Wu, Z.; Chen, Z.; Du, X.; Logan, J. M.; Sippel, J.; Nikolou, M.; Kamaras, K.; Reynolds, J. R.; Tanner, D. B.; Hebard, A. F.; *et al.* Transparent, Conductive Carbon Nanotube Films. *Science* **2004**, *305*, 1273–1276.

(233) Raichman, D.; Strawser, D. A.; Lellouche, J.-P. Covalent Functionalization/polycarboxylation of Tungsten Disulfide Inorganic Nanotubes (INTs-WS2). *Nano Res.* **2015**, *8*, 1454–1463.

(234) Mansfield, E.; Feldman, A.; Chiaramonti, A. N.; Lehman, J.; Curtin, A. E. Morphological and Electrical Characterization of MWCNT Papers and Pellets. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2015**, *120*, 304-315.

(235) De, S.; Higgins, T. M.; Lyons, P. E.; Doherty, E. M.; Nirmalraj, P. N.; Blau, W. J.; Boland, J. J.; Coleman, J. N. Silver Nanowire Networks as Flexible, Transparent, Conducting Films: Extremely High DC to Optical Conductivity Ratios. *ACS Nano* **2009**, *3*, 1767–1774.

(236) Papakonstantinou, P.; Kern, R.; Irvine, J.; McAdams, E.; McLaughlin, J.; McNally, T. Fundamental Electrochemical Properties of Carbon Nanotube Electrodes. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures* **2005**, *13*, 275–285.

(237) Valentini, L.; Lozzi, L.; Cantalini, C.; Armentano, I.; Kenny, J. M.; Ottaviano, L.; Santucci, S. Effects of Oxygen Annealing on Gas Sensing Properties of Carbon Nanotube Thin Films. *Thin Solid Films* **2003**, *436*, 95–100.

(238) Collins, P. G. Extreme Oxygen Sensitivity of Electronic Properties of Carbon Nanotubes. *Science* **2000**, *287*, 1801–1804.

(239) Hu, L.; Peng, X.; Huo, K.; Chen, R.; Fu, J.; Li, Y.; Lee, L. Y. S.; Wong, K.-Y.; Chu, P. K. Dominant Factors Governing the Electron Transfer Kinetics and Electrochemical Biosensing Properties of Carbon Nanofiber Arrays. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 28872–28879.

(240) Barsoukov, E.; Macdonald, J. R. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*; John Wiley & Sons, 2005.

(241) Daniels, J. S.; Pourmand, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1239–1257.

(242) Gönüllü, Y.; Kelm, K.; Mathur, S.; Saruhan, B. Equivalent Circuit Models for Determination of the Relation between the Sensing Behavior and Properties of Undoped/Cr Doped TiO2 NTs. *Chemosensors* **2014**, *2*, 69–84.

(243) Fievet, P.; Mullet, M.; Reggiani, J. C.; Pagetti, J. Influence of Surface Charge on Adsorption of a Hydrophobic Peptide onto a Carbon Surface by Capacitance Measurements. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *144*, 35–42.

(244) Devanathan, M. A. V.; Ramakrishnaiah, K. Differential Capacitance of Some Solid Metal/aqueous-Electrolyte Interfaces. *Electrochimica Acta* **1973**, *18*, 259–264.

(245) Bernabeu, P.; Caprani, A. Influence of Surface Charge on Adsorption of Fibrinogen And/or Albumin on a Rotating Disc Electrode of Platinum and Carbon. *Biomaterials* **1990**, *11*, 258–264.

(246) Mitioglu, A. A.; Plochocka, P.; Jadczak, J. N.; Escoffier, W.; Rikken, G. L. J. A.; Kulyuk, L.; Maude, D. K. Optical Manipulation of the Exciton Charge State in Single-Layer Tungsten Disulfide. *Phys. Rev. B* **2013**, *88*, 245403.

(247) Yang, J.; Voiry, D.; Ahn, S. J.; Kang, D.; Kim, A. Y.; Chhowalla, M.; Shin, H. S. Two-Dimensional Hybrid Nanosheets of Tungsten Disulfide and Reduced Graphene Oxide as Catalysts for Enhanced Hydrogen Evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13751–13754.

(248) Zafir Mohamad Nasir, M.; Sofer, Z.; Pumera, M. Effect of Electrolyte pH on the Inherent Electrochemistry of Layered Transition-Metal Dichalcogenides (MoS_2, $MoSe_2$, WS_2, WSe_2). *ChemElectroChem* **2015**, *2*, 1713–1718.

(249) Cheng, L.; Huang, W.; Gong, Q.; Liu, C.; Liu, Z.; Li, Y.; Dai, H. Ultrathin WS2 Nanoflakes as a High-Performance Electrocatalyst for the Hydrogen Evolution Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7860–7863.

(250) Roncali, J. Conjugated Poly (thiophenes): Synthesis, Functionalization, and Applications. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 711–738.

(251) Wei, Y.; Chan, C. C.; Tian, J.; Jang, G. W.; Hsueh, K. F. Electrochemical Polymerization of Thiophenes in the Presence of Bithiophene or Terthiophene: Kinetics and Mechanism of the Polymerization. *Chem. Mater.* **1991**, *3*, 888–897.

(252) Rodríguez, M. C.; Rivas, G. A. Glassy Carbon Paste Electrodes Modified with Polyphenol Oxidase. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *459*, 43–51.

(253) OMS | Choléra http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/fr/ (accessed Jul 11, 2017).

(254) Dick, M. H.; Guillerm, M.; Moussy, F.; Chaignat, C.-L. Review of Two Decades of Cholera Diagnostics – How Far Have We Really Come? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1845.

(255) Boncy, J.; Rossignol, E.; Dahourou, G.; Hast, M.; Buteau, J.; Stanislas, M.; Moffett, D.; Bopp, C.; Balajee, S. A. Performance and Utility of a Rapid Diagnostic Test for Cholera: Notes from Haiti. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *76*, 521–523.

(256) F. Turner, A. P. Biosensors: Sense and Sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3184–3196.

(257) Caballero, B.; Trugo, L.; Finglas, P. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition: Volumes 1-10.*; Elsevier Science BV, 2003.

(258) Cosnier, S. *Electrochemical Biosensors*; CRC Press, 2015.

(259) J. Ronkainen, N.; Brian Halsall, H.; R. Heineman, W. Electrochemical Biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747–1763.

(260) K. Hunt, H.; M. Armani, A. Label-Free Biological and Chemical Sensors. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1544–1559.

(261) Giroud, F.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, D. G.; Marco, M.-P.; Sánchez-Baeza, F. J. Impedimetric Immunosensor Based on a Polypyrrole−Antibiotic Model Film for the Label-Free Picomolar Detection of Ciprofloxacin. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8405–8409.

(262) M, H.; A, L. G.; S, C. Nanomaterials for Biosensing Applications: A Review., Nanomaterials for Biosensing Applications: A Review. *Front. Chem. Front. Chem.* **2014**, *2*, *2*, 63–63.

(263) Wang, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 7–14.

(264) Goff, A. L.; Holzinger, M.; Cosnier, S. Enzymatic Biosensors Based on SWCNT-Conducting Polymer Electrodes. *Analyst* **2011**, *136*, 1279–1287.

(265) Tîlmaciu, C.-M.; Morris, M. C. Carbon Nanotube Biosensors. *Front. Chem.* **2015**, *3*, article 59.

(266) Dong, J.; Zhao, H.; Xu, M.; Ma, Q.; Ai, S. A Label-Free Electrochemical Impedance Immunosensor Based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi Nanocomposite Modified Glassy Carbon Electrode for Detection of Salmonella Typhimurium in Milk. *Food Chem.* **2013**, *141*, 1980–1986.

(267) Tertiş, M.; Florea, A.; Feier, B.; Marian, I. O.; Silaghi-Dumitrescu, L.; Cristea, A.; Săndulescu, R.; Cristea, C. Electrochemical Impedance Studies on Single and Multi-Walled Carbon Nanotubes—Polymer Nanocomposites for Biosensors Development. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 3385–3393.

(268) So, D.-S.; Kang, I.; Huh, H.; Lee, H. Electrical Impedance Properties of Carbon Nanotube Composite Electrodes for Chemical and Biosensor. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 3449–3452.

(269) Zhou, N.; Yang, T.; Jiang, C.; Du, M.; Jiao, K. Highly Sensitive Electrochemical Impedance Spectroscopic Detection of DNA Hybridization Based on Au(nano)-CNT/PAN(nano) Films. *Talanta* **2009**, *77*, 1021–1026.

(270) Bharati, K.; Ganguly, N. K. Cholera Toxin: A Paradigm of a Multifunctional Protein. *Indian J. Med. Res.* **2011**, *133*, 179–187.

(271) Dertzbaugh, M. T.; Peterson, D. L.; Macrina, F. L. Cholera Toxin B-Subunit Gene Fusion: Structural and Functional Analysis of the Chimeric Protein. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 70–79.

(272) Mekalanos, J. J.; Collier, R. J.; Romig, W. Purification of Cholera Toxin and Its Subunits: New Methods of Preparation and the Use of Hypertoxinogenic Mutants. *Infect. Immun.* **1978**, *20*, 552–558.

(273) Bart, M.; Stigter, E. C. A.; Stapert, H. R.; de Jong, G. J.; van Bennekom, W. P. On the Response of a Label-Free Interferon-γ Immunosensor Utilizing Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 49–59.

(274) Johnson, R. D.; Arnold, F. H. The Temkin Isotherm Describes Heterogeneous Protein Adsorption. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1247*, 293–297.

(275) Cecchini, F.; Fajs, L.; Cosnier, S.; Marks, R. S. Vibrio Cholerae Detection: Traditional Assays, Novel Diagnostic Techniques and Biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 199–209.

(276) Singh, M.; Holzinger, M.; Tabrizian, M.; Cosnier, S. Layer-by-Layer Scaffold Formation Using Magnetic Attraction between HiPCO® Single-Walled Carbon Nanotubes and Magnetic Nanoparticles: Application for High Performance Immunosensors. *Carbon* **2015**, *81*, 731–738.

(277) Ionescu, R. E.; Gondran, C.; Gheber, L. A.; Cosnier, S.; Marks, R. S. Construction of Amperometric Immunosensors Based on the Electrogeneration of a Permeable Biotinylated Polypyrrole Film. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6808–6813.

(278) Wenjuan, Y.; Le Goff, A.; Spinelli, N.; Holzinger, M.; Diao, G.-W.; Shan, D.; Defrancq, E.; Cosnier, S. Electrogenerated Trisbipyridyl Ru(II)-/nitrilotriacetic-Polypyrene Copolymer for the Easy Fabrication of Label-Free Photoelectrochemical Immunosensor and Aptasensor: Application to the Determination of Thrombin and Anti-Cholera Toxinantibody. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 556–562.

(279) Nagaraju, K.; Reddy, R.; Reddy, N. A Review on Protein Functionalized Carbon Nanotubes. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2015**, *13, 301-312*.

(280) WHO | Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020 http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/ (accessed Jul 27, 2017).

(281) Bhatt, S.; Gething, P. W.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Farlow, A. W.; Moyes, C. L.; Drake, J. M.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Sankoh, O.; *et al.* The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507.

(282) La Ruche, G.; Souarès, Y.; Armengaud, A.; Peloux-Petiot, F.; Delaunay, P.; Desprès, P.; Lenglet, A.; Jourdain, F.; Leparc-Goffart, I.; Charlet, F. First Two Autochthonous Dengue Virus Infections in Metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* **2010**, *15*.

(283) Gjenero-Margan, I.; Aleraj, B.; Krajcar, D.; Lesnikar, V.; Klobučar, A.; Pem-Novosel, I.; Kurečić-Filipović, S.; Komparak, S.; Martić, R.; Duričić, S. Autochthonous Dengue Fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill* **2011**, *16*.

(284) Schaffner, F.; Mathis, A. Dengue and Dengue Vectors in the WHO European Region: Past, Present, and Scenarios for the Future. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 1271–1280.

(285) Tricou, V.; Vu, H. T.; Quynh, N. V.; Nguyen, C. V.; Tran, H. T.; Farrar, J.; Wills, B.; Simmons, C. P. Comparison of Two Dengue NS1 Rapid Tests for Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *BMC Infect. Dis.* **2010**, *10*, 142.

(286) Peeling, R. W.; Artsob, H.; Pelegrino, J. L.; Buchy, P.; Cardosa, M. J.; Devi, S.; Enria, D. A.; Farrar, J.; Gubler, D. J.; Guzman, M. G.; *et al.* Evaluation of Diagnostic Tests: Dengue. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, S30–S37.

(287) Pal, S.; Dauner, A. L.; Mitra, I.; Forshey, B. M.; Garcia, P.; Morrison, A. C.; Halsey, E. S.; Kochel, T. J.; Wu, S.-J. L. Evaluation of Dengue NS1 Antigen Rapid Tests and ELISA Kits Using Clinical Samples. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113411.

(288) Dauphin, G.; Zientara, S. West Nile Virus: Recent Trends in Diagnosis and Vaccine Development. *Vaccine* **2007**, *25*, 5563–5576.

(289) Silva, M. M. S.; Dias, A. C. M. S.; Silva, B. V. M.; Gomes-Filho, S. L. R.; Kubota, L. T.; Goulart, M. O. F.; Dutra, R. F. Electrochemical Detection of Dengue Virus NS1 Protein with a Poly(allylamine)/carbon Nanotube Layered Immunoelectrode. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 194–200.

(290) Silva, M. M. S.; Dias, A. C. M. S.; Cordeiro, M. T.; Marques, E.; Goulart, M. O. F.; Dutra, R. F. A Thiophene-Modified Screen Printed Electrode for Detection of Dengue Virus NS1 Protein. *Talanta* **2014**, *128*, 505–510.

(291) Parkash, O.; Yean, C. Y.; Shueb, R. H. Screen Printed Carbon Electrode Based Electrochemical Immunosensor for the Detection of Dengue NS1 Antigen. *Diagnostics* **2014**, *4*, 165–180.

(292) Darwish, N. T.; Alrawi, A. H.; Sekaran, S. D.; Alias, Y.; Khor, S. M. Electrochemical Immunosensor Based on Antibody-Nanoparticle Hybrid for Specific Detection of the Dengue Virus NS1 Biomarker. *J. Electrochem. Soc.* **2016**, *163*, B19–B25.

(293) Luna, D. M. N.; Avelino, K. Y. P. S.; Cordeiro, M. T.; Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L. Electrochemical Immunosensor for Dengue Virus Serotypes Based on 4-

Mercaptobenzoic Acid Modified Gold Nanoparticles on Self-Assembled Cysteine Monolayers. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *220*, 565–572.

(294) Sinawang, P. D.; Rai, V.; Ionescu, R. E.; Marks, R. S. Electrochemical Lateral Flow Immunosensor for Detection and Quantification of Dengue NS1 Protein. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 400–408.

(295) Fang, X.; Tan, O. K.; Tse, M. S.; Ooi, E. E. A Label-Free Immunosensor for Diagnosis of Dengue Infection with Simple Electrical Measurements. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1137–1142.

(296) Teles, F. S. R. R. Biosensors and Rapid Diagnostic Tests on the Frontier between Analytical and Clinical Chemistry for Biomolecular Diagnosis of Dengue Disease: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *687*, 28–42.

(297) Oliveira, N.; Souza, E.; Ferreira, D.; Zanforlin, D.; Bezerra, W.; Borba, M. A.; Arruda, M.; Lopes, K.; Nascimento, G.; Martins, D.; *et al.* A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences. *Sensors* **2015**, *15*, 15562–15577.

(298) Sehgal, D.; Vijay, I. K. A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 87–91.

(299) Gutsche, I.; Coulibaly, F.; Voss, J. E.; Salmon, J.; d'Alayer, J.; Ermonval, M.; Larquet, E.; Charneau, P.; Krey, T.; Mégret, F.; *et al.* Secreted Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is an Atypical Barrel-Shaped High-Density Lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 8003–8008.

(300) Recombinant Dengue Virus 2 NS1 glycoprotein (ab64456) http://www.abcam.com/recombinant-dengue-virus-2-ns1-glycoprotein-ab64456.html (accessed Sep 1, 2017).

(301) Figueiredo, A.; Vieira, N. C. S.; dos Santos, J. F.; Janegitz, B. C.; Aoki, S. M.; Junior, P. P.; Lovato, R. L.; Nogueira, M. L.; Zucolotto, V.; Guimarães, F. E. G. Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. *Sci. Rep.* **2015**, *5*.

(302) Liu, W.; Wu, L.; Zhang, X.; Chen, J. Highly-Selective Electrochemical Determination of Catechol Based on 3-Aminophenylboronic Acid-3,4,9,10-Perylene Tetracarboxylic Acid Functionalized Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 718–724.

(303) Nazari, M.; Kashanian, S.; Rafipour, R. Laccase Immobilization on the Electrode Surface to Design a Biosensor for the Detection of Phenolic Compound such as Catechol. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *145*, 130–138.

(304) Asan, A.; Isildak, I. Determination of Major Phenolic Compounds in Water by Reversed-Phase Liquid Chromatography after Pre-Column Derivatization with Benzoyl Chloride. *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 145–149.

(305) Lu, Q.; Hu, H.; Wu, Y.; Chen, S.; Yuan, D.; Yuan, R. An Electrogenerated Chemiluminescence Sensor Based on Gold nanoparticles@C60 Hybrid for the Determination of Phenolic Compounds. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 325–331.

(306) Liao, C.-I.; Ku, K.-L. Development of a Signal-Ratio-Based Antioxidant Index for Assisting the Identification of Polyphenolic Compounds by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7440–7448.

(307) Huang, Y.-K.; He, Z.-H. Processing Continuous K-Nearest Skyline Query with Uncertainty in Spatio-Temporal Databases. *J. Intell. Inf. Syst.* **2015**, *45*, 165–186.

(308) Lunardi, G.; Galati, S.; Tropepi, D.; Moschella, V.; Brusa, L.; Pierantozzi, M.; Stefani, A.; Rossi, S.; Fornai, F.; Fedele, E.; *et al.* Correlation between Changes in CSF Dopamine Turnover and Development of Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2009**, *15*, 383–389.

(309) Tao, Y.; Lin, Y.; Ren, J.; Qu, X. A Dual Fluorometric and Colorimetric Sensor for Dopamine Based on BSA-Stabilized Aunanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 41–46.

(310) Wightman, R. M.; May, L. J.; Michael, A. C. Detection of Dopamine Dynamics in the Brain. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 769A – 793A.

(311) Malem, F.; Mandler, D. Self-Assembled Monolayers in Electroanalytical Chemistry: Application Of. Omega.-Mercapto Carboxylic Acid Monolayers for the Electrochemical Detection of Dopamine in the Presence of a High Concentration of Ascorbic Acid. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 37–41.

(312) Du, M.; Flanigan, V.; Ma, Y. Simultaneous Determination of Polyamines and Catecholamines in PC-12 Tumor Cell Extracts by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *ELECTROPHORESIS* **2004**, *25*, 1496–1502.

(313) Yoshitake, T.; Kehr, J.; Yoshitake, S.; Fujino, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M. Determination of Serotonin, Noradrenaline, Dopamine and Their Metabolites in Rat Brain Extracts and Microdialysis Samples by Column Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Following Derivatization with Benzylamine and 1,2-Diphenylethylenediamine. *J. Chromatogr. B* **2004**, *807*, 177–183.

(314) Moghadam, M. R.; Dadfarnia, S.; Shabani, A. M. H.; Shahbazikhah, P. Chemometric-Assisted Kinetic–spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Uric Acid, and Dopamine. *Anal. Biochem.* **2011**, *410*, 289–295.

(315) Wu, W.-C.; Chang, H.-W.; Tsai, Y.-C. Electrocatalytic Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid and Uric Acid at Silicon Carbide Coated Electrodes. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6458–6460.

(316) Qian, T.; Wu, S.; Shen, J. Facilely Prepared Polypyrrole -Reduced Graphite Oxide Core–shell Microspheres with High Dispersibility for Electrochemical Detection of Dopamine. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4610–4612.

(317) Wang, W.; Xu, G.; Cui, X. T.; Sheng, G.; Luo, X. Enhanced Catalytic and Dopamine Sensing Properties of Electrochemically Reduced Conducting Polymer

Nanocomposite Doped with Pure Graphene Oxide. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 153–156.

(318) Bujduveanu, M.-R.; Yao, W.; Le Goff, A.; Gorgy, K.; Shan, D.; Diao, G.-W.; Ungureanu, E.-M.; Cosnier, S. Multiwalled Carbon Nanotube-CaCO3 Nanoparticle Composites for the Construction of a Tyrosinase-Based Amperometric Dopamine Biosensor. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 613–619.

(319) Decker, H.; Tuczek, F. Tyrosinase/catecholoxidase Activity of Hemocyanins: Structural Basis and Molecular Mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 392–397.

(320) Fenoll, L. G.; Rodríguez-López, J. N.; García-Molina, F.; García-Cánovas, F.; Tudela, J. Michaelis Constants of Mushroom Tyrosinase with Respect to Oxygen in the Presence of Monophenols and Diphenols. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 332–336.

(321) Shan, D.; Zhu, M.; Han, E.; Xue, H.; Cosnier, S. Calcium Carbonate Nanoparticles: A Host Matrix for the Construction of Highly Sensitive Amperometric Phenol Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 648–654.

(322) Carralero Sanz, V.; Mena, M. L.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Development of a Tyrosinase Biosensor Based on Gold Nanoparticles-Modified Glassy Carbon Electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *528*, 1–8.

(323) Mei, L.-P.; Feng, J.-J.; Wu, L.; Zhou, J.-Y.; Chen, J.-R.; Wang, A.-J. Novel Phenol Biosensor Based on Laccase Immobilized on Reduced Graphene Oxide Supported Palladium–copper Alloyed Nanocages. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 347–352.

(324) Karim, M. N.; Lee, J. E.; Lee, H. J. Amperometric Detection of Catechol Using Tyrosinase Modified Electrodes Enhanced by the Layer-by-Layer Assembly of Gold Nanocubes and Polyelectrolytes. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 147–151.

(325) Zhou, Y.; Tang, L.; Zeng, G.; Chen, J.; Cai, Y.; Zhang, Y.; Yang, G.; Liu, Y.; Zhang, C.; Tang, W. Mesoporous Carbon Nitride Based Biosensor for Highly Sensitive and Selective Analysis of Phenol and Catechol in Compost Bioremediation. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 519–525.

(326) Sethuraman, V.; Muthuraja, P.; Anandha Raj, J.; Manisankar, P. A Highly Sensitive Electrochemical Biosensor for Catechol Using Conducting Polymer Reduced Graphene Oxide–metal Oxide Enzyme Modified Electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *84*, 112–119.

(327) Espín, J. C.; Varón, R.; Fenoll, L. G.; Gilabert, M. A.; García-Ruíz, P. A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. Kinetic Characterization of the Substrate Specificity and Mechanism of Mushroom Tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1270–1279.

(328) Canbay, E.; Akyilmaz, E. Design of a Multiwalled Carbon nanotube–Nafion–cysteamine Modified Tyrosinase Biosensor and Its Adaptation of Dopamine Determination. *Anal. Biochem.* **2014**, *444*, 8–15.

(329) Wang, K.; Liu, P.; Ye, Y.; Li, J.; Zhao, W.; Huang, X. Fabrication of a Novel Laccase Biosensor Based on Silica Nanoparticles Modified with Phytic Acid for Sensitive Detection of Dopamine. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *197*, 292–299.

(330) Lete, C.; Lupu, S.; Lakard, B.; Hihn, J.-Y.; del Campo, F. J. Multi-Analyte Determination of Dopamine and Catechol at Single-Walled Carbon Nanotubes – Conducting Polymer – Tyrosinase Based Electrochemical Biosensors. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *744*, 53–61.

(331) Florescu, M.; David, M. Tyrosinase-Based Biosensors for Selective Dopamine Detection. *Sensors* **2017**, *17*, 1314.

Experimental Part

A. Cholera biosensor

1. Materials

Cholera toxin B subunit-biotin conjugated (b-CTB; lyophilized powder), anti-cholera toxin antibody produced in Rabbit (anti-CT; whole antiserum), bovine serum albumin (BSA), copper(II) chloride ($CuCl_2$), monobasic and dibasic phosphates, were purchased from Sigma. Mouse monoclonal anti-dengue NS1 antibody (IgG) (3.29 mg mL^{-1}) was purchased from Fitzgerald (Cat. no. 10-1507). All chemicals were used as received unless it is mentioned. Commercial grade thin multi-walled carbon nanotubes (9.5 nm diameter, purity >95%) were obtained from Nanocyl and used as received without any purification step. 11-Pyrrol-1-yl-undecanoic acid $N_{\alpha'}$,N_{α}-Bis(carboxymethyl)-L-lysine amide (Pyrrole-NTA) was synthesized as described.

2. Electrochemical Measurements

Electropolymerized films were formed in organic media (CH_3CN + 0.1 mol L^{-1} $LiClO_4$) with a $AgNO_3$/Ag 10^{-2} mol L^{-1} in CH_3CN + 0.1 mol L^{-1} $LiClO_4$ electrode used as reference electrode and a Pt wire, placed in a separate compartment, as counter electrode.

Electrochemical measurements were performed in a conventional three electrode cell, containing 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer (PB) as electrolyte solution (0.05 mol L^{-1}, pH 7.0) with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) using its NOVA software. A platinum wire was used as the counter electrode and a saturated calomel electrode (SCE) served as the reference electrode. Cyclic voltammetry was carried out in PB (pH 7.0) containing 5×10^{-3} mol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-}$ redox probe system. Impedimetric measurements were run in a solution of $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5×10^{-3} mol L^{-1} in PB pH 7.0) used as the redox probe at 25°C by potentiostating the immunosensor at 0.2 V versus SCE.

Potentials given in organic and aqueous media are referred to Ag/$AgNO_3$ and SCE electrodes, respectively.

3. Preparation of the sensor electrodes

The surface of glassy carbon electrodes (GCE) was polished with a 2 µm diamond paste purchased from Presi (France) and rinsed successively with water, acetone, and ethanol under sonication (5 min). CNT dispersions were formed by sonication of 5 mg CNTs in 1 L of deionized water during 30 min. Then, the solution is allowed to stand for 24 hours enabling the settling of aggregates. The remaining transparent supernatant is then filtered on cellulose nitrate filter (Sartorius, 0.45 µm, ∅ 3.5 cm). The thickness of the CNT films on the filters is controlled by the filtered volumes (500, 300 and 100 mL). To transfer the films to electrodes, the filters were cut into the right shape fitting the electrode surface and these were then deposited of the glassy carbon electrodes. The filter membrane was then carefully dissolved with acetone avoiding a displacement of the CNT film.

Once the CNT film was deposited on the GCE, an electropolymerized layer of poly(pyrrole-NTA) was generated on this film by chronopotentiometry. The monomer (5×10^{-3} mol L^{-1}) was solubilized in CH_3CN +$LiClO_4$, 0.1 mol L^{-1} and electropolymerized at a charge of 0.18 mC. The formation of the electrogenerated film was then observed by cyclic voltammetry in CH_3CN + $LiClO_4$ 0.1 mol L^{-1} (monomer free electrolyte solution).

These films were used for the subsequent attachment of the bioreceptor unit (b-CTB) via subsequent coordination of copper (II) ions at the NTA chelate. The "as-prepared" electrodes were incubated for 30 min with b-CTB (10 µL, 0.5 mg mL^{-1}) dissolved in 1 % W/V BSA/PBS. After each step, the electrodes were rinsed with 0.1 mol L^{-1} PB for several times. These electrodes were then stored at 5°C until use.

B. Dengue antibody biosensor

1. Materials

Plasma from bovine, Phosphate buffered saline (PBS) tablets, Potassium hexacyanoferrate(III) and Potassium hexacyanoferrate(II) were purchased from Sigma Chemical. Dengue Virus 2 NS1 glycoprotein was obtained from Creative Diagnostics while Dengue NS1 Antibodies were obtained from Prospec. Thin multi-walled carbon nanotubes (9.5 nm diameter, purity >95%) were obtained from Nanocyl. All chemicals and solvents were of analytical grade and were used as received, without further purification. The monomer pyrrole-NHS (N-hydroxysuccinimido 11-(pyrrol-1-yl) undecanoate) was synthesized according to the literature.

2. Electrochemical Measurements

All electrochemical experiments were realized using an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). The data were recorded and operated using Nova software. Electrochemical measurements were carried out in a conventional three-electrode cell. In aqueous media, a saturated calomel electrode (SCE) was used as reference electrode. A platinum wire and a modified glassy carbon electrode (GCE) were used as auxiliary and working electrodes, respectively. A 5×10^{-3} mol L^{-1} $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (1:1) solution was used as a redox probe in PBS throughout the different EIS measurements. Impedance spectra were recorded by immersing the sensors into the abovementioned solution. A frequency range from 50000 to 0.1 Hz was scanned using an amplitude of 0.02 V and at a potential of 0.2 V versus SCE. A rotational speed of 2000 rpm was applied during the measurement. Cyclic voltammetry (CV) was carried out in PBS solution containing 5.10^{-3} mol L^{-1} $[Fe(CN)_6]^{3-}$ between 0 and 0.4 V at a scan rate of 0.1 Vs^{-1}.

Electropolymerization of pyrrole-NHS was performed in organic media (CH_3CN + 0.1 mol L^{-1} TBAP) with the use of a $AgNO_3/Ag$ 10^{-2} mol L^{-1} in CH_3CN + 0.1 mol L^{-1} TBAP electrode as reference electrode and a Pt wire, placed in a separate compartment, as counter electrode. The polypyrrole films were electrochemically generated by cycling between 0 and 0.85 V versus Ag/Ag^+ at room temperature under argon atmosphere (15 cycles). The electrodes were then thoroughly rinsed with CH_3CN to remove traces of monomer residue.

Potentials given in organic and aqueous media are referred to $Ag/AgNO_3$ and SCE electrodes, respectively.

3. Surface modification of the glassy carbon electrodes

Prior to any modification, the surface of glassy carbon electrodes (GCE) was polished with a 2 µm diamond paste purchased from Presi (France) and rinsed successively with water, acetone, and ethanol under sonication (5 min). Afterwards, the GCE (∅ = 3 mm) were modified with multi walled carbon nanotubes (MWCNT). A film of controlled thickness and presenting a good surface homogeneity was deposited on top of the GCE as described in previously. Subsequently, this film is used to support the electro-polymerization of pyrrole-

NHS. The monomer is solubilized (2.10^{-3} mol.L^{-1}) in 25 mL of CH_3CN + 0.1 mol L^{-1} TBAP to obtain a concentration of 2×10^{-3} mol L^{-1}. The polymer is electrogenerated by CV between 0 and 0.85 V

4. Immobilization of the Dengue Virus 2 NS1 glycoprotein

The Dengue Toxin was covalently immobilized via NHS activated amide coupling. The reacting solution contained 5 mg of the Dengue Virus 2 NS1 glycoprotein in 250 µL of PBS solution. 75 µL of this solution was then drop-casted on the polypyrrole-NHS/CNT/GC electrodes for incubation overnight at 4°C. The resulting electrodes were then washed carefully several times with PBS solution.

5. Antibody

In order to test the validity of our system, the constructed immunosensor was exposed to different antibody concentrations. Two different approaches were applied.Firstly, the polypyrrole-Dengue Virus electrodes were incubated with 75 µL of the Dengue NS1 antibody solution for 30 min at 4 °C. Several concentrations ranging from 1.10^{-7} µg.mL^{-1} to 10 µg.mL^{-1} were tested. Starting from a stock solution of 10 µg.mL^{-1} Dengue Virus 2 NS1 glycoprotein in PBS solution, a cascade dilution of a factor of 1/10 was carried out in PBS solution until the final concentration was reached. Between each concentration, the electrodes were rinsed with PBS solution and characterized by EIS and CV. Secondly, the same protocol was followed by using bovine plasma instead of buffer solution. This approach aims to evaluate this immunosensor design close to real test conditions in order to observe possible nonspecific binding events due to the complexity of the plasma. The same concentration range was tested for this second approach.

C. Catechol and Dopamine biosensor

1. Materials

Dopamine hydrochloride 98%, 1,2-Dihydroxybenzene (catechol), Phosphate buffered saline (PBS) tablets, N-Hydroxysuccinimide 98% and Tyrosinase from mushroom were purchased from Sigma Chemical. The nano-fibers of tungsten disulfide with different functionalization were obtained from collaboration with professor Lelouch (Bar-Ilan University; Israël). All chemicals and solvents were of analytical grade and were used as received, without further purification.

2. Electrochemical Measurements

Chronoamperometric experiments were performed with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by the NOVA software.

Modified glassy carbon electrodes (Ø = 3 mm) were used as working electrode for all the characterization. A platinum wire was used as the counter electrode. A saturated calomel electrode (SCE) was used as reference electrode. The electrochemical measurements were performed in phosphate buffer solution 0,1 mol.L^{-1} (pH = 7,4).

3. Preparation of the sensor electrodes

Prior to any modification, the surface of glassy carbon electrodes (GCE) was polished with a 2 µm diamond paste purchased from Presi (France) and rinsed successively with water, acetone, and ethanol under sonication (5 min). Afterwards, the GCE (∅ = 3 mm) were modified with nano-sticks of tungsten disulfide functionalized by carboxylic acid groups (WS_2-COOH). The film was obtained by filtration on a cellulose filter of said material suspended in aqueous solution. It was finally transferred to the surface of a GCE by dissolution of the cellulose filter by dissolving the film by means of acetone rinsing. This film, with a controlled thickness of 6.2 µm, was then used as a support for the immobilization of the polyphenol oxidase. This polymerization involves the activation of the carboxylic acid functional groups of the film in order to allow the coupling of the NHS function. For this, the electrode is incubated with 75 µL of a phosphate saline buffer solution containing EDC (20 mmol.L^{-1}), NHS (10 mmol.L^{-1}) and DMAP (10 mmol.L^{-1}) for 12 h at 4°C. EDC and DMAP serve as activation agents.

Eventually, the GCE is incubated with a solution containing 0,3 mg.mL^{-1} of PPO in PBS 0,1 mol.L-1 pH 7,4 for 12h at 4°C in order to immobilize the enzyme. The resulting electrodes were then washed carefully several times with PBS solution.

4. Detection of the species

a) Catechol

The detection of catechol was performed by chronoamperometry by applying a potential of -0,2 V vs SCE. The measurement is carried out by immersing the electrode in an electrochemical cell containing 20 mL of a phosphate buffer solution (0,1 mol.L^{-1} , pH = 7;4). After stabilization of the current, successive additions of different catechol concentrations are performed under stirring. Each new addition takes place after the current is stable, following the previous injection, in order to obtain well-defined current values.

The range of concentrations thus tested varies from 0,3 µmol.L^{-1} to 300 µmol.L^{-1}.

b) Dopamine

The detection of dopamine was performed by the same electrochemical technique and at the same potential (- 0,2 V vs SCE). As presviously, the measurement is carried out by immersing the electrode in an electrochemical cell containing 20 mL of a phosphate buffer solution (0,1 mol.L^{-1} , pH = 7;4). After stabilization of the current, successive additions of different dopamine concentrations are performed under stirring. It can be seen that the time of stabilization of the current after injection of a new dopamine concentration is relatively low, the electronic transfer as well as the permeation of the substrate through the different layers are therefore fast.

The range of concentrations thus tested varies from 0,5 µmol.L^{-1} to 137 µmol.L^{-1}.

Liste des abréviations

ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

AchE : Acetylcholinesterase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

Anti-CT : anticorps contre la toxine du choléra

BPA : Bisphenol-A

C_{DC} : capacité de double couche

CFU : unités de colonisation

CPE : élément de phase constant

CNT : nanotube de carbone

CTB : toxine du choléra biotinilée

CV : voltampérométrie cyclique

CVD : dépôt chimique en phase vapeur

DENV : toxine de la Dengue

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

DMF : N,N-Diméthylformamide

EDC : 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EIS : spectroscopie d'impédance électrochimique

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FRET : transfert d'énergie par résonance en fluorescence

GCE : electrode de carbone vitreux

GO : oxyde de graphène

GOX : glucose oxydase

HRP : Peroxydase de raifort

K_M : constante de Michaelis-Menten

K_{Mapp} : constante de Michaelis-Menten apparente

MEB : microscopie électronique à balayage

MIP : polymères à empreintes moléculaires

MWCNT : nanotubes de carbone multi-feuillets

NHS : N-Hydroxysuccinimide

NTA : Acide nitrilotriacétique

PBS : Tampon phosphate salin

PEDOT : poly(3,4-éthylènedioxythiophène)

PFP : poly{1,4-phenylene-[9,9-bis(4-phenoxybutylsulfonate)]fluorene-2,7-diyl}

PPO : polyphenol oxydase

PTFE : Polytétrafluoroéthylène

PVD : dépôt physique en phase vapeur

QCM : microbalance à quartz

QD : quantum dot ou boîte quantique

R_{CT} : résistance de transfert de charge

Rdiff : résistance de diffusion

rGO : oxyde de graphène réduit

SAM : monocouche auto-assemblée

SCE : Électrode au calomel saturée en KCl

SDS : sodium dodécylsulfate

SPR : résonance de plasmon de surface

TBAP : Tetrabutylammonium perchlorate

TMD : dichalcogénure de métaux de transition

Ws : résistance de warburg

WS_2 : disulfure de tungstène

Liste des publications

2017 **Palomar, Q., Gondran, C., Holzinger, M., Marks, R. & Cosnier,** S. Controlled carbon nanotube layers for impedimetric immunosensors: High performance label free detection and quantification of anti-cholera toxin antibody. Biosens. Bioelectron. 97, 177–183 **(2017)**.

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

Résumé

Le but principal de ces travaux de thèse fut la conception et la réalisation de biocapteurs par utilisation de méthodes de transduction sans marquage, comme la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), pour la détection de cible d'intérêt. Pour cela, différentes architectures moléculaires, spécifiques à la molécule d'intérêt ciblée, ont été développées afin de permettre la transduction du signal issu de la reconnaissance entre le biorécepteur et son substrat, et conduire ainsi à la détection de la cible.

Les systèmes mis au point reposent sur l'intégration de nanomatériaux, tels que les nanotubes de carbones ou le disulfure de tungstène, pour assurer l'immobilisation de l'entité biospécifique à la surface du capteur. L'intérêt de ces matériaux est multiple puisqu'ils permettent une très forte augmentation de la surface spécifique du système et sont également mis à contribution lors de la fonctionnalisation de la surface de l'électrode. Un des grands défis rencontré dans le développement des biocapteurs étant la stratégie d'immobilisation de l'entité biospécifique sur la surface du capteur.

Ces travaux se sont donc dans un premier temps intéressés à la réalisation et à la caractérisation de films minces de ces nanomatériaux ainsi qu'à leur transfert à la surface d'une électrode. Dans ce contexte, le but est de concevoir des bioarchitectures poreuses à base de polymères fonctionnels électrogénérés autour des nanostructures de carbone permettant la pénétration de grandes biomolécules comme des anticorps pour développer des immunocapteurs de haute performance.

La seconde partie de ce travail s'est donc orientée vers la conception de biocapteurs par utilisation de ces différents matériaux. La fiabilité du procédé de la construction de ces nanostructures poreuses a été validée par la conception de systèmes immunologiques pour la détection de l'anticorps de l'antitoxine du choléra et l'anticorps de la toxine de la dengue.

Enfin, un dernier biocapteur enzymatique, s'appuyant sur l'utilisation de nano-bâtonnets de disulfure de tungstène, a été développé. Ce dernier permet la détection de deux molécules d'intérêt, à savoir le catéchol et la dopamine, par utilisation de la polyphénol oxydase.

Abstract

The main purpose of this work was the design and the development of biosensors by using non-marking transduction methods, such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS), for the detection of targets of interests. To this end, various molecular architectures have been developed to allow the transduction of the signal resulting from the recognition between the bioreceptor and its substrate, and thus lead to the detection of the target.

The systems developed are based on the integration of nanomaterials, such as carbon nanotubes or tungsten disulfide, to ensure the immobilization of the biospecific entity at the surface of the sensor. The advantages of these materials are multiples, since they allow a very large increase in the specific surface area and are also used in the functionalization of the surface of the electrode. Indeed, one of the major challenges encountered in the development of biosensors is the strategy involved in the immobilization of the biospecific entity on the surface of the sensor.

This work was initially interested in the realization and characterization of thin films of these nanomaterials as well as their transfer to the surface of an electrode. In this context, the aim is to design porous bioarchitectures based on electrogenerated functional polymers around carbon nanostructures allowing the penetration of large biomolecules such as antibodies to develop high-performance immunosensors.

The second part of the work was oriented towards the design of biosensors using these different materials. The reliability of the process has been validated by the design of immunological systems for the detection of the anti-cholera toxin antibody and dengue toxin antibody.

Finally, a last enzymatic biosensor, based on the use of tungsten disulfide nano-sticks, has been developed. The latter allows the detection of two molecules of interest, catechol and dopamin, by the use of polyphenol oxidase.