



HAL
open science

Mise en oeuvre de biocapteurs en vue de la détection de pesticides dans l'eau par diffusion Raman exaltée

Amal El Alami

► To cite this version:

Amal El Alami. Mise en oeuvre de biocapteurs en vue de la détection de pesticides dans l'eau par diffusion Raman exaltée. Physique [physics]. Le Mans Université; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc), 2017. Français. NNT : 2017LEMA1010 . tel-01794107

HAL Id: tel-01794107

<https://theses.hal.science/tel-01794107>

Submitted on 17 May 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.

Thèse de Doctorat

Amal EL ALAMI

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université du Maine
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
/l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah –fsdm- Fès*

Écoles doctorales : 3MPL-Le Mans /SMPI-Fès

Discipline : *physique*

Unité de recherche : IMMM-CNRS-UMR 6283, Le Mans, France/ LPS, équipe polymères et nanomatériaux, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, B.P. 1796, Fès-Atlas, Fès, Maroc.

Soutenue le : 20/04/2017
Thèse N° : 2017LEMA1010

Mise en œuvre de biocapteurs en vue de la détection de pesticides et polluants dans l'eau par diffusion Raman exaltée

JURY

Rapporteurs : **Jean-Louis MARTY**, Professeur, Université de Perpignan (France)
Zouheir SEKKAT, Professeur, Université Mohammed V Rabat (Maroc)
Abdellah REZZOUK, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès (Maroc)

Examineurs : **Anouar JORIO**, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès (Maroc)

Directeur de Thèse : **Philippe DANIEL**, Professeur, Université du Maine Le Mans (France)

Co-directeur de Thèse : **Mimouna BAITOUL**, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès (Maroc)

Co-encadrant de Thèse : **Fabienne LAGARDE**, Maître de conférences, Université du Maine Le Mans (France)

Remerciement

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université du Maine (Faculté des Sciences et Techniques du Mans) et de l'Université Sidi Mohamed Ben Abd Allah (Faculté des Sciences Dhar El Mehraz Fés). Elle a été réalisée principalement à l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans (IMMM) et au Laboratoire de Physique de Solide (LPS) de FSDM-Fés.

Je souhaite remercier Monsieur Jean-Marc Grenèche, Directeur de l'IMMM ainsi que Monsieur Laurent FONTAINE qui a pris sa relève en janvier 2009 et Monsieur BENZAKOUR NAJIB directeur du LPS de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et profiter des compétences qui s'y développent.

Je tiens également à remercier l'Office Méditerranéen pour la Jeunesse (OMJ) pour avoir financé une partie de mes séjours au Mans. Je remercie également toute l'équipe des Relations Internationales de l'Université du Maine pour la facilité de toutes les démarches y compris le logement.

A l'Université du Maine pour sa contribution financière à travers l'aide à ma thèse en cotutelle.

Je remercie aussi sincèrement mes directeurs et co-encadrant à savoir : Philippe DANIEL, Mimouna BAITOUL, Fabienne LAGARDE pour avoir dirigé mes travaux. Je souhaite les remercier pour leur investissement, leur enthousiasme et leurs conseils. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et donné durant ces quelques années!

Je suis très sensible à l'honneur que me font également Messieurs Jean-Louis MARTY, Professeur à l'Université de Perpignan (France,) Zouheir SEKKAT, Professeur à l'Université Mohammed V Rabat (Maroc) et Abdellah REZZOUK, Professeur à l'Université Sidi Mohamed Ben Abd Allah-Fès (Maroc), en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je tiens ensuite à remercier Monsieur Anouar JORIO, Professeur à l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès (Maroc), de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse ainsi comme membre de comité de suivie de thèse.

Je remercie également Monsieur Antoine Kather, Professeur à l'Université d'Angers pour sa participation au comité de suivie de thèse.

Je voudrais remercier tous ceux qui de près ou de loin ont participé à ce travail.

Je voudrais exprimer toute ma considération aux ingénieurs et techniciens qui ont participé au bon fonctionnement de ce travail : Frédéric Amiard, Agnès Ranger, Francis Chavanon, Alexandra Biget-Brebion...

Je remercie tout les enseignants des Département de Chimie et de Physique de la Faculté des Sciences Dhar Mahraz-Fès qui ont participé à ma formation durant mon cursus universitaire et également le laboratoire IMMM.

Un grand merci à tous les thésards avec qui j'ai passé de très bons moments et auprès des quels j'ai trouvé du soutien et de l'amitié. Merci à Yueying, Ophélie, Kenza, Héloïse, Huy, Romain, Fatima Zahra ...

Je ne remercierai jamais assez ma mère, sans qui rien n'aurait été possible.

La thèse ne peut se faire sans des moments de stress, je tiens à remercier : Michèle Houdusse, ma marraine, pour ses conseils intéressants et pour l'aide qu'elle m'a apportée et Saida Menard, gestionnaire de l'IMMM pour le réconfort, et sa bonne humeur durant ces moments de stress.

Je dédie ce manuscrit à ma mère, à l'âme de mon père, Sébastien Hérault, à toutes mes sœurs et frères, ainsi qu'à chacun des membres de ma famille pour leurs encouragements et leur soutien constant pendant ces années.

Amal EL ALAMI

-Articles ou proceedings publiés

- “Enhanced Raman spectroscopy coupled to chemometrics for identification and quantification of acetylcholinesterase inhibitors”, Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL (El-alami et al.).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203116302375>
- “Enhanced Raman spectroscopy coupled to chemometrics for identification and quantification of acetylcholinesterase inhibitors”, Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL (proceeding template, SETAC Nantes France 2016) .
<http://www.setac.org/store/download.asp?id=DDF264C5-0CAE-4957-B0BB-F8C8A03F0C32>
- “New sensor for direct detection of pesticides in water by Raman spectroscopy coupled with enzymatic functionalized nanoparticles “, Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL (proceeding template, NANOTECH France 2015).
http://www.setcor.org/files/papers/1475876746_NanotechFrance2015-ProceedingPapersConcate.pdf

-Articles en préparation

- “Sensitive unmodified Gold Nanoparticle-based dynamic light scattering assay for acetylcholine and acetylcholinesterase inhibitors detection”. Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Qun HUO, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.
- “Enhanced Raman spectroscopy coupled to acetylcholinesterase activity for identification of plastics as acetylcholinesterase inhibitors”. Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.

-Communications à des colloques/congrès

- SETAC Nantes France 2016, 22-26 juin, Nantes, « Enhanced Raman spectroscopy coupled to chemometrics for identification and quantification of acetylcholinesterase inhibitors», Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL
- NANOTECH France 2015, 15-17 juin, Paris, « New sensor for direct detection of pesticides in water by Raman spectroscopy coupled with enzymatic functionalized nanoparticles », Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.
- Journées de l’école doctorale, 18 et 19 juin 2015 à Université du Maine: « New sensor for the detection of pesticides in water by enhanced Raman spectroscopy of enzymatic activity »Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.

-Présentations de posters

- SETAC Europe, 3-7 May 2015 en Centre Convencions Internacional de Barcelona Espagne « New sensor for direct detection of pesticides in water by Raman spectroscopy coupled with enzymatic functionalized nanoparticles » les auteurs : Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.
- Journées de l'école doctorale, 16 et 17 juin 2014 à Université de Nantes, le titre du poster : « New sensor for the detection of pesticides in water by enhanced Raman spectroscopy of enzymatic activity » les auteurs : Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.
- Les doctoriales 2013, 13-15 février 2013 à Université Sidi Mohamed Ben Abd Allah-Fés (Maroc), le titre du poster : « Vers un model de détection des polluants et Virus par la spectroscopie Raman » les auteurs : Amal EL ALAMI, Fabienne LAGARDE, Mimouna BAITOUL, Philippe DANIEL.

Liste des abréviations

ACHE: Acétylcholinestérase

AgNPs: Nanoparticules d'argent

ACH: Acétylcholine

ACHCl: Le chlorure d'acétylcholine

AuNPs: nanoparticules d'or

CA: Carbaryl

CETAB: bromure de cetyltriméthylammonium

D_{hm} : diamètre hydrodynamique moyen

DLS: diffusion dynamique de la lumière

GC,LC: chromatographie en phase liquide et gazeuse

HPLC: Chromatographie en Phase liquide à Haute Performance

I_{dm} : intensité de diffusion moyenne

LSPR: Résonance Plasmon de Surface Localisé

MET: Microscopie Electronique à Transmission

NPs: Nanoparticules

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OPs: Organophosphorés

PO: Paraoxon

PP: Phosphate de Potassium

PPS: Plasmons Polaritons de Surface

SEM: monocouches autoassemblées

SERS: Spectroscopie Raman Exaltée de Surface

SPR: Résonance Plasmon de Surface

Table des matières

Introduction générale.....	14
Partie A SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I. Les pesticides.....	18
1. Bref historique	19
2. Classification des pesticides.....	20
3. Utilisation des pesticides.....	21
4. Exposition aux pesticides	22
5. Effets sur la santé.....	26
6. Limites réglementaires	28
7. Les pesticides organophosphorés et les carbamates	30
7.1. Mécanismes d'inhibition.....	32
7.2. Organophosphorés.....	33
7.3. Carbamates.....	35
Conclusion.....	36
II. Détection des organophosphorés et carbamates.....	37
1. Détection directe	38
2. Détection par mesure de l'activité enzymatique	40
3. Définition et principe du biocapteur.....	42
3.1 Biorécepteurs enzymatiques pour la détection des pesticides.....	43
3.1.1 Biorécepteurs catalytiques pour les pesticides	44
3.1.2 Biorécepteurs basés sur l'inhibition par des pesticides.....	45
3.2 Les types de transducteurs.....	46
3.2.1 Capteurs électrochimiques.....	46
3.2.2 Capteurs thermométriques et calorimétriques	46
3.2.3 Capteurs à effet piézoélectrique (ou mécaniques).....	47

3.2.4 Les transducteurs optiques	47
Conclusion.....	48
III. La diffusion Raman.....	49
1. Principe de la diffusion Raman.....	50
2. Théorie de l'effet Raman.....	52
3. Des plasmons à la diffusion Raman Exaltée de surface (SERS)	56
4.1. Les plasmons de surface	57
4.2. Nature du plasmon de surface.....	59
4.3. Plasmon de surface localisé dans les nanoparticules métalliques	60
5. La diffusion Raman Exaltée de surface	62
5.1. L'Effet électromagnétique	63
5.2. L'effet chimique	65
5.3. Types de substrat SERS actifs :.....	67
6. Techniques de fabrication de Substrats SERS : nanoparticules d'or.....	68
Conclusion et résumé.....	71
Objectifs de la thèse :.....	73
Partie B MISE EN ŒUVRE DE BIOCAPTEURS ET TECHNIQUES DE CARACTERISATION	74
IV. Protocoles expérimentaux.....	75
1. Synthèses des nanoparticules d'or.....	75
1.1. Choix de la méthode de synthèse	75
1.2. Mode opératoire	76
1.3. Caractérisation des nanoparticules d'or synthétisées	77
1.4. Elaboration de substrats pour la spectrométrie Raman SERS	78
2. Préparation des solutions:.....	79
2.1. Tampon phosphate de potassium	79
2.2. Préparation/stockage de la solution de l'ACHE	80

2.3.	Préparation de la solution de l'acétylcholine	80
2.4.	Préparation des solutions de pesticides.....	80
2.4.1.	Paraoxon	80
2.4.2.	Carbaryl.....	81
3.	Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE par la spectroscopie Raman SERS	81
3.1.	L'ACHE non immobilisée	81
3.1.1.	Activité de l'ACHE en absence de pesticides	81
3.1.2.	Activité de l'ACHE en présence de pesticides	82
3.1.3.	Activité de l'ACHE en présence de plastiques avec additifs.....	83
3.2.	L'ACHE Immobilisée sur la surface d'or.....	84
3.2.1.	Modification de la surface d'or	86
3.2.2.	Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE.....	88
4.	Mesure de l'activité de l'ACHE par la diffusion de lumière DDL	88
V.	Techniques de caractérisation.....	90
1.	Spectrométrie Raman	90
2.	Diffusion dynamique de la lumière (DDL).....	92
3.	Electrochimie.....	94
4.	Autres techniques.....	95
4.1.	Spectrométries d'absorption UV-Visible	95
4.2.	Microscopie électronique en transmission (MET)	95
	Conclusion.....	96
	Partie C RESULTATS ET DISCUSSIONS	97
VI.	Biocapteur optique basé sur le Raman SERS et ACHE non immobilisée.....	98
1.	Caractérisation des nanoparticules d'or par TEM et UV-visible.....	98
2.	Diffusion Raman Exaltée de Surface (SERS): Détection directe des pesticides.....	100

2.1	Détection du carbaryl	100
2.2	Détection du Paraoxon	102
3.	Détection des inhibiteurs de l'ACHE par mesure de son activité enzymatique couplée à la spectroscopie Raman SERS	104
3.1	Détection de l'ACH	104
3.2.	Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE en absence de pesticides	106
3.3.	Optimisation de paramètres d'élaboration du biocapteur	108
3.3.1.	Optimisation de la concentration de temps de contact.	109
3.3.2.	Optimisation de la concentration de l'ACHE	110
3.3.3.	Interactions NP-Molécules	112
3.3.4.	Conditions optimales retenues	114
3.4.	Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE en présence de pesticides	114
3.5.	Détection du paraoxon	115
3.5.1.	Optimisation du temps de contact PO&ACHE	115
3.5.2.	Limite de détection	116
3.6.	Détection du Carbaryl	117
3.7.	Identification des pesticides	119
3.8.	Mesure de l'activité de l'ACHE en présence d'échantillons d'eaux naturelles.	121
4.	Perspectives : mesures d'autres polluants émergents (plastiques)	122
Conclusion		126
VII.	Biocapteur optique basé sur le Raman SERS@ACHE immobilisée	128
1.	Immobilisation de l'ACHE en vue d'une réutilisation	128
1.1.	Modification de la surface d'or	128
1.2.	Immobilisation de l'ACHE	130
2.	Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE.	134

3.	Détection du paraoxon	134
	Conclusion.....	135
VIII.	Autres résultats : Détection de pesticides par mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE couplée à la diffusion dynamique de la lumière.....	137
1.	Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE par la DLS.....	137
1.1.	Effet de la taille des nanoparticules.....	137
1.2.	Optimisation du temps d'incubation.....	140
1.3.	Optimisation de la concentration en ACHE et ACH	141
2.	Discussion	143
2.1.	Formation du couple ACH@NPs.	143
2.2.	Formation des agrégats de nanoparticules.....	145
3.	Détection du paraoxon	147
	Conclusion.....	149
	Conclusion générale et perspectives	150
	Résumé.....	168
	Abstract	168

Introduction générale

Les organophosphates (OP) et les carbamates sont actuellement connus en tant que composés chimiques utilisés principalement dans l'agriculture en raison de leur très grande efficacité insecticide. Les organophosphorés sont utilisés depuis les années 70 et les carbamates depuis les années 40. La neurotoxicité de ces composés en a fait une arme chimique redoutable employée dans plusieurs conflits militaires et civils, ce qui a entraîné des dommages très importants.

Aujourd'hui, de nombreux produits issus de ces insecticides sont commercialisés pour le traitement des plantes, des animaux et même des êtres humains (contre les poux, les mites, le paludisme). Leur toxicité n'est pas seulement limitée aux espèces cibles à éradiquer. En effet, du à une utilisation massive, ces contaminants sont retrouvés dans l'environnement aquatique notamment et peuvent donc être ingérés par l'homme.

L'empoisonnement provoqué par ces pesticides à fortes doses peut être mortel par asphyxie due à l'atonie grandissante des muscles respiratoires. Certains OP prescrits dans la lutte contre le varron chez les vaches et contre les oestres chez le mouton ont été suspectés d'être responsables de la maladie de la vache folle ou de la tremblante du mouton. A faibles concentrations d'exposition, l'empoisonnement chronique conduit à des atteintes neurologiques en raison de leur toxicité élevée pour les enzymes cholinestérases érythrocytaires (acétylcholinestérases ou cholinestérases vraies) et plasmatiques (pseudo cholinestérases).

L'acétylcholinestérase (ACHE) est la principale cible physiologique de ces neurotoxiques. Cette enzyme joue un rôle essentiel dans le cerveau en permettant la transmission de l'influx nerveux au niveau central et périphérique. Son inhibition peut entraîner la mort par arrêt cardio-respiratoire. Par conséquent, le développement de moyens de protection et de détection contre ces neurotoxiques est important.

Les techniques utilisées actuellement pour la détection des inhibiteurs de l'ACHE, telles que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide et la spectrométrie de masse, impliquent des procédés de prétraitement d'échantillons délicats et complexes. De plus, la plupart d'entre elles sont spécifiques à chaque polluant et nécessitent habituellement de longues périodes d'analyse. Diverses techniques de biodétection basées sur l'activité enzymatique des cholinestérases associées à différents types de transduction

(électrochimie, fluorescence, sondes colorimétriques, etc.) ont également été conçues pour fournir des méthodes plus rapides, simples et sélectives permettant la surveillance de la toxicité dans les domaines alimentaire, environnemental ou militaire. Cependant, ces techniques présentent plusieurs inconvénients, tels qu'une mauvaise sélectivité, une complexité de préparation, et enfin, un manque de stabilité limitant leurs applications.

Ces dernières années, la Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS) a été développée pour diverses applications telles que l'identification et la détection de nombreux types d'analytes. L'effet SERS correspond à la signature vibrationnelle Raman associée à une amplification importante d'intensité, par l'association de l'analyte à des nano-surfaces ou des nanoparticules métalliques (telles que l'or ou l'argent). Cette technique, en raison de sa sensibilité, a été mise en œuvre dans de nombreux domaines de recherche tels que la science des matériaux, la chimie analytique, la biologie ou même des disciplines plus éloignées comme l'art. La combinaison entre l'inhibition de l'ACHE et la spectroscopie Raman SERS peut donc être applicable à la conception d'un dispositif de type biocapteur, destiné à la détection, sensible et spécifique de ces pesticides.

Ce manuscrit décrit le travail de thèse mené sur l'optimisation d'un biocapteur simple, rapide, sensible, non sélectif et à faible coût.

En préambule, une étude bibliographique exhaustive traite de l'utilisation des pesticides, de leur toxicité et structure, de leur mécanisme d'inhibition de l'activité enzymatique de l'ACHE. Le principe de la spectroscopie Raman, l'origine de l'effet SERS ainsi que quelques techniques de fabrication des nanostructures sont ensuite présentés dans ce mémoire. Nous aborderons, en deuxième partie, les protocoles expérimentaux pour le développement du biocapteur enzymatique. Dans ce but, le processus d'élaboration de substrat SERS actif est présenté pour l'application à la détection des pesticides ainsi que les étapes pour la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE. Une brève description des techniques de caractérisation utilisées a été exposée.

En troisième partie, nous avons caractérisé les nanoparticules d'or ayant servi de substrat SERS actif puis nous avons vérifié leur effet SERS, par la détection directe de pesticides (sans mesure de l'activité de l'ACHE). Après avoir constaté que les NPs seules non modifiées n'ont pas permis la détection de pesticides à très faible concentration, le développement d'un biocapteur utilisant l'ACHE est proposé. Pour cela, une optimisation de différents paramètres (concentration d'enzyme et de son substrat, temps d'incubation) a été réalisée avant de les appliquer pour la détection de pesticides. Le biocapteur développé à

partir de la mesure de l'activité de l'ACHE et les nanoparticules synthétisées a été validé avec succès pour la détection de paraoxon (à titre d'exemple de composé organophosphorés) et du carbaryl (au titre des carbamates). Au-delà de la simple détection, nous avons également utilisé la chimiométrie pour leur identification. Après la validation du biocapteur (avec l'ACHE non immobilisée), nous l'avons utilisé pour la détection d'autres inhibiteurs émergents (par exemple micro-plastiques). Afin de se rapprocher d'une problématique de transfert technologique nous avons également immobilisé l'enzyme sur une surface d'or pour rendre possible sa réutilisation.

Nous avons aussi étudié la diffusion dynamique de la lumière (DLS) comme nouvelle technique optique pour la détection qualitative des pesticides. La DLS nous a permis la mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or en mesurant l'activité enzymatique de l'ACHE.

Partie A

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les pesticides

Les pesticides (du latin *cida*, tuer et de l'anglais *pest*, nuisible) sont des substances chimiques minérales ou organiques de synthèse utilisées à vaste échelle pour lutter contre des organismes nuisibles aux cultures, les animaux nuisibles et les agents vecteurs d'affections parasitaires ou microbiologiques de l'homme et des animaux domestiques (figure 1) (OMS, 2016).

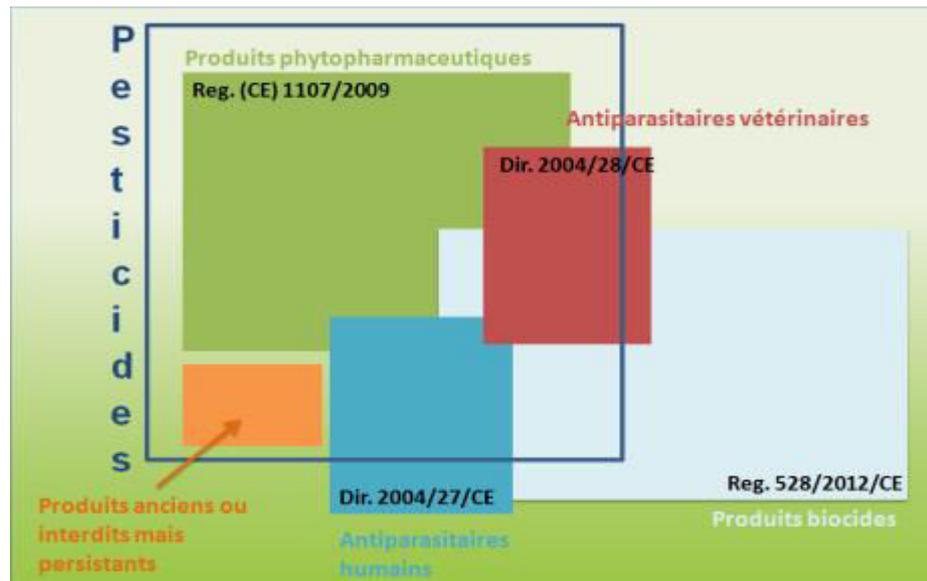


Figure 1 : Les cadres réglementaires distincts régissent la mise sur le marché des pesticides (la directive 91/414/CEE abrogée par le règlement (CE) n°1107/2009 pour les produits phytopharmaceutiques, la directive 98/8/CE abrogée par le règlement (UE) n°528/2012 pour les produits biocides et les directives 2004/27/CE et 2004/28/CE pour les produits antiparasitaires à usages humains et vétérinaires) (ORP, 2016).

En Europe (UE, 1991), avant la mise en œuvre de la Directive 91/414/CE, 800 substances actives d'origine végétale, minérale ou de synthèse pouvaient être utilisées en tant que pesticides (Thiollet-Scholtus, 2014). La révision des substances actives a permis le retrait progressif de nombreux produits et la plupart de celles utilisées aujourd'hui sont de nature organique dont un petit nombre est extrait ou dérivé de plantes. En 2005, 489 substances actives, appartenant à environ 150 familles chimiques différentes, sont encore disponibles et se répartissent en fonction de leurs sensibilités selon les utilisateurs (EU law; Miquel). Ces substances actives sont formulées et commercialisées sous forme de préparations ou produits commerciaux : 6 000 substances environ sont homologuées, mais environ 2 500 sont réellement distribuées.

Il faut également souligner l'existence des « biocides », une large famille de substances destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, par une action chimique ou biologique (Anses, 2016). Ces substances présentent également les mêmes actions de destruction ou de contrôle d'un organisme cible. Alors que les pesticides sont utilisés principalement dans l'agriculture pour protéger les végétaux, les biocides quant à eux, sont réservés à des usages domestiques non agricoles tels que l'entretien des espaces publics, des infrastructures de transport et des jardins des particuliers (Encyclo-ecolo 2016; Anses 2013).

1. Bref historique

L'agriculture moderne est le secteur qui consomme le plus de pesticides (Carvalho et al.). On trouve des traces d'utilisation du soufre en Grèce antique (1000 ans avant J.-C) comme agent de fumigation. De la même manière, Pline l'Ancien, naturaliste romain du I^{er} siècle, recommandait dans ses écrits l'usage de l'arsenic comme insecticide. Cependant, les pesticides ont été employés de façon plus intensive, avant la guerre 39-45, mais surtout après, avec le développement de la chimie organique. C'est à cette époque qu'apparaît un grand nombre de composés organiques (notamment la grande famille 10 des organophosphorés) (Apfelbaum). Ensuite dans les années 50, des insecticides comme le dichlorodiphényldichloroéthane (DDD) et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) sont utilisés en grandes quantités en agriculture (élimination du doryphore) et en médecine préventive (pour détruire le moustique responsable de la malaria) (Alvarez et al.). D'autres biocides sont mis au point pour l'industrie textile et du bois, pour les usages domestiques (aérosols tue-mouches), pour l'entretien des routes et pour une utilisation en médecine. La seconde moitié du XX^{ème} siècle a vu la généralisation de l'utilisation des pesticides au niveau mondial, avec des variations locales quant aux quantités et aux types de pesticides utilisés (de 1945 à 1985, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans). Ils jouent donc un rôle économique et social important notamment par le biais de la politique agricole commune qui vise entre autre à accroître les rendements pour atteindre l'autosuffisance. Dans ce sens, les pesticides jouent un rôle important dans l'accessibilité à un approvisionnement alimentaire abondant pour l'ensemble de la planète, puisqu'ils contribuent à protéger les cultures vivrières et fourragères contre les organismes nuisibles (insectes, mauvaises herbes et maladies fongiques) (Apfelbaum et al.). Par ailleurs, l'augmentation des rendements des terres

agricoles a permis de limiter la déforestation, ainsi les experts estiment que leur utilisation, en 50 ans, a permis de préserver 50 % de la surface de la forêt actuelle (Schiffers et al.).

2. Classification des pesticides

Les pesticides peuvent être classés selon deux critères principaux : par famille chimique ou par cible (WHO, 2009). Selon le classement par cibles, on distingue 4 grandes familles de pesticides:

- Les insecticides : destinés à la lutte contre les insectes. Ils interviennent en les tuant ou en empêchant leur reproduction. Ce sont souvent les pesticides les plus toxiques et c'est dans cette famille que l'on trouve la plupart des polluants organiques persistants, dont le DDT et le lindane. Les familles les plus rencontrées sont les organophosphorés (malathion), les carbamates insecticides (carbaryl), les pyréthrinoïdes (deltaméthrine) et les organochlorés (endosulfan).
- Les herbicides : destinés à limiter l'installation d'espèces végétales qui entrent en concurrence avec les plantes cultivées (sélectifs ou totaux). Leur mode d'épandage est différent puisqu'ils sont déposés directement sur le sol, tandis que les autres pesticides sont plutôt pulvérisés sur la plante en croissance. Les herbicides constituent aujourd'hui la famille la plus importante en nombre de molécules et la plus utilisée.
- Les fongicides : destinés à éliminer les moisissures et parasites fongiques des plantes.
- Le quatrième groupe est celui des molluscicides et autres pesticides : les molluscicides sont destinés à éliminer les escargots et les limaces. Les rotenticides agissent contre les rongeurs. Les anticoagulants représentent 85% du marché. Quelques produits de gazage sont encore utilisés. Les nématicides agissent sur les nématodes.

Le classement par structure chimique comprend :

- Les pesticides carbamates : fongicides et insecticides ;
- Les pesticides organochlorés : parmi les plus anciens et les plus persistants, surtout utilisés comme insecticides en agriculture et dans les métiers du bois ;
- Les pesticides organophosphorés : insecticides ;
- Les urées substituées : herbicides et fongicides, (nom avec le suffixe "uron") ;
- Les pesticides organoazotés : herbicides principalement, repérables par le suffixe "zine" ;
- Les pesticides sulfonylurées : herbicides.

3. Utilisation des pesticides

L'utilisation des pesticides dans le monde entier ne cesse de croître et particulièrement dans le secteur agricole qui en consomme de plus en plus ; la prise de conscience des risques qu'ils présentent pour la santé et l'environnement s'en trouve tout autant développée. Le marché mondial des pesticides représentait environ 40 milliards de dollars en 2009 d'après l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP, 2009), la part de l'Afrique est estimée à 4% (soit 1,5 milliard de dollars) du marché mondial. 30% des pesticides vendus dans les pays en développement ne se conforment pas aux normes mondiales, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). L'Europe et les États Unis sont respectivement le premier et deuxième consommateur mondial (Figure 2). La France, premier producteur agricole en Europe et deuxième consommateur de pesticides derrière l'Espagne, montre pourtant des rendements, qui ne progressent plus : céréales, oléagineux, poires, pommes ou betteraves sont moins productifs qu'en 2009 (Anses, 2016).

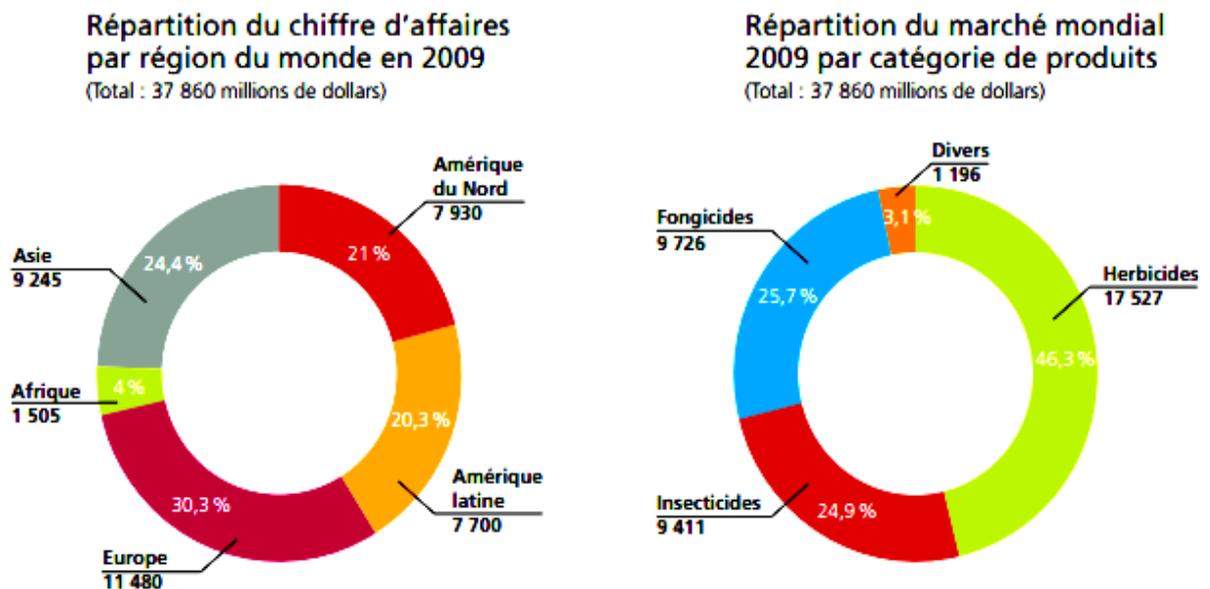


Figure 2: Parts de marché des pesticides en 2009 au niveau mondial (UIPP, 2009).

- **Les pesticides au Maroc en particulier:**

La grande majorité des pesticides fournis au Maroc vient de l'étranger. En 2005, le Maroc a importé 12.000 tonnes de produits phytosanitaires, principalement des insecticides (39% du total), suivis des fongicides (35%), des herbicides et nématicides (11% chacun) puis des acaricides et divers (7%) (ONSSA,2016).

4. Exposition aux pesticides

Les personnes travaillant dans l'agriculture sont potentiellement les plus exposées aux pesticides. Autant de dangers qui pèsent potentiellement sur ceux qui habitent dans ces zones exposées. L'exposition de la population générale aux pesticides se caractérise par des expositions inégales et à diverses doses répétées dans le temps liées au contact avec des milieux contaminés (sol, air extérieur et intérieur, poussières, surfaces, etc.). En effet ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation (Augustijn-Beckers et al.; Schiavon et al.; Apfelbaum et al.).

Les pesticides sont aujourd'hui considérés comme une source importante de pollution (Mostafalou et al.). Ils sont connus pour leur impact dans tous les secteurs de l'environnement : pollution des sols, de l'air, de l'eau et responsables d'émissions de gaz à effet de serre (figure 3) (Ministère de l'environnement de l'énergie et de la mer. 2014). Effectivement, les pesticides sont présents dans tous les compartiments de l'environnement et par conséquent dans notre alimentation.

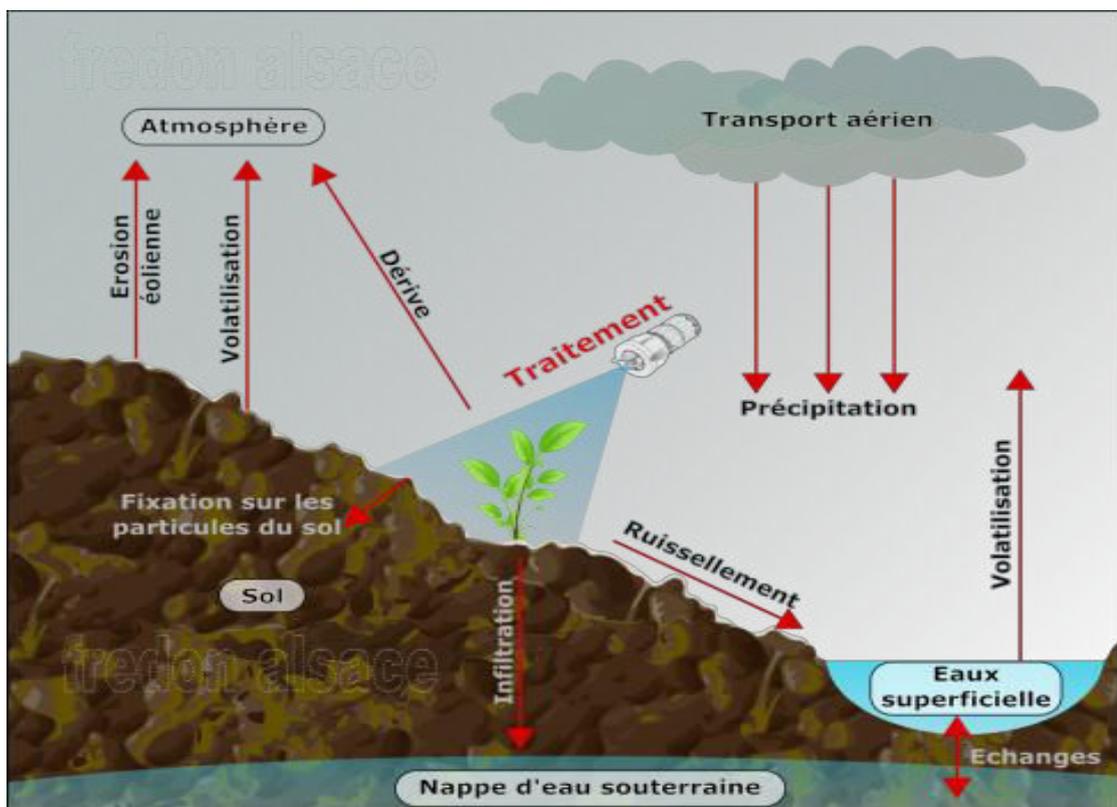
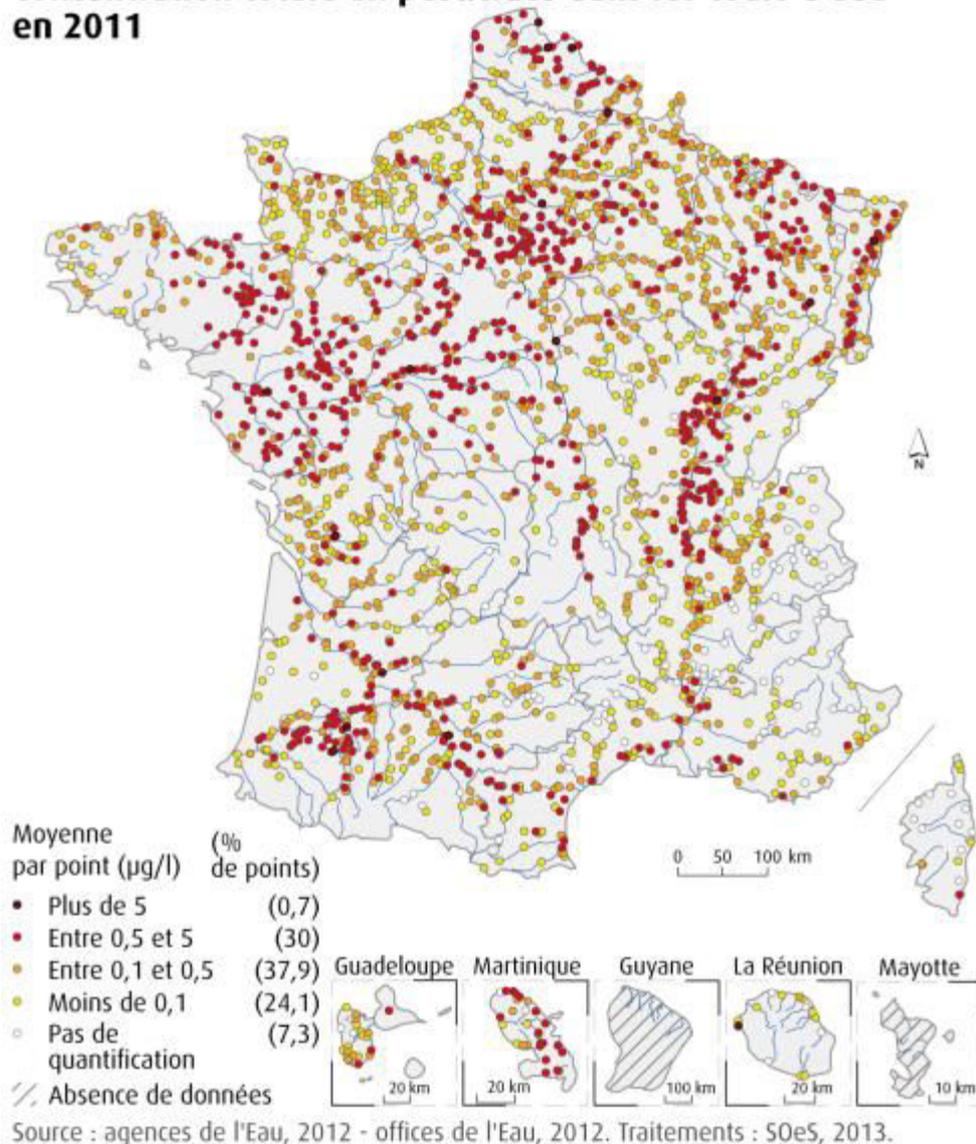


Figure 3 : Devenir et transformation des pesticides dans l'environnement (Fredon).

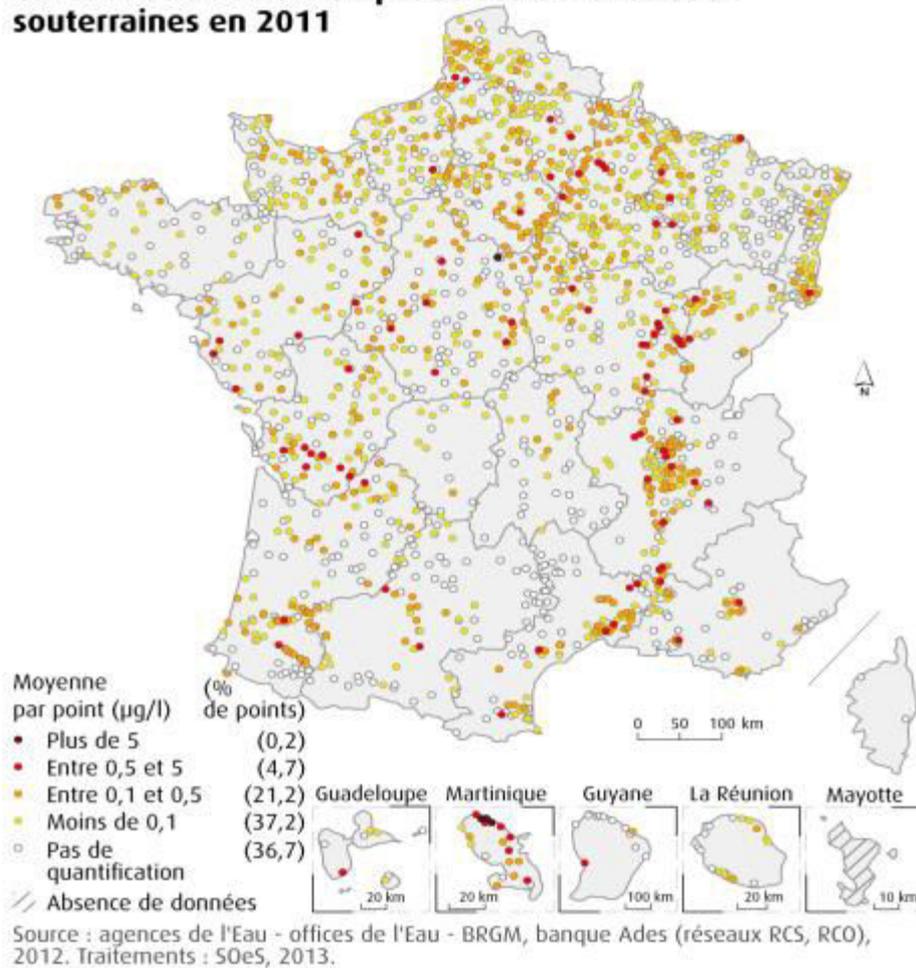
- **Les milieux aquatiques :**

Des recherches sur la contamination des eaux de surfaces et les eaux souterraines, en France, sont réalisées pour contrôler les niveaux de contamination par les pesticides. Le Service de l'Observation et des statistiques du Ministère chargé de l'écologie évaluait que 90 % des points de mesures de la qualité des eaux superficielles en 2006 mettaient en évidence la détection d'au moins un pesticide, et 37 % des points exploitables montraient une qualité moyenne à mauvaise vis-à-vis du paramètre pesticides avec la détection de 235 substances actives. Dans les eaux souterraines, on a retrouvé au moins un pesticide dans 47 % des points de mesures, et 25 % des points exploitables montraient une qualité moyenne, à mauvaise, vis-à-vis du paramètre pesticide, avec la détection de 116 substances actives (SOes) :

Concentration totale en pesticides dans les cours d'eau en 2011



Concentration totale en pesticides dans les eaux souterraines en 2011



Les milieux marins et littoraux ne bénéficient d'aucune obligation réglementaire de contrôle et donc sont probablement aujourd'hui l'un des compartiments de l'environnement les moins bien renseignés (Le Bris et al.; Paulsson et al.).

Maroc :

La qualité des eaux au Maroc est gravement menacée. Les eaux superficielles constituent l'évacuateur des déchets de tous genres. Ces rejets s'amplifient et menacent le milieu aquatique. Les eaux souterraines ne sont pas à l'abri de cette pollution due essentiellement à l'utilisation abusive des fertilisants et des pesticides en agriculture dont une partie est lessivée par les eaux de ruissellement (Miras et al.; Debbarh et al.; Eddaya et al.). La surveillance des contaminants dans les eaux au Maroc n'est pas bien renseignée. Jusqu'à présent il n'existe pas de données sur des contrôles de la qualité des eaux.

- **L'air**

En 2002, les associations agréées pour la surveillance de la qualité de l'air en France, ont réalisé des mesures sur la présence de pesticides dans l'air. Près de 100 000 mesures ont été réalisées depuis. Environ 12 % de ces mesures ont permis de détecter un pesticide. 114 substances actives différentes ont été ainsi retrouvées dans l'atmosphère. Les résultats montrent une saisonnalité de la présence de pesticides dans l'air. Les concentrations observées, et notamment les plus élevées, sont largement corrélées avec les périodes d'utilisation agricole des pesticides (printemps et en automne). L'exposition par la voie aérienne des populations intervient principalement dans les milieux fermés. Les traitements des matériaux, l'utilisation de produits insecticides ou antiparasitaires et l'usage domestique constituent autant de sources d'exposition. Selon l'ORP, la contamination des environnements intérieurs, peut-être quelques fois plus élevée que le milieu extérieur.

- **Les sols**

Peu d'études sont disponibles sur la présence des pesticides dans les sols. Toutefois une étude pilote conduite par l'INRA, en France, a permis de réaliser des mesures sur des échantillons de sols collectés par le Réseau de mesures de la qualité des sols (RMQS). Les premiers résultats ont permis de relever que pratiquement 100 % des 200 échantillons analysés contenaient du lindane (insecticide organochloré).

- **Les denrées alimentaires et l'eau distribuée**

En France, pour garantir la sécurité des consommateurs, la législation impose le respect des critères de qualité des eaux distribuées et des limites maximales de résidus dans les denrées. Les données produites dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle sont nombreuses. Mais cette exigence n'est pas forcément appliquée pour les denrées alimentaires. Une analyse, effectuée par la DGCCRF en 2006 sur 4 749 échantillons de fruits et légumes frais ou transformés, de céréales et de produits végétaux issus de l'agriculture biologique analysés, a montré un taux de non-conformité de 6,0 %.

Un rapport de l'Association WEDFOCUS sur les pesticides au Maroc a affirmé que ces derniers sont très mal utilisés dans la majorité des cas, fréquemment sans respect des doses et des rythmes d'applications (plusieurs au cours du même cycle de culture). Les délais

avant récolte ne sont pas davantage respectés, ce qui induit une pollution accrue des différentes composantes de l'environnement (nappe phréatique, sol, air, etc.) et laisse surtout des quantités énormes de résidus de pesticides dans les fruits et légumes, d'où des risques graves pour la santé des consommateurs (INRA,2016).

5. Effets sur la santé

Les effets de l'exposition peuvent aller d'une légère irritation cutanée jusqu'à des pathologies beaucoup plus graves :

- dérèglement du système hormonal : diabète de type 2, obésité, cancers hormonodépendants (sein, prostate, thyroïde) (Multigner et al.; Namer et al.) ,
- troubles neurologiques (Baldi et al.; Parrón et al.; Hayden et al.; Blanc-Lapierre et al.) avec des conséquences sur les capacités cognitives et des troubles comportementaux (troubles de l'attention, hyperactivité, etc.), l'autisme ou les atteintes au développement du cerveau,
- les maladies congénitales, des tumeurs, des modifications génétiques, des troubles sanguins, pouvant aller jusqu'à la mort.

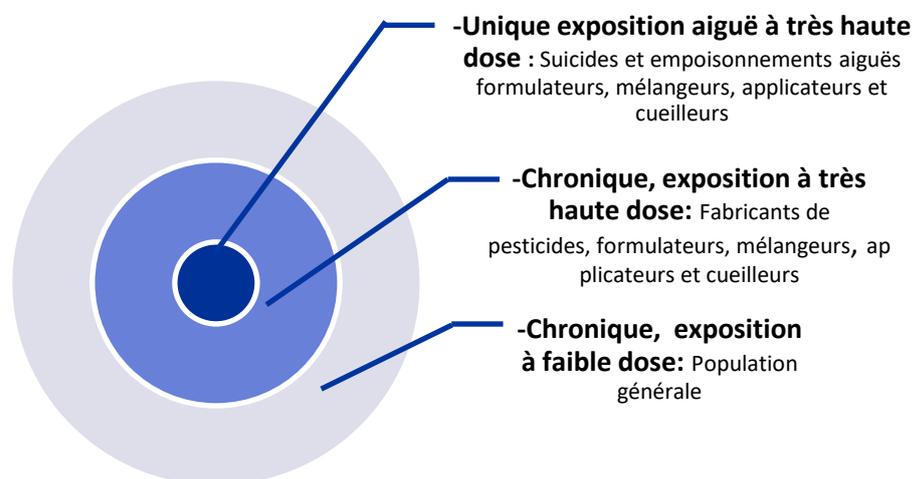


Figure 4 : *Groupes de populations liés au risque de l'exposition des pesticides (WHO, Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture).*

De manière générale, nombre de pesticides sont classés CMR — cancérogènes, mutagènes (toxique pour l'ADN) ou reprotoxiques (nocifs pour la fertilité). La maladie de

Parkinson, enfin, a été reconnue en 2012 maladie professionnelle en lien avec les pesticides (Rugbjerg et al.).

Une faible quantité de pesticides peut modifier les fonctions et le développement du système nerveux, chez le fœtus, l'enfant et l'adulte (Andersen et al.; Greenlee et al.; Rauh et al.). D'autres études montrent que les effets neuro-cognitifs des pesticides organophosphorés sur les populations exposées professionnellement se manifeste par des troubles de la mémoire, anxiété, irritabilité et dépression (J.M. Saïssy et al.).

La figure 4 représente une description, selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), des catégories exposées aux pesticides et le risque lié à chaque cas. La surface de chaque partie du cercle indique approximativement la taille du groupe exposé et le degré des dangers. En France, la Mutualité Sociale Agricole (MSA), qui a en charge la médecine du travail et la prévention des risques professionnels des salariés agricoles, a relevé des effets indésirables chez 20 % des manipulateurs lors d'enquêtes portant sur une année d'utilisation professionnelle de pesticides (Direction générale du travail).

Le 20 mars 2015 le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) relevant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a publié les conclusions d'un groupe de travail sur l'évaluation de la cancérogénicité de cinq matières actives pesticides (glyphosate, malathion, diazinon, tetrachlorvinphos et le parathion). Malgré cela le glyphosate est encore autorisé en France et le malathion l'est au Maroc (Source ONSSA 2012- Office national de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires et WHO 2015).

Selon un rapport de l'OMS, le nombre annuel d'intoxications par pesticides est estimé entre 1 et 5 millions, dont plusieurs milliers de cas mortels. Au Maroc, bien que peu d'études aient mis l'accent sur la place des pesticides dans la pathologie toxique, certaines d'entre elles ont montré qu'ils constituent une cause d'intoxication loin d'être négligeable.

Selon une étude rétrospective réalisée sur une série de 500 malades admis à l'hôpital pour enfants de Rabat, les pesticides étaient responsables de 38 % des cas d'intoxication aiguës. Une autre étude a montré qu'ils étaient impliqués dans 28,5 % des intoxications traitées aux urgences de l'hôpital Ibn Rochd de Casablanca (Rhalem et al.). En effet, la non

vigilance requise pour l'utilisation et la commercialisation des pesticides fait du Maroc l'un des pays où les intoxications aiguës par pesticide (IAP) occupent la 4ème position après celles provoquées par les médicaments, les produits industriels et les aliments. Cependant, elles restent faibles par rapport à d'autres pays, tels que la Chine et le Sri Lanka où l'intoxication aux pesticides est un problème particulier (Figure 5) (FAO 2016; Kabbaj et al.).

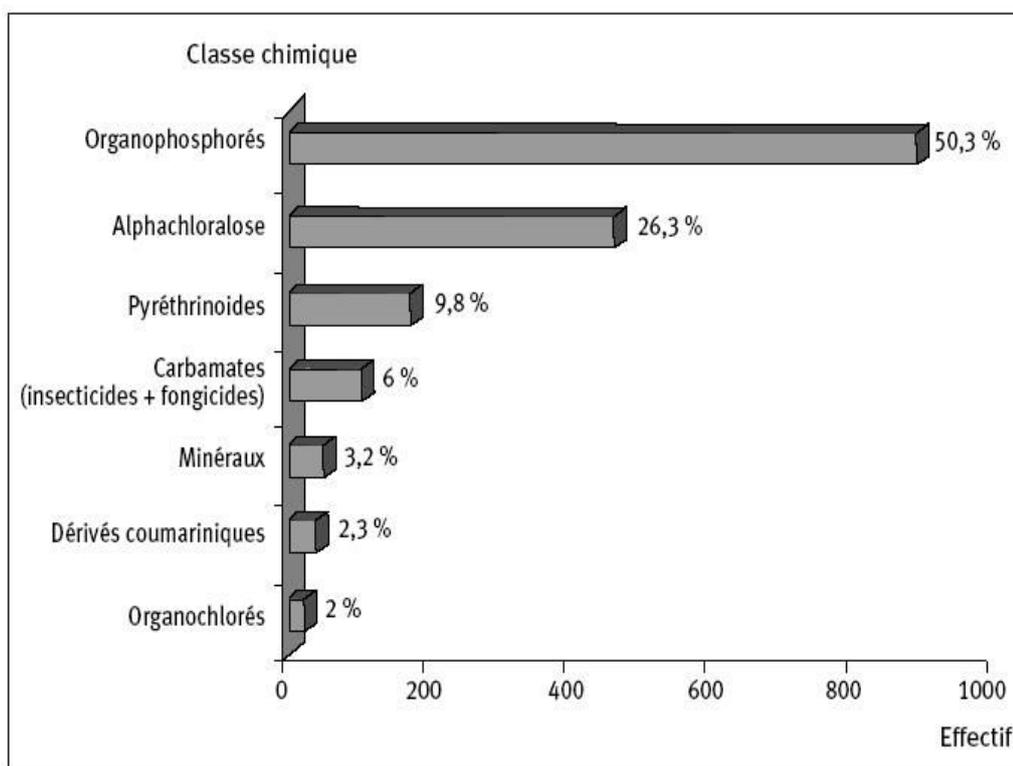


Figure 5 : Classe chimique de pesticides impliqués dans les intoxications, unité d'information toxicologique, Centre Antipoison du Maroc, 1992–2007 (Rhalem et al.).

6. Limites réglementaires

En 1991, la première Directive européenne (91/414) concernant la mise sur le marché des pesticides agricoles a été publiée et mise en application en 1993. Le cadre relatif à l'homologation des pesticides a été complété par des dispositions législatives et réglementaires. La Convention de Rotterdam est une convention internationale engagée par le Programme des Nations unies pour l'environnement (PNUE). Cette convention, parfois appelée Convention Pic (pour prior informed consent) ouverte aux signatures le 10 septembre 1998, offre la possibilité pour un pays de décider du choix des produits afin d'assurer la sécurité dans le domaine sanitaire (rejet des produits considérés trop dangereux). Elle

encourage le partage des responsabilités et la coopération entre les pays signataires dans le domaine du commerce international de certains produits chimiques très dangereux dont notamment certains pesticides et certains produits chimiques industriels.

Les « douze vilains » (en anglais : Dirty Dozen) représentent une catégorie de polluants organiques persistants (POP) qui s'inscrivent parmi les contaminants organiques les plus répandus et les plus nocifs pour l'environnement. « The dirty dozen », est en fait composé de 17 produits qui sont, pour la plupart, des pesticides et des insecticides : 2,4,5-T (un composant de l'agent orange), aldicarbe, aldrine, chlordane, chlordimeform, DBCP, DDT, dieldrine, DBE, heptachlore, HCH, lindane (γ -HCH), parathion méthyl (méthylparathion), dichlorure de paraquat, parathion éthyl (parathion), PCP, toxaphène. La convention de Rotterdam demande aux états signataires de les interdire. La Convention de Stockholm complète la dirty dozen avec les produits suivants: binapacryl, toxaphène, oxyde d'éthylène, dichlorure d'éthylène, parathion éthyl, parathion méthyl et monocrotophos. Dans les pays du sud comme l'Afrique, des textes législatifs et réglementaires ont été élaborés au niveau régional concernant la gestion, l'utilisation, l'agrément et le contrôle des pesticides, en conformité avec les exigences et recommandations de l'OMS et de la FAO. Différentes actions ont été menées par certains pays en vue de contrôler l'importation et l'utilisation de pesticides contenant des matières actives dangereuses.

La directive n° 91/414/CEE du Conseil de l'Union européenne a fixé les limites maximales de résidus (LMR). Elles correspondent aux niveaux supérieurs de concentration de résidus de pesticides autorisés légalement sur les denrées alimentaires et les aliments destinés aux animaux. Elles sont fondées sur les bonnes pratiques agricoles et visent à garantir le niveau d'exposition le plus faible possible pour les consommateurs. Pour les ressources en eau en France, la limite maximale de résidus dans l'eau est éditée par le code de la santé publique sur la base des directives européennes 98/83/CE et 75/440/CEE retranscrites en droit français le 11 janvier 2007 au journal officiel dans les articles R.1321-1 à R1321-66 (EU Law; MEEM).

Pour les pesticides, les limites de qualité (LQ) sont fixées :

- pour chaque pesticide : à $2\mu\text{g/L}$ dans les eaux brutes et à $0.1\mu\text{g/L}$ dans les eaux du robinet (sauf pour l'aldrine, dieldrine, heptachlore et heptachloroépoxyde la LMR est de $0.03\mu\text{g/L}$)

- pour le total des substances mesurées: à 5µg/L dans les eaux brutes et à 0.5µg/L pour les totaux des substances mesurées dans l'eau du robinet (ORP, "Observatoire Des Résidus de Pesticides").

7. Les pesticides organophosphorés et les carbamates

Les carbamates et les organophosphorés (insecticides) représentent les deux classes majeures de pesticides utilisés comme : herbicides, insecticides et fongicides (Fukuto et al.). Ils sont généralement utilisés pour contrôler les insectes dans les récoltes, notamment celles des pommes de terre, du maïs, du blé et du riz. Ces deux familles de pesticides agissent sur l'enzyme et entraînent la phosphorylation des estérases incluant les cholinestérases érythrocytaires (acétylcholinestérases ou cholinestérases vraies) et les cholinestérases plasmiques (pseudocholinestérases) (Lauwerys et al.; Thabet et al.). Ils opèrent en bloquant l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase, essentielle aux transferts nerveux chez les insectes, les humains, ainsi que chez la plupart des animaux. La capacité à bloquer l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (et donc la toxicité) peut varier de façon importante d'un composé à l'autre.

Le tétraéthyl-pyrophosphate, premier insecticide organophosphoré (OP) synthétisé en Allemagne dans les années 1930, s'est rapidement avéré trop toxique pour les mammifères et trop instable pour une utilisation phytosanitaire à grande échelle. Parallèlement, des recherches conduites pour développer les OPs comme arme chimique aboutissent à la mise au point du tabun et du sarin. C'est en 1944 qu'apparaît le parathion, premier composé largement employé en agriculture pour la prévention des vecteurs de maladies. Les maladies à transmission vectorielle, sont des maladies pour lesquelles l'agent pathogène (virus, bactérie ou parasite) est transmis d'un individu infecté (un hôte vertébré : homme ou animal) à un autre par l'intermédiaire d'un arthropode (insecte, tique) hématophage (Turdean et al.).

Les insecticides organophosphorés (OPs) se sont développés comme une alternative intéressante aux pesticides organochlorés persistants, au début des années 1970, dont la production mondiale a décuplé entre 1955 et 1985. Ils constituent une grande classe de substances chimiques organiques avec plus de 50 000 congénères. Aujourd'hui, environ 200 OPs sont vendus sur le marché sous forme de milliers de produits différents (*Tableau 1*).

Tableau 1 : exemple des produits phytosanitaires à base d'organophosphorés et leur utilisation (SAGÉ pesticides).

Nom du produit	Substance active	Toxicité	Ecotoxicité	Usage
DIAZINON 50 W	diazinon	-Nocif si avalé, inhalé ou absorbé par la peau. -Cause une irritation modérée des yeux. - inhibiteur de la cholinestérase	hautement toxique pour les oiseaux, les poissons et les autres animaux sauvages.	Insecticide utilisé pour la lutte contre plusieurs insectes et acariens dans diverses grandes cultures, fruitières, légumières et ornementales.
-Malathion 50 EC - Fyfanon Insecticide 50% EC - Malathion (Dust, EC, WP ULV Formulas)	Malathion	-insecticide inhibiteur de la cholinestérase -très toxique par exposition à long terme	hautement toxique pour les poissons et les insectes non ciblés	largement utilisé, dans les programmes d'éradication de moustiques en santé publique, dans l'agriculture et l'horticulture pour contrôler les insectes sur les fruits et légumes et sur les plantes ornementales.
- Orthene 75% - Acecap 97	Acéphate	- inhibiteur de la cholinestérase -très toxique par exposition à long terme	toxique pour les poissons, les oiseaux et hautement toxique pour les insectes non ciblés	-Utilisé pour les arbres et Arbustes ornementaux pour contrôler les Arpenteuses, cercope, chenille, cicadelle, enrouleuse à bandes obliques, Lymantride, mineuse du pin, mouche à scie, perceurameau du pin, puceron, pyrale des cônes de l'épinette, spongieuse, tordeuse.
-Chlorpyrifos 48% EC - Pyrinex ME -Makhteshim Agan	Chlorpyrifos-éthyl	- inhibiteur de la cholinestérase	Toxique pour l'environnement	-principalement utilisé pour le contrôle des coléoptères, diptères, lépidoptères Homoptera du riz, du coton, des arbres fruitiers, les plantes ornementales en serre et en plein air, les arbres à thé, les gazons et tous les légumes à l'exception des cucurbitacées. également utilisé pour le contrôle des parasites domestiques, moustiques adultes et larves.
PRIODERM	Malathion	-Irritation, rougeur en cas de contact avec les muqueuses. -nausées, vomissements, maux de tête.	Produit très toxique pour les insectes utiles (les coccinelles, chrysopes, aphidoletes...)	Médicament utilisé pour détruire les poux et leurs œufs (lentes)

Les insecticides carbamates se sont développés vers la fin des années 1940 et présentent les mêmes caractéristiques que les organophosphorés. On trouve aujourd'hui une cinquantaine de molécules actives qui font des carbamates des insecticides en constante progression (Tableau 2).

Tableau 2: exemples des produits phytosanitaires à base de carbamates et leur utilisation (SAgE pesticides).

Nom du produit	Substance active	Toxicité	Ecotoxicité	Usage
-Sevin T&O -Chipco Sevin T&O -Carbaryl 85 WP -carbacha -SuperTox	Carbaryl	-Nocif si avalé, inhalé ou absorbé par la peau. - irritation des yeux. - inhibiteur de la cholinestérase	hautement toxique pour les poissons et pour les insectes utiles.	carbamate insecticide systémiques à large spectre, inhibiteur de la cholinestérase agissant par contact et par ingestion, permet de contrôler une grande variété d'insectes. Il est approprié pour une utilisation dans les jardins potagers, l'agriculture commerciale et la sylviculture. Efficace comme molluscicide et acaricide, Carbaryl 85 WP peut également être utilisé pour traiter les infestations de ravageurs, comme celle due à des espèces de poux sur le bétail, la volaille et les animaux de compagnie.
- Témik	Aldicarbe	- Mortel en cas d'ingestion - Toxique par contact cutané - Mortel par inhalation	Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme	Les seules utilisations agricoles du produit encore autorisées concernent uniquement la vigne et la betterave
- Curater G1 - Furadan	Carbofuran (non autorisée en France)	-inhibiteur de la cholinestérase -très toxique par exposition à long terme	Dangereux pour la faune sauvage.	- carbamate utilisé en agriculture pour lutter contre une grande variété d'insectes défoliateurs et fousseurs qui s'attaquent à de nombreuses cultures fruitières et maraîchères.

7.1. Mécanismes d'inhibition

Près de 85% des insecticides sont neurotoxiques. En effet, le système nerveux central des insectes est l'une de leurs cibles primordiales (Nauen et al.).

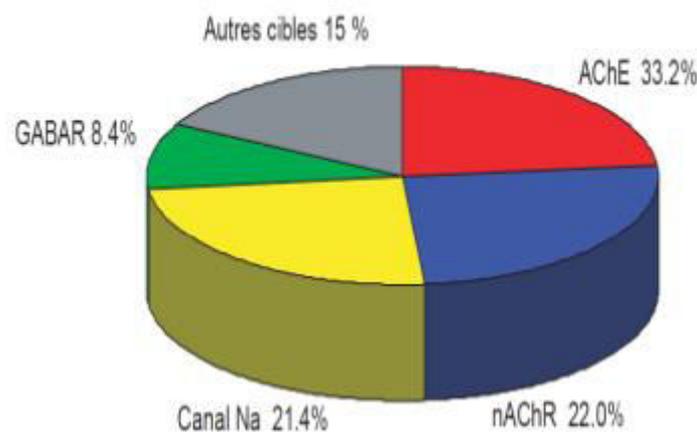


Figure 6 : Cibles des insecticides neurotoxiques (Modifié d'après, Phillips McDougall, 2006, www.fao.org).
AChE : Acétylcholinestérase, nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique, GABAR : récepteur à l'acide gamma aminobutyrique (Aly) .

Les insecticides agissent sur les canaux ioniques dépendants du potentiel d'action (le canal sodium), touchant ainsi la genèse de l'activité nerveuse, sur les systèmes enzymatiques synaptiques et extra-synaptiques (Acétylcholinestérase) et sur les récepteurs ionotropes (Récepteur de l'acétylcholine de type nicotinique : nAChR, récepteur à l'acide gamma aminobutyrique : GABARs), altérant la transmission synaptique, relais nécessaire de l'information nerveuse (Figure 6).

7.2. Organophosphorés

Les insecticides organophosphorés sont des composés organiques se caractérisant par une structure chimique proche (contenant du phosphore) : amides ou des esters d'acides phosphoriques, phosphonique, thiophosphorique et thiophosphonique (dérivés de l'acide phosphorique) et un mode d'action identique. Ces composés organophosphorés existent sous forme d'insecticides (parathion, glyphosate, malathion, formation, phosalone...) ou sous forme de neurotoxiques de guerre (figure 7). Ils sont peu solubles dans l'eau, peu volatils, mais très liposolubles (Saïssy et al.).

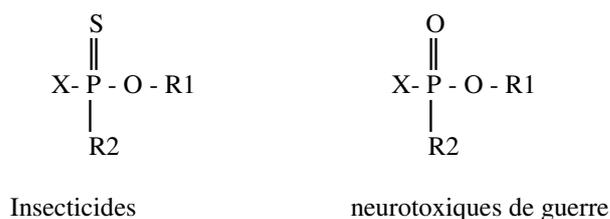


Figure 7 : Structure chimique des insecticides et des neurotoxiques de guerre. X : déterminant majeur des classes qui est soumis à l'hydrolyse ; R1 et R2 : groupement diméthoxy, diéthoxy, autre dialkoxy, diamino, chloré ou autre dialkoxy substitué, trithioalkyl, triphényln éventuellement substitué, constituant mixte.

Le substituant X est celui qui sera soumis à l'hydrolyse ; selon sa valeur, les OPs sont classés en quatre groupes de toxicité décroissante (Tableau 3).

Tableau 3: Classification des insecticides organophosphorés en fonction de leur toxicité (Saïssy et al.; Thabet et al.).

Groupement de X	Toxicité	Domaine d'utilisation
Ammonium quaternaire	aiguë	Non utilisés en agriculture
F	aiguë	Gaz de combat (tabun). peuvent être aussi utilisés en agriculture : (comme le diméthoate et le fenthion, le dichlorvos)
CN, OCN, SCN ou un halogène autre que F	Intermédiaire	Certains sont utilisés comme gaz de combat (exemple : sarin)
Autre substituant	Modérée	Regroupent la plupart des produits utilisés en agriculture

- **Mode d'action toxique:**

Les OPs, très lipophiles, franchissent facilement toutes les barrières biologiques, cutanées, digestives et respiratoires. Ensuite, ils créent une lésion biochimique aux cholinestérases que ce soit les acétylcholinestérases du système nerveux central, des muscles et des globules rouges ou les pseudocholinestérases du système nerveux central et plasmatisques. Ce sont des inhibiteurs irréversibles de l'ACHE, l'enzyme n'est alors plus fonctionnelle et n'est pas ré-activable (Thabet et al.).

Tableau 4 : Effets de l'intoxication par les OPs sur l'ACHE (Testud et al.).

Système	Récepteurs	Organe ou tissu	Action	Effet clinique
Parasympathique	Muscariniques	-Œil	-Contraction de l'iris et du muscle ciliaire	-Vision trouble, myosis
		-Glandes lacrymales, salivaires et sudoripares -Cellules à mucus des voies respiratoires et du tube digestif	-Sécrétion -Sécrétion	-Larmoiement, salivation, hypersudation -Rhinite, bronchorrhée, œdème pulmonaire, vomissements, diarrhée
Sympathique	Muscariniques	-Bronches et tube digestif	-Contraction du muscle lisse	-Bronchospasme, nausées, crampes et douleurs abdominales
		-Anus et vessie Cœur	-Relaxation du muscle lisse sphinctérien Dépression du nœud sinusal et augmentation de la période réfractaire au niveau du nœud auriculoventriculaire	-Incontinence fécale et urinaire Bradycardie, arythmies, bloc auriculoventriculaire
Jonction neuromusculaire	Nicotiniques	-Muscles squelettiques	-Contraction	-Fasciculations, crampes, paralysies du diaphragme et des muscles respiratoires
		-Cœur	-Excitation	-Tachycardie, hypertension
		-Œil	-Relaxation de l'iris	-Mydriase
Système nerveux central	Nicotiniques	-Cerveau	-Excitation initialement, puis dépression	-Céphalées, malaise, confusion mentale, ataxie, tremblements, coma, convulsions, dépression des

L'enzyme acétylcholinestérase permet la transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme par l'hydrolyse de l'acétylcholine, le neurotransmetteur excitateur le plus

répondu chez les insectes, les humains, ainsi que chez la plupart des animaux (Dvir et al.). L'inhibition de l'activité de cette enzyme par des neurotoxiques entraîne une accumulation du neurotransmetteur dans l'organisme. Cette accumulation est responsable des effets nicotiniques et muscariniques (Tableau 4) et peut conduire jusqu'à la tétanie musculaire et à la mort (Baldi et al.).

7.3. Carbamates

Les carbamates inhibiteurs de l'ACHE sont des insecticides qui regroupent les dérivés de l'acide carbonique. Cependant il ne faut pas les confondre avec les herbicides carbamates qui ne sont pas des inhibiteurs de l'ACHE ("Les Insecticides Chimiques"). Les carbamates sont des dérivés du N-méthylcarbamate. Leur formule chimique est la suivante :

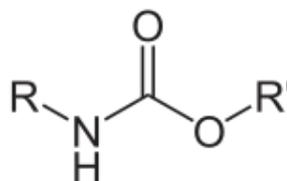


Figure 8 : Formule chimique de carbamates

La toxicité des insecticides carbamates comme celle causée par les OPs, est due à leur capacité de bloquer l'activité enzymatique de l'ACHE. Par contre dans le cas des carbamates, cette inhibition est réversible (Eckert et al.). En effet, après phosphorylation par un carbamate, l'ACHE est capable de se réactiver spontanément plus ou moins rapidement selon la molécule. Parmi les carbamates les plus utilisées, on trouve le carbofuran et le carbaryl. Du fait de sa toxicité, le carbofuran est interdit en France depuis 2008 (Testud et al.).

Les carbamates ne se transforment pas très vite dans la nature. Ils sont plus stables et ont une durée d'action moins courte comparée à celle des organophosphorés. Le tableau 5 représente une comparaison entre ces deux types d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.

Tableau 5 : comparaison entre la toxicité des carbamates et celle des organophosphorés

	Organophosphorés	Carbamates
Dérivation	Dérivation très vite	Moins dérivable
Toxicité	Aiguë	Modérée
Durée d'action	Très longue	Courte
Inhibition de l'ACHE	Irréversible	Réversible

- **Autre inhibiteurs de l'ACHE** : Les pyrèthroïdes utilisés comme insecticide dans les produits domestiques sont des inhibiteurs potentiels de l'activité enzymatique de la cholinestérase. Il y a aussi les triazines et le paraquat (herbicides puissants agissant sur les processus de respiration et de photosynthèse des végétaux), certaines toxines algales et les métaux lourds (comme pour toutes les enzymes, la conformation de la molécule d'ACHE est modifiée par la présence de métaux) (Encyclo-ecolo, "Pesticides"; Testud et al.).

Conclusion

Plusieurs pesticides sont utilisés aujourd'hui dans des domaines différents. Ceux-ci sont transportés loin de la zone d'épandage grâce à l'air et au ruissellement des eaux et contaminent ainsi les eaux souterraines, les rivières et le sol. Ces pesticides ne sont donc pas seulement toxiques pour les organismes cibles mais aussi pour l'environnement, incluant les humains. Dans de nombreux cas, la toxicité n'est pas aiguë, mais l'exposition répétée à faibles doses, peut exercer un effet toxique sur de nombreuses années. La contamination des eaux est devenue un problème mondial, notamment à cause de la persistance dans l'environnement de ces pesticides qui peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

Un manque de données pour la surveillance des pesticides ne nous permet pas actuellement de mesurer l'ampleur du problème de la contamination, en particulier dans les pays émergents. Par voie de conséquence la prévention et des mesures correctives ne peuvent pas être prises pour réduire le risque pour l'environnement et les humains en particulier. Il en résulte un intérêt immédiat d'être en mesure de développer un outil susceptible d'apporter des informations sur la contamination de milieu aquatique par une grande variété de pesticides, organophosphorés et carbamates.

II. Détection des organophosphorés et carbamates

En raison de leur toxicité et de leur accumulation dans l'environnement, il est important de pouvoir détecter et quantifier rapidement ces molécules dans les milieux naturels. Pour cela, différentes techniques analytiques classiques sont employées, comme la chromatographie en phase liquide ou gaz (GC, GL), la spectrométrie de masse (MS), la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou le couplage entre plusieurs de ces techniques pour la détection des pesticides et de leurs résidus dans l'environnement. Cependant, l'utilisation de ces techniques de détection n'est pas toujours facile en raison de leur coût élevé, de durée d'analyse parfois longues, et de l'exigence de main-d'œuvre qualifiée (Selim et al.; Su et al.; Dijkman et al.).

Le développement de biocapteurs, d'immunocapteurs, de senseurs chimiques ou de capteurs électrochimiques est une alternative souvent plus simple et moins coûteuse aux techniques de détection précédemment citées (figure 9).

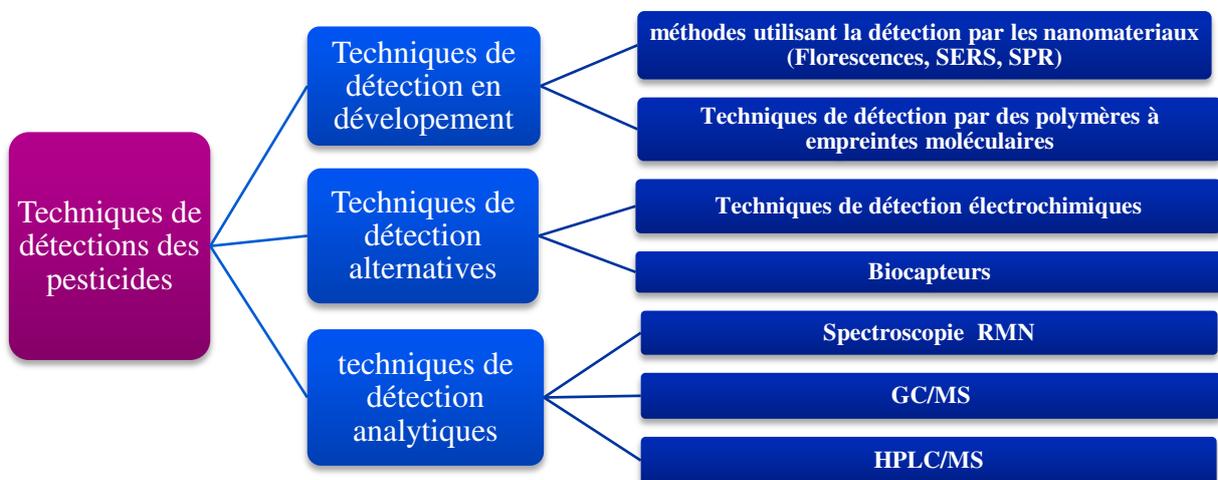


Figure 9. Techniques de détection des pesticides.

Le développement de capteurs très sensibles, rentables, miniatures nécessite une technologie de pointe couplée avec des connaissances fondamentales en chimie, biologie et sciences des matériaux (Yan et al.; Simonian et al.; Anandhakumar et al.; Q. Li et al.; S. Liu

et al.). Un système de détection durable et efficace repose en grande partie sur les caractéristiques suivantes :

- une gamme de détection adaptée vis-à-vis du type d'échantillon, la sensibilité, la température, le pH, et la spécificité
- un temps de réponse rapide,
- une utilisation simple sur le terrain,
- une analyse qualitative et quantitative,
- un rapport coût-qualité concurrentiel
- l'acquisition de modes supplémentaires pour la transduction du signal.

Une comparaison entre les différentes techniques d'analyses les plus utilisées est représentée au tableau 6.

Tableau 6 : Comparaison entre les différentes techniques de détection de pesticides (Kumaret al.).

Type de la technique	Techniques de chromatographie /spectroscopie	biocapteurs	Capteurs optiques	Capteurs à base de polymère à empreinte.	Capteurs électrochimiques
Manipulation	difficile	intermédiaire	facile	facile	facile
Coup d'analyse	+++	++	+	++	+
sensibilité	excellente	excellente	excellente	excellente	excellente
sélectivité	excellente	excellente	excellente	excellente	excellente
précision	excellente	bonne	bonne	bonne	excellente
reproductibilité	Grande	Bonne	Bonne	Très bonne	Très bonne
application	Très répandue	Pas Très répandue	Pas Très répandue	Répandue	répandue

1. Détection directe

Pour la détection des organophosphorés et carbamates, il existe de nombreuses techniques directes sans passer par les mesures de l'activité enzymatique. On peut citer des techniques d'analyse comme la chromatographie en phase liquide et gazeuse (GC, LC), et des techniques de détection avec couplage chromatographique, la spectrométrie de masse technique directe la plus utilisée (environ 9000 publications concernant les pesticides en 35 ans) et ensuite la chromatographie sur couche mince (1844 publications) (tableau 7) (Cotton et al.).

Tableau 7 : Exemples d'analyses effectuées pour la détection des pesticides avec des systèmes de détection complexe (nécessitant un couplage ou plus) avec leur limite de sensibilité.

Système analytique employé	Matrice analysée	La molécule cible	Sensibilité (ng/L)	Réf.
HPLC-MS/MS	Huile essentielle de lavandin	256 pesticides	1000-10000	(Stachniuk et al.)
UPLC-MS/MS	Eau de surface et de STEP	50 produits d'hygiène personnelle et composées pharmaceutiques	1-100	(Angela et al.)
GC-MS/MS ET HPLC-MS/MS	Urine (Milieu agricole)	Pesticides polaires et non polaires	10-3000	(Ye et al.)
UHPLC-MS	Eau STEP	84 pesticides et produits pharmaceutiques	10-100	(Gerónimoa et al.)
UHPLC-MS	Eau brute et traitée	72 pesticides et médicaments	30-300	(Primel et al.)

El-Saeid et Selim (Selim et al.) ont déterminé les paramètres de base tels que le temps de rétention, la limite de quantification et le mode de balayage pour détecter différents types de pesticides par GC-MS. Le temps de rétention varie de 7 minutes pour le dichlorvos à 58 minutes pour la deltaméthrine et environ 85% de l'analyse a pris plus de 20 minutes pour détecter les 86 pesticides qui ont été quantifiés. La limite de quantification était comprise entre 0,01 mg / kg et 0,10 mg / kg, alors que dans 92% des cas, elle était inférieure à 0,05 mg / kg (Selim et al.). Ainsi ces techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse sont incapables de détecter l'ensemble des organophosphorés et carbamate : par exemple le « fenchlorphos » pour les OPs et « chlorpropham » pour carbamate) (Alder et al.).

La spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) a montré un bon potentiel d'application dans la détection de diverses molécules chimiques et biologiques. Depuis plusieurs années, différents types de substrats SERS actifs sont développés, la plupart sont utilisés pour la détection de molécules spécifiques (selon leur nature chimique) ou quelques types de pesticides seulement (Dulkeith et al.; Saha et al.). Le tableau 8 illustre des exemples de surfaces SERS actifs utilisées pour la détection des pesticides.

Tableau 8 : Exemples de surfaces SERS actives utilisées pour la détection des pesticides avec leur limite de sensibilité.

Pesticides	Substrat SERS actif	Limite de détection	Réf
Carbaryl	nanofils de Si recouvert de nanoparticules d'argent	Inférieure à 10^{-7} M (0.02 ppm)	(X. T. Wang et al.)
Carbaryl	Klarite recouvert d'or	0.5 mg g ⁻¹ dans les pommes	(Fan et al.)
Carbaryl	Nanoparticules d'argent sur cotons-tiges	5.0×10^{-7} M	(Qu et al.)
Paraoxon et thiram	Nanocubes d'argent	Inférieur à 5×10^{-8} mol/L	(Wang et al.)
Organophosphorés: paraoxon et sumithion	Polystyrène/Ag nanoparticules	96 nM (0.026 ppm) et 34 nM (0.011 ppm).	(P. Li et al.)

La morphologie de la surface SERS active et le type des molécules cibles influencent la performance de la spectroscopie Raman SERS. En effet si les molécules cibles sont modifiées, il est nécessaire de changer le substrat SERS actif. Pour cette raison, la détection des molécules individuelles ou à faible concentration par la spectroscopie Raman exaltée de surface reste limitée.

Cependant, ces procédés analytiques basés sur la spectroscopie restent très intéressants mais ils ne reflètent pas réellement la toxicité potentielle. Des techniques moins ciblées et plus rapides peuvent s'avérer aussi intéressantes. Par conséquent, l'intérêt à développer un dispositif portable plus approprié pour la mise en œuvre sur le terrain, avec une analyse directe, rapide, avec une limite de détection plus faible et à coût restreint préoccupe de plus en plus les chercheurs et le milieu industriel.

2. Détection par mesure de l'activité enzymatique

Au cours des dernières années, de nombreuses recherches ont été menées afin de développer des biocapteurs enzymatiques, en utilisant différents types d'enzymes. Dans un but de faire état de manière quantitative des travaux actuels, nous avons réalisé, une recherche bibliographique au sein de la base de données « PubMed » sur mots clés, pour chaque enzyme utilisée pour la détection de pesticides. Pour cette recherche, nous avons sélectionné les mots clés « pesticide » et « détection » ainsi que le nom de chaque type d'enzyme (Note : recherches au niveau du résumé et du titre). Les résultats sont illustrés dans la Figure 10. Les chiffres trouvés ne sont bien évidemment pas exhaustifs mais permettent de rendre compte de la « popularité » des différentes enzymes.

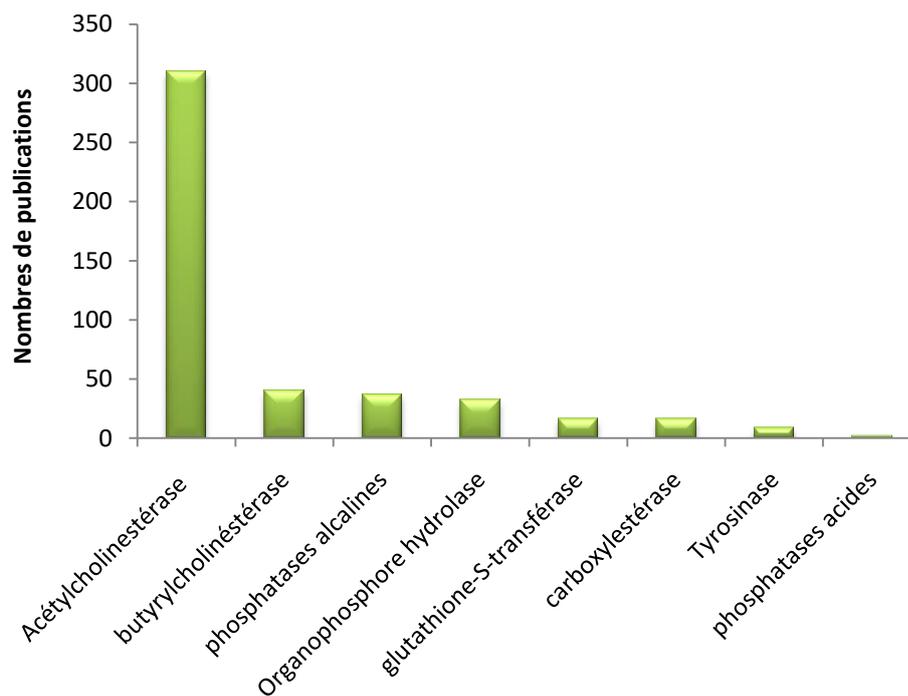


Figure 10: Distributions des enzymes les plus utilisées pour la détection des pesticides.

De nombreux biocapteurs utilisés pour la détection des pesticides sont basés sur l'inhibition de l'activité de l'enzyme cholinestérase par des pesticides (Dyk et al.).

Il existe aussi d'autres biocapteurs utilisés pour la détection d'autres types de polluants comme les métaux lourds, les toxines et les médicaments. Ils fonctionnent selon le même principe que les biocapteurs pour la détection des pesticides, mais cependant ils utilisent d'autres types d'enzymes (par exemple le glucose oxydase pour les métaux lourds (Malitesta et al.) et la tyrosinase pour l'acide benzoïque (Brisolari et al.).

L'acétylcholinestérase (ACHE) est amplement utilisée pour la détection enzymatique des pesticides dans l'environnement, comme le montre la Figure 10. Dans la majorité des cas, elle est utilisée dans les biocapteurs pour la détection des pesticides organophosphorés et carbamates (Dyk and et al.; Vimala et al.; Turdean et al.).

Il est clair que les méthodes enzymatiques pourraient jouer un rôle important dans le dépistage rapide et in situ d'un grand nombre de pesticides, à bas prix. L'ACHE est la plus adaptée pour la détection d'une vaste gamme de pesticides, spécifiquement organophosphorés et carbamates.

3. Définition et principe du biocapteur

Un biocapteur est un système utilisé pour la détection, l'analyse et la synthèse d'un composé en utilisant des composants biologiques qui sont utilisés comme récepteurs biologiques. Ce biorécepteur est associé à un transducteur (électromagnétique, calorimétrique, électronique, acoustique ou piézoélectrique) (Paddle et al.). Le mot biocapteur est utilisé même si il ne contient pas un dispositif biologique.

Le biocapteur est constitué de trois éléments essentiels :

- Le biorécepteur, élément biologique (enzyme, anticorps, microorganisme, antigène, ADN, tissus, acide nucléique, ...etc.) représentant l'élément de reconnaissance moléculaire dans le biocapteur.
- Le transducteur, jouant le rôle de convertisseur, permet de transformer la réaction biochimique en un signal physique (optique, électrique, magnétique, thermique ou massique).
- Le transducteur est lui-même associé à un élément électronique qui permet l'amplification, l'affichage, l'envoi, ou l'impression du signal transmis et du stockage sous forme de fichier ou base de données (voir figure 11).

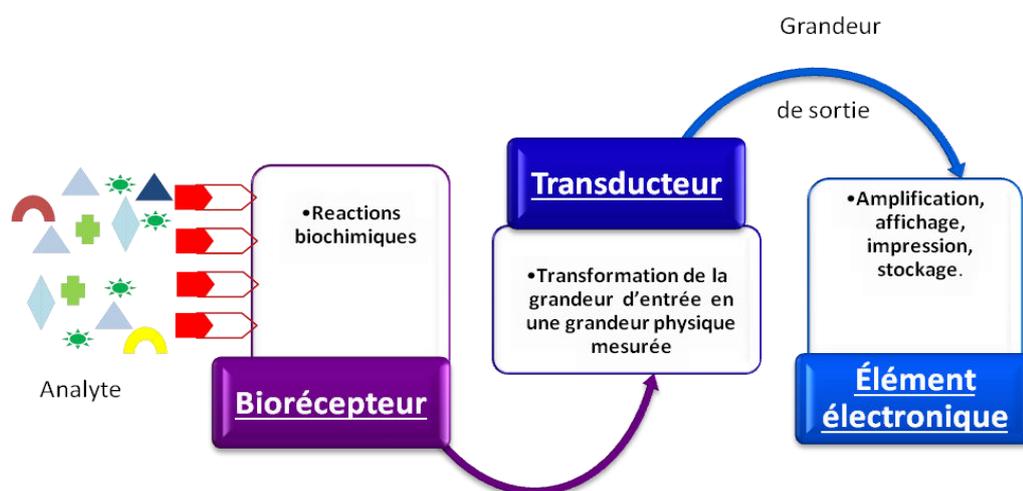


Figure 11 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur

L'efficacité de ce dispositif dépend de l'efficacité du processus de reconnaissance en termes de temps de réponse, rapport signal / bruit (S / N), sélectivité et limite de détection. Une bonne combinaison du choix du biorécepteur et du transducteur est nécessaire. Le choix

du biorécepteur dépend de sa spécificité de réponse ainsi que de sa stabilité opérationnelle et environnementale. Pour le transducteur, ce choix dépend du type de résultat obtenu par les réactions de l'analyste avec le biorécepteur ainsi que du domaine d'application de ce dispositif (Mehrotra et al.).

3.1 Biorécepteurs enzymatiques pour la détection des pesticides.

Un inhibiteur enzymatique est une molécule qui ralentit l'activité d'une enzyme, tandis qu'un activateur de cette enzyme l'accélère. De nombreux médicaments et poisons sont des inhibiteurs enzymatiques.

Les biocapteurs utilisant l'inhibition enzymatique sont développés en se basant sur les mécanismes d'interaction entre le composé à détecter, l'analyte, et l'enzyme. Pour ce type de biocapteur, la génération de signal de la réaction catalysée par l'enzyme est la partie la plus importante. Son principe de fonctionnement est basé sur le suivi de la variation de la concentration des composés (c'est-à-dire, des réactifs et des produits) et l'évaluation de l'activité de l'enzyme (inhibée ou activée, selon le type d'enzyme employée). De plus, l'activité d'une enzyme est modulée par diverses autres molécules.

Le Tableau 8 récapitule quelques exemples de biocapteurs enzymatiques, à base de nanomatériaux, utilisés pour la détection des pesticides ainsi que leurs limites de détection (Mehta et al.; Amine et al.; Viswanathan et al.; Kumar et al.) .

Les enzymes aussi peuvent être classées en deux catégories selon leur mode d'action sur les pesticides :

- La première classe regroupe les enzymes qui catalysent la réaction de transformation ou de dégradation des pesticides (comme pour le substrat acétylcholine), donc l'enzyme est toujours active en présence de pesticides.
- La deuxième classe contient les enzymes qui se lient (réversiblement ou irréversiblement) avec les pesticides mais sans les transformer, donc en présence de ce type de pesticides, l'activité de l'enzyme est bloquée (pas de transformation du substrat comme acétylcholine).

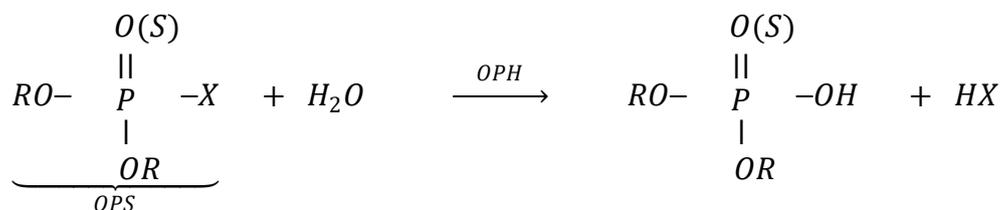
Tableau 8 .exemples de biocapteurs à base d'enzymes pour la détection des organophosphorés et carbamates.

Enzyme/ biomarqueurs	Analyte cible	Type de substrat	Nanomaterieles	Limite de détection	réf.
ACHE	Paraoxon	Electrode en carbone vitreux	CNT-NH ₂	0.08 nM	(Yu et al.)
ACHE	Paraoxon carbaryl	Electrode en carbone vitreux	MWCNT- (PEI/DNA) ₂ /OPH	0.5 μM 1 μM	(Y. Zhang et al.)
ACHE	monocrotophos	Electrode (amperimetrique)	Au-PDDA-PB	0.8 pg/ml	(S. Wu et al.)
ACHE-CHO*	Sarin methyl- paraoxon Acéphate	Test cholorimetrique	Fe ₃ O ₄	1 nM 10 nM 5 μM	(Liang et al.)
OPH*	Paraoxon	Test de fluorescence	Structure en “core- shell” en nano-silice	5x10-6 μM	(Khaksarinejad et al.)
OPH	Paration- methyl	Test de fluorescence	CdTe QDs	18 ng/mL	(Yan, Li, Wang, et al.)
ACHE	Carbofuran Oxamyl Methomyl carbaryl	Membrane de fenugrec hydrogel- agarose- acetylcholinesterase	AuNPs	2 nM 21 nM 113 nM 236 nM	(Kestwal et al.)
ACHE	Paraoxon dichlorvos	Electrode en carbone vitreux	CdSe@ZnS/graphene nanocomposite	10-14 M 10-6 M	(X. Li et al.)
BCHE	Paraoxon	dispositif à base de bande de test	Fe ₃ O ₄ @TiO ₂ , HRP/Ab-GNPs	0.01 Nm	(Ge et al.)
BCHE	Paraoxon	Bille magnetique	QDs	0.5nM	(Du et al.)

*CHO: choline oxidase ; *OPH: organophosphorés hydrolase

3.1.1 Biorécepteurs catalytiques pour les pesticides

Ce type de biocapteur, est basé sur la transformation ou la destruction des pesticides. En effet, les enzymes de la première classe sont utilisées c'est-à-dire les enzymes catalytiques pour les pesticides. L'Aryldialkylphosphatase (ou les organophosphorés hydrolase (OPH)) est l'enzyme capable de cliver les liaisons P-F, P-O et P-S des organophosphorés (Mulchandani et al.). La réaction de catalyse est la suivante:



Des chercheurs ont pu contrôler cette réaction, en effectuant le suivi des produits générés par des capteurs électrochimiques (par exemple, potentiométrique et ampérométrique)

(Mulchandani et al.; Mulchandani et al.). Ce type de biocapteurs est typique pour les OPs. Ils peuvent être utilisés pour identifier les organophosphorés en cas de présence de carbamate plus précisément. Ils sont donc employés pour distinguer les OPs en utilisant organophosphorus acide anhydrolase (OPAA) (Hill et al.).

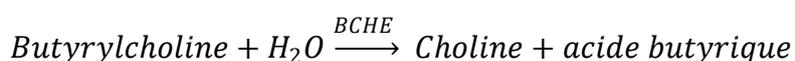
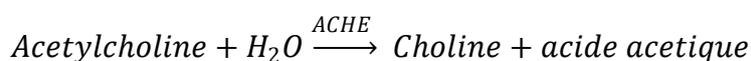
3.1.2 Biorécepteurs basés sur l'inhibition par des pesticides

Les cholinestérases (acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase) (Pohanka et al.) sont les deux principaux types d'enzymes constituant la deuxième classe des enzymes inhibées par les pesticides.

-L'acétylcholinestérase est la principale enzyme du genre cholinestérase. Cette famille d'enzymes de cholinestérases transforme l'acétylcholine (pour réduire sa neurotoxicité), en choline et acide acétique. Cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation.

- butyrylcholinestérase catalyse l'hydrolyse de butyrylcholine (BCH) en choline et acide butyrique (Hošťálková et al.). BCH fonctionne de la même façon que l'acétylcholine (ACH), mais c'est une enzyme synthétique. De même l'acétylcholine n'est pas la seule molécule utilisée comme substrat pour l'ACHE puisqu'il existe l'acetylthiocholine comme substrat alternatif. Cette dernière se décompose en thiocholine, utilisée par exemple pour le cas de la réaction d'oxydation en raison de ses propriétés électroactives (tandis que la choline en est dépourvue) (Liu et al.). Elle est aussi utilisée pour comparer les biocapteurs mono-enzymatiques et bi-enzymatiques.

Les réactions catalysées par les cholinestérases sont:



Les biocapteurs à base d'enzymes cholinestérases sont utilisés comme biocapteurs à inhibition par les pesticides. Pour ce type de détection, les sites de reconnaissances (ou sites de liaisons au substrat) de l'enzyme pour l'ACH sont bloqués par des pesticides (Chatonnet et al.). D'autres enzymes, en plus des organophosphorés hydrolase et cholinestérases, sont utilisées comme composants biologiques dans des biocapteurs pour pesticides. Les

phosphatases acides sont des enzymes présentes dans la prostate, les os, les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes sanguines, les poumons, le foie, les reins, la rate, le pancréas et le liquide séminal. Ce sont aussi des enzymes utilisées pour mesurer l'inhibition par des carbamates et des OPs, mais avec un mécanisme d'inhibition réversible (Mazzei et al.). L'activité enzymatique se régénère après la détection sans ajout d'autres produits chimiques supplémentaires (Marty et al.).

3.2 Les types de transducteurs

Les transducteurs servent à mesurer les changements physico-chimiques des interactions entre l'analyte et le biorécepteur. Il existe plusieurs types de transducteur. Ils sont caractérisés selon leur type de transduction et le paramètre à détecter. Ils servent aussi de connexion entre le générateur de signal (Composante bio) logique et la sortie. Ils peuvent être classés en quatre grandes familles notamment optique, électrochimique, calorimétrique et à effet piézoélectrique (Arduini et al.).

3.2.1 Capteurs électrochimiques

La détection électrochimique se base sur la transformation chimique qui provient des réactions d'oxydoréduction de l'élément à détecter. L'analyse se fait par mesure de la variation de tension (potentiométrie) (Mulchandani et al.), variation du courant (ampérométrie) (Mulchandani et al.) ou par mesure de la variation de conductivité (conductimétrie) (Mulchandani et al.).

3.2.2 Capteurs thermométriques et calorimétriques

Le capteur calorimétrique est basé sur le contrôle du changement de température pendant une réaction catalytique, qui est généralement exothermique. La cellule de référence est utilisée pour éliminer la variation de chaleur produite autre que celle produite par la réaction spécifique dans la cellule enzymatique. La conception simple et la détection rapide de ce type de capteur le rendent pratique pour la détection *in situ*. Zheng et al. (2006) ont créé un biocapteur calorimétrique par injection du flux de résidus de dichlorvos. Ils ont utilisé l'estérase du foie de volaille au lieu de CHE ou OPH, en tenant compte du coût d'OPH et de la stabilité de CHE. L'introduction du dichlorvos inhibe l'activité de l'estérase, ce qui entraîne le blocage partiel de la réaction catalytique d'origine et par conséquent la quantité de chaleur libérée se trouve réduite. L'activité de l'enzyme dans ce cas est influencée spécialement par deux facteurs : le débit du flux et le temps d'incubation.

3.2.3 Capteurs à effet piézoélectrique (ou mécaniques)

Les transducteurs mécaniques ou piézoélectriques mesurent de façon très sensible la variation de masse lors d'une interaction moléculaire.

L'effet piézoélectrique direct se traduit par la naissance d'une polarisation électrique (potentiel électrique) à cause d'une modification mécanique (variation de la masse). L'effet piézoélectrique indirect se manifeste par apparition d'un effet mécanique lors de l'application d'un potentiel électrique.

Ce type de transducteur est composé généralement par un cristal de quartz. Pour l'insertion de ces capteurs dans les biorécepteurs, on s'intéresse à l'effet piézoélectrique direct. C'est-à-dire, on détecte la variation de masse par un changement dans le potentiel électrique appliqué sur le cristal. Ce dispositif a plusieurs applications, il peut être utilisé comme biocapteur pour la détection des pesticides et des métaux lourds dans les eaux par inhibition de l'activité enzymatique. L'enzyme est immobilisée sur la surface du cristal de quartz. Quand l'interaction entre le substrat et l'enzyme a lieu, on obtient une variation de fréquence de résonance du cristal; ensuite, la variation de masse ou des propriétés superficielles du cristal sera enregistrée en temps réel (Scarano et al.; Mehta et al.).

Il y a quatre types de transducteurs : mécanique, microbalance à quartz (QCM), micro-leviers et le transducteur à ondes acoustiques de surface (SAW).

3.2.4 Les transducteurs optiques

Les biocapteurs optiques sont devenus de plus en plus sophistiqués. On les trouve dans des domaines très diversifiés (médecine, industrie, agroalimentaire...etc.). La détection et l'analyse s'effectuent grâce à une transformation des phénomènes optiques (réflexion, absorption, ..) en un signal électrique. Parmi les transducteurs optiques, on trouve: l'absorption UV, la fluorescence, l'absorption infrarouge (IR), la diffusion Raman et la résonance plasmonique de surface (SPR) (Bi et al. 2016; Convertino et al. 2016; Jin et al. 2004; Matuszczak et al. 2016; Qi et al. 2016; B. Wang et al. 2014). La détection de fluorescence est la plus populaire (Ji et al. 2016; H. Li et al. 2016; Toma et al. 2016), tandis que la spectroscopie UV est limitée à la recherche académique en raison de sa faible sensibilité et la difficulté d'analyser des échantillons complexes. Ce type de dispositif est utilisé dans divers domaines : la photographie, l'imagerie spatiale, la reconnaissance de forme,

la mesure de déplacement et de déformation, dans le domaine industriel (automatisation des procédés industriels) et militaire pour la détection et l'analyse.

Ces dernières années, la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) est développée pour de nombreuses applications telles que l'identification et la détection des molécules individuelles et de nombreux types d'analyte à faible concentration (Laariedh et al.; Gill et al.). La SERS correspond à la signature Raman vibratoire associée à une augmentation importante d'intensité, par l'association de l'analyte à des nano-surfaces métalliques (telles que l'or ou l'argent) ou des nanoparticules. Cette technique optique, en raison de sa sensibilité, a été mise en œuvre dans de nombreux domaines de recherche tels que la biologie, la science des matériaux, l'art et la chimie analytique (Temiz et al.; Saha et al.).

Conclusion

Les biocapteurs enzymatiques non seulement empêchent l'effet d'interférence (élimination des résidus par rinçage si l'enzyme est immobilisée), mais offrent aussi de meilleures limites de détection. L'ACHE est l'enzyme la plus utilisée dans les biocapteurs pour la détection des pesticides organophosphorés et carbamates pour les raisons suivantes :

- L'ACHE est la principale cible de plusieurs types de pesticides : organophosphorés, carbamates, ...
- L'acétylcholinestérase est la principale enzyme du genre cholinestérase.
- L'immobilisation de l'ACHE est facile.
- Les réactions impliquées dans le fonctionnement des biocapteurs à cholinestérases permettent une grande sensibilité (biocapteurs ampérométriques)
- Elle permet une bonne sélectivité, sensibilité.

Les biocapteurs optiques sont très sensibles et offrent plusieurs avantages : ils sont stables, non-destructifs. En particulier, la spectroscopie Raman exaltée de surface est une technique très sensible beaucoup utilisée pour la détection des molécules individuelles.

III. La diffusion Raman

Le phénomène de diffusion inélastique des photons (ou diffusion Raman) par des molécules en solution et sous forme gazeuse (éther, amyliène) a été découvert par le chercheur indien Chandrasekhara Venkata Raman et K. S. Krishnan en 1928 (Barbillat et al.). C'est en 1930 que ce phénomène est reconnu (effet Raman) et que C.V.Raman obtient un prix Nobel de physique, d'où le nom « diffusion Raman ».

Plusieurs phénomènes peuvent se produire lorsqu'une lumière éclaire un matériau. La majeure partie du faisceau lumineux est réfléchi ou transmise à travers l'échantillon et une faible quantité est diffusée (environ 0.1% diffusée élastiquement : diffusion Rayleigh, et environ 0.0001% diffusée inélastiquement : diffusion Raman) (figure 12). Le signal Raman est le résultat d'une interaction inélastique entre la lumière incidente (la plupart du temps une lumière monochromatique) et la molécule irradiée.

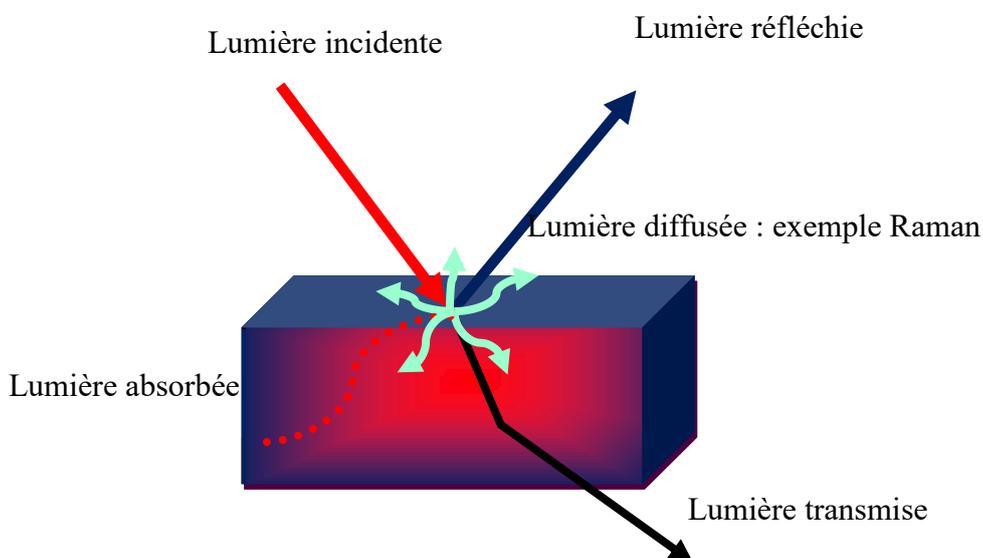


Figure 12 : Différents phénomènes produits dans l'interaction lumière-matière.

Pour que la spectroscopie Raman soit utilisée plus couramment, il a fallu attendre le développement de sources monochromatiques tels les lasers dans les années 60 et des détecteurs CCD dans les années 80 (Yao et al.). Actuellement la spectroscopie Raman est une technique de caractérisation très utilisée dans les laboratoires. Les informations sur la

structure chimique de l'échantillon qu'elle livre, la flexibilité en termes de taille et de diversité d'échantillons analysables et le caractère non-destructif sont autant de points forts qui expliquent la popularité de cette technique dans divers champs disciplinaires (Colthup et al. 1975). La figure 13 illustre les résultats obtenus, sur l'utilisation de la spectroscopie Raman, par une recherche sur la base de données « PubMed », avec les mots clés : « Raman spectroscopy » OR « Raman scattering » OR « Raman », afin d'y associer un nombre de publications. Les chiffres trouvés ne sont bien évidemment pas exhaustifs mais permettent de rendre compte de l'évolution de l'utilisation de la technique.

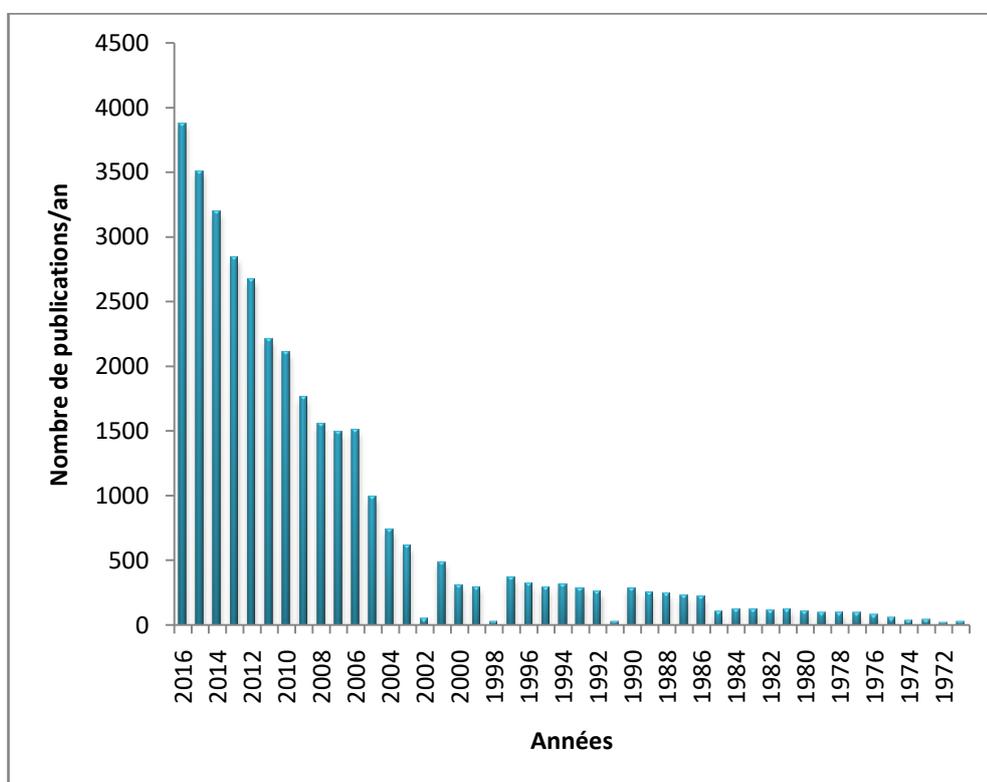


Figure 13 : Evolution du nombre de publications utilisant la spectroscopie Raman comme technique de caractérisation.

1. Principe de la diffusion Raman

La spectroscopie Raman apporte une information sur les propriétés vibrationnelles des matériaux. Lors de l'interaction entre un rayonnement incident monochromatique avec une molécule, la molécule peut atteindre un état d'énergie

virtuel correspondant à un état excité, puis un photon peut être diffusé. La longueur d'ondes de ce photon est la plupart du temps de même énergie que la lumière incidente. Ce phénomène de diffusion élastique est nommé diffusion Rayleigh. De manière plus rare cette interaction peut se traduire par une diffusion inélastique de la lumière, c'est l'effet Raman (voir figure 14).

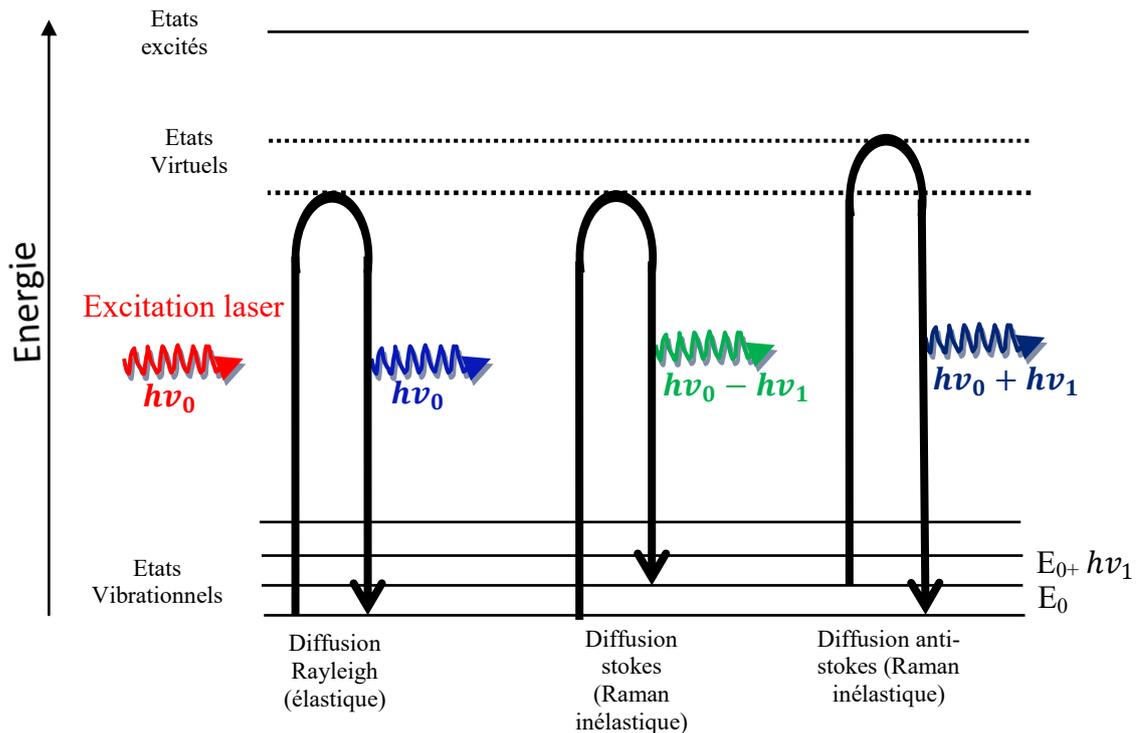


Figure 14 : Schéma descriptif de la diffusion Raman.

Deux cas de diffusion inélastique de la lumière peuvent apparaître :

- Le premier, le plus favorable, appelé la diffusion Raman Stokes, correspond à l'excitation de la molécule à l'état fondamental avec la lumière incidente et l'émission d'un photon pour atteindre un état d'énergie supérieur correspondant à un état de vibration caractéristique de la molécule excitée. La différence entre la longueur d'ondes incidente et celle émise est appelée le déplacement Raman (on l'exprime généralement en cm^{-1}). La différence dans ce cas est positive.
- Le deuxième cas, moins probable, est appelé diffusion Raman anti-Stokes. Dans celui-ci, la molécule est toujours sur un état de vibration avant l'excitation par la lumière

incidente. Alors, le photon émis permet d'atteindre l'état fondamental de la molécule ou un état inférieur de vibration. Dans ce cas, le déplacement Raman est négatif.

Le changement de longueur d'onde observé lors de la diffusion d'un photon (diffusion Stokes ou anti-Stokes) est attribué aux niveaux énergétiques correspondant aux énergies de vibration d'une molécule (Figure 15) (Slusher et al. 1975).

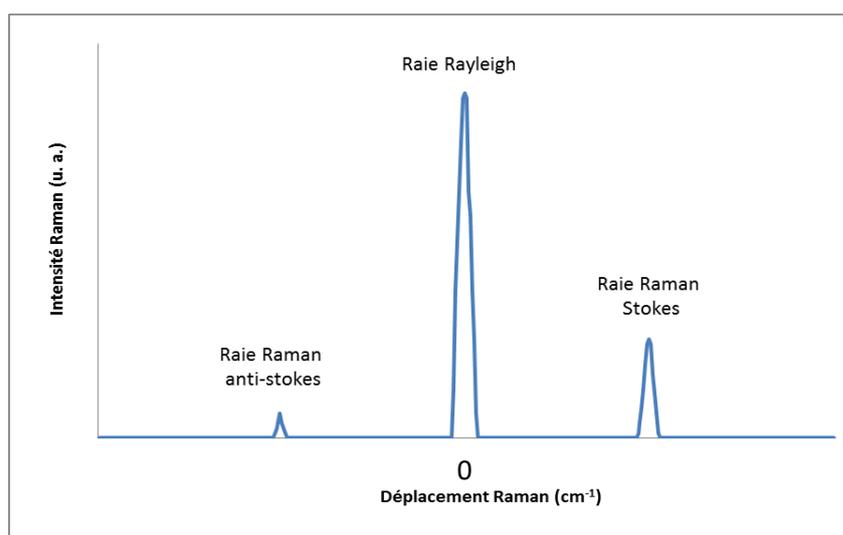


Figure 15 : Spectre (théorique) de diffusion Rayleigh et Raman (Stokes et anti-Stokes).

2. Théorie de l'effet Raman

Lorsqu'une molécule est placée dans un champ électrique, son nuage électronique se déforme relativement au noyau chargé positivement. La molécule présente donc un moment électrique dipolaire (Barbillat et al.). Dans le cas où le champ électrique est faible, le moment dipolaire induit \vec{P} est proportionnel au champ électrique \vec{E} .

$$\vec{P} = [\alpha]\vec{E}$$

Dans un cas général le coefficient de proportionnalité entre P et E, appelé polarisabilité n'est pas un scalaire mais un tenseur de rang 2. D'où l'équation suivante dans un trièdre orthonormé Oxyz :

Si l'on projette sur les axes oxyz d'un trièdre direct, il vient :

$$\begin{pmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}$$

$[\alpha]$ est le tenseur de polarisabilité de la molécule. Soit \vec{E} le vecteur du champ électrique associé à l'onde électromagnétique du photon :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

Où \vec{E}_0 est l'amplitude du champ électrique, t le temps et ν_0 la fréquence du photon.

Lorsque ce photon interagit avec une molécule, le moment dipolaire qu'il induit oscille à la même fréquence ν_0 . Ce moment dipolaire induit va émettre un photon à la même fréquence (ν_0), c'est la diffusion Rayleigh. Pour chaque liaison moléculaire vibrant à une fréquence particulière ν , on peut écrire :

$$Q = Q_0 \cos(2\pi\nu t)$$

Q représente la variation de la position du centre de masse de la molécule par rapport à la position d'équilibre (coordonnée normale). Si les mouvements de la molécule entraînent une variation de la polarisabilité et si on suppose que ces variations sont de faible amplitude, on admet que le tenseur de polarisabilité dépend de la position des électrons qui tournent autour du noyau. Si la position est caractérisée par la coordonnée Q , la position ne reste pas constante au cours du temps parce que la molécule vibre ; la variation du tenseur de polarisabilité se traduit donc par :

$$[\alpha] = [\alpha_0] + \left(\frac{\partial[\alpha]}{\partial Q} \right)_{Q=0} \cdot Q$$

Le moment dipolaire induit s'écrit alors :

$$\vec{P} = [\alpha_0] \cdot \vec{E} + \left(\frac{\partial[\alpha]}{\partial Q} \right)_{Q=0} \cdot Q \cdot \vec{E}$$

Il est fonction de la coordonnée normale. Le dipôle oscillant induit par une excitation monochromatique réémet un rayonnement électromagnétique polychromatique. Donc l'équation du moment dipolaire peut être écrite comme :

$$\vec{P} = \underbrace{[\alpha_0] \cdot \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)}_{\text{diffusion Rayleigh}} + \underbrace{\frac{1}{2} \left(\frac{\partial[\alpha]}{\partial Q} \right)_{Q=0} \cdot Q_0 \cdot \vec{E}_0 \left[\underbrace{\cos 2\pi(\nu_0 + \nu)t}_{\text{anti-Stokes}} + \underbrace{\cos 2\pi(\nu_0 - \nu)t}_{\text{Stokes}} \right]}_{\text{diffusion Raman}}$$

Donc selon cette équation, pour un mode normal de vibration de fréquence ν le dipôle induit donne naissance à trois émissions différentes: Le premier terme de l'équation décrit l'oscillation du dipôle générée par la diffusion Rayleigh, tandis que le second terme décrit les oscillations de dipôle générées par la diffusion Raman.

La diffusion Raman contient 2 composantes :

- une diffusion anti-Stokes (à la fréquence $(\nu_0 + \nu)$, gain d'énergie pour le photon.
- une diffusion Stokes (à la fréquence $(\nu_0 - \nu)$) perte d'énergie pour le photon. Ces deux composantes ont une énergie fixe ($\pm \nu$) par rapport à la longueur d'onde d'excitation. Cette énergie est propre à chaque molécule.

L'approche ondulatoire classique de la diffusion Raman explique bien l'existence ou l'absence de raies de part et d'autre du pic de diffusion Rayleigh. L'écart avec ce pic central est égal aux fréquences de vibration de la molécule. Par contre, elle ne justifie pas les intensités relatives des deux raies Raman (raies Stokes et Anti-Stokes) que seul le traitement par la mécanique quantique permet d'obtenir.

Nous allons maintenant situer cet effet dans le diagramme énergétique issu de la théorie quantique qui fait appel à un niveau virtuel pour rappeler que le phénomène de diffusion est le résultat d'une interaction photon-molécule hors des conditions de résonance. Il importe en effet de bien différencier le mécanisme d'excitation moléculaire tel qu'il apparaît ici de celui mis en jeu lors de l'absorption d'un photon car les deux phénomènes n'obéissent pas aux mêmes lois.

Si la fréquence de la lumière incidente est proche d'une fréquence de vibration de la molécule, on observe un phénomène d'absorption, c'est le cas de la spectroscopie infrarouge. Si, comme en spectroscopie Raman, la fréquence de la lumière incidente est très grande par rapport aux fréquences de vibrations de la molécule ($\nu_0 \gg \nu_{vib}$), le phénomène le plus probable est une diffusion dont on peut décrire le mécanisme de manière très schématique de la façon suivante:

- Lors de l'excitation par le photon incident d'énergie $h\nu$, la molécule transite dans un état appelé virtuel car l'énergie du photon est très importante.

- Puis elle redescend sur un niveau réel. On peut montrer que seuls les niveaux $\nu-1$, ν et $\nu+1$ sont possibles. On retrouve ainsi les 3 types de diffusions rencontrées dans la description classique de la spectroscopie Raman.

On remarque que la diffusion Rayleigh est la plus probable alors que les diffusions Stokes et Anti-Stokes sont très peu favorisées. De plus, à une température donnée, le remplissage des niveaux d'énergie est donné par une loi de distribution de type Maxwell-Blotzmann qui prédit que les niveaux excités ($\nu+1$, $\nu+2$...) sont très peu peuplés par rapport aux niveaux d'énergie fondamentaux (ν). Or la diffusion Anti-Stokes ne concerne que les molécules se trouvant dans un état excité (transition $\nu+1 \rightarrow \nu$) ce qui explique sa faible intensité par rapport à la diffusion Stokes.

On exprime alors le rapport des intensités selon la relation suivante :

$$\frac{I_{Anti-stokes}}{I_{Stokes}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_\nu}{\nu_0 - \nu_\nu} \right) \cdot \exp\left(-\frac{h\nu_\nu}{k_B t} \right)$$

On voit donc que les raies anti-Stokes seront toujours moins intenses que les raies Stokes correspondantes. Elles deviennent inobservables dès que l'écart de fréquence par rapport à la fréquence incidente devient important et/ou que la température s'abaisse. La mesure de leur rapport permet de déterminer la température absolue d'un échantillon soumis au rayonnement monochromatique laser.

Il faut ainsi noter que l'activité Raman est étroitement liée à la modification de la polarisabilité sous l'action d'un champ électrique. Il en résulte qu'une molécule centrosymétrique est active en diffusion Raman (à l'inverse de la spectroscopie Infrarouge).

Limites de la spectroscopie Raman :

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la spectroscopie Raman est un outil de caractérisation appliqué dans plusieurs domaines, notamment dans le domaine fondamental de l'étude structurale et dynamique de la matière et ainsi comme technique d'analyse (mesures de pollution, process en ligne,..). Elle apporte des informations complémentaires à la spectroscopie Infrarouge.

Bien qu'applicable dans de très nombreuses domaines, comme toute technique la spectroscopie Raman se révèle parfois inadéquate. La diffusion Raman représente environ 1 photon pour 10^8 photons incidents (Everall et al.). Ce phénomène est particulièrement

remarqué pour des molécules non-résonantes, ce qui est le cas de la majeure partie des molécules biologiques. La lumière diffusée est donc très faible, ce qui rend le spectre Raman très peu intense et donc peut adapter au dosage de molécules à l'état de traces. A titre comparatif la section efficace de la diffusion Raman est de 10^8 à 10^{10} fois inférieure par rapport à l'absorption infrarouge ou la fluorescence (Rubim et al.).

De plus dans le cadre d'une étude de matériau sous microscope, la résolution est nécessairement liée au critère d'Abbe qui définit la résolution optique maximum de tout système optique. Ce critère exprime la distance minimale de distinction entre 2 points par un système optique, en l'occurrence dans notre cas un microscope, et s'exprime de la manière suivante :

$$d_{min} = \frac{1.22 \lambda}{2 n \times \sin \theta} = \frac{1.22 \lambda}{2 \times ON}$$

Avec :

- λ : longueur d'onde de la lumière ;
- n : indice de réfraction du milieu,
- θ : le demi-angle du cône lumineux incident
- ON : ouverture numérique (de l'objectif de microscope).

En pratique, cela signifie que dans l'air la meilleure résolution qu'on puisse obtenir avec un spectromètre Raman conventionnel couplé à un microscope confocal est de l'ordre de 250 nm pour une longueur d'onde de 400 nm. C'est la raison pour laquelle l'utilisation d'une surface métallique destinée à l'exaltation de signal par la résonance de plasmon de surface localisée, est nécessaire.

2. Des plasmons à la diffusion Raman Exaltée de surface (SERS)

L'effet SERS (Surface Enhanced Raman Scattering), c'est-à-dire l'exaltation de surface de la diffusion Raman, se produit lorsque les molécules de l'espèce à caractériser sont adsorbées à la surface d'un substrat métallique. L'effet SERS a tout d'abord été observé par Fleischman et al. en 1974 (Fleischmann et al 1974), puis découvert quasi parallèlement par

Jeanmaire et Van Duyne (Jeanmaire et al 1977) et Albrecht et Creighton en 1977 (Albrecht et al 1977).

En 1974, Fleischman et al. ont réalisé l'expérience d'une amplification considérable de l'intensité des pics du spectre Raman de la pyridine adsorbée à la surface d'une électrode d'argent. Albrecht et Creighton (Albrecht et al 1977) ont conclu que l'effet d'exaltation résulte du substrat métallique, responsable de l'élargissement des niveaux électroniques de la molécule adsorbée et induisant la diffusion Raman résonante grâce à l'interaction avec les plasmons de surface. Parallèlement, Jeanmaire et Van Duyne identifièrent les facteurs responsables de l'exaltation de l'intensité Raman (l'état de surface de l'électrode ; la concentration de la solution de pyridine ; la nature et la concentration d'anions électrolytes ; le potentiel de l'électrode) (Jeanmaire et al 1977).

Les deux communications de Jeanmaire et Van Duyne (Jeanmaire et al 1977) et de Albrecht et Creighton (Albrecht et al 1977) ont mis en évidence une inadéquation entre l'importance de l'exaltation du signal Raman et l'augmentation de la surface spécifique de l'électrode métallique après réduction. Dès lors, la communauté scientifique s'accorde sur le fait que les propriétés de surface du substrat métallique interviennent dans le processus d'exaltation. En effet, l'exaltation de la diffusion Raman dépend de l'état de surface du substrat métallique, mais aussi de sa nature (seuls quelques métaux comme l'argent, le cuivre et l'or produisent une exaltation importante (D.-Y. Wu et al.; Kneipp et al.)). De plus, suivant la longueur d'onde d'excitation utilisée, l'amplification du signal varie sensiblement.

4.1. Les plasmons de surface

Les plasmons de surface (PSs) sont les oscillations collectives des électrons délocalisés existant à l'interface entre un matériau où la partie réelle de la fonction diélectrique change de signe à travers l'interface (par exemple une interface entre un métal, tel l'argent, et un milieu diélectrique comme le vide ou l'air). Cette onde (assimilable à des vagues qui parcourraient la surface du métal) est produite, dans certaines conditions, par une onde lumineuse incidente. On obtient une interaction résonante entre la lumière et le plasmon (Raether et al. 1988). L'existence de plasmons de surface a été d'abord prouvée en 1957 par

Rufus Ritchie (Ritchie et al. 1957). Ces ondes sont principalement exploitées en (bio) physique et en (bio) chimie *au travers* de la résonance de plasmon de surface.

Ces ondes de surface sont appliquées dans plusieurs domaines tels que l'émission de la lumière et les guides d'ondes. Plus généralement, on distingue les « plasmons de volume » et les « plasmons de surface » suivant la localisation des oscillations dans un métal. Pour quantifier ces oscillations, nous pouvons nous rapporter à la fonction diélectrique qui dépend du matériau et de la radiation excitatrice de fréquence angulaire ω , et s'écrit :

$$\check{\epsilon}(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega) \quad (1)$$

La constante diélectrique $\epsilon(\omega)$ permet de décrire les propriétés optiques du métal, notamment ses coefficients d'absorption et de diffusion ainsi que sa fréquence plasma. Sa dépendance en fréquence peut être obtenue en utilisant le modèle de Drude (Drude et al. 1900). Ce modèle décrit les mécanismes d'interaction des électrons à l'intérieur du métal. Brièvement dans le modèle de Drude, le métal est assimilé à un réseau ionique baigné dans un nuage d'électrons libres (les électrons de conduction). La direction de propagation d'une onde plane monochromatique est définie par un vecteur d'onde \vec{k} parallèle à l'un des trois axes (x, y ou z) et par la pulsation ω . Le mouvement des électrons libres est alors modélisé en considérant le champ électrique \vec{E} appliqué, la masse effective des électrons, leur vitesse et leur charge, ainsi qu'une constante d'amortissement Γ , décrivant les interactions inhomogènes des électrons comme les collisions inélastiques des électrons libres mais aussi le couplage phonon-électron, les défauts, les impuretés, etc. On obtient alors la relation de dispersion de la fonction diélectrique dans le domaine visible ($\omega > \Gamma$) selon l'expression de Drude :

$$\check{\epsilon}(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega) = \left(\epsilon_r - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \right) + i \left(\frac{\omega_p^2}{\omega^3} \Gamma \right) \quad (2)$$

Où $\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\epsilon_0 m_e}}$ est la fréquence plasma métallique avec n : le nombre d'électrons de charge e et de masse effective m_e et ϵ_0 : la permittivité du vide.

Dans les cas des métaux, ϵ_r (la partie réelle de la constante diélectrique, est la permittivité relative du milieu incluant la contribution des électrons de liaison à la polarisabilité) est négative et prend une valeur égale à 1 si, seuls, les électrons de la bande de conduction, contribuent à la fonction diélectrique.

4.2. Nature du plasmon de surface

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, les plasmons de surface sont à la fois une excitation collective des électrons et une onde électromagnétique de la surface confinée vérifiant la relation $\epsilon(\omega) < 0$. Cette dernière condition est vérifiée entre un diélectrique ($\epsilon_d > 0$) et un métal ($\epsilon_m < 0$). On parle parfois de plasmons polaritons de surface (PPS) pour faire référence à cette nature hybride (Raether et al. 1988). Ils apparaissent donc à des fréquences différentes de celles des plasmons de volume qui eux doivent remplir la condition $\epsilon(\omega) = 0$.

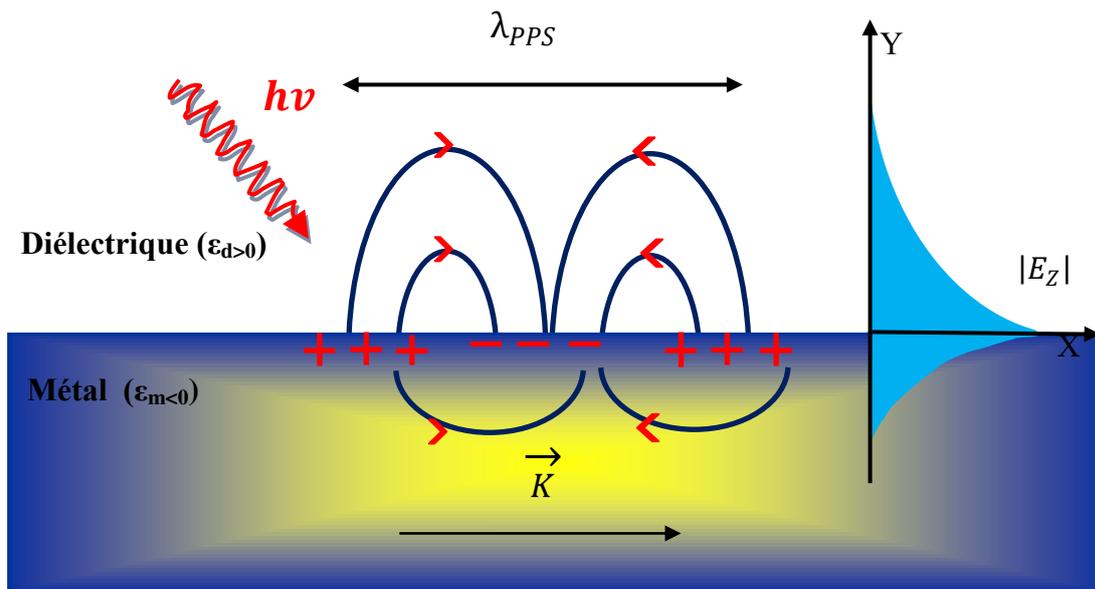


Figure 16 : Schéma de la propagation d'une onde de densité électronique à l'interface entre un métal de constante diélectrique ϵ_m et un milieu diélectrique de constante ϵ_d . Les oscillations de la densité de charge et les champs électromagnétiques associés, constituent les ondes plasmon-polariton de surface. La décroissance exponentielle de l'intensité du champ électromagnétique perpendiculairement à l'interface est montrée à droite.

Considérons l'interface entre un métal de constante diélectrique ϵ_m et un milieu diélectrique de constante ϵ_d . L'intensité du champ associé à l'onde électromagnétique se propageant entre ces deux surfaces est maximale à l'interface. L'intensité du champ associé à cette onde décroît exponentiellement dans les directions perpendiculaires à la surface dans les deux milieux suivants, ce qui est une caractéristique des ondes de surface (Figure 16). Il

existe des modes optiques longitudinaux dans ce plasma d'électrons libres qui correspondent à des oscillations de la densité d'électrons se propageant dans le métal avec un vecteur d'onde \vec{k} dirigé dans le même sens que les modes d'oscillation.

Les conditions d'existence d'un plasmon de surface à l'interface entre un diélectrique et un métal peuvent être exprimées en utilisant la continuité des équations de Maxwell à l'interface, dans des conditions au limites appropriés ($\epsilon_m \epsilon_d < 0$) et en négligeant le terme d'amortissement présent dans l'expression de la constante diélectrique du métal donnée par le modèle de Drude (Eq. 2) (Han et al. 2013). La relation de dispersion des plasmons (polaritons) de surface se propageant à l'interface selon un vecteur d'onde propagatif est donnée par la relation de dispersion (Eq. 3), qui relie la fréquence angulaire ω et le vecteur d'onde $k_0 = 2\pi/\lambda$ (où λ est la longueur d'onde du rayonnement) (Dionne et al.):

$$k_{pps} = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (3)$$

La distance de propagation des plasmons est inversement proportionnelle à la partie imaginaire (Im) de k_{pps} et s'écrit :

$$l_{pps} = \frac{1}{2\text{Im}(k_{pps})} \quad (4)$$

4.3. Plasmon de surface localisé dans les nanoparticules métalliques

Une nouvelle technique de caractérisation basée sur les nanoparticules métalliques et plus spécifiquement leurs propriétés optiques à cette échelle : la Résonance Plasmon de Surface Localisé (LSPR pour Localized Surface Plasmon Resonance), basée sur les plasmons, est apparue. Différents types de résonances plasmons peuvent être excités selon le type de surface métallique (film continu ou non). Les films continus ne peuvent maintenir que d'éventuelles résonances plasmons délocalisées, alors que pour une surface rugueuse les résonances plasmons de surface localisées et délocalisées peuvent apparaître. Lorsque la taille de la surface métallique est petite devant la longueur d'onde ($R \ll \lambda$), les propriétés optiques

des nanoparticules métalliques, assimilées à des sphères, sont dominées par l'oscillation collective des électrons de conduction (plasmon de surface localisé) induite par l'interaction avec un rayonnement électromagnétique (Ritchie et al. 1973). En effet, le champ électromagnétique entraîne la polarisation du métal constituant les sphères et induit la formation d'un dipôle dans la nanoparticule (Figure 17).

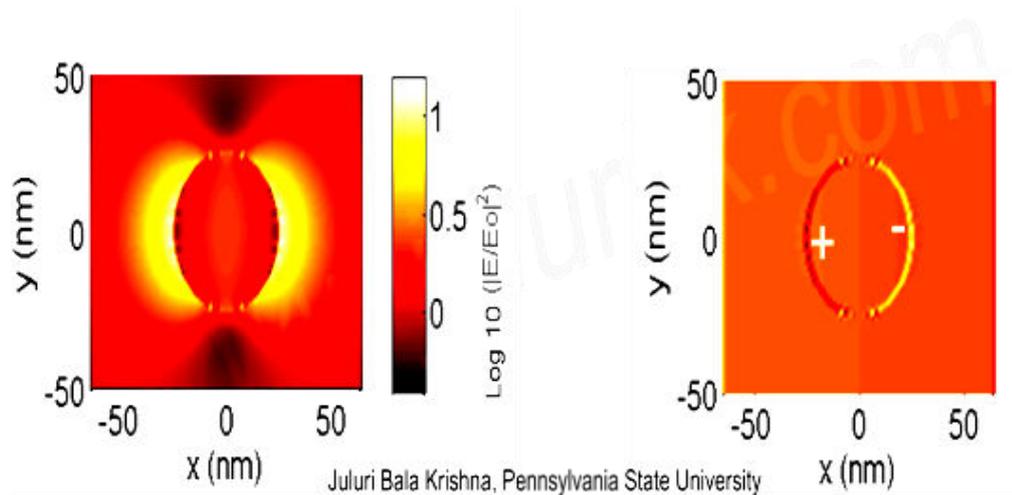


Figure 17 : Image du champ électrique et la distribution de la densité de charges d'une nanoparticule métallique sphérique (Adapté de (Juluri et al.)).

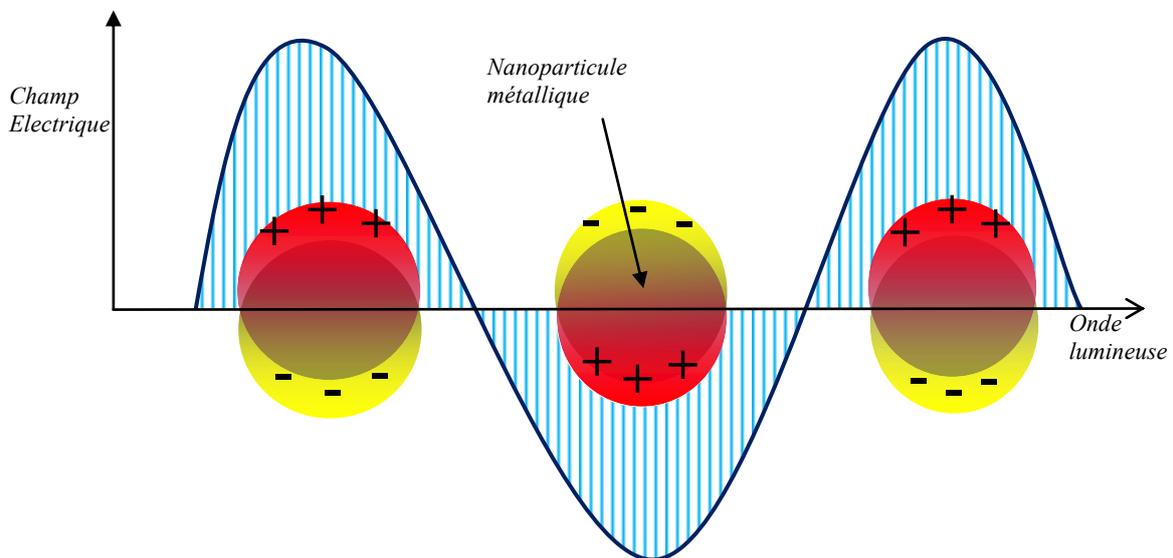


Figure 18 : Diagramme schématique de la résonance des plasmons de surface localisés dans les particules métalliques sphériques. Le couplage entre le champ électrique et les nanoparticules métalliques incite les oscillations collectives des électrons de particules.

Le champ électrique d'une radiation provoque la conduction des électrons qui, par la suite, se mettent à osciller collectivement. Le métal est considéré comme étant composé

d'ions positifs formant un réseau régulier et d'électrons de conduction les plasmons de surface se déplaçant librement à travers le réseau ionique. En conséquence, localisés résultent de la vibration électronique de nanoparticules métalliques comme indiqué sur la (Figure 18).

La fréquence plasmon de résonance est déterminée par la force de rappel des électrons de conduction du métal, laquelle dépend de plusieurs paramètres dont la nature du métal, la taille et la forme des nanoparticules (Chen et al.), mais également du milieu dans lequel se trouvent les nanoparticules (plus particulièrement de l'indice de réfraction.) (Figure 19) (Mock et al. 2003) . Cette fréquence change si le milieu est modifié ou si des molécules se lient à la surface du métal. D'autre part, la LSPR exalte le champ incident, et peut ainsi être utilisée pour exalter la diffusion Raman, ainsi que dans de nombreuses autres applications.

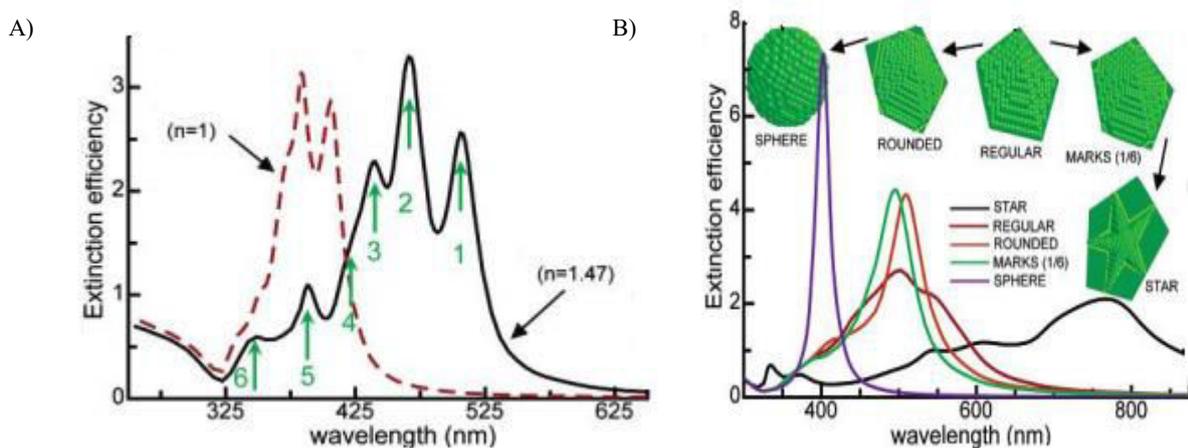


Figure 19: Coefficient d'extinction en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente pour : A) une nanoparticule cubique d'argent immergée dans deux milieux différents (vide : $n=1$ et le silicium : $n=1.47$, les six principales résonances de plasmons de surface sont indiquées) et B) pour le décaèdre régulier et ses morphologies tronquées (pour une polarisation parallèle de la lumière) (Noguez et al.).

5. La diffusion Raman Exaltée de surface

Dans ce qui précède, nous avons exposé les avantages de la spectrométrie Raman. Son avantage principal réside dans sa capacité à fournir des informations très riches sur la structure moléculaire de l'analyte. Pourtant, la faible intensité du signal Raman peut limiter l'utilisation de cette technique dans le cas de très faibles concentrations d'espèces diffusantes et/ou de molécules avec très faibles sections efficaces de diffusion.

Depuis la découverte de l'effet SERS en 1974 par (Fleischmann et al 1974), un regain d'intérêt pour la spectroscopie de diffusion Raman a été observé. Une exaltation de 10^{14} a été obtenue, sous des conditions de résonances appropriées, dans les travaux de Nie et al (Nie et al.) et Kneipp et al (Kneipp et al.). Ceci a permis l'ouverture de perspectives d'utilisation de la spectroscopie Raman en tant que technique disposant d'une grande sensibilité de détection.

L'effet SERS reste un phénomène complexe dont son facteur d'exaltation peut être compris comme le produit d'une contribution simultanée de deux types de mécanisme : de l'amplification électromagnétique (Campion et al.) et de l'amplification chimique (Garrell et al. 1989).

5.1. L'Effet électromagnétique

L'interaction d'un champ électromagnétique avec une surface métallique, peut exciter les plasmons de surface localisés, induisant l'amplification du champ électromagnétique proche de la surface du métal (Zayats et al 2005). En effet, l'exaltation du signal Raman observée est associée à l'amplification de l'intensité du champ électrique incident et diffusé. Cette exaltation est principalement due à une résonance localisée des plasmons de surface. Ce concept a servi de modèle important dans la compréhension du mécanisme électromagnétique de l'effet SERS (Pockrand et al 1981).

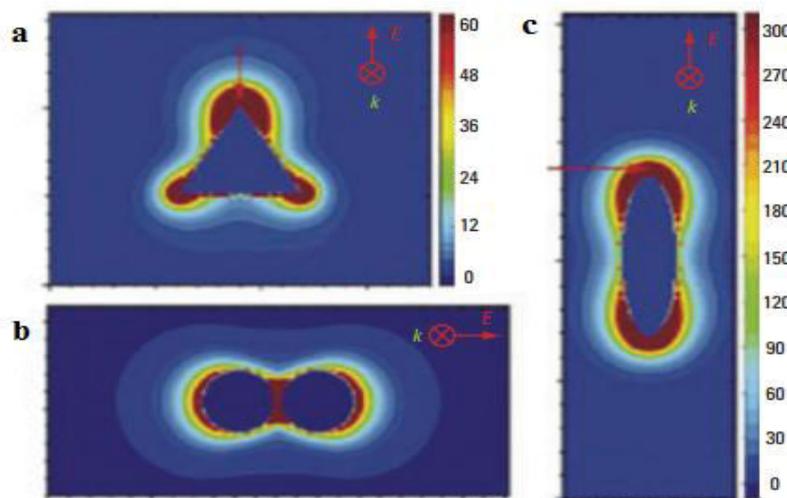


Figure 20: simulations théoriques de l'amplification du champ électromagnétique autour des nanoparticules d'argent de différentes formes : (a) une nanoparticule triangulaire (700 nm), (b) un dimère de nanoparticules sphériques (520 nm), et (c) une nanoparticule ellipsoïdale (695 nm). L'échelle d'intensité en (a) applique également à (b) (Haynes et al 2005).

Des études théoriques ont permis de décrire l'effet électromagnétique impliqué dans l'exaltation SERS, dans le cas de différentes morphologies du substrat, de la forme la plus simple (particule sphérique) à la plus complexe (colloïdes fractals) afin d'améliorer les facteurs d'amplification de l'effet SERS (Zeman et al 1987). Ce facteur augmente considérablement, peut atteindre 10^{10} à 10^{12} , si on ne considère non plus une, mais deux particules à une distance de quelques nanomètres l'une de l'autre. Alors qu'il est seulement de l'ordre de 10^6 dans le cas d'une sphère métallique isolée (Figure 20).

En spectroscopie Raman, l'intensité diffusée est proportionnelle au carré du champ appliqué à la molécule, E_0 (McCreery et al 2000). En effet le facteur d'amplification électromagnétique du SERS peut être donné approximativement pour chaque molécule, par la relation suivante (Cotton et al 1986):

$$F = \left| \frac{E_l(\omega)}{E_0(\omega)} \right|^4 \quad (6)$$

Avec $E_l(\omega) = \left(\frac{1}{\epsilon(\omega)+2} \right) E_0$: est le champ électrique local à la fréquence incidente ω et $\epsilon(\omega)$ est la constante diélectrique totale du métal à la fréquence ω .

$E_0(\omega)$: Le champ électrique incident. Nous comprenons alors que l'amplification du signal Raman de la molécule dépend du champ électrique perçu par la surface métallique.

L'amplitude de l'exaltation SERS dépend de la distance entre la molécule et la surface métallique. Il n'exige pas que l'adsorbat soit en contact direct avec la surface mais dans un certain volume de détection. L'intensité dépend de la distance surface-matériau selon la relation suivante :

$$I_{SERS} = \left(\frac{a+r}{a} \right)^{-10} \quad (7)$$

Où I_{SERS} est l'intensité Raman, a le rayon de courbure de la fonction de rugosité sur la surface, et r représente la distance entre la surface et l'adsorbat.

L'effet géométrique (ou effet d'antenne) qui est relié aux propriétés géométriques de la surface métallique (L. Chen et al.), contribue aussi à l'exaltation électromagnétique. En présence de champ électromagnétique, les charges positives et négatives se déplacent à la surface du métal (comme dans le cas de la déformation du nuage électronique d'une molécule) ce qui conduit à l'apparition d'un moment dipolaire induit. Ces charges se localisent en particulier sur les régions de fortes courbures présentes sur la surface et donc sur les excroissances et les interstices. Il en résulte un champ électromagnétique à la fois très intense mais aussi très localisé dans ces régions.

5.2. L'effet chimique

Selon Moskovits (Moskovits et al. 1985), l'effet chimique fait intervenir la modification du tenseur de polarisabilité Raman résultant de l'interaction des nuages électroniques de l'analyte avec la surface métallique. Ce changement peut, selon les cas, soit diminuer (« quenching ») l'intensité du signal Raman, soit l'exalter.

Le transfert de charge (électrons ou trous) est le plus exploité pour expliquer le changement de polarisabilité dans la théorie et l'expérience de SERS. Kerker (Kerker et al. 1991), E.C.Le Ru et P.G.Etchegoin (Le Ru et al. 2008) ont étudié en détails ce mécanisme de transfert de charge entre la molécule et la surface métallique. Il y a un transfert de charge, soit du métal vers la molécule, soit de la molécule vers le métal (Lombardi et al.), ce transfert peut être résumé selon deux types de mécanismes:

- a) la perturbation de la structure électronique de la molécule, en présence du métal, par transfert d'électrons, à partir du niveau de Fermi du métal, à une orbite moléculaire non occupée de la molécule sonde ou vice versa (Arenas et al.), ensuite une modification du tenseur de polarisabilité s'opère. Dans une telle situation la molécule n'établit pas de liaison covalente avec le métal. Dans les cas les plus favorables, la création de tels niveaux peut placer le système dans des conditions proches du Raman résonant.
- b) la production de la diffusion Raman résonante par les complexes métalliques formés avec la molécule adsorbée. Ce phénomène est obtenu lorsque la différence d'énergie

entre le niveau de Fermi du métal et l'orbitale la plus haute occupée (HOMO) ou la plus basse inoccupée (LUMO) est proche de celle de la lumière excitatrice. Dans ce cas, le niveau de Fermi peut servir de canal. En effet, un électron peut être transféré entre de l'HOMO vers un niveau inoccupé du niveau de Fermi (ou d'un niveau occupé en dessous du niveau de Fermi vers la LUMO) (Figure 21). Le transfert de charge du métal vers les matériaux adsorbés est abouti pour le cas des molécules chemisorbées sur le substrat du métal (par effet tunnel en cas de physisorption, et par hybridation pour les molécules chimisorbées).

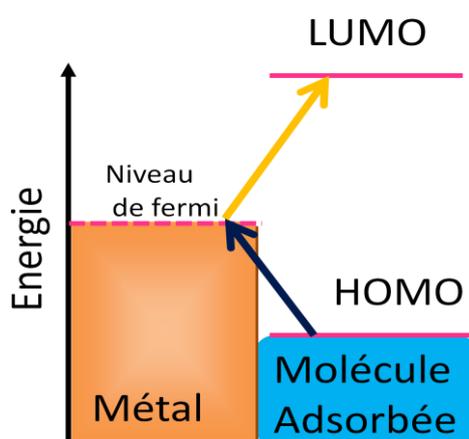


Figure 21: Diagramme d'énergie illustrant l'énergie de bandes de la nanostructure du métal et l'espace HOMO-LUMO de la molécule adsorbée.

La molécule peut être chimiquement adsorbée sur la surface métallique, donc former une nouvelle liaison chimique qui se manifeste par l'apparition de nouveaux pics caractéristiques, des changements de fréquences des modes habituellement observées ou bien des modifications dans les intensités relatives des pics, avec amplification sélective de certaines vibrations dans le spectre SERS (Figure 22). En effet, cette différence entre les spectres Raman classique et les spectres Raman SERS rend parfois l'interprétation des spectres SERS difficile, due au fait des orientations moléculaires à la surface du substrat SERS. Les excitations par transfert des charges entre le métal et les molécules adsorbées peuvent provoquer une exaltation de l'ordre de 10^2 (Persson et al 1981).

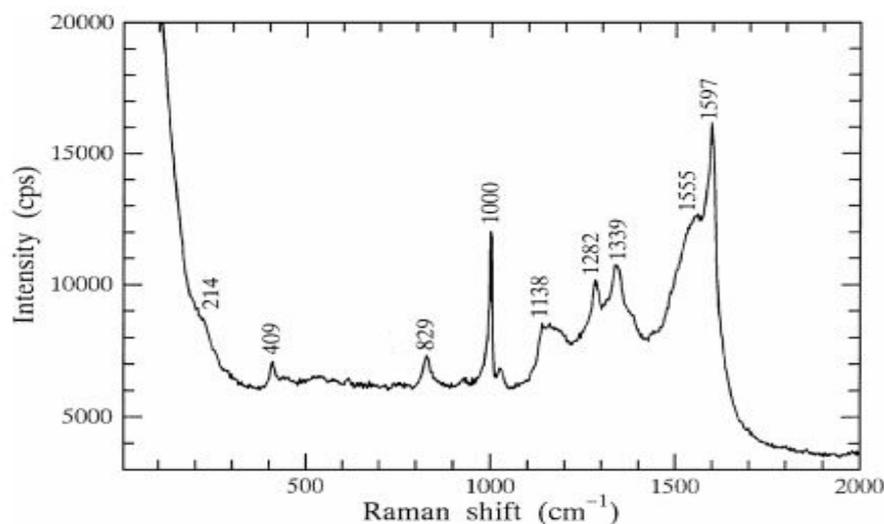


Figure 22 : Spectre SERS de l'acide benzoïque ($C_6H_5^{13}COOH$) greffé sur un film d'argent rugueux. Apparition de la bande Ag-Cl à 214 cm^{-1} (Imai et al 1998).

5.3. Types de substrat SERS actifs :

Pour obtenir une amplification optimale, une résonance entre le laser et la surface métallique est nécessaire. La taille et la forme sont des facteurs importants pour l'amplification du signal Raman. L'effet SERS varie avec le métal utilisé. Il existe plusieurs substrats SERS actifs qui sont classés selon leur :

- Nature des métaux (Au, Ag, Cu, Pt, Pd)
- méthodes de fabrication des surfaces : Métal "dépoli", dépôt sur lames, surfaces métallisées après photogravure, gravure chimique (solutions colloïdales : Argent, Or), Sol-gels...
- formes : Surface, feuilles, solutions colloïdales (sphère, cube, étoiles...) couches minces...

Les colloïdes d'or ou d'argent sont largement utilisés pour l'obtention d'un effet SERS significatif, soit en solution (mélange avec la molécule cible) ou bien déposés sur des substrats (plans, poreux, rugueux, nanostructurés, fonctionnalisés.).

Les nanoparticules d'or (AuNPs) possèdent des propriétés physiques et chimiques qui en font d'excellents éléments pour l'élaboration de nouveaux capteurs chimiques et biologiques (Jain et al 2007; Saha et al. 2012) :

- synthétisables de façon simple et leurs solutions colloïdales sont très stables.

- possédant des propriétés optoélectroniques uniques, elles fournissent un grand rapport surface/volume avec une excellente biocompatibilité en utilisant des ligands appropriés.
- ces propriétés peuvent être facilement ajustées en faisant varier leur taille, leur forme et le milieu environnant. Par exemple, l'existence d'une liaison entre l'élément de reconnaissance et l'analyte peut altérer les propriétés physico-chimiques des AuNPs, telles que la bande de plasmon de résonance, la conductivité, les propriétés redox, etc.
- Elles offrent aussi une plateforme adéquate pour la multifonctionnalisation avec une large gamme de ligands organiques ou biologiques formant des liaisons sélectives pour la détection de molécules et de cibles biologiques.
- Le rendement de la luminescence des nanoparticules est supérieur à celui du métal massif (de l'ordre de 10^{-10}) tout en restant faible (de l'ordre de 10^{-4} - 10^{-5}).

6. Techniques de fabrication de Substrats SERS : nanoparticules d'or

Nous avons montré précédemment l'importance de l'état de surface sur les mécanismes d'amplification de la diffusion Raman. Compte tenu de la diversité des substrats élaborés, leur classement n'est pas toujours aisé et plusieurs manières de procéder sont possibles. De nombreuses méthodes de synthèses, chimiques ou lithographiques (Wiley et al.), se sont développées pour l'élaboration de ces substrats « SERS-actifs ». Ces surfaces sont souvent élaborées à partir de métaux nobles (or ou argent, ou même parfois un mélange des deux).

L'utilisation des nanoparticules d'or (AuNPs) date depuis des siècles en raison de leurs propriétés optiques et décoratives. Tandis que le concept de nanoparticules est beaucoup plus récent, Michael Faraday fut le premier à étudier la formation de colloïdes d'or (Michael et al. 1857). Ainsi, l'intérêt pour les nanoparticules d'or est extrêmement lié à l'exploitation de leurs propriétés plasmoniques. Ces nanoparticules d'or qui ont lancé les nanotechnologies, suscitent encore un vif intérêt aujourd'hui et représentent une grande partie des travaux rapportés notamment dans le domaine des applications telles que la détection, l'optique, la catalyse, la détection des molécules uniques (Lamy et al. 2013). Leur large gamme de taille leur confèrent une bonne biocompatibilité et biodisponibilité. Elles sont utilisées dans plusieurs domaines et particulièrement dans les applications biologiques. La propriété intrinsèque la plus remarquable des nanoparticules d'or reste toutefois la SPR qui leur procure des propriétés applicables dans les techniques de diffusion de la lumière. Les solutions

colloïdales d'or disposent d'une bande plasmon autour de 520 nm. En effet, leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur cœur métallique mais aussi et surtout à leurs énormes capacités de fonctionnalisation (et de multifonctionnalisation) en surface par greffage de molécules soufrées (notamment biologiques). D'où l'intérêt croissant pour des stratégies de fabrication de nanostructures en or faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses.

La méthode la plus utilisée pour la synthèse des nanoparticules est la réduction d'ions AuCl_4^- par différents types de réducteurs. C'est une méthode facile qui permet d'obtenir des particules d'or monodisperses entre 3 et 160 nm, de morphologies différentes. Cette réduction aisée d'au (III) ou au (I) sous forme de sels (HAuCl_4 , $\text{AuPC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ (Bartlett et al. 1978)) en au (0) par différents types de réducteurs ($\text{NaSCN}+\text{K}_2\text{CO}_3$, phosphore blanc, acide ascorbique + K_2CO_3 , PPh, NaBH_4 , citrate de sodium (Horisberger et al. 1983; Hu et al. 2015; Roth et al. 1982)) est due au fait que l'or est le plus électronégatif des métaux de transition. Les différentes méthodes de synthèse de colloïdes d'or sont basées sur le contrôle de la réduction de l'au (III) en au (0). L'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) est le sel d'or le plus utilisé dans ces méthodes. La taille (variant de 2 à 200 nm), la forme (cubes, des lignes finies, sphères ou des triangles (Tsuji et al.; Sun et al.; Ahmed et al.)) et le taux d'agrégation des nanoparticules (Faulds et al.), dépendent considérablement des paramètres physiques (concentration, température et vitesse d'agitation), de la nature du réducteur et de l'ordre de l'addition des réactifs.

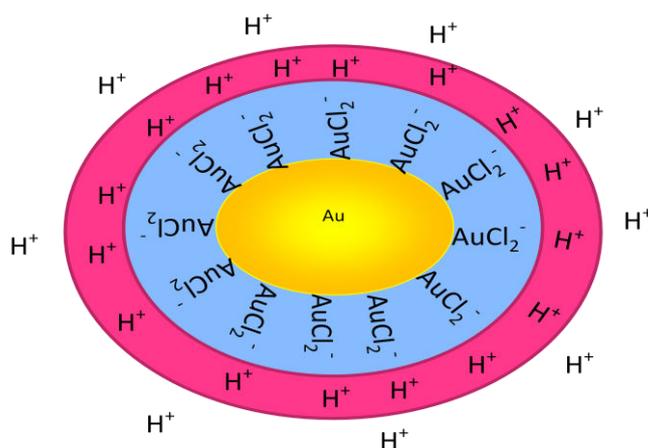


Figure 23 : Structure des nanoparticules d'or.

Les colloïdes d'or ont une charge négative attribuée aux ions $AuCl_2^-$ adsorbés sur la surface du noyau d'or pur (0). Ces ions protègent de l'agrégation par répulsion électrostatique (Figure 23). Toutes les synthèses de colloïdes d'or sont sensibles à l'anion (chlorure>bromure>iodure) qui assure leur stabilisation (Munro et al.) en comprimant la double couche ionique et réduisant donc les répulsions électrostatiques. La déstabilisation du système aboutit à une agrégation qui s'accompagne d'un changement de couleur de la solution et éventuellement d'une sédimentation de l'or (Saha et al.). Les thiols sont des types de stabilisant employés pour les nanoparticules d'or de n'importe quelle taille du fait de la plus grande force de la liaison Au-S. La stabilisation de AuNPs par des thiols fut pour la première fois publiée en 1993 par Mulvaney et Giersig (Giersig et al 1993) qui démontraient la possibilité d'utiliser des thiols de chaînes carbonées de différentes longueurs. Mais cette méthode rend les nanoparticules moins sensibles en comparaison aux autres substrats SERS, ceci étant dû à la présence des ligands thiolés à la surface. Ce ligand rend les nanoparticules très stables, en conséquence, pour les utiliser, il faut une seconde fonctionnalisation (obtention des structures complexes), ce qui induit une augmentation de la distance entre la molécule et la nanoparticule (moins de sensibilité SERS). Ainsi, ils sont également) peu solubles dans l'eau (agrégation dans les milieux aqueux) car leur solubilité dépend du pH (Simard et al.). Par exemple, les AuNPs fonctionnalisées par des molécules porteuses de groupements amines sont solubles en solution acide, tandis qu'avec une fonction acide carboxylique, elles sont solubles en milieu basique.

Il existe encore une autre méthode utilisée de nos jours, pour l'élaboration des nanoparticules stables : la synthèse par réduction d'un dérivé d'or au degré d'oxydation III ($HAuCl_4$) en présence de citrate de sodium dans l'eau, si l'on excepte la réduction en présence de $NaBH_4$. Le citrate et le produit de son oxydation (le dicarboxylate d'acétone) agissent comme des agents protecteurs. Cette méthode ne nécessite donc aucun recours à d'autre stabilisant, comme c'est souvent le cas. Comparée à d'autres, telles que la stabilisation par des thiols, elle se révèle plus intéressante pour certaines applications, comme la spectroscopie Raman exaltée de surface. Elle a été mise au point, pour la première fois, par Turkevich en 1951, les nanoparticules obtenues ont un diamètre de l'ordre de 10 à 20 nm (Turkevich et al 1951). Et en 1973, Frens (Roth et al 1982) reprend ce procédé, en modifiant le rapport citrate de sodium/or, pour obtenir des nanoparticules de taille variant de 16 à 147 nm. Ceci a permis

à ce procédé d'être plus performant pour la préparation de matériaux AuNP-ligand exigeant une quantité contrôlée de ligands en surface.

Il existe aussi d'autres ligands contenant du soufre utilisés pour stabiliser des AuNPs, tels que des xanthates, des disulfures et des di-, tri- et tétrathiols (Saha et al.). L'acétone aussi a été utilisée comme agent réducteur au lieu du citrate pour la synthèse des nanoparticules d'or. Ces nanoparticules sont stables en présence de BH_4^- ou d' HCl (Li et al. 2003). L'iode peut aussi remplacer les ions citrate à la surface des nanoparticules d'or par addition de KI, menant ainsi à la formation de superstructures (Cheng et al. 2003).

Au-delà des synthèses de nanoparticules par voie chimique évoquées ci-dessus, celles-ci peuvent être obtenues par des méthodes physiques, telles que les techniques lithographiques (photolithographie, la lithographie à faisceau d'électrons (EBL pour Electron Beam Lithography) et la lithographie par faisceau d'ions focalisés (FIB), les techniques microscopiques (à effet tunnel, à force atomique ou optique en champ proche) ou le dépôt par ablation laser (Marinakos et al. 1999). Ces méthodes servent à fabriquer des nanostructures de taille, forme et espacement contrôlés mais sur de petites surfaces. Néanmoins, la plupart des méthodes de synthèse physique demande la nécessité d'une enceinte expérimentale appropriée, plus difficile à mettre en œuvre surtout si d'autres techniques de caractérisations in situ sont couplées avec le dispositif. Donc le coût élevé et la production en série restent de sérieux défis pour de gros volumes industriels (par exemple EBL et la FIB). D'autre part, pour les techniques microscopiques, les particules sont obtenues sous forme de films, ce qui limite leur utilisation. En effet, pour le cas des méthodes chimiques, la synthèse des nanoparticules est plus facile puisqu'elle se base en général sur l'association de flux de réactifs en présence d'une solution.

Conclusion et résumé

La spectroscopie Raman se base sur le phénomène de diffusion inélastique de la lumière (échange d'énergie) lors de son interaction avec la matière. Elle permet d'obtenir des informations très fines (empreinte) sur la nature chimique des matériaux. La diversité des échantillons analysables (liquides, gazeux ou solides) ainsi que son caractère non-destructif, expliquent sa large diffusion dans des domaines scientifiques divers et variés (physique, chimie, biologie, médecine, archéologie etc.).

Cependant, cette technique d'analyse présente quelques limites (résolution spatiale, signal faible) qui doivent être surpassées (exalter la diffusion Raman). Ceci est possible en utilisant **la diffusion Raman exaltée de surface** ou SERS qui a lieu lorsque la molécule est très proche, voire adsorbée sur une surface métallique rugueuse.

L'effet SERS est capable d'augmenter l'intensité du signal Raman d'un facteur de l'ordre de 10^6 et pouvant atteindre 10^{14} à 10^{15} . Le SERS a pour origine deux types d'exaltation, électromagnétique mettant en jeu les propriétés optiques inhérentes aux métaux que sont les plasmons et chimiques qui met en jeu interaction chimique entre la molécule et la surface métallique (transfert de charge entre le métal et la molécule.).

Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à développer des nanoparticules d'or non fonctionnalisées afin de détecter les pesticides directement par la spectroscopie Raman.

Les surfaces SERS actives ont différentes tailles, formes et types. Les surfaces actives à base de colloïdes d'or présentent plusieurs avantages. D'autre part, Il existe plusieurs méthodes pour les fabriquer. Les méthodes chimiques sont les plus facile à mettre en œuvre, moins coûteuses puisqu'elles se basent en général sur l'association de flux de réactifs en présence d'une solution.

Objectifs de la thèse :

Vu le manque de données pour la surveillance des pesticides, il est indispensable de développer un outil simple, sensible, non ciblé, plus rapide et moins coûteux capable d'apporter des informations sur la contamination des eaux par toute une variété de pesticides, organophosphorés et carbamates. La spectroscopie Raman, qui est une technique facile, simple, non destructive, rapide et moins coûteuses, peut être un bon outil pour la détection et la quantification des molécules organiques comme les polluants et plus précisément les pesticides. Cependant, pour une limite de détection trop élevée (analyse de traces) il est nécessaire d'amplifier le signal Raman. Cette amplification est rendue possible par l'utilisation de nanoparticules métalliques au sein notamment de colloïdes. Elle dépend non seulement du type, de la taille et du milieu environnant des colloïdes mais aussi de la nature de la molécule cible.

L'ACHE est la principale cible de plusieurs types de pesticides (organophosphorés, carbamates, pyréthroides, triazines, le paraquat...). Le couplage entre l'activité enzymatique de l'ACHE et la spectroscopie Raman exaltée de surface peut être utilisé pour la détection de tous les polluants inhibant son activité (pesticides en grande partie) tout en respectant l'objectif de notre travail : l'élaboration d'un outil de détection simple, rapide, non ciblé, moins coûteux.

C'est dans ce contexte, que notre étude, sur la diffusion Raman exaltée de surface, pour la détection des pesticides par le suivi de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase, s'est inscrite et s'est tournée vers l'utilisation de nanoparticules d'or en solution.

Partie B

MISE EN ŒUVRE DE BIOCAPTEURS ET TECHNIQUES DE CARACTERISATION

L'objectif de cette partie est de présenter les protocoles expérimentaux utilisés pour les différents systèmes étudiés dans le cadre de cette thèse, et les dispositifs expérimentaux employés.

IV. Protocoles expérimentaux

1. Synthèses des nanoparticules d'or

1.1. Choix de la méthode de synthèse

Comme nous l'avons précédemment rappelé les nanoparticules d'or peuvent être élaborées par un large panel de méthodes qu'elles soient physiques ou chimiques. Pour notre travail, nous nous sommes focalisés sur les méthodes de synthèse chimiques. Selon toutes les approches, la préparation des colloïdes d'or stables, nécessite la réduction d'un sel d'or en présence d'un stabilisant. La réduction par le borohydrure de sodium (Burst) et la réduction par le citrate de Turkevich produisant des nanoparticules aux caractéristiques différentes sont les méthodes les plus répandues. Nous allons maintenant les développer pour expliciter les raisons de notre choix.

La réduction par le NaBH_4 mène donc à des nanoparticules de différentes tailles et formes, mais elle présente des désavantages tels que la perte d'accessibilité des sites de greffage, après la réduction du métal. La méthode utilisant le citrate de sodium permet d'obtenir des particules de diamètre plus grand d'environ 20 nm. La reproduction de ces deux types de synthèse, nous a permis, dans les deux cas, d'obtenir des particules de tailles différentes et dispersées. Cependant, la voie citrate est plus adaptée à la réaction avec différents ligands sur la surface des particules. Avec la voie NaBH_4 , la quantité de thiols en solution est généralement en large excès par rapport à celle des greffés, de telle sorte que le greffage dépend d'une réaction d'échange dynamique entre les thiols en excès en solution et les thiols greffés en surface. Dans ce cas, la quantité de molécules adsorbées peut varier très significativement de celles qui sont en solution. Le contrôle de l'interaction de la nanoparticule avec d'autres molécules devient alors très difficile. Ce problème est moins probable pour la voie citrate, car le citrate de sodium agit à la fois comme agent réducteur et comme agent stabilisant lors de la synthèse, limitant ainsi au maximum le nombre de réactifs. C'est la raison pour laquelle, la méthode par la voie citrate a été choisie.

Cette voie mène cependant à des solutions moins concentrées. Ceci ne présente aucun problème dans les mesures où les applications biologiques ne nécessitent que de faibles concentrations. Les nanoparticules d'or utilisées sont donc obtenues par la synthèse suivant la méthode or/citrate.

L'avantage de cette méthode est l'utilisation de citrate de sodium agissant, à la fois comme agent réducteur et comme agent stabilisant lors de la synthèse, limitant ainsi au maximum le nombre de réactifs. Il est ainsi possible d'obtenir des particules de tailles très variées, monodisperses, avec une forme sphérique. Cette technique présente un autre avantage, à savoir que l'agent stabilisant en surface des nanoparticules (le citrate de sodium) est une molécule facile à éliminer (plasma cleaner) ou à remplacer car de nature organique est liée aux particules par une simple attraction électrostatique.

1.2. Mode opératoire

Comme nous l'avons expliqué précédemment, dans le cadre de notre étude, les nanoparticules d'or utilisées pour la spectroscopie Raman SERS, sont synthétisées selon la méthode « bottom up » de Turkevich et al. (Turkevich et al 1951) dont il existe de nombreuses variantes (Aiken et al 1999; Bönnemann et al 2001; Chu et al. 2009; Lee et al 1982). Cette méthode est basée sur la réduction *in situ* de sels d'or en présence de citrate de sodium. De plus les molécules de citrate et ses dérivés, vont se fixer sur la surface des particules en formation, jouant le rôle de stabilisant et stoppant ainsi la croissance du métal à une échelle nanométrique. En jouant sur le ratio sel métallique/citrate, il est donc possible d'obtenir des nanoparticules de tailles diverses. L'utilisation de citrate de sodium qui agit à la fois comme agent réducteur et comme agent stabilisant lors de la synthèse, limite au maximum le nombre de réactifs et rend cette méthode plus avantageuse. La figure 24 présente le montage à reflux employé pour la synthèse des nanoparticules d'or.

- La verrerie est tout d'abord nettoyée à l'eau régale (HNO_3 1:3 HCl) afin d'éliminer toutes les impuretés qui risqueraient de servir de point de germination et d'agglomération des particules en formation.
- *Synthèse par la voie citrate* : Dans un ballon de 500 mL équipé d'une colonne réfrigérante, 500 ml d'une solution de 0,01% d'acide tétrachloroaurique trihydrate

($\text{HAuCl}_4, 3\text{H}_2\text{O}$) est chauffé à reflux. Lorsque l'ébullition est bien effective, une quantité ajustée d'une solution à 7,5 ml de citrate de sodium ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) à 1% est rajoutée dans le milieu réactionnel. Le mélange est agité magnétiquement à vitesse modérée et chauffé à reflux durant 20 minutes puis refroidi à température ambiante. La solution initialement jaune change progressivement de couleur pour devenir rouge-bordeaux indiquant ainsi la formation de colloïdes d'or.

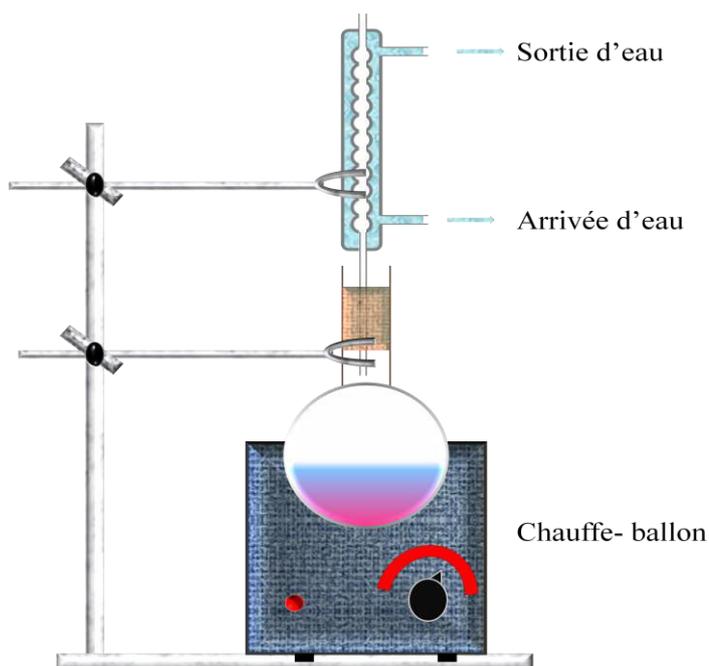


Figure 24 : Montage à reflux utilisé pour la synthèse de nanoparticules.

1.3. Caractérisation des nanoparticules d'or synthétisées

Nous avons utilisé deux méthodes d'analyse pour caractériser la suspension de nanoparticules d'or synthétisées : la microscopie électronique à transmission (TEM) et la spectrométrie d'absorption UV-Visible. Pour amplifier le signal Raman, les nanoparticules obtenues ont été centrifugées pour une durée de 20 min à 8000 tours/min. Ensuite le surnageant a été éliminé et les nanoparticules restantes sont placées quelques minutes dans le bain à ultrasons (Fisherbrand, S-LINE, 37 kHz).

1.4. Elaboration de substrats pour la spectrométrie Raman SERS

Pour les mesures SERS, plusieurs paramètres ont été optimisés pour l'obtention de l'amplification du signal Raman SERS de l'analyte.

- **types de nanoparticules** : bâtonnets ou sphères synthétisées par la méthode NaBH_4 ou la méthode citrate.
- **optimisation des volumes des nanoparticules** : pour optimiser le pourcentage des nanoparticules ajoutées pour l'effet SERS, nous avons essayé les NPs sans centrifugation et après centrifugation (temps, volume, lavage). Les conditions optimales retenues sont : un volume initial de NPs de 1mL centrifugé pendant une durée de 20 min à 8000 tours/min, ensuite l'élimination de 900 μL de surnageant.
- **type de couplage** : couplage par des dépôts de couches successifs (goutte de NPs après séchage + goutte d'analyte + une goutte de NPs) ou couplage par mélange de nanoparticules avec l'analyte avant dépôt sur la lame. Le deuxième couplage est retenu car il nous a permis une bonne amplification due à l'interaction des NPs avec l'analyte.
- **l'analyte en solution ou après séchage** : après chaque mesure en solution, l'analyte exposé au faisceau laser se sèche et la goutte n'est pas stable. Avec le séchage l'échantillon est stable, donc nous avons travaillé avec séchage des gouttes. Nous avons aussi testé la vitesse de séchage de la goutte (changement de la température), le séchage à 37°C s'est révélé optimal parce que nous travaillons avec des enzymes (sensibles à la température).
- **le type de lame utilisée comme support de l'analyte** : sur *lame de verre normale*, la goutte s'étale sur la surface et on obtient une inhomogénéité de la dispersion des nanoparticules. Sur *lame de verre fonctionnalisée* par une molécule hydrophobe (le groupement silane est connu pour réagir avec les groupes hydroxyles présent à la surface du verre et donner les propriétés hydrophobes au substrat) , la fonctionnalisation empêche l'interaction de la solution avec la surface (Cras et al.). Par conséquent, la ségrégation de la surface vis-à-vis de la solution, provoque une grande agrégation des nanoparticules et donc un manque d'homogénéité des nanoparticules

avec l'analyte. *Sur surface d'aluminium* utilisée à la fois comme support et comme substrat métallique, la goutte est plus homogène grâce à l'interaction de l'analyte avec les nanoparticules et de plus cette surface métallique permet la réflexion de la lumière (Figure 25).



Figure 25: Exemple des images microscopique (x50) d'une goutte de solution déposée sur la lame. De gauche à droite : lame de verre normale, lamme de verre fonctionalisée, surface en aluminium.

2. Préparation des solutions:

2.1. Tampon phosphate de potassium

Nous avons préparé la solution tampon pour conserver l'enzyme en réalisant un mélange entre un acide faible et sa base conjuguée. La solution a été tamponnée à un pH égal au pKa du couple. Pour notre cas, nous avons choisi le tampon phosphate de potassium qui ne contient pas de sel parce que la présence du sel dans le tampon va provoquer l'agrégation des nanoparticules lors des mesures SERS.

- **Mode opératoire :**

- Solution I : 0.5L de 1M phosphate de potassium monobasique ($\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$) à $147.18 \text{ g/mol}^{-1}$
- Solution II : 0.5L de 1M phosphate de potassium dibasique ($\text{HK}_2\text{O}_4\text{P}$) à 136.09g/mol^{-1}
- Mélanger 6 mL de solution I ($\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$) à 94 ml de solution II ($\text{HK}_2\text{O}_4\text{P}$). Compléter à 1 L avec de l'eau distillée pour une solution mère de 0.1 M à pH = 8. Nous avons dilué la solution mère avec de l'eau distillée pour obtenir le tampon phosphate à (0.01M) et pH=8 à 25°C.

2.2. Préparation/stockage de la solution de l'ACHE

L'ACHE provenant d'*Electrophorus electricus* (500U / mg) a été achetée auprès de Sigma-Aldrich. Nous avons préparé une solution de cette enzyme dans le tampon phosphate (0.01M, pH=8) comme précédemment décrit. Ensuite le volume de 10 U d'ACHE a été mis dans un micro-tube et conservé à -20°C. Pour une utilisation ultérieure, nous décongelons un micro-tube et nous le diluons dans le tampon.

2.3. Préparation de la solution de l'acétylcholine

L'acétylcholine (ACH) est le neurotransmetteur choisi comme substrat pour la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (ACHE).

L'ACH se trouve à l'état solide sous forme de chlorure d'acétylcholine (ACHCl), bromure d'acétylcholine (ACHBr) ou iodure d'acétylcholine (ACHI).

La molécule de l'ACH peut être obtenue à partir de la dissociation de ces produits dans une solution aqueuse. Cette dissociation permet d'avoir le cation ACH^+ (le même pour tous les produits) qui sera utilisé comme substrat biologique.

Le chlorure d'acétylcholine (ACHCl) a été dissout dans le tampon pour obtenir la solution de l'acétylcholine (ACH). La concentration molaire des solutions a été calculée selon la formule chimique suivante : $C = \frac{n}{V} [M]$; avec n : le nombre de moles et V : volume de solution (L). La solution de l'ACH a été conservée à 4°C durant l'utilisation sachant qu'elle ne peut être conservée plus de 3h.

2.4. Préparation des solutions de pesticides

Les inhibiteurs d'enzyme utilisés dans notre étude sont : le paraoxon et carbaryl ainsi que les matières plastiques.

2.4.1. Paraoxon

L'huile de paraoxon-ethyl utilisée est de pureté $\geq 90\%$ (Figure 26). La dilution de ce pesticide a été faite dans le tampon et conservée à 4°C pendant 6 mois.

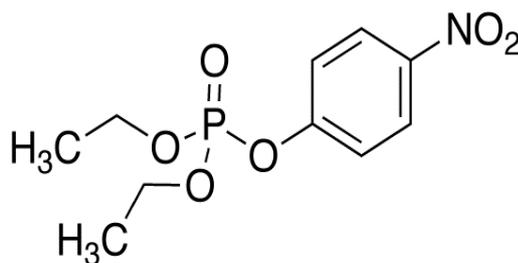


Figure 26 : Structure de la molécule de paraoxon-ethyl

2.4.2. Carbaryl

La solution mère du carbaryl a été obtenue à partir du carbaryl en poudre (Figure 27) dissout dans l'éthanol. Ensuite cette solution a été diluée dans le tampon, la dilution de l'éthanol par dix nous permet d'éliminer son effet sur l'enzyme.

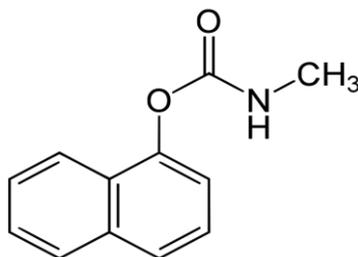


Figure 27 : Structure de la molécule de carbaryl

Les pesticides utilisés et le neurotransmetteur ACH ont été également achetés chez Sigma-Aldrich.

3. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE par la spectroscopie Raman SERS

3.1. L'ACHE non immobilisée

L'activité de l'ACHE est mesurée par la spectrométrie Raman afin de déterminer les conditions optimales requises pour la détection de ces inhibiteurs.

3.1.1. Activité de l'ACHE en absence de pesticides

En absence des inhibiteurs, la molécule de l'acétylcholine se transforme en acide acétique et choline en présence de l'enzyme ACHE, selon la réaction suivante (Figure 28) :

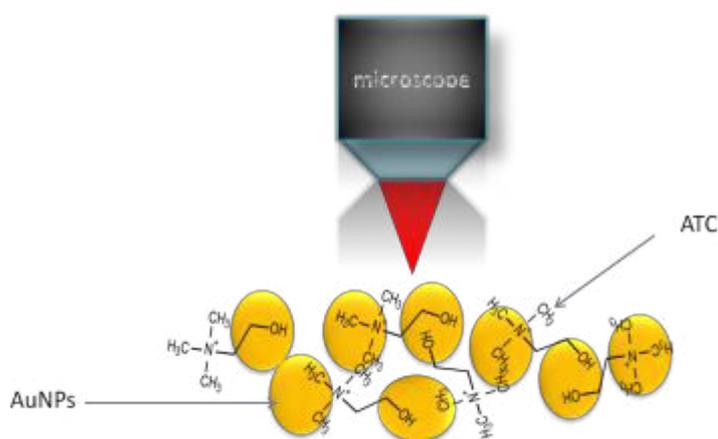


Figure 30 : Schéma de l'expérience SERS sur l'échantillon de l'ACH non transformé par l'ACHE inhibée.

- **Mode opératoire** : 5 μ l de la solution de l'ACHE a été ajouté à 5 μ l de la solution de pesticide. Après inhibition, 5 μ L de 1 mM d'ACH dans PB ont été ajoutés à 5 μ L de ce mélange. Les spectres SERS du mélange résultant ont été enregistrés après addition d'ACH.

3.1.3. Activité de l'ACHE en présence de plastiques avec additifs

Le biocapteur a été testé pour la détection de potentiels inhibiteurs contenus dans les matières plastique. En effet, tous les polymères plastiques utilisés dans la vie de tous les jours contiennent de nombreux additifs mais avec des compositions qui sont rarement connues. Pour ce teste d'inhibition, nous avons mesuré l'activité de l'ACHE en présence des formes suivantes de plastiques :

- Le PE-HD ou polyéthylène à haute densité : plastique très utilisé pour la fabrication des bouteilles de lait. Il a une très bonne compatibilité avec l'usage alimentaire. Le morceau testé dans notre étude est un morceau de récipient de stockage, type bidon transparent.
- Le PEBD ou LDPE : ou polyéthylène basse densité, plus souple que le PEHD, il est utilisé pour emballer les sacs de pain, les aliments congelés, les tasses destinées à contenir des aliments chauds. Les différents échantillons testés ici sont 1) un sachet alimentaire commercial et 2) un film extrudé par le Centre de Transfert et de Technologie du Mans à partir de granules PE pur d'origine bio-sourcée, sans additifs.

- Le PP : encore appelé polypropylène, employé pour les gourdes ou les barquettes plastiques micro-ondables. Il serait compatible pour les usages alimentaires mais il se dégrade au fil du temps et peut relarguer des molécules de dégradation dans les aliments. Les trois PP testés sont des emballages commerciaux domestiques différents (un sachet, une bouteille, un film).

L'enzyme a été incubée avec des morceaux de plastiques, ensuite son activité a été mesurée en ajoutant le neurotransmetteur ACH à cette enzyme. Les mesures par la spectroscopie Raman SERS sont réalisées par la suite.

- **Mode opératoire** : 100 μl de 1 U ml^{-1} d'ACHE a été ajouté à 20 mg de chaque forme de plastiques (PP, PEHD, PE, PELD et PELD-Bio), dans 0,01 M PB (pH 8) 37 ° C, pendant plusieurs jours (0-11j). Ensuite, 5 μL de l'ACH dans PP ont été ajoutés à 5 μL de ce mélange. Les spectres SERS du mélange résultant ont été enregistrés après addition d'ACH.

Remarques : aucune des compositions des polymères d'origine commerciale n'est connue à l'exception du film en PELD bio-sourcé qui est pur, sans aucun additif.

3.2. L'ACHE Immobilisée sur la surface d'or

Les enzymes sont immobilisées en s'appuyant sur des méthodes physico-chimiques de confinement de la biomolécule au sein d'édifices à 2 ou 3 dimensions. Elles doivent être suffisamment stables, tout en conservant leur propriétés structurales; bien entendu, la cinétique, la sélectivité et la réactivité des enzymes peuvent être altérées et donc l'efficacité catalytique également. Avec tout cela, le confinement des biocatalyseurs doit permettre l'accès du substrat au site actif ou au site de reconnaissance de l'enzyme. Diverses techniques d'immobilisation des enzymes ont été développées ces vingt dernières années (Kumar et al. 2009). On distingue plusieurs techniques d'immobilisation des bioéléments sur le transducteur : l'encapsulation, le greffage sur monocouches auto-assemblées, l'adsorption (physisorption), la réticulation, la formation d'un lien covalent et les assemblages supramoléculaires...

Le tableau 9 expose une comparaison entre les principales méthodes d'immobilisation des biorécepteurs utilisées. Nous nous intéresserons à la technique d'immobilisation par couplage covalent pour mettre en œuvre notre biorécepteur. C'est la technique qui permet une forte immobilisation de l'enzyme à faible coût.

Tableau 9 : Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs.

Technique d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Adsorption (liaison réversible)	-Simple -rapide -bon rendement (1g/g)	-désorption possible -perte à chaque lavage
Liaison covalente	-plus stable -Résistance après lavage	-Coût élevé -difficile à mettre en œuvre -irréversibilité de la liaison covalente -faible rendement
Incubation	-simple -protège les propriétés de l'enzyme en cas de gel organique	-dénaturation de l'enzyme pour le gel inorganique -limitation à des substances de faible poids moléculaire -la sensibilité du gel à des agents complexes
Encapsulation	-fiable	-complexe -accessibilité des polluants

L'or est le substrat le plus utilisé pour fabriquer des biocapteurs par auto-assemblage des multicouches ou des monocouches. En effet, les substrats en or possèdent différents avantages :

- Ils permettent une biocompatibilité qui facilite l'allongement de la durée de vie des protéines immobilisées à leur surface.
- Ils possèdent une grande surface spécifique favorisant l'adsorption d'une grande quantité de protéines à la surface.

Grâce à leur conductivité, ils se comportent comme des électrodes. Leurs propriétés physiques et optiques leur permettent d'être utilisés dans différentes techniques analytiques (SPR, QCM). Ils sont aussi souvent utilisés pour augmenter la sensibilité des mesures dans les biocapteurs (SERS).

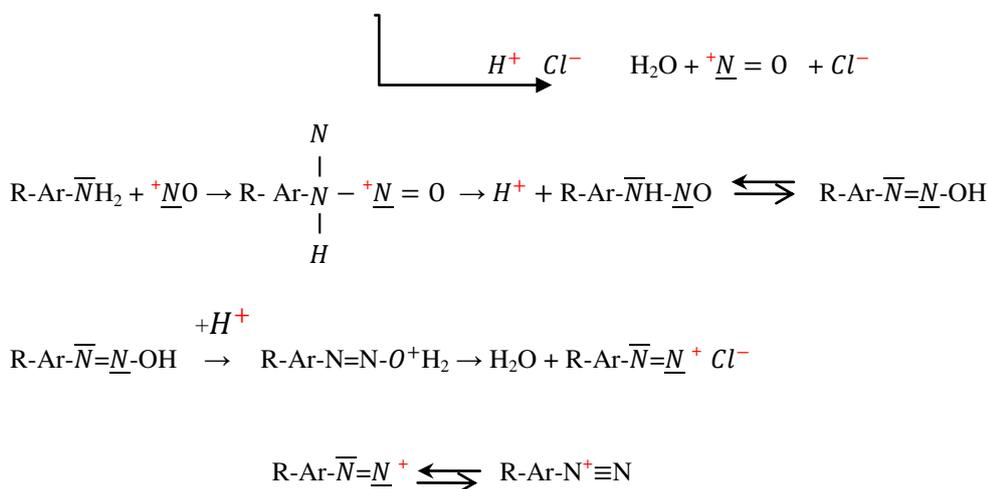
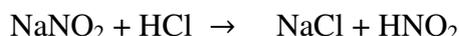
La modification de surface d'or se fait essentiellement par des monocouches autoassemblées (SAM). Une grande partie des SAM formés sur des surfaces d'or se fait avec des thiols car l'or peut former aisément des liaisons covalentes avec des atomes de soufre.

3.2.1. Modification de la surface d'or

La surface d'or a été modifiée en formant une couche active par l'électro-greffage d'une molécule organique sur électrode métallique en or. L'électro-greffage, caractérise une réaction électrochimique permettant la formation d'une couche organique sur la surface conductrice via une liaison covalente (Bélanger and Pinson). Cependant, la surface de l'électrode est modifiée par la formation d'une liaison covalente très résistante avec le radical formé. Il existe une grande variété de voies électrochimiques et de molécules permettant l'électro-greffage (par voie oxydante, réductrice, ..., amine, vinyle, etc.). Nous avons choisi de fonctionnaliser la surface d'or par réduction électrochimique des sels d'aryldiazonium, en nous inspirant des travaux de Kengne-Momo et al. (Kengne-Momo), pour maintenir l'objectif de notre projet, à savoir l'élaboration d'un biocapteur sensible, facile à mettre en œuvre et peu coûteux.

Cette méthode met en jeu le greffage covalent d'un radical d'acide sulfonique à la surface d'or. Ce radical est formé par la réduction électrochimique des sels de diazonium aromatiques en présence de nitrite de sodium, en solution dans d'acide chlorhydrique, selon la réaction suivante (figure 31):

- **Formation des sels aryldiazonium :**



-Formation du Radical par application d'un potentiel réducteur :

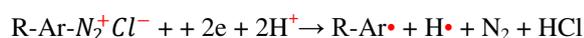


Figure 31 : Préparation et réaction pour l'obtention d'aryles radicalaires à partir d'un composé de type R-Ar-NH₂

Il a été démontré que la modification de l'électrode par une couche organique selon ce procédé se fait de façon irréversible et passive (au sens d'un greffage homogène) (Mathieu et al 2007). Nous avons utilisé une molécule R-Ar-NH₂ ayant pour radical le chlorure de sulfonyle (-SO₂Cl) afin qu'elle puisse se transformer, par la suite, en sel d'aryldiazonium dont le groupement R est réactif à -OH, molécule très réactive avec les enzymes et al 1998). L'activation de la surface Ar-SO₃H en Ar-SO₂Cl, a été réalisée en se basant sur des travaux précédemment effectués au sein du laboratoire de chimie de l'IMMM (Chen et al. 2008; Esnault et al. 2013; Kengne-Momo et al 2011). La formation de cette couche permet la réaction avec l'enzyme et donc la fonctionnalisation de la surface de l'électrode. La figure 32 résume les étapes de la modification de la surface d'or utilisée, pour l'élaboration du biocapteur.

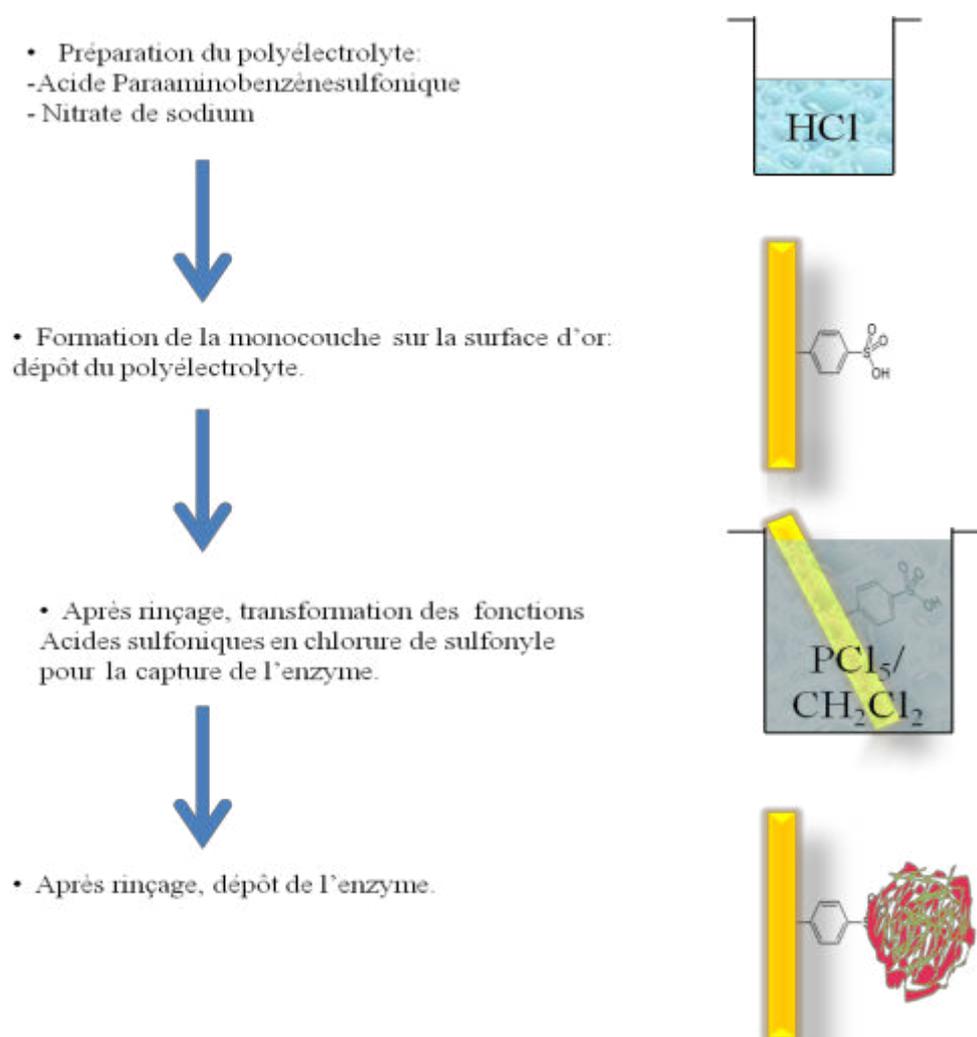


Figure 32: Représentation schématique de la modification de la surface d'or utilisée.

3.2.2. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE

Nous avons développé un biocapteur qui nous permettra la détection de l'activité enzymatique de l'ACHE en solution (en présence et absence des inhibiteurs de l'ACHE), selon la réaction décrite dans la Figure 28. L'ACH est utilisé comme substrat pour mesurer l'activité de l'ACHE par la spectroscopie Raman SERS (Figure 33).

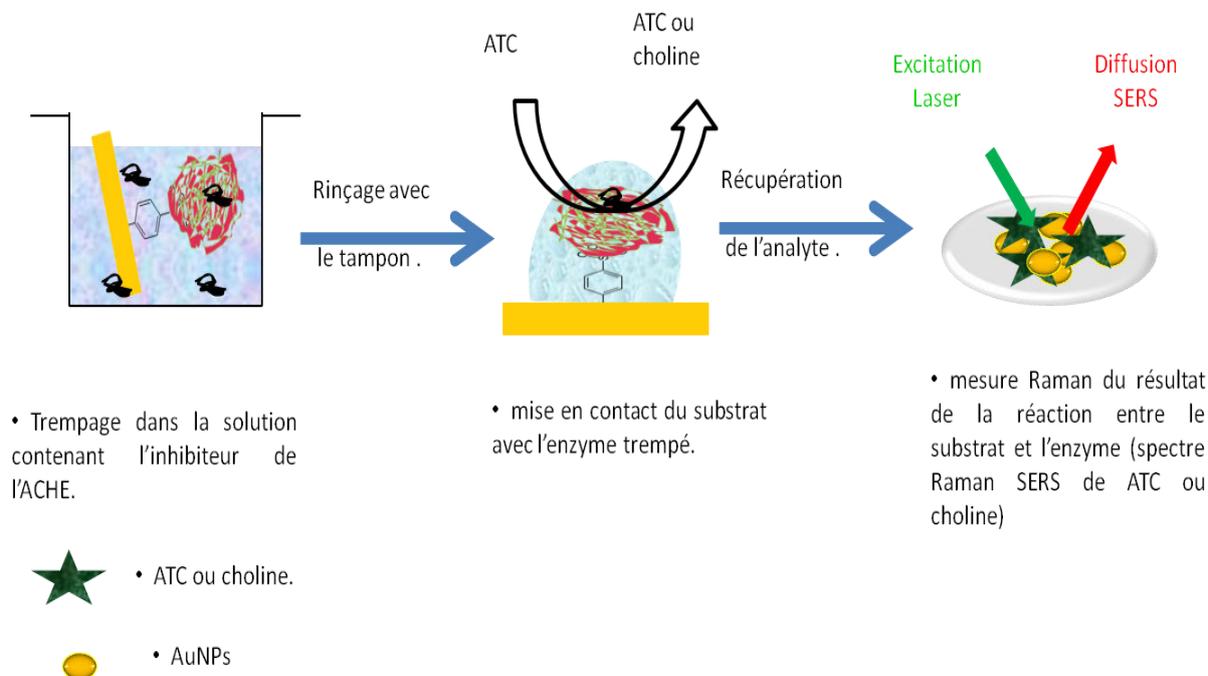


Figure 33: Mesure de l'activité de l'ACHE immobilisée sur la surface d'or en solution.

L'eau utilisée pour la préparation des solutions et pour le nettoyage approprié est de l'eau Milli Q® ultrapure.

- **Mode opératoire :** l'enzyme immobilisée sur la surface d'or est trempée dans 2 ml de la solution de pesticide (pour le cas d'une inhibition) ou conservée dans PP. Ensuite, cette surface est rincée avec du PP, et nous avons ajouté 5 μ L de l'ACH sur cette surface. Après la réaction de l'ACH avec la surface, nous avons récupéré l'analyte pour les mesures Raman SERS (Figure 33).

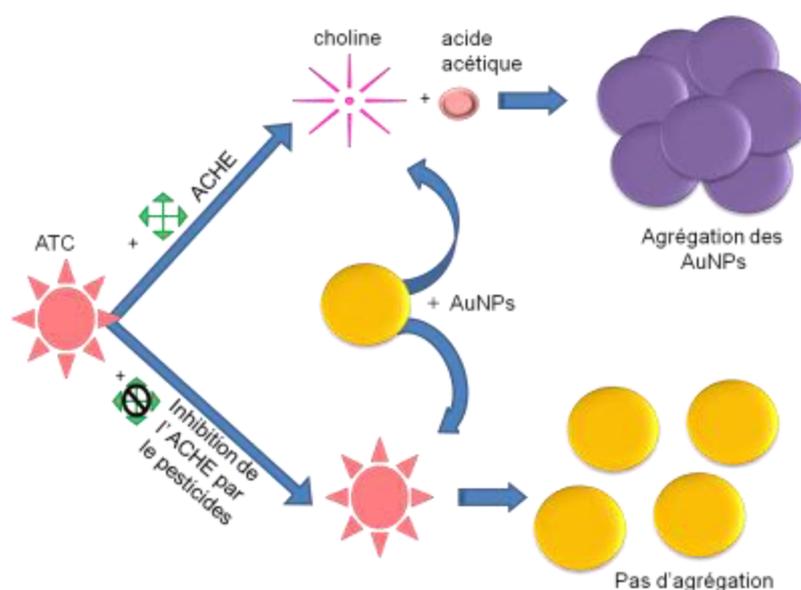
4. Mesure de l'activité de l'ACHE par la diffusion de lumière DDL

Pour cette étude, nous avons utilisé des nanoparticules d'or et argent (20 ; 40 et 80nm), revêtues de citrate dans l'eau, achetées auprès de la société BBI-Solutions (Tableau 10).

Tableau 10. Concentration et potentiel Zeta des nanoparticules utilisées.

Diamètre des particules (nm)	Nombre de particules/ml	Nombre de particules utilisés en suspension/ml	Potentiel Zeta en (mV)
20 (Au)	7.00x10 ¹¹	7x10 ¹¹	-41.4
40 (Au)	9.00x10 ¹⁰	45x10 ⁹	-44.0
80 (Au)	1.10x10 ¹⁰	1.1x10 ⁹	-52.8
Ag 40 et 80	1.10 x 10 ⁹	1.1x10 ⁸	-
Ag 20	7.00 x 10 ¹⁰	7x10 ¹⁰	-

Nous avons étudié l'effet de l'activité enzymatique de l'ACHE sur la stabilité des nanoparticules. Les nanoparticules sont soumises à un phénomène majeur d'instabilité (l'agrégation), susceptible de nous permettre de distinguer les deux cas (absence et présence de paraoxon). Le principe de notre mécanisme de détection est représenté dans la figure 34. Comme le montre ce schéma, en absence d'inhibiteurs, l'ACH ajouté à la solution d'enzyme ACHE a été totalement hydrolysé pour produire de la choline et de l'acide acétique. Lorsque les AuNPs non modifiées sont ajoutées à cet analyte, elles sont instables et s'agrègent en présence de la choline. Mais en présence d'un pesticide tel que le paraoxon, l'activité enzymatique de l'ACHE est bloquée et l'ACH ne peut pas être transformé en choline. Les AuNPs ajoutées ne subissent pas d'agrégation, leur taille reste inchangée. Cette réaction, couplée à la diffusion de lumière (DLS), a été utilisée pour mesurer l'activité de l'ACHE et la détection de pesticides.

**Figure 34 :** L'illustration schématique du biocapteur avec les AuNPs non modifiées.

V. Techniques de caractérisation.

Ces travaux sont essentiellement basés sur l'utilisation de la spectroscopie Raman. Nous avons utilisé d'autres techniques pour caractériser les nanoparticules comme la diffusion dynamique de la lumière, la spectrométrie d'absorption UV-Visible, la microscopie électronique en transmission (MET) et la Microbalance à Cristal de quartz pour la fonctionnalisation de la surface d'or.

1. Spectrométrie Raman

Le spectromètre Raman utilisé pour la partie expérimentale de cette étude est un modèle Xplora™ commercialisé par la société Horiba – Jobin Yvon (figure 35). Ce spectromètre micro-Raman est équipé d'une platine motorisée assurant un déplacement dans le plan (x, y) avec une précision micrométrique, une lampe blanche pour l'éclairage en transmission et réflexion et une caméra pour faciliter l'observation.

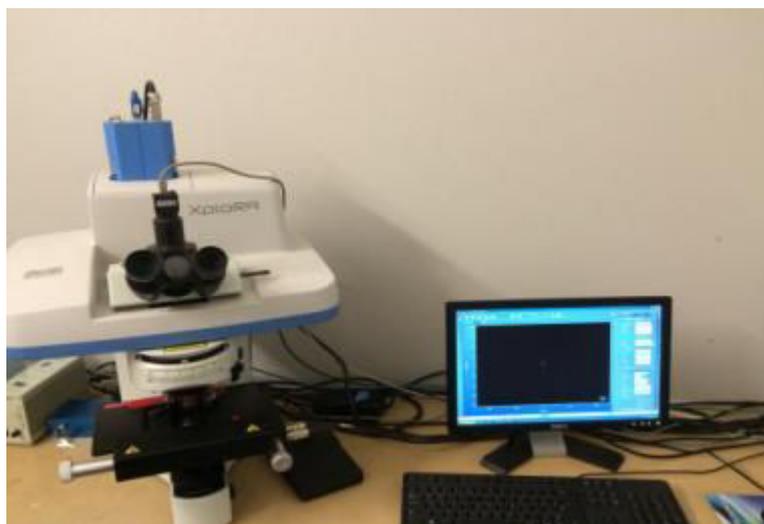


Figure 35 : Spectromètre Raman utilisé pour la partie expérimentale de cette étude.

L'excitation et la collection du signal Raman sont réalisées dans le domaine visible entre 100 à 3500 cm^{-1} . Le spectromètre dispose de trois diodes laser à une longueur d'onde de 532 nm, 638 nm ou 785 nm. Le faisceau laser est guidé par le système optique jusqu'à l'échantillon, en traversant la roue à filtres pour densités neutres à 6 positions (0.1 ; 1 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100%) qui est contrôlée par le logiciel « Labspec6 ». Ces filtres permettent l'ajustement de l'intensité parvenant à l'échantillon. Le microscope confocal focalise le spot

laser incident sur la surface de l'échantillon, via l'objectif approprié (trois objectifs de microscope : x10, x50, x100) permettant à la fois de focaliser le laser sur l'échantillon et de collecter la lumière diffusée. Ensuite les photons diffusés sont dirigés vers un système optique permettant de distinguer la diffusion Raman de la diffusion Rayleigh à travers un filtre « Edge ». Les photons ainsi diffusés entrent dans le monochromateur par une fente/trou dont l'ajustement permet de régler le volume focal analysé et d'affiner la résolution spectrale.

Après dispersion spectrale du signal, au moyen d'un réseau holographique (à 600, 1200, 1800 ou 2400 traits/mm), la détection est alors assurée par un détecteur de type CCD 1024x256, refroidi par Peltier à air et contrôlé par USB. Un système d'alignement automatique permet l'alignement optimal du dispositif à chaque changement de configuration. Finalement, l'acquisition et l'exploitation des spectres sont réalisées avec le logiciel Labspec 6 (Jobin-Yvon Horiba)

- **Protocole de l'analyse spectroscopique :**

Tous les spectres Raman et SERS présentés dans ce travail ont été enregistrés selon les paramètres d'acquisition suivants : ouverture du trou confocal à 100 μ m ; réseau 600 traits/mm ; puissance laser à l'échantillon d'environ 4mW ; objectif x50 ; soit une résolution spatiale de 1 μ m et une résolution spectrale de 4 cm^{-1} pour une longueur d'onde d'excitation de 638nm respectivement.

Pour collecter les spectres SERS, 2 μ l de la solution d'analyte et 2 μ l de solution AuNPs ont été mélangés avant le dépôt sur une lame en aluminium. Pour toutes les analyses, les spectres SERS ont été acquis à 5 positions différentes. Les spectres ont été enregistrés avec le temps d'acquisition de 6 s avec 5 accumulations. Ces conditions d'acquisition ont été optimisées afin d'éviter la dégradation de l'échantillon. Pour l'analyse statistique (analyse en composantes principales), le logiciel Unscrambler® X a été utilisé.

Le protocole d'échantillonnage pour l'étude des SERS est le suivant :

Une goutte de 5 μ L de la solution est déposée sur une lame en aluminium. Ce substrat sert de miroir afin de collecter davantage de lumière diffusée en provenance de l'échantillon. La surface étant un peu hydrophobe, ceci permet de former une goutte localisée et d'éviter ainsi une adsorption trop rapide des molécules à la surface du substrat. Dans notre cas, grâce à cette hydrophobicité, plutôt que s'étaler sur la surface, la solution va former une goutte dans

laquelle il sera plus aisé de focaliser le faisceau laser. Par ailleurs, avec une goutte bien formée, il est possible d'obtenir un volume de solution suffisant pour l'analyse avec un minimum de suspension (5 μL). Pour focaliser le laser dans cette goutte, un objectif x50 longue distance de travail est utilisé. Sa grande distance focale lui permet de rester à une distance suffisante de la goutte d'échantillon pour une grande facilité d'expérimentation.

2. Diffusion dynamique de la lumière (DDL)

Les techniques de diffusion de la lumière sont des techniques d'analyse spectroscopique non destructives, très répandues dans le domaine de la physico-chimie car elles permettent d'extraire une grande variété de données caractéristiques du système étudié et ici plus précisément, elles permettent d'accéder à la taille de particules en suspension dans un liquide de 1 à 500 nm. Le principe de base est simple: L'échantillon est éclairé par un faisceau laser, le champ électrique de l'onde incidente interagit avec le nuage électronique des molécules en provoquant la polarisation oscillante des électrons qui se comportent alors comme des sources secondaires qui émettent une radiation lumineuse diffusée (Schurr). Cette lumière diffusée, détectée à un angle de diffusion θ , va être mesurée en fonction du temps et définie par un détecteur de photons rapide (Figure 36).

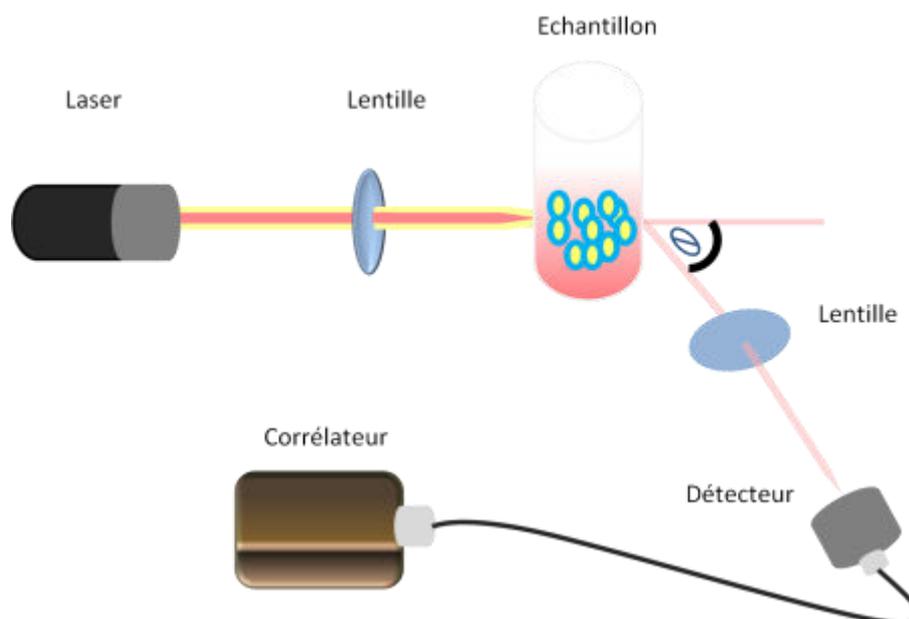


Figure 36 : Principe de la diffraction Laser

La variation de l'intensité diffusée dans le temps vient du fait que les particules dans un liquide sont soumises au mouvement brownien dû à l'agitation thermique. Ce mouvement Brownien des particules modifie les interférences entre les ondes diffusées par chaque particule. Cette variation sera différente selon la taille des particules puisqu'une petite particule bouge plus vite qu'une grosse (Morrison, et al. 2002). La comparaison entre l'intensité du signal à temps t avec l'intensité d'un temps $(t + \delta t)$, nous permet de calculer la fonction de corrélation. L'exemple illustre bien cette corrélation : plus les particules sont petites, plus leur fonction de corrélation diminue rapidement (Figure 37).

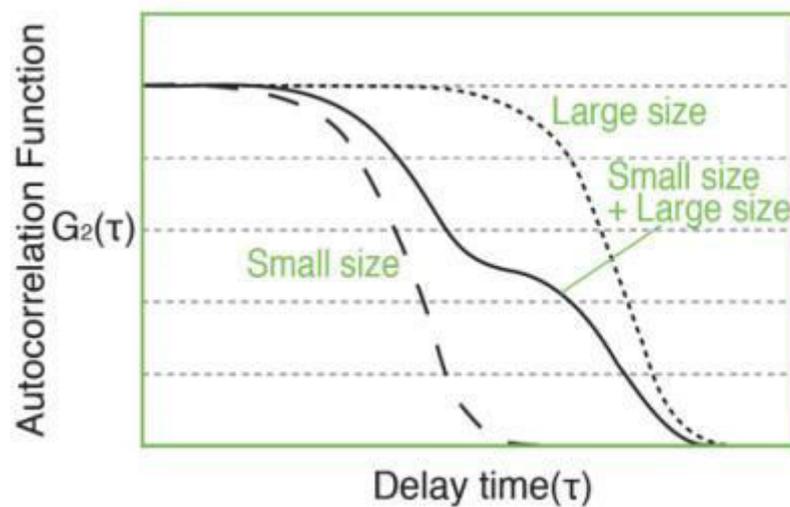


Figure 37: La fonction d'auto-corrélation pour des nanoparticules de différents diamètres (Saint-Petersburg State University and Center for optical and laser materials research).

La taille des particules est donnée en termes de diamètre hydrodynamique: le diamètre d'une sphère ayant le même coefficient de diffusion translationnel que celui de la particule. Ce diamètre est calculé par la relation de Stokes-Einstein, qui est donnée ci-dessous dans sa forme la plus couramment employée dans l'analyse granulométrique.

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Avec :

- k_B : constante de Boltzmann
- η : est la viscosité dynamique

- T : température absolue ($T = D_t \cdot q^2 = D_t \cdot \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$; n : indice de réfraction; θ : l'angle entre le laser et le photomultiplicateur).
- D_t : le coefficient de diffusion translationnel, mesuré à partir de la fonction de corrélation ($G(t) = \exp(-T \cdot t)$) par diffusion dynamique de la lumière .

Nous avons utilisé un équipement Malvern ZetaSizer Nano S (Malvern Instruments), pour mesurer la taille des nanoparticules. Le système utilise un laser à gaz He-Ne polarisé verticalement (longueur d'onde 633 nm dans le vide). La puissance du laser peut être atténuée, par des filtres gris neutre à 11 niveaux différents d'intensité, de sorte que l'atténuateur puisse augmenter ou diminuer la lumière qui traverse l'échantillon, afin d'ajuster l'intensité lumineuse diffusée par ce dernier. Deux positions du détecteur sont possibles dans la série Zetasizer Nano, soit un angle de 173° soit de 90° par rapport à la direction de l'onde incidente. Nous avons travaillé avec l'angle de 173° .

Le porte-échantillon comporte un élément de Peltier utilisé pour maintenir la température de l'échantillon à une valeur fixe entre 0°C et 120°C (25°C dans notre cas). Des cuvettes jetables en polystyrène de dimensions 10 x 10 x 45 mm (Cuve macro en PMMA, Plastibrand) sont utilisées pour les mesures. Le volume d'échantillon par mesure est d'environ 1 ml, et la durée de l'équilibration de la température est de 2 min.

Après la préparation des nanoparticules, la dilution a été faite par le tampon pour obtenir le même volume final de 1 ml.

3. Electrochimie

La voltamétrie cyclique à trois électrodes est, la technique électrochimique, utilisée au cours de notre travail pour l'électro-greffage. Cette technique nécessite de contrôler le potentiel appliqué et de mesurer le courant résultant. Dans un système à trois électrodes, l'électrode de travail (ET) est celle sur laquelle on applique une différence de potentiel (ddp) et par conséquent où auront lieu les réactions électrochimiques. La ddp est appliquée par rapport à une électrode de référence (ER) (dans notre cas Ag/AgCl) permettant alors de contrôler constamment le potentiel au cours des différentes expériences. Ceci est difficile avec un système à deux électrodes car le fait d'imposer une tension et de mesurer un courant entre ces mêmes électrodes va engendrer une chute ohmique. Le courant arrivant sur l'électrode de travail suite à l'application de la ddp est mesuré via une contre-électrode (CE) inerte (platine)

(figure 38). Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé un quartz recouvert d'un film d'or, comme électrode de travail, pour les expériences de QCM, à usage unique.

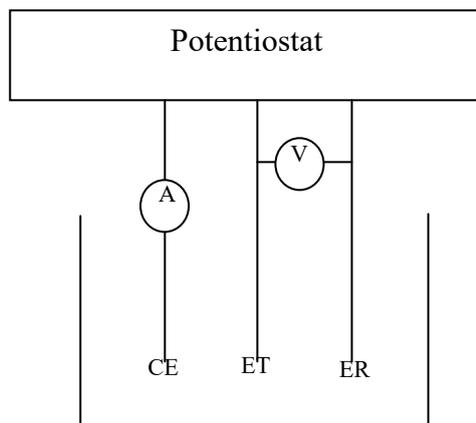


Figure 38: Montage d'une cellule électrochimique à 3 électrodes connectée sur un potentiostat.

Les mesures de voltammétrie cyclique (VC), ont été réalisées avec un potentiostat EG&PAR modèle VMP2/Z-40 piloté par le logiciel EC-Lab V9.2, relié à une cellule thermostatée à trois électrodes; une électrode de référence (fil d'argent plongé dans un compartiment isolé contenant une solution de nitrate d'argent 0,1 M et un compartiment inférieur comportant l'acétonitrile Ag/AgCl), une électrode auxiliaire en platine et une électrode de travail d'un cristal de quartz ACHut 9 MHz recouvert d'or.

4. Autres techniques

4.1. Spectrométries d'absorption UV-Visible

La spectrométrie d'absorption UV-Visible nous a permis de caractériser les nanoparticules synthétisées grâce à leur bande résonance plasmon. Le spectromètre UV-Visible utilisé est un Carry 50 bio travaillant sur une gamme de longueurs d'ondes de 300 à 700 nm.

4.2. Microscopie électronique en transmission (MET)

La taille et la forme des nanoparticules ont été déterminées par l'utilisation d'un microscope électronique en transmission de type microscope JEOL 2100 HR. La résolution point à point peut atteindre 0,23nm. Les échantillons étaient supportés par une grille de cuivre recouvert de carbone.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la méthode d'élaboration des nanoparticules d'or, la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE et sa manipulation par la spectroscopie Raman SERS pour la détection de ces inhibiteurs. Nous avons exposé la méthode de fonctionnalisation de la surface d'or dans le but de développer un biocapteur pour la détection des pesticides ainsi que la méthode de détection de paraoxon par la diffusion dynamique de la lumière par mesure de l'activité de l'ACHE. Ce chapitre a permis de présenter également toutes les techniques utilisées au cours de nos travaux.

Partie C
RESULTATS ET
DISCUSSIONS

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus pour l'élaboration d'un biocapteur par un nouveau procédé, basé sur la spectroscopie Raman exaltée de surface. Le biocapteur est utilisé pour la détection qualitative et quantitative des pesticides en mesurant l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (ACHE). Pour cette raison nous présentons également les résultats obtenus pour la synthèse des nanoparticules d'or (AuNPs), qui ont été utilisés comme substrats SERS.

VI. Biocapteur optique basé sur le Raman SERS et ACHE non immobilisée

Afin de tester notre protocole, nous avons commencé avec les enzymes ACHE sans immobilisation. Dans un premier temps, l'amplification du signal Raman des molécules individuelles par les nanoparticules synthétisées a été vérifiée, en s'assurant que ces nanoparticules ont bien les propriétés plasmoniques nécessaires pour l'effet SERS. Ensuite la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE a été effectuée pour optimiser le protocole expérimental. Nous nous sommes basés sur ce procédé pour la détection des pesticides.

1. Caractérisation des nanoparticules d'or par TEM et UV-visible

Pour étudier les spectres Raman, et en particulier l'utilisation de l'effet SERS pour la détection des pesticides, nous avons travaillé initialement sur trois types de nanoparticules d'or : une première série obtenue par la méthode NaBH_4 (Brust), avec des nanoparticules de différents diamètres, une deuxième série (avec des nanoparticules sous forme de nanobâtonnet (deux bandes d'absorption UV-visibles) et une troisième série (la méthode de Turkevich) où leur diamètre avoisinait les 15 nm .

Nous avons constaté que pour obtenir de bons résultats SERS, la taille des nanoparticules joue un rôle important ainsi que le type de surfactant. En particulier, nous avons rapidement éliminé la première et la deuxième série à cause de l'excès en bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), malgré les tentatives de purification (centrifugation et lavage), ces dernières ne donnant pas les fortes exaltations recherchées. C'est pour cette raison que tous les résultats présentés dans cette partie concernant l'exaltation du signal

Raman (SERS) sont obtenus en utilisant des nanoparticules d'or synthétisées par la méthode de Turkzvich.

L'image obtenue par microscopie électronique à transmission (MET) des NPs non fonctionnalisées est présentée dans la figure 39.

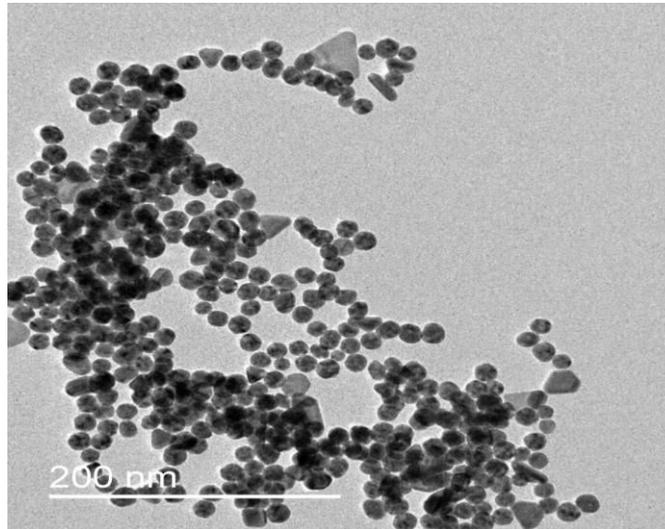
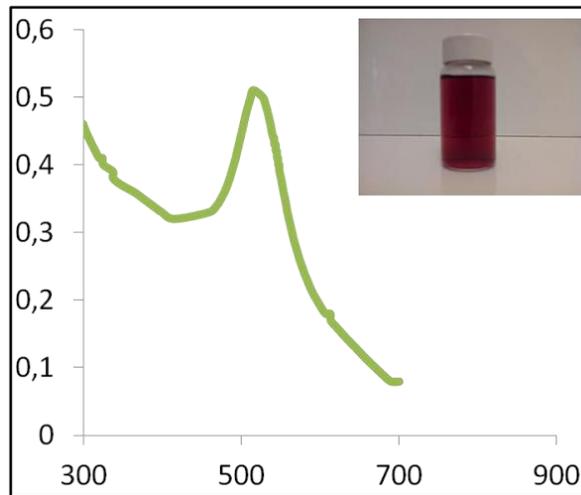


Figure 39 : Image de microscopie (MET).

La figure 39 montre l'image (MET) des NPs d'or, préparées par la voie citrate. Ces images nous permettent de mesurer la taille moyenne ainsi que la polydispersité en taille des AuNPs préparées. Les nanoparticules sont sphériques (légèrement facettées), d'une taille moyenne d'environ 15 nm de diamètre.

Nous avons aussi effectué une analyse par spectroscopie UV-visible (Figure 40), qui est une technique de choix pour l'étude des dispersions aqueuses de nanoparticules d'or, due à la bande de résonance plasmon de surface (SPR). Cette bande est sensible à la taille, à la forme et à l'environnement local des nanoparticules d'or (Moore et al 2006; Peng Wang et al. 2010).

Le spectre d'absorption UV-visible obtenu est caractéristique de la dispersion de nanoparticules d'or dans une solution aqueuse de phosphate de potassium à 0.01M. Le spectre a été réalisé à température ambiante. Les AuNPs présentent en solution, une bande de résonance plasmon de surface intense avec un maximum à ~516 nm, qui est caractéristique des nanoparticules d'or sphériques, dispersées individuellement dans une gamme de taille de 3 à 50 nm (Jain et al 2007).



La figure 40 : Le spectre UV-visible des NPs sphériques dans une solution aqueuse de PP (0.01M).

Il apparaît donc que la synthèse par réduction chimique permet d'obtenir une solution de nanoparticules d'or en grande quantité dont la morphologie est assez bien maîtrisée. En effet, les images TEM et le spectre d'absorption dans l'UV-visible sont concordants et permettent de confirmer la distribution en taille et la morphologie des nanoparticules d'or ainsi que la position de leur bande de résonance plasmon de surface.

2. Diffusion Raman Exaltée de Surface (SERS) : Détection directe des pesticides

L'exaltation des signaux Raman des paraoxon et carbaryl comme pesticides a été évaluée afin de quantifier le potentiel SERS des nanoparticules synthétisées. Ce protocole pourrait constituer une méthode alternative directe pour la détection des pesticides directement sans passer par la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE ni par une fonctionnalisation de ces dernières.

2.1 Détection du carbaryl

Pour détecter les pesticides directement par la diffusion Raman exaltée de surface, à faible concentration, nous avons utilisé les nanoparticules d'or sans aucune modification. Les échantillons ont été préparés en déposant des nanoparticules d'or mélangées avec différentes concentrations de pesticides, sur une surface d'aluminium. Les gouttes sont laissées à sécher avant les mesures Raman. Le spectre Raman de carbaryl en poudre et le

spectre Raman SERS, que nous avons obtenus pour ce pesticide en solution dans le phosphate de potassium (0.01M), sont représentés dans la figure 41. Ces spectres sont en bon accord avec la littérature (Fan, Lai, Barbara A Rasco, et al.; Qu et al.; X. T. Wang et al.) et montrent un pic à 1576 cm^{-1} attribué à l'élongation de la liaison C-C, les modes d'oscillation du C-H à 1432 cm^{-1} , vibrations symétriques de cycle à 1374 cm^{-1} et les vibrations de la liaison C-C à basse fréquence à $464, 546\text{ cm}^{-1}$.

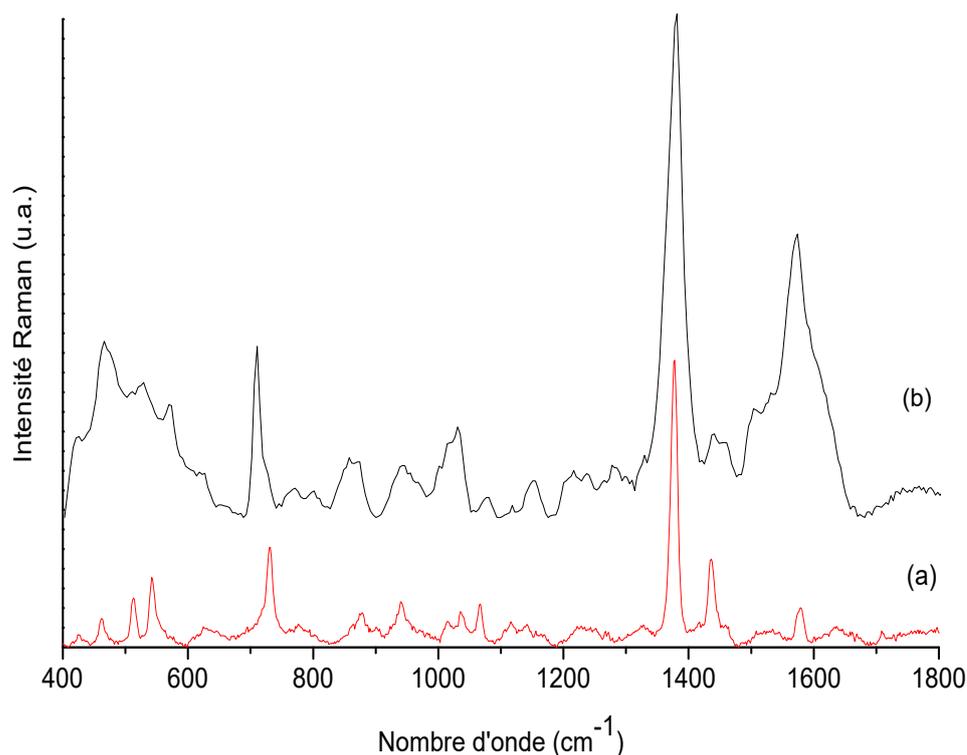


Figure 41 : (a) Spectres diffusion Raman du carbaryl en poudre et (b) le spectre de diffusion Raman SERS de carbaryl en solution (10^{-4} M) dans PP (0.01M). Paramètres d'acquisition: $\lambda = 638\text{ nm}$ et temps d'acquisition 6s.

Les nanoparticules d'or nous ont donc permis, avec un protocole très simple, la détection de Carbaryl, par la diffusion Raman SERS, à une concentration de 10^{-1} mM . Ce même substrat SERS-actif a été utilisé pour la détection de Carbaryl à différentes concentrations. La figure 42 représente la diminution de l'intensité du spectre diffusion Raman SERS du Carbaryl avec la diminution de la concentration de celui-ci. La limite de détection de cet inhibiteur pourrait être inférieure ou égale à 10^{-4} mM . Cette valeur est comparable avec les résultats des autres recherches : 10^{-4} mM (X. T. Wang et al.; Qu et al.) sachant que nos nanoparticules d'or sont utilisées sans aucune modification.

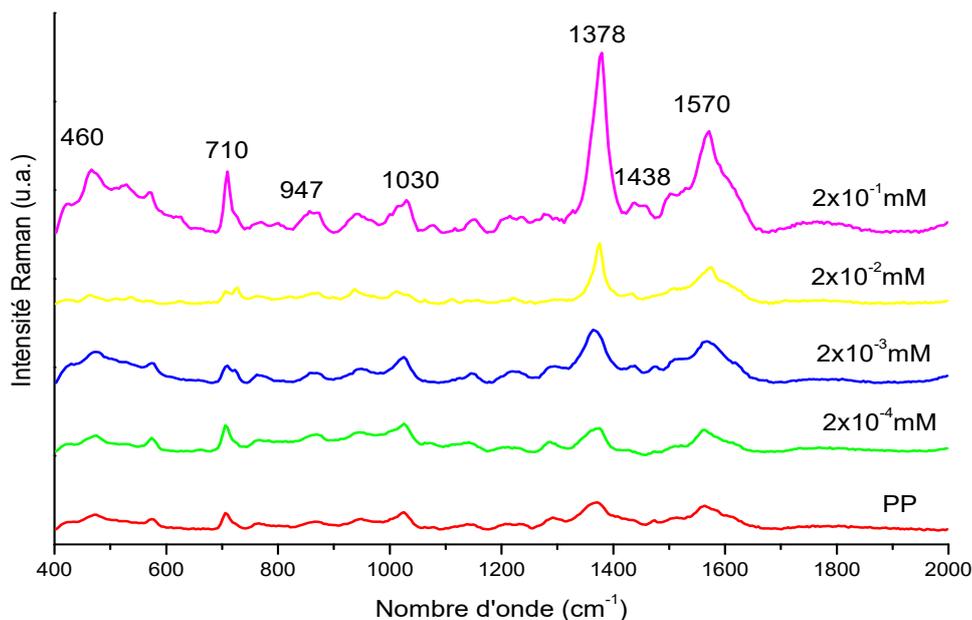


Figure 42 : spectres de diffusion Raman SERS de carbaryl en solution, à différentes concentrations (2×10^{-4} - 2×10^{-1} mM), et le spectre de diffusion Raman SERS de PP (0.01M).

2.2 Détection du Paraoxon

Le spectre Raman de paraoxon pur (sous forme liquide) a été enregistré pour servir de comparatif aux spectres SERS de ce pesticide. La figure 43 présente le spectre de diffusion Raman SERS du paraoxon comparé avec le spectre Raman du paraoxon pur (huile), avec l'excitation de 638 nm pour une région spectrale comprise entre 400 à 1800 cm^{-1} .

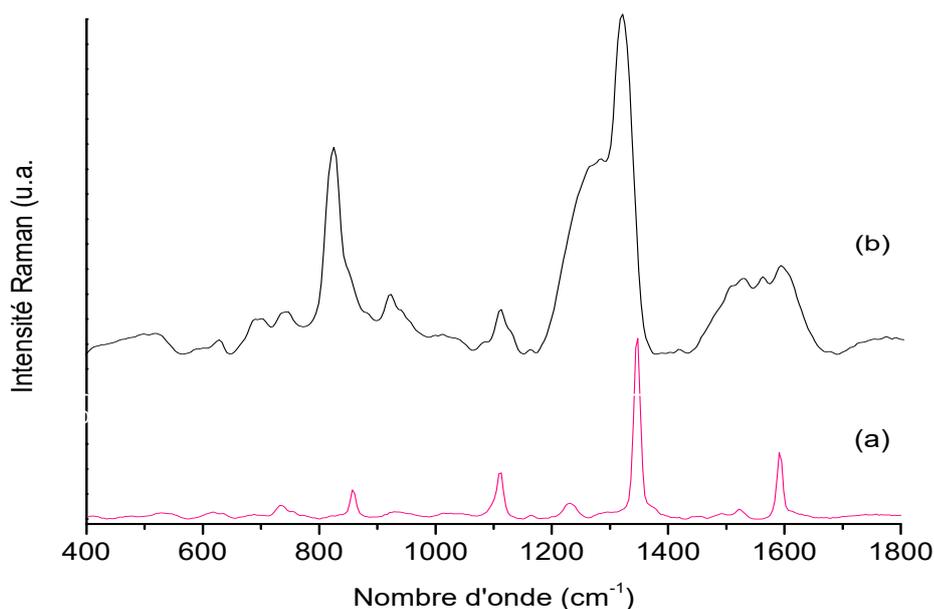


Figure 43 : (a) : Spectre Raman du paraoxon pur et (b) : spectre SERS de paraoxon (10^{-6} M).

Le spectre Raman de la solution de paraoxon pur reporté en figure 43 est similaire au spectre Raman reporté dans la littérature (Wang et al.; P. Li et al.). En effet, en plus des bandes de vibration du groupement phényl à 1592 cm^{-1} et l'élongation asymétrique de NO_2 à 1524 cm^{-1} , nous pouvons observer les bandes à 1448, 1348, 1231, 1164, 1110, 857, 732 et 629 cm^{-1} (tableau 11). Les mêmes bandes se retrouvent dans le spectre Raman SERS de paraoxon (figure 43). La différence marquée entre les positions des bandes dans le spectre Raman et le spectre Raman SERS du paraoxon est due à l'interaction de la molécule avec les nanoparticules d'or (P. Li et al. 2014b; Wang et al 2014). L'adsorption de l'analyte sur les NPs métalliques peut entraîner une modification du spectre.

Tableau 11: Interprétation du spectre Raman du paraxon (Fathi et al.).

Déplacement Raman (cm^{-1})	Mode de vibration
619	vibration or du plant
636	NO_2 élongation symétrique, CC déformation
732	NO_2 élongation symétrique, CC déformation
857	NO_2 élongation symétrique (Ar- NO_2)
1110	C-H déformation (dans le plan)/ NO_2 élongation asymétrique
1164	C-H déformation (dans le plan)/ NO_2 élongation asymétrique, vibration dans le plan du para-nitrophenol + translation (C14, C12 -H) + élongation (C15,C13-H) + T(O-C14 ou 12-C15 ou 13 -H)
1231	P=O élongation
1348	élongation symétrique NO_2
1448	déformation du cycle
1524	élongation asymmetrique NO_2
1592	vibration du cycle Phenyl

Comme le montre la figure 43, l'utilisation des nanoparticules d'or sans aucune modification, permet une bonne capacité d'amplification du signal Raman de pesticides. La limite de détection est de $1 \times 10^{-7}\text{ M}$, sans aucune modification des nanoparticules d'or. Celle-ci est comparable avec les résultats des autres recherches: 96 nM (P. Li et al., "Polystyrene/Ag Nanoparticles as Dynamic Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates for Sensitive Detection of Organophosphorus Pesticides"), 0.5 nM (Wang et al 2014) et 10 nM (Fathi et al.).

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, la toxicité aiguë des pesticides résultant d'un usage à dose importante est connue. En Europe, les valeurs limites des pesticides dans l'eau destinée à la consommation sont fixées par le décret 2001- 1220 du 20 décembre 2001. Les références de qualité applicables aux eaux destinées à la consommation humaine sont les suivantes : 0,1 $\mu\text{g/l}$ par substance individualisée, voir moins (0.03 $\mu\text{g/l}$) pour un résidu

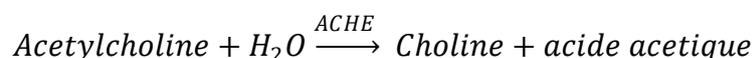
particulièrement toxique et 0,5 µg/l pour le total des pesticides quantifiés. Ces seuils s'appliquent aux eaux destinées à la consommation humaine et non aux eaux brutes, pour lesquelles les seuils sont de 2 µg par substance et 5µg pour le total (OMS, “Normes de l’OMS Sur L’eau Potable”). Une proposition de modification visant à adapter les seuils de référence a été proposée (Sénat).

Cette étude préliminaire nous a donc permis de démontrer que l’utilisation des nanoparticules d’or pour la détection directe des pesticides était réalisable. Cette étude a ainsi évalué les limites de détections de ces insecticides à 1×10^{-7} M pour le paraoxon, ce qui correspond à 28 µg/L (valeur supérieure à la valeur fixée par l’OMS) et 1×10^{-7} M pour le carabaryl qui correspond à 0.5 µg/L (valeur comparable à celles fixées par l’OMS).

La détection directe des pesticides par la spectroscopie de diffusion Raman SERS des pesticides est possible mais la quantification reste propre à chaque pesticide et pour atteindre des limites de détection faibles (convenables) la surface SERS-active doit être modifiée selon la molécule cible. Dans la suite de ce travail nous avons privilégié une détection non ciblée via la mesure de l’activité enzymatique de l’ACHE.

3. Détection des inhibiteurs de l’ACHE par mesure de son activité enzymatique couplée à la spectroscopie Raman SERS.

Pour connaître l’activité d’une enzyme, on peut suivre la réaction qu’elle provoque. Par exemple, le suivi de la transformation du substrat de cette enzyme (ACH dans notre cas) ou encore la formation du produit (choline). La réaction enzymatique de l’ACHE est la suivante :



3.1 Détection de l’ACH.

Pour l’optimisation de notre protocole expérimental, l’amplification du signal Raman de l’ACH utilisé comme substrat de l’ACHE a été d’abord effectuée. Les figures suivantes représentent le spectre Raman de l’*iodure de l’acétylcholine* (ACHCl) poudre et le spectre de diffusion Raman SERS de l’ACH (10^{-6} M) en PP (0.01 M).

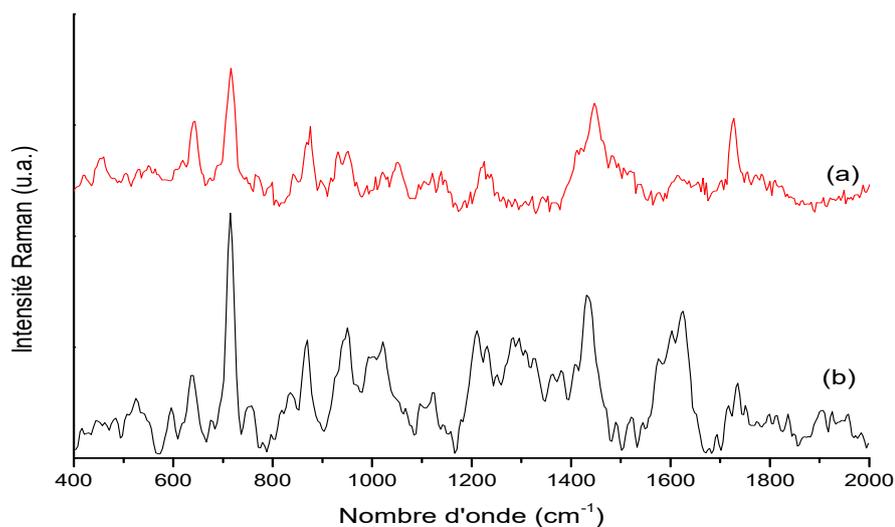


Figure 44: Spectre Raman de l'iodure de l'acétylcholine (a) et spectre SERS de ACH (10^{-3} M) (b).

Le spectre de diffusion Raman SERS de la solution de l'ACH dans le PP, reporté en figure 44 est similaire au spectre Raman de ACHCl. Les bandes à 639 cm^{-1} et 1735 cm^{-1} correspondent aux vibrations du groupement acide acétique de la molécule d'ACH, nous observons également des bandes à $714, 865, 950, 1267, 1164, 1438\text{ cm}^{-1}$ caractéristiques des vibrations du groupement choline de cette molécule (tableau 12).

Tableau 12. Interprétation du spectre Raman de l'ACH (De Cheveigne et al.; Siek et al.).

Déplacement Raman (cm-1)	Modes de vibrations
639	C-C déformation (groupement acide acétique)
714	N-C4 élongation tétraédrique symétrique
865	N-(CH ₃) ₃ élongation symétrique
950	déformation(CH ₃)N/ élongation (C-N)
1267	translation du groupe méthyle
1438	mouvement de déformation symétrique
1736	C=O déformation (groupement acide acétique)

Les spectres SERS de l'ACH dans une gamme de concentration allant de 10^{-3} M à 10^{-15} M, mélangée à une solution de colloïdes d'or sont présentés à la figure 45. Les bandes de vibration caractéristiques de cette molécule sont notamment celles situées à $639, 714, 1736\text{ cm}^{-1}$ (Tableau 12). Evidemment, lorsque la concentration de l'ACH diminue, le signal

SERS correspondant diminue également. Notre limite de détection correspond à une concentration de 10^{-11} M.

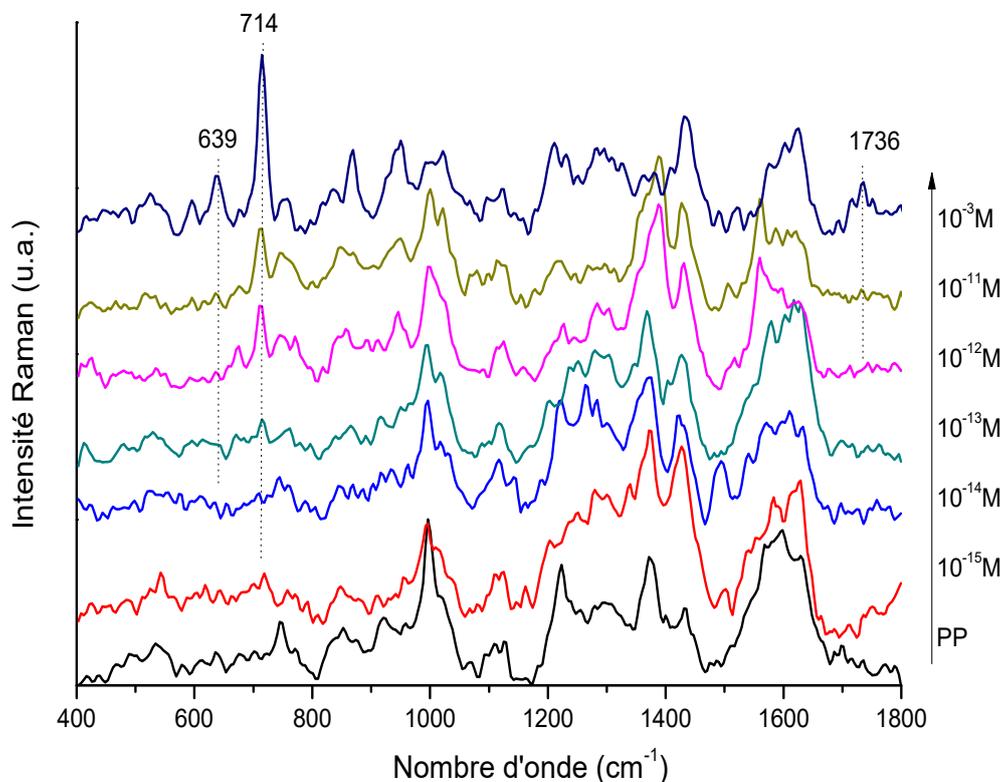


Figure 45 : Spectres SERS de solutions de l'ACH de concentration 10^{-3} M à 10^{-15} M.

Ces différents résultats montrent la possibilité d'amplifier le signal Raman du neurotransmetteur dans PP, avec les nanoparticules d'or sans modification. Ce qui permettra dans la suite le suivi de la réaction de l'activité enzymatique de l'ACHE. Cette amplification peut être utilisée aussi en biologique pour la détection des neurotransmetteurs à très faible concentration, par exemple.

3.2. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE en absence de pesticides

Notre objectif est de mettre en place un protocole de détection de tous les inhibiteurs (organophosphorés, carbamates ...) de l'ACHE en manipulant son activité par la spectroscopie de diffusion Raman SERS. Par exemple, le paraoxon est un agent neurotoxique qui inhibe irréversiblement l'enzyme, tandis que le carbaryl est un inhibiteur

réversible de l'ACHE. Les pesticides organophosphorés forment des complexes très stables avec l'ACHE, alors que dans le cas des carbamates, l'ACHE est facilement réactivée.

Nous avons commencé par l'analyse de l'activité de l'ACHE par spectroscopie Raman SERS (en absence des inhibiteurs) afin d'évaluer ses propriétés catalytiques et d'optimiser les conditions de détection de cette inhibition. En absence d'inhibiteurs, l'ACHE catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en acide acétique et choline. En effet, en présence de l'ACHE, l'ACH est totalement transformé en choline et acide acétique. La figure 46 représente la superposition des spectres de diffusion Raman SERS de : la choline produite par hydrolyse de l'acétylcholine en présence de l'enzyme ACHE ; l'acétylcholine et l'ACHE.

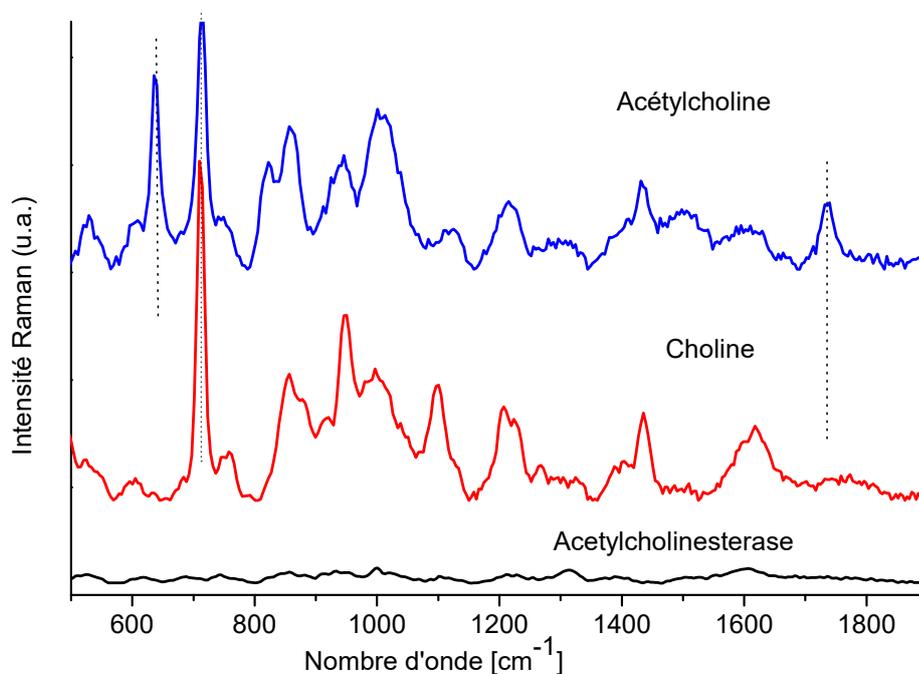


Figure 46 : Spectres de diffusion Raman SERS de solutions de : l'acétylcholine ($10^{-3} M$), choline produite par hydrolyse de l'acétylcholine en présence de l'enzyme ACHE et l'ACHE.

Après l'ajout des AuNPs à la solution d'analyte (ACHE + ACH), lorsque l'enzyme est active, on obtient un signal Raman très intense (Figure 46, choline) correspondant au spectre de diffusion Raman SERS de la choline, avec les bandes de vibration à 714, 865, 950, 1267 et 1438 cm^{-1} caractéristiques de cette molécule (Tableau 12 ; § VI-3) (Siek et al.; De Cheveigne et al.). Pour comparaison, nous avons aussi représenté le spectre de diffusion Raman SERS de l'ACH et l'ACHE (Figure 46). Nous observons bien les

différences entre les spectres de diffusion Raman SERS de l'ACH et de la choline. Les bandes à 639 et 1735 cm^{-1} sont caractéristiques de la partie acide acétique de la molécule ACH. Leur disparition dans le spectre d'hydrolyse de ce neurotransmetteur est directement liée à la transformation de l'ACH, comme affirmation de l'activité de l'ACHE.

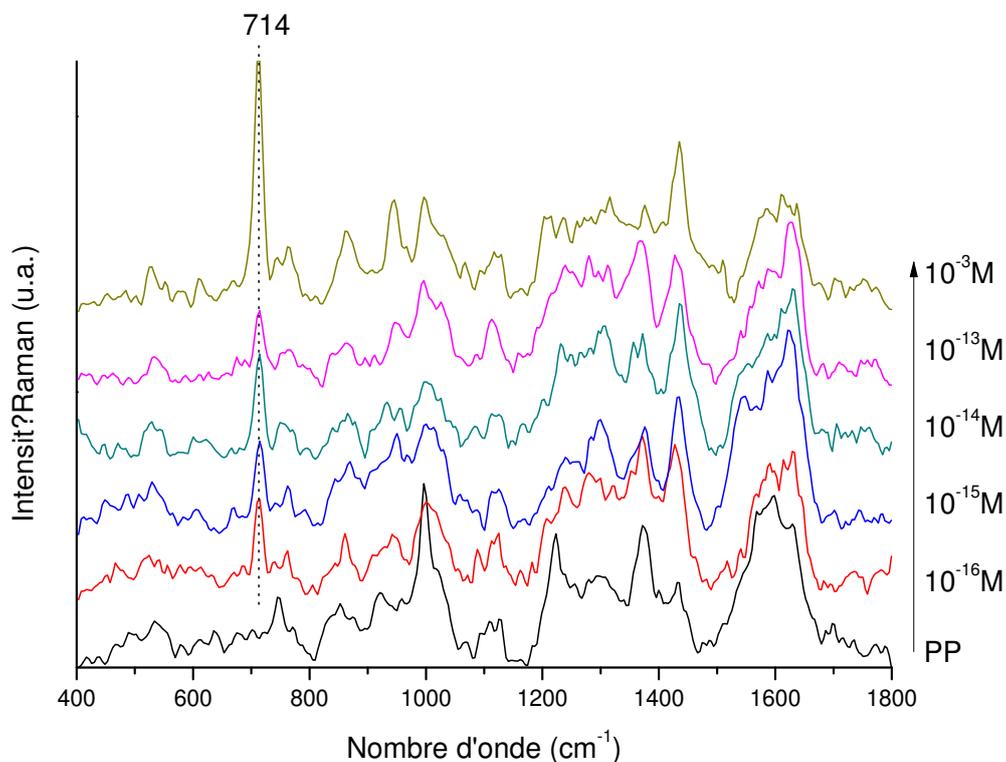


Figure 47: Spectres Raman SERS de solutions de la choline produite par hydrolyse de l'ACH, de concentration 10^{-3} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} et 10^{-16} M, en présence de l'ACHE et le spectre Raman SERS de PP (0.01M).

Comme la choline est le produit de la réaction de l'activité enzymatique de l'ACHE et que sa présence indique qu'elle est non bloquée, nous nous sommes intéressés à la mesure de la choline produite par la transformation de l'ACH à différentes concentrations. Les spectres SERS de la choline produite par hydrolyse de l'ACH, dans une gamme de concentration allant de 10^{-3} M à 10^{-15} M, en présence de l'ACHE, sont présentés à la figure 47. Nous observons les bandes de vibration de la choline situées à 714 , 865 , 950 , 1267 et 1438 cm^{-1} (Tableau 12). Nous pouvons détecter la choline, produite par transformation de l'ACH, à une très faible concentration.

3.3. Optimisation de paramètres d'élaboration du biocapteur.

Les nanoparticules d'or non fonctionnalisées nous ont permis l'amplification du signal Raman de l'ACH et la choline, cela est dû aux propriétés plasmoniques des

nanoparticules et aussi à l'attraction électrostatique entre les nanoparticules non fonctionnalisées chargées négativement et le groupement quaternaire ammonium de ces molécules chargées positivement (Mautner, 1964). Cela nous permet de nous poser la question : quelle molécule allons-nous utiliser comme indicateur pour l'élaboration de notre biocapteur enzymatique ? C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à l'optimisation de notre biocapteur en variant tous les paramètres expérimentaux : concentration de l'ACH, l'ACHE et le temps d'incubation.

3.3.1. Optimisation de la concentration de temps de contact.

Nous avons étudié l'effet de l'enzyme, à des concentrations différentes, sur la transformation de l'ACH (0.001 M). La variation de la concentration de l'enzyme se traduit par la quantité de l'ACH transformé. Sur la figure 48, une disparition des bandes de vibration du groupement acide acétique lors de l'augmentation de la concentration de l'enzyme ajouté signifie la transformation presque complète de l'ACH en choline.

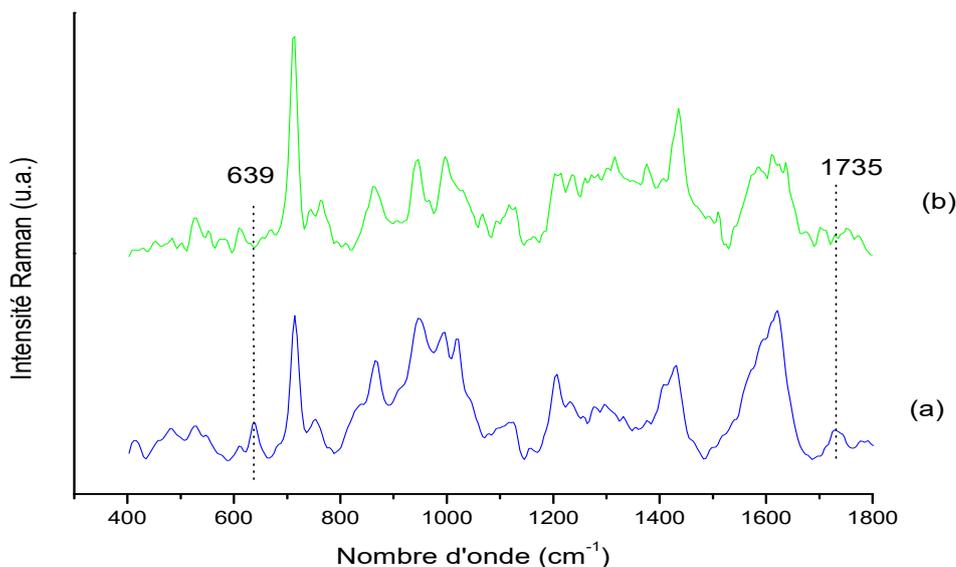


Figure 48 : Spectres Raman SERS de solutions de : (a) L'ACH non transformé par l'ACHE (1×10^{-1} U/mL) et (b) la choline produite par hydrolyse de l'ACH en présence de l'ACHE (1.5U/mL).

La variation de l'intensité de la bande de vibration Raman à 639 cm^{-1} en fonction de la concentration de l'ACHE est exposée sur la figure 49-A. Une disparition de la bande de vibration à 639 cm^{-1} apparaît clairement dès que la concentration d'enzyme augmente (1 U/mL). Nous avons suivi aussi la transformation de l'ACH en présence de l'ACHE pour des durées de contact différentes. L'intensité de la bande de vibration à 639 cm^{-1} diminue et disparaît après environ 30 min de contact (Figure 49-B).

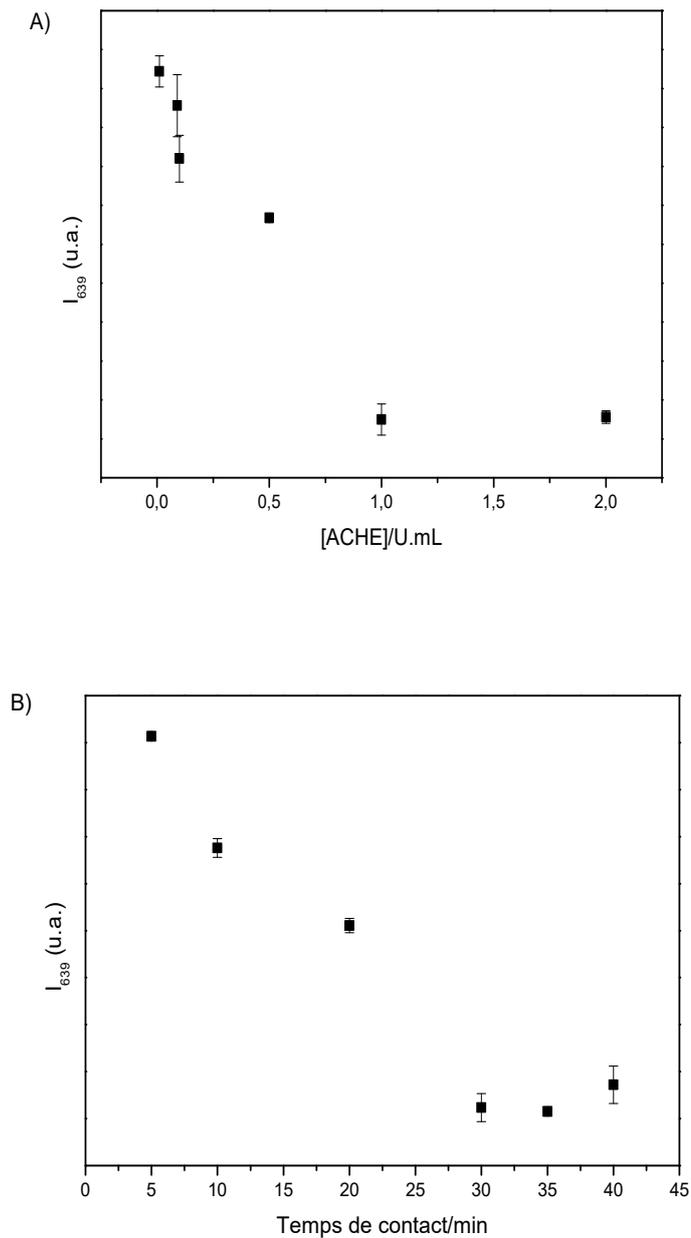


Figure 49: Courbe d'étalonnage montrant l'effet de : (A) la variation de la concentration de l'ACHE (1×10^{-2} - 2 U/mL) et (B) du temps de contact (0-45min), sur l'intensité de la bande de vibration à 639 cm^{-1} .

La transformation de l'ACH (0.001M) peut donc être effectuée complètement en 30 min de contact avec l'ACHE (1U/mL).

3.3.2. Optimisation de la concentration de l'ACHE

Les résultats obtenus pour la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE confirment la possibilité de son utilisation pour l'élaboration d'un biocapteur enzymatique à

base de l'ACHE. Sachant que notre objectif est la détection de faibles concentrations de pesticides, une faible concentration d'enzyme sera donc idéale. Pour cette raison, nous avons également mesuré l'activité enzymatique de l'ACHE à une concentration de 1×10^{-1} U/mL avec différentes concentrations de l'ACH. Nous avons constaté qu'à haute concentration de l'ACH non transformée nous obtenons le signal Raman SERS de l'ACH, mais pour la choline produite par une transformation de l'ACH (0.0001M) en présence de l'ACHE le signal Raman était faible ou inexistant. La figure 50 expose la différence entre le spectre Raman SERS de la choline produite par la transformation de l'ACH (0.0001M) en présence de l'ACHE (1U/mL) et le spectre Raman SERS de l'ACH (0.0001M).

On compare ces résultats avec ceux obtenus précédemment (Figure 48). L'absence du signal Raman de la choline en présence d'une faible concentration de l'ACHE (Figure 50) (alors qu'on l'observe à haute concentration (figure 48)), peut être expliquée par le fait que la choline provoque l'agrégation des nanoparticules et que celles-ci précipitent (faible signal Raman). Au contraire en présence d'une forte concentration d'enzyme, cette dernière se lie avec les nanoparticules et les protège de l'agrégation (signal Raman SERS de la choline) (Liron et al 2011).

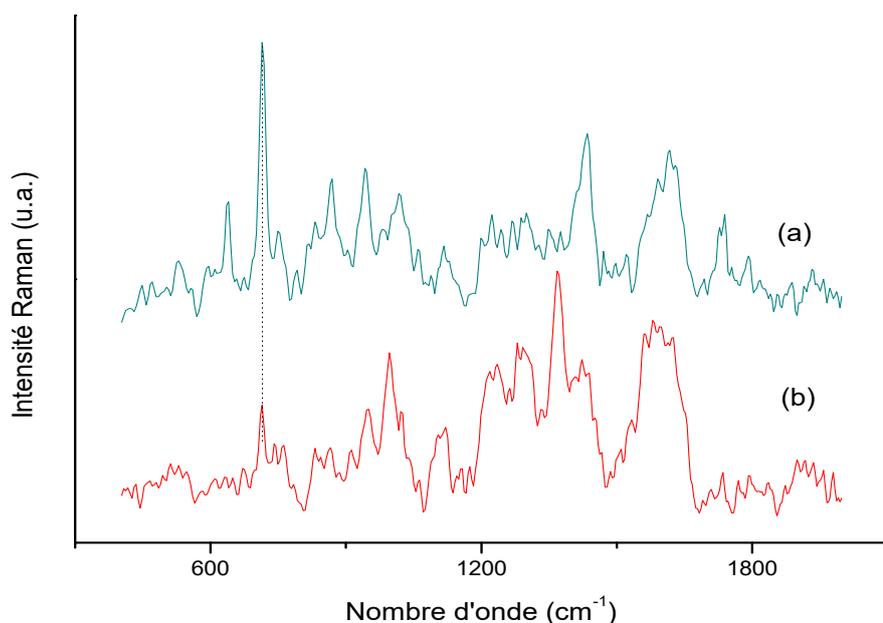


Figure 50 : Spectres Raman SERS des solutions de : (a) l'ACH ($10^{-4}M$) et la choline produite par hydrolyse de l'ACH ($10^{-4}M$) en présence de l'ACHE (b) 1×10^{-1} U/mL).

3.3.3. Interactions NP-Molécules

Pour confirmer ces hypothèses une étude par la diffusion dynamique de la lumière est effectuée. La stabilité des NPs est essentielle pour comprendre les phénomènes en jeu lors des interactions avec les molécules.

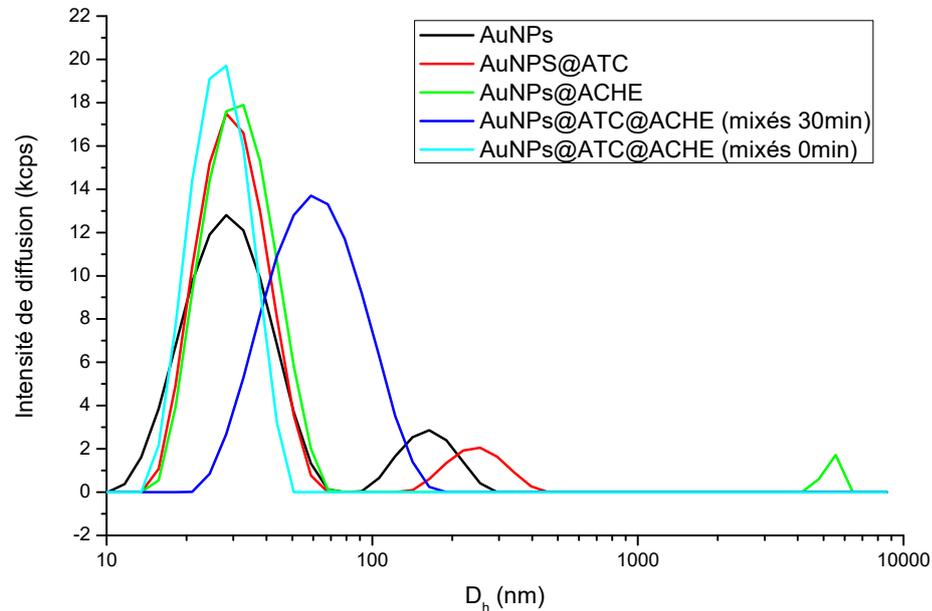


Figure 51 : Distribution en intensité du diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or : (a) seul ; (b) en présence de l'ACH ($10^{-4}M$) ; (c) l'ACH non transformé et l'ACHE ; (d) mixés avec l'ACHE : 2×10^{-1} [μ/ml] et (e) en présence de la choline produite par l'hydrolyse de l'ACH catalysée par l'ACHE. Les suspensions sont préparées dans le PP (0.01M).

Nous avons tracé sur les Figure 51 la distribution en intensité du diamètre hydrodynamique des nanoparticules : seules ; en présence de l'ACH ($10^{-4}M$) ; incubées avec l'ACHE et en présence de la choline produite par l'hydrolyse de l'ACH catalysée par l'ACHE successivement. En première observation, nous apercevons une grande augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en présence de la choline produite par l'hydrolyse de l'ACH catalysée par l'ACHE. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, dans les différentes suspensions, est donné dans le tableau 13. Ces résultats confirment, comme attendu, que les nanoparticules commencent à s'agréger en présence de la choline.

Tableau 13 : distributions de taille des AuNPs dans différentes suspensions.

Taille et intensité des NPs	Z-average (d.nm)
AuNPs	36
AuNPs@ ACH	52
AuNPs @ ACH non transformée @ACHE	30
AuNPs @ ACHE	36
AuNPs @choline obtenue par l'hydrolyse de l'ACH en présence de l'ACHE	150

La légère augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en présence de l'ACH est due à la liaison de l'ACH sur la surface des nanoparticules par interaction électrostatique. Le diamètre des nanoparticules donné par la DLS reste inchangé par rapport à leur diamètre initial en présence de l'ACH non transformé par l'enzyme, mais les nanoparticules d'or sont devenues monodisperse car l'enzyme recouvre la surface des nanoparticules qui deviennent plus stables. Cela correspond à la disparition de la deuxième bande dans la distribution en intensité du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en présence de l'ACHE sur la figure 51 (Li H et al. 2004). Ces expériences nous indiquent que l'ACH, peut raisonnablement être considérée comme un bon ligand pour les nanoparticules mais elle peut être rapidement remplacée par d'autres ligands, comme l'ACHE par exemple (Lim et al. 2008 ; Levchenko et al. 2011).

Par contre, les nanoparticules d'or s'agrègent en présence de la choline (Figure 51). L'agréation des nanoparticules apparaît dès le contact, soit instantanément lors de l'introduction des nanoparticules dans l'analyte. Ceci est probablement dû au fait qu'en forte concentration, la choline diminue le potentiel électrostatique des NPs (C.-W. Liu et al.). La molécule de la choline contient le groupement quaternaire ammonium ainsi que le groupement -OH qui sont capables de se lier à la surface d'or (Okumura et al.). Le composé (nanoparticules d'or et ACHE) peut être utilisé comme un composé négatif pour attirer d'autres molécules positives, car le point isoélectrique de l'ACHE se trouve aux environs d'un pH=5, or nous avons un pH=8. Ceci permet aux NPs de se lier à d'autres molécules par absorption électrostatique (Hou et al.).

3.3.4. Conditions optimales retenues

La transformation de l'ACH (0.001 M) peut être effectuée complètement en 30 min de contact avec l'ACHE (1U/mL). Nous avons utilisé ces valeurs comme conditions optimales pour la suite de nos tests de mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE. Cela nous garantira une fiabilité des résultats en cas de faible concentration de l'ACHE. Dans la suite de notre travail, nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'ACHE, par mesure de la variation de l'intensité de la bande de vibration Raman à 639 cm^{-1} . Cette bande caractérise la vibration du groupement acide acétique et sa disparition est caractéristique de l'activité de l'ACHE (transformation de l'ACH en choline).

3.4. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE en présence de pesticides

La spectroscopie Raman SERS, a permis de quantifier la transformation de l'ACH par l'ACHE. Notre objectif est de détecter des pesticides en nous servant du changement d'activité de l'ACHE, sachant qu'en absence de pesticides l'acétylcholine se transforme en acide acétique et choline. En présence de pesticides l'acétylcholine ne s'hydrolyse pas, à cause du blocage de l'activité enzymatique de l'ACHE.

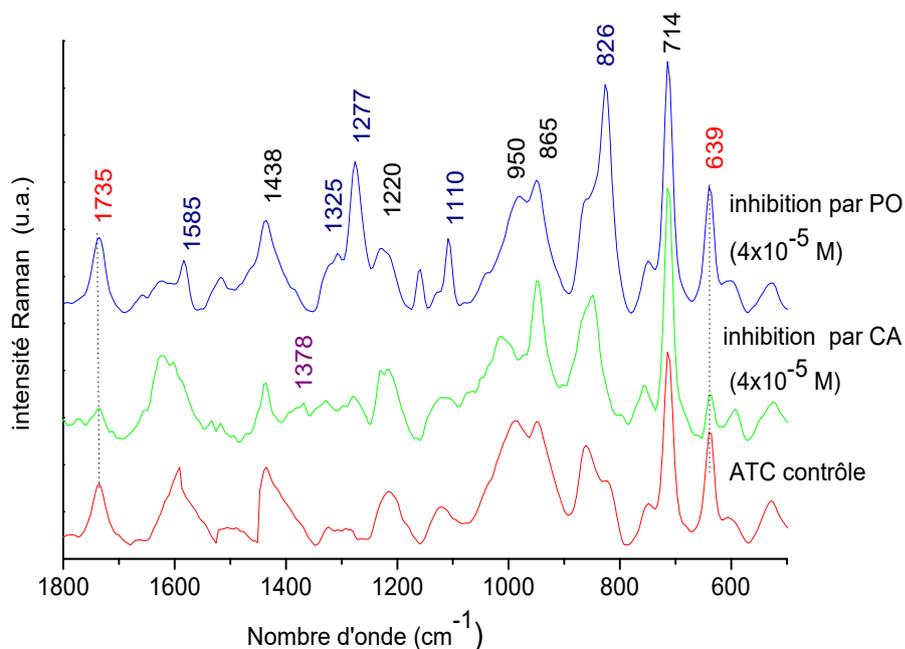


Figure 52 : Spectres Raman SERS de : l'acétylcholine (ACH) seul et ACH (non transformé) observés à cause de l'inhibition de l'activité de l'ACHE par le carbaryl ($4 \times 10^{-5}\text{ M}$) et le paraoxon ($4 \times 10^{-5}\text{ M}$).

Dans un premiers temps, les spectres Raman SERS de l'activité enzymatique de l'ACHE en absence de pesticide et en présence de deux types de pesticides : carbaryl (4×10^{-5} M) et paraoxon (4×10^{-5} M) sont représentés sur la figure 52. Le spectre de diffusion Raman SERS de la choline est obtenu, en absence d'inhibiteurs. En présence des pesticides, nous obtenons bien un spectre identique à celui de l'ACH.

3.5. Détection du paraoxon

3.5.1. Optimisation du temps de contact PO&ACHE

Différents temps d'incubation avec différentes concentrations de pesticides ont été testés afin d'optimiser la limite de détection de ce pesticide.

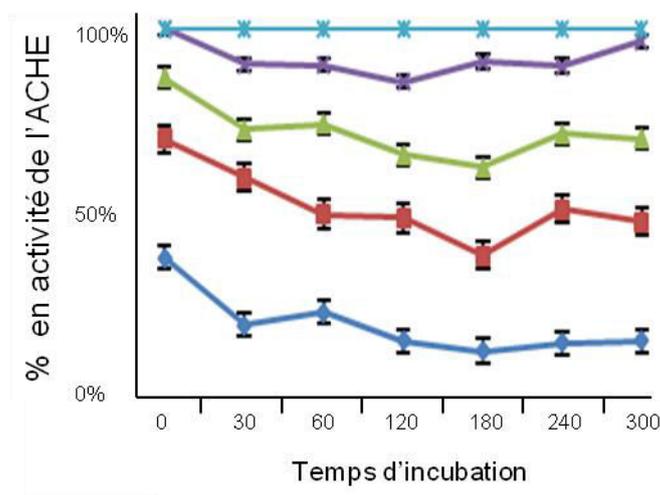


Figure 53 : Mesure de l'activité de l'ACHE inhibée par le paraoxon à différentes concentrations : (x) 0 M, (x) 4×10^{-10} M, (▲) 4×10^{-9} M, (■) 4×10^{-7} M, (◆) 4×10^{-3} M et différentes durées d'incubation (0-5h). La courbe est exprimée par mesure de l'ACH transformé (intensité de la bande Raman à 639 cm^{-1}).

L'inhibition de l'ACHE est observée dès le contact de l'ACHE avec les pesticides. La figure 53 illustre l'effet du paraoxon, à différentes concentrations (4×10^{-10} M, 4×10^{-9} M, 4×10^{-7} M, 4×10^{-3} M), sur l'activité de l'ACHE au cours du temps d'incubation. A partir de ces résultats, une durée de contact, entre l'ACHE et l'inhibiteur avant l'analyse SERS, de 30 min a été choisie pour la quantification de l'inhibition de l'enzyme par les polluants. On considère que la disparition de la bande de vibration Raman à 639 cm^{-1} , en absence de pesticides, correspond à 100% d'activité de l'ACHE.

3.5.2. Limite de détection

Afin de mesurer la limite de détection de notre biocapteur, basé sur la spectroscopie Raman SERS, différentes concentrations de paraoxon ont été testées (figure 54) avec une durée optimisée d'incubation de 30 min. La concentration de paraoxon varie de 4×10^{-9} à 4×10^{-15} mol.L⁻¹ (figure 54-A).

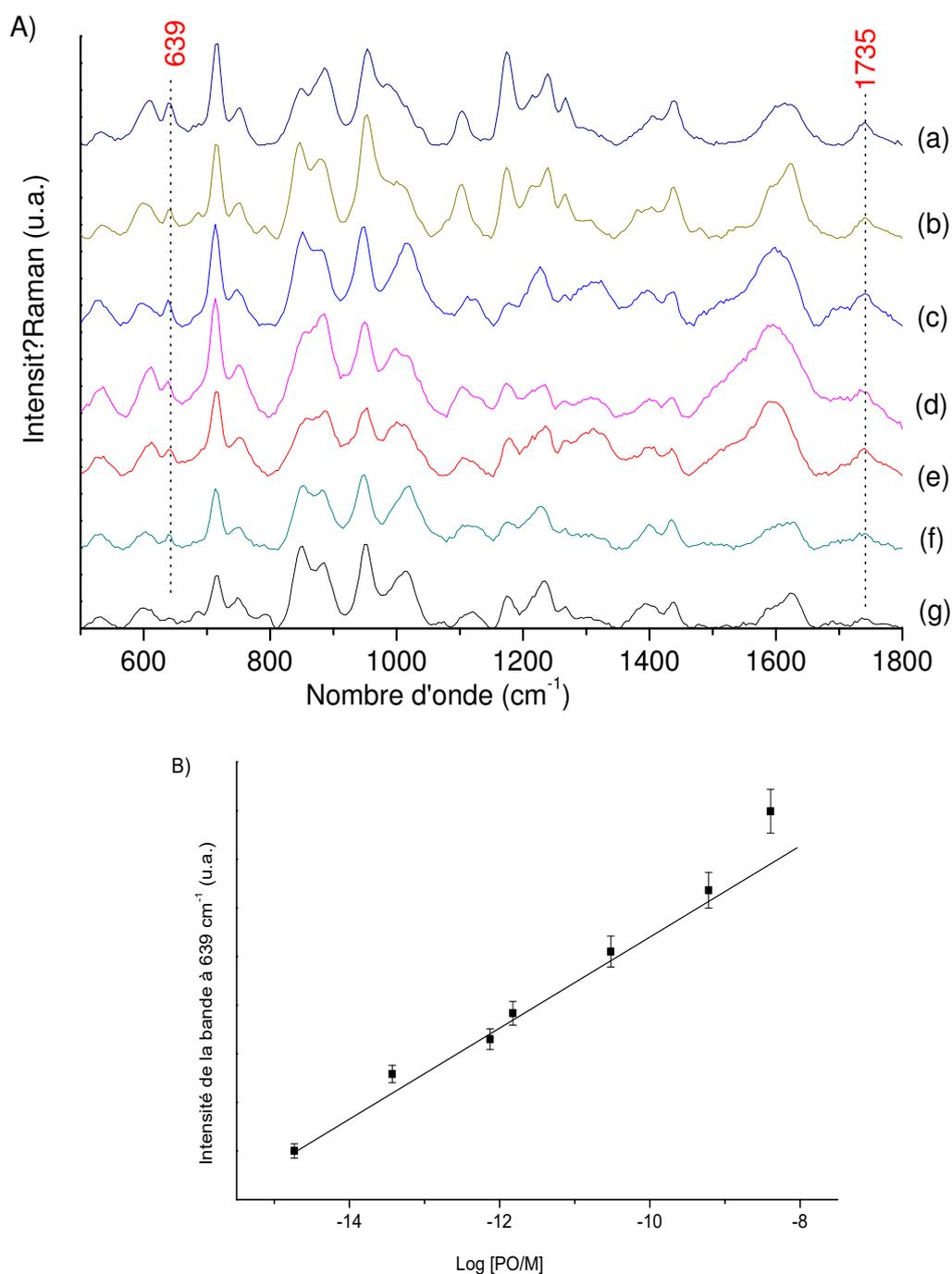


Figure 54 : (A) Spectres Raman SERS de l'acétylcholine après incubation avec l'acétylcholinestérase mélangée avec différentes concentrations de paraoxon: (a) 4×10^{-9} ; (b) 4×10^{-10} ; (c) 4×10^{-11} ; (d) 4×10^{-12} ; (e) 4×10^{-13} ; (f) 4×10^{-14} et (g) 4×10^{-15} M respectivement. (B) Courbe d'étalonnage de la variation de l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} en fonction de la concentration de paraoxon.

Comme le montre la figure 54-A, l'intensité des bandes à 639 cm^{-1} et 1735 cm^{-1} croît lorsqu'on augmente la concentration de pesticides, montrant ainsi l'accumulation de l'ACH due à l'inhibition progressive de l'activité enzymatique de l'ACHE. L'intensité de la bande à 639 cm^{-1} en fonction de la concentration du paraoxon (exprimée en log) est représentée dans la figure 54-B. Cette figure montre que l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} est directement proportionnelle à la concentration de Paraoxon avec une limite de détection d'environ $4 \times 10^{-14}\text{ M}$.

3.6. Détection du Carbaryl

Nous avons également étudié l'effet du carbaryl sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase. Pour cette raison, différents temps d'incubation avec différentes concentrations de ce pesticide ont également été testés.

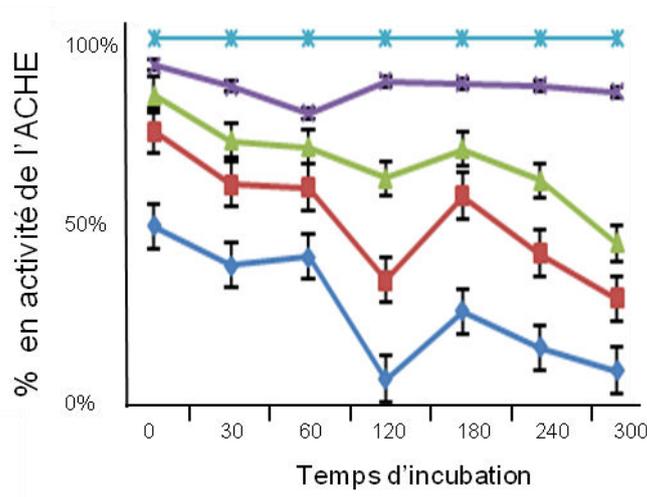


Figure 55 : Mesure de l'activité de l'ACHE inhibée par le carbaryl à différentes concentrations : (x) 0M, (x) $4 \times 10^{-9}\text{ M}$, (▲) $4 \times 10^{-8}\text{ M}$, (■) $4 \times 10^{-6}\text{ M}$, (◆) $4 \times 10^{-4}\text{ M}$ et différentes durées d'incubation (0-5h). La courbe est exprimée par mesure de l'ACH transformé (intensité de la bande Raman à 639 cm^{-1}).

L'inhibition de l'activité de l'ACHE par le carbaryl, à différentes concentrations ($4 \times 10^{-10}\text{ M}$, $4 \times 10^{-9}\text{ M}$, $4 \times 10^{-7}\text{ M}$, $4 \times 10^{-3}\text{ M}$) et après 0 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h de temps d'incubation, est illustrée à la figure 55. Nous avons observé le même effet du carbaryl sur l'activité de l'ACHE que celui du paraoxon. L'activité de l'ACHE est inhibée directement après l'exposition de cet enzyme aux pesticides. Nous avons utilisé la même durée d'incubation (carbaryl&ACHE) que celle choisie pour le paraoxon (30 min).

Les spectres Raman SERS de l'activité enzymatique de l'ACHE inhibée par une gamme de concentrations de carbaryl, allant de 4×10^{-5} à $4 \times 10^{-10}\text{ M}$, apparaissent sur la figure

56-A. De façon analogue à l'inhibition avec le paraoxon, l'intensité de la bande de vibration à 639 cm^{-1} s'amplifie lorsque la concentration de l'inhibiteur augmente, ce qui montre que l'activité de l'enzyme est bloquée. La variation de l'intensité de la bande de vibration à 639 cm^{-1} , en fonction du logarithme de la concentration de carbaryl, est donnée en figure 56-B. L'intensité de cette bande est directement proportionnelle à la concentration de carbaryl avec une limite de détection d'environ $1.9 \times 10^{-9}\text{ M}$.

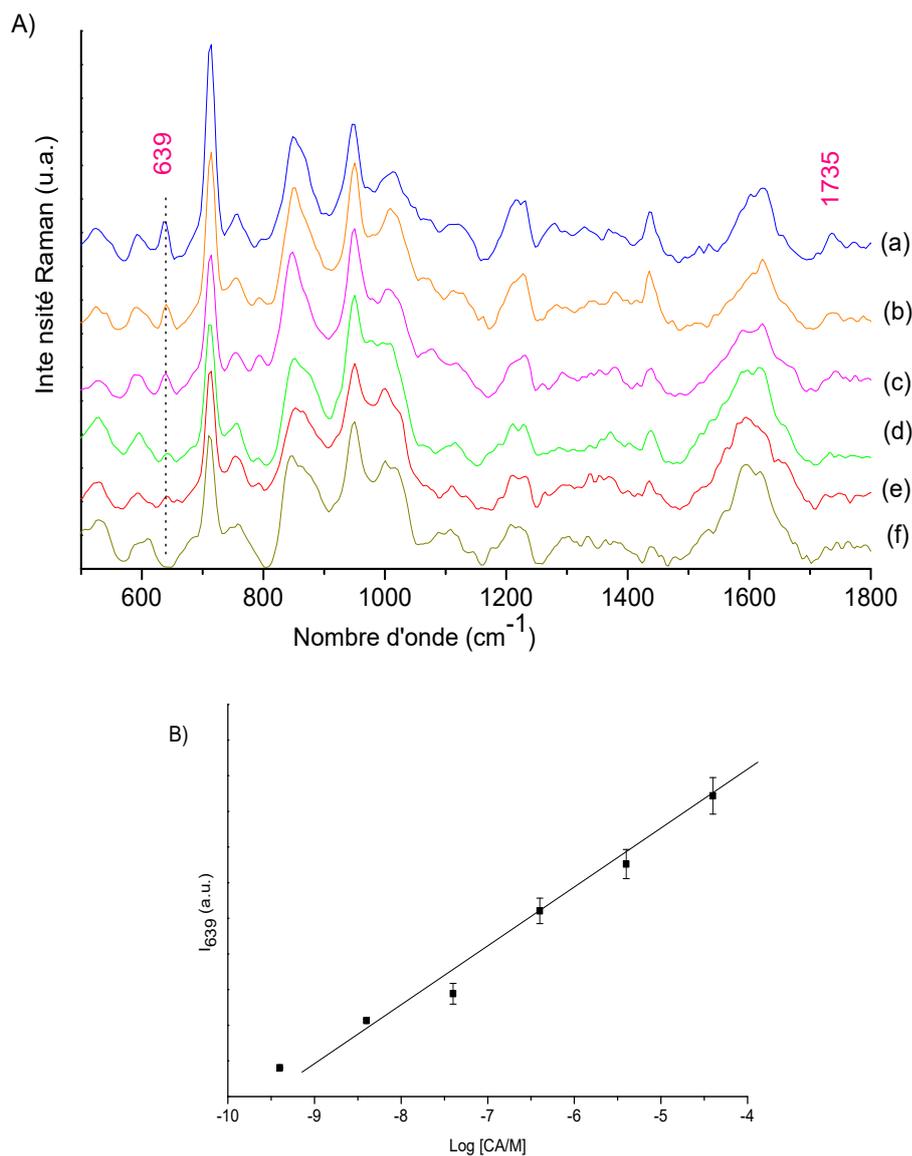


Figure 56 (A) Spectres Raman SERS de l'acétylcholine après incubation avec l'acétylcholinestérase mélangée avec différentes concentrations de paraoxon: (a) 4×10^{-5} ; (b) 4×10^{-6} ; (c) 4×10^{-7} ; (d) 4×10^{-8} ; (e) 4×10^{-9} et (f) $4 \times 10^{-10}\text{ M}$ respectivement. (B) Courbe d'étalonnage de la variation de l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} en fonction de la concentration de carbaryl.

La différence entre la limite de détection du carbaryl et celle du paraoxon peut être expliquée par le fait de la différence de leur mode d'inhibition. Le complexe ACHE-paraoxon est plus stable dans le temps que l'ACHE-carbaryl (Jeon et al.). Les insecticides organophosphorés (par exemple le paraoxon) forment des complexes très stables avec l'ACHE par phosphorylation du groupe hydroxyle sérine. L'enzyme phosphorylée est à peine réactivée, ce qui entraîne une perte pratiquement irréversible de l'activité enzymatique. En revanche, l'enzyme inhibée par des carbamates (comme carbaryl) via la carbamylation se régénère spontanément en enzyme active (Bartolini et al. 2007; Eckert et al. 2006; Kretschmann et al. 2012). En résumé, ces différents résultats montrent que ce biocapteur peut être utilisé pour la détection des pesticides, dans les deux cas d'inhibition de l'ACHE (réversible et irréversible). Ce biocapteur est non sélectif, avec une limite de détection inférieure ou égale aux résultats obtenus par d'autres techniques (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison de la méthode présentée dans ce document avec des méthodes classiques pour la détection de différents pesticides.

Method	Materials	Recognition element	Target analyte	Detection limit	Reference
electrochemical sensor	pralidoxime on GQDs modified glassy carbon electrode	-	OP pesticides	6.8 pM	(Dong et al. 2015)
electrochemical sensor	microelectrod array	ACHE	OP pesticides	33 nM	(J. Wang, Suzuki, and Satake 2014)
optical sensor	Eu(III)-Bathophenanthroline probe	-	Azinphous ethyl Malathion and Heptachlor	0.35 μM	(Azab, Orabi, and Abbas 2015)
potentiometric sensor	the IrOx pH-sensing electrode	ACHE	OP pesticides	3 μM	(J. Wang et al. 2015)
Biosensor	Immobilization of AChE onto amino functionalized carbon nanotubes	ACHE	OP pesticides	0.08 nM	(Yu et al. 2015a)
Biosensor	AuNPs	ACHE	OP and CA pesticides	4*10 ⁻² pM	This method

3.7. Identification des pesticides

Nous pouvons identifier les pesticides (à forte concentration) directement sur les spectres Raman SERS en mesurant l'activité de l'ACHE. Sur les spectres Raman SERS de l'activité enzymatique de l'ACHE inhibée par le paraoxon (4×10^{-5} M), nous observons

des bandes de vibrations caractéristiques de ce pesticide : 826, 1110, 1277, 1325, 1585 cm^{-1} . De même, en présence de carbaryl ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$), nous obtenons une bande spécifique de cet inhibiteur à 1370 cm^{-1} (Figure 57)

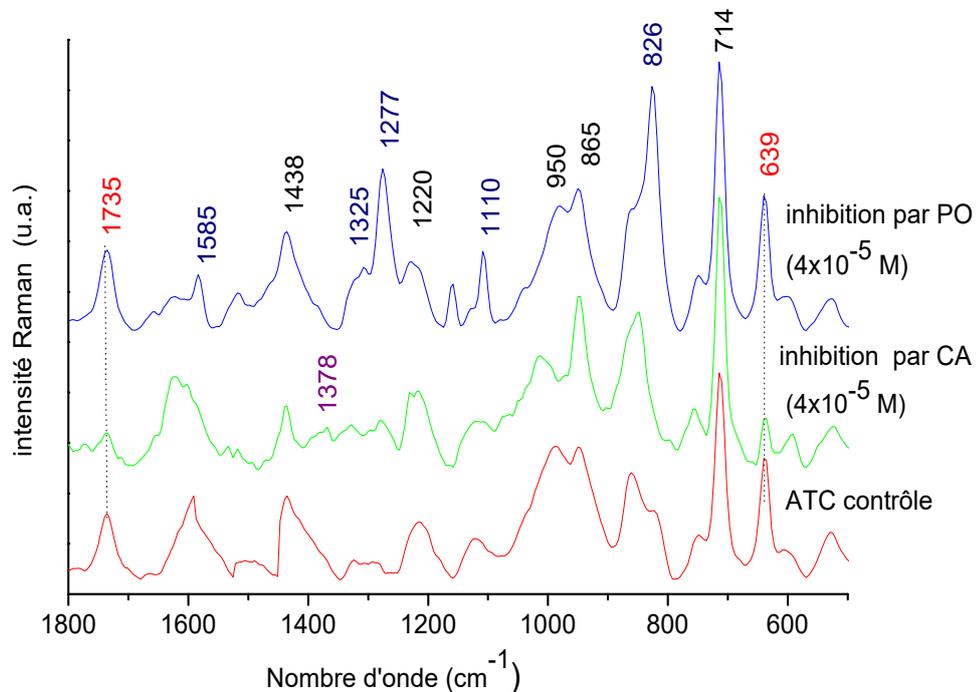


Figure 57: Spectres Raman SERS de : l'acétylcholine (ACH) et ACH (non transformé) observés à cause de l'inhibition de l'activité de l'ACHE par le carbaryl ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$) et le paraoxon ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$).

L'étude de la variation de l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} , en présence de pesticides à très faible concentration, nous a permis une quantification de l'inhibition de l'ACHE. Cependant, ces mesures ne nous ont pas permis l'identification de ces inhibiteurs. Celle-ci peut être réalisée en analysant les spectres par des méthodes statistiques telles que l'analyse en composante principale (ACP) qui est une méthode statistique multivariée utilisée en spectroscopie analytique. Cette approche consiste à trier les spectres, en différentes catégories, en fonction de leur degré de similarité. La classification des familles de spectres indépendants permet de mieux les identifier. L'ACP applique des transformations linéaires spécifiques pour convertir un ensemble de variables éventuellement corrélées en un ensemble de valeurs de variables linéairement non corrélées appelées composantes principales (Almaviva et al.).

La courbe de l'ACP obtenue concernant les deux premières composantes principales des spectres Raman, est illustrée sur la Figure 58. Les échantillons contenant du carbaryl

apparaissent nettement séparés des échantillons contenant du paraoxon. Ils se sont agglomérés de manière satisfaisante en groupes distincts (Figure 58). De plus, les échantillons, dont la concentration de paraoxon est élevée (4×10^{-7} M), sont séparés des échantillons contenant des concentrations moindres (de 4×10^{-9} à 4×10^{-15} M). Cela peut être expliqué, par la présence de bandes intenses du paraoxon sur le spectre Raman SERS qui s'ajoute aux bandes de vibration de l'ACH non transformé (Figure 57).

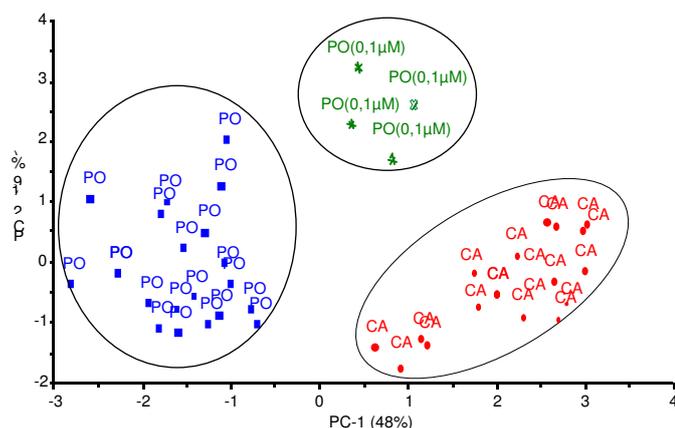


Figure 58 : Courbe ACP des répartitions des deux premières composantes principales pour les spectres Raman SERS obtenues par la réaction de l'acétylcholine avec l'acétylcholinestérase inhibée par le carbaryl (4×10^{-6} – 4×10^{-9} M) et le paraoxon (4×10^{-7} – 4×10^{-14} M).

Ces résultats montrent des différences significatives dans les spectres Raman SERS observables pour les deux pesticides. Outre la quantification par la spectroscopie Raman SERS, l'utilisation d'une technique d'analyse chimométrique simple, comme l'ACP, permet une identification et une distinction rapide et fiable du paraoxon et du carbaryl.

3.8. Mesure de l'activité de l'ACHE en présence d'échantillons d'eaux naturelles.

Nous avons réalisé des tests avec notre biocapteur sur des échantillons d'eau naturelle, prélevés dans des fermes utilisant des pesticides. Nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'ACHE, dans trois échantillons d'eau conservés à 4°C. L'activité de l'ACHE a été mesurée chaque jour pour tous les échantillons y compris le témoin avec l'ACHE seul. Nous avons remarqué une inhibition de l'activité de l'enzyme après le dixième jour de contact. Cependant, nous n'avons pas constaté d'interférence entre le spectre d'ACH et les composés ciblés et non ciblés dans l'eau. Cette inhibition peut être expliquée

soit par la présence d'autres inhibiteurs dans les échantillons d'eau (autres que les pesticides), soit par la présence d'une faible concentration de ceux-ci : le moment de notre prise d'échantillons au Maroc ne correspondant pas à la période de traitement des cultures, nous avons testé de l'eau de puits (peu profonds), utilisée pour l'usage quotidien (traitée pour être potable). Nous n'avons pas eu l'occasion d'effectuer d'autres mesures afin d'analyser la qualité et la composition de nos échantillons pour confirmer les résultats.

4. Perspectives : mesures d'autres polluants émergents (plastiques)

Chaque année dans le monde, plusieurs dizaines de millions tonnes de matières plastiques sont produites pour une très large gamme d'utilisation industrielles et domestiques. En raison de leur faible coût et de nombreux avantages (durabilité, facilité de mise en oeuvre, légèreté...), les quantités produites sont en constante augmentation. Mais de nombreux usages des matières plastiques sont des usages de courte durée (emballages notamment) et (Jambeck et al.) ont récemment estimé que pour la seule année 2010, entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de déchets plastiques sont entrés dans les océans et une forte tendance à la hausse pour les années à venir est attendue. Après moins d'un siècle d'existence, les plastiques représentent jusqu'à 80 % des déchets marins dans les zones les plus contaminées (Cózar et al.).

Le terme "plastiques" représente en fait l'ensemble des polymères thermodurcissables produits industriellement. Les plus utilisés sont le polyéthylène (PE, existe sous deux formes: haute densité PEHD et basse densité PELD), le polypropylène (PP), le polyvinyl chloride (PVC), le polystyrène (PS) et le polyéthylène téréphtalate (PET). Ces 5 polymères représentent environ 90% de la production totale (Andrady). Ce sont des matériaux de haut poids moléculaire, non biodégradable et donc extrêmement persistants dans l'environnement où ils s'accumulent depuis plusieurs décennies. Ils y subissent différents processus de dégradation - exposition aux UV, oxydation, très lente biodégradation par des micro-organismes marins, abrasion mécanique du sable et des marées - qui conduisent à leur fragmentation en particules de petites tailles, appelées microplastiques (Andrady et al 2011; Costa et al. 2010). Cette nouvelle pollution omniprésente dans tous les compartiments océaniques soulève de nombreuses questions. Les plastiques contiennent notamment de nombreux additifs permettant d'allonger leurs durées de vies et pour leur conférer une meilleure résistance à la chaleur, l'oxydation et aux mécanismes de dégradation (anti-

oxydants, anti-UV,...) (Browne et al.). Tous les additifs utilisés dans l'industrie des plastiques ne sont pas parfaitement identifiés mais certains (nonylphenol, polybrominated diphenyl ethers, phthalates, bisphenol A) sont connus comme des composés genotoxiques et toxiques pour la reproduction (perturbateurs endocriniens) (Talsness et al.; Teuten et al.). Une étude suggère même que certaines formulations pourraient inhiber l'activité de l'ACHE (Oliveira et al.) sans que les composés en cause aient pu être identifiés. Tous ces additifs sont incorporés dans les polymères en concentrations variées et peuvent être relargués dans l'environnement aquatique à différentes périodes au cours du vieillissement en

fonction des paramètres physico-chimiques ambiants (température par exemple) (Teuten et al.). Bien que leur toxicité soit fortement suspectée même à faibles concentrations, il y a, à l'heure actuelle, peu de méthodologies permettant de doser tous ces additifs, la plupart du temps non identifiés car les compositions sont rarement connues, dans les polymères commerciaux. Et surtout, doser un à un ces additifs relève d'une méthodologie analytique complexe.

Nous avons donc testé la potentialité de notre protocole non sélectif pour détecter la présence d'éventuels inhibiteurs de l'ACHE dans plusieurs polymères commerciaux dont nous ne connaissons pas la composition.

Dans la figure 59-A, nous avons tracé la variation de l'activité enzymatique de l'ACHE, en fonction de la durée d'incubation avec le plastique à 37°C. Pour cette phase d'optimisation du protocole, nous avons travaillé sur un seul polymère, un PELD commercial. La Figure 59 indique son effet au cours du temps sur l'activité enzymatique de l'ACHE. L'activité est quantifiée en fonction de la quantité de l'ACH non transformée, c'est-à-dire la variation de l'intensité de la bande de vibration à 639 cm^{-1} . En effet, nous avons remarqué que cette activité diminue après le neuvième jour de contact. La superposition des spectres Raman SERS de l'activité enzymatique de l'ACHE : en absence d'inhibiteur et incubée avec le plastique à 4 et 37°C après neuf jours, est représentée sur la figure 59- B.

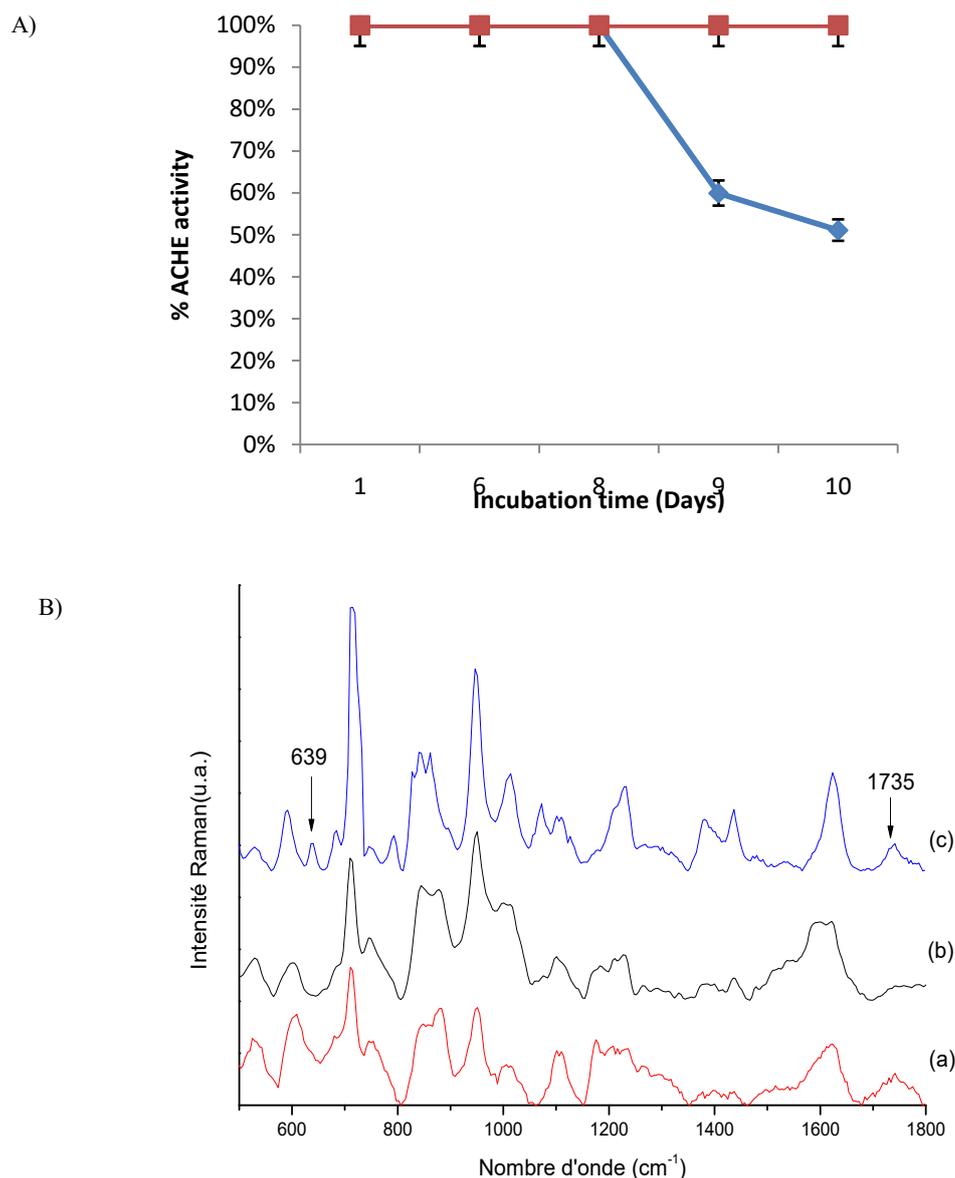


Figure 59 : (A)- l'activité de l'ACHE déterminée par le taux d'hydrolyse de l'ACH (intensité de la bande à 639 cm⁻¹). Les données sont exprimées en pourcentages de l'activité de l'ACHE testé selon différents temps d'exposition (0-10j) à 37 ° C: (◆) incubée avec PELD2 (20 mg); (■) Contrôle sans inhibiteur. (B) spectres Raman SERS de l'activité enzymatique de l'ACHE incubée avec le plastique (20mg de PELD2), après neuf jours, à différentes températures : (a) contrôle sans PELD2; (b) à 4°C et (c) à 37°C.

Comme le montre la figure 59 en présence de 20mg de PELD2 et à 37°C, l'activité de l'ACHE est inhibée après le dixième jour mais pour le même échantillon conservé à 4°C nous n'avons pas observé d'inhibition. Nous avons refait les mêmes mesures pour une période de 11jours, mais après le onzième jour l'activité de l'ACHE sans inhibiteurs a été également bloquée par accumulation de l'ACH. Nous avons réalisé le même test avec des morceaux de plastiques récupérés dans différents endroits.

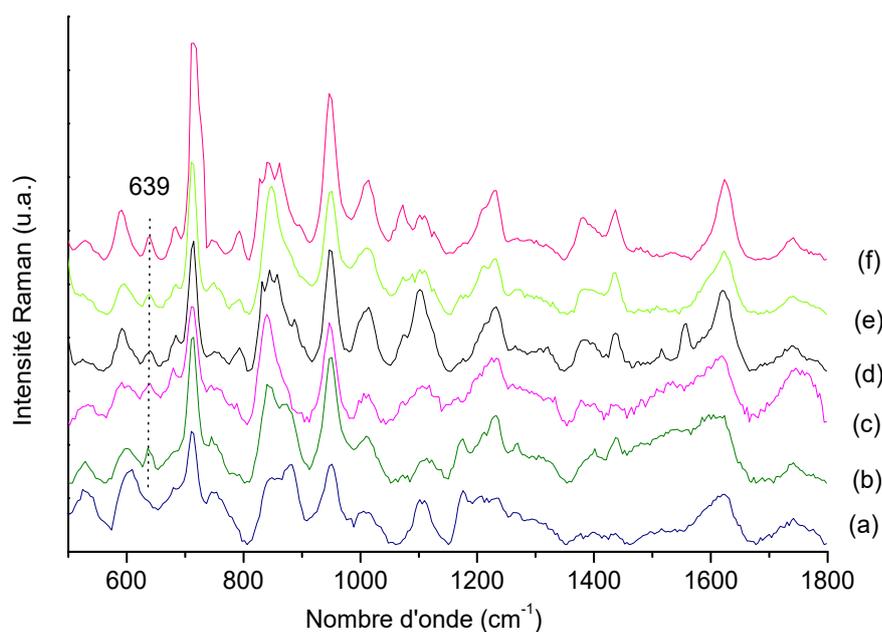


Figure 60 : Les spectres Raman SERS d'acétylcholine après incubation avec l'acétylcholinestérase en présence de 20 mg de plastique: (a) 0; (b) PP1 ; (c) PP2; (d) PEHD; (e) PELD1 et (f) PELD2.

La figure 60 montre les spectres Raman SERS de l'ACH après incubation avec l'ACHE en présence de différentes formulations commerciales de plastiques (PP1, PP2, PP3, PEHD, PELD1, PELD2 et PELD-Bio). En effet, en absence de plastique, l'ACHE reste active jusqu'au dixième jour, tandis que pour la même période d'incubation, l'inhibition de l'ACHE par les plastiques (PP1, PP2, PEHD, PELD1 et PELD2) est très clairement mise en évidence par la présence de bandes de vibrations d'ACH accumulé, dans les spectres Raman SERS (figure 60 : b ; c ; d ; e et f). On constate, qu'en présence de certains plastiques (5 sur 7), l'activité de l'ACHE est bloquée et l'ACH n'est pas hydrolysé. Nous n'avons pas observé d'inhibition, dans les mêmes conditions pour une des formes de PP et pour le PELD-Bio, qui est un polyéthylène sans additifs.

Pour la comparaison entre la toxicité des plastiques et celle de pesticides (paraoxon), nous avons tracé l'étalonnage de la variation de l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} en fonction du logarithme de la concentration de paraoxon ($4 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-14}\text{ M}$) (Figure 61). Comme nous l'avons déjà vu, l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} augmente en augmentant la concentration de paraoxon. Elle atteint sa limite à environ $1 \times 10^{-8}\text{ M}$, après cette concentration nous observons une légère diminution due à l'interférence des bandes de

paraoxon avec celles de l'ACH. L'intensité de la bande de l'ACH en présence de 1×10^{-8} M de paraoxon est considérée comme une inhibition complète de l'enzyme.

Par ailleurs, nous avons mesuré l'intensité de la bande d'ACH à 639 cm^{-1} pour l'inhibition de l'enzyme avec les plastiques étudiés. Nous avons observé que le taux d'inhibition de l'ACHE par 5 sur 7 des plastiques étudiés est d'environ $29 \% \pm 4$, ce qui est équivalent à une inhibition par une concentration de PO d'environ 10^{-13} M. Nous avons donc montré le potentiel de notre protocole pour détecter la présence d'inhibiteurs de l'ACHE, même s'ils sont non identifiés, dans des matrices autres qu'aqueuses. On peut supposer que dans le cas des plastiques, un temps de contact de plusieurs jours avec l'enzyme a été nécessaire car les inhibiteurs, piégés dans une matrice solide, n'étaient pas immédiatement en contact avec l'enzyme comme c'est le cas lorsque les polluants sont en phase liquide. Pour gagner du temps, une phase d'extraction des additifs pourrait être réalisée. Mais ces résultats préliminaires, obtenus de façon assez simple, illustrent déjà les perspectives d'utilisation d'un tel biocapteur.

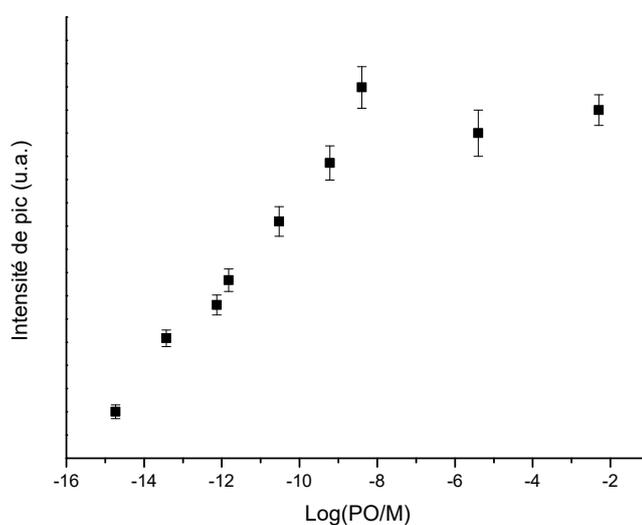


Figure 61: Courbe d'étalonnage de la variation de l'intensité de la bande à 639 cm^{-1} en fonction de Log de la concentration de paraoxon (4×10^{-3} – 4×10^{-14} M).

Conclusion

Les synthèses de nanoparticules d'or ont été réalisées avec la méthode de Turkevich. Les observations effectuées notamment par microscopie électronique en transmission ont

montré la formation de nanoparticules de taille moyenne de 15 nm avec une bande de résonance plasmon à ~516 nm.

Ces nanoparticules non transformées ont permis, d'une part, l'obtention d'une exaltation du signal Raman (SERS) du paraoxon et du carbaryl ainsi que de l'ACH et d'autre part, leur détection à très faible concentration. Pour cela, un système simple et efficace d'échantillonnage a été mis en place en mélangeant une goutte de nanoparticules centrifugées avec la molécule cible, puis en déposant une goutte de cette solution sur un substrat réfléchissant et hydrophobe (surface en aluminium).

A partir de l'effet SERS obtenu par ces nanoparticules, un nanobiocapteur sensible a été développé pour mesurer l'activité enzymatique de l'ACHE et détecter ces inhibiteurs. Le principe de ce biocapteur est basé sur la spectroscopie Raman SERS couplée à l'activité enzymatique de l'ACHE.

Ce protocole s'est révélé très sensible, très simple et peu coûteux, pour la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE en présence de concentrations extrêmement faibles de pesticides. Notre technique ne nécessite aucun processus compliqué, elle ne nécessite pas de modification de l'ACHE ni de prétraitement des nanoparticules. La quantification de la détection de pesticides a été obtenue par le contrôle de la quantité du neurotransmetteur ACH non transformé. Pour cela la variation de l'intensité de la bande caractéristique de l'ACH à 639 cm^{-1} a été contrôlée. La variation de la concentration du paraoxon ou du carbaryl est apparue linéairement proportionnelle à la variation de l'intensité de cette bande. Nous avons constaté qu'avec cette méthode, leur limite de détection est nettement plus basse que celle obtenue par détection directe avec la spectroscopie Raman SERS.

Dans toutes les conditions, les spectres enregistrés se sont avérés très reproductibles avec un écart type inférieur ou égal à 6% de l'intensité moyenne à 639 cm^{-1} .

Comme perspectives, notre biocapteur peut être utilisé dans l'analyse de nouveaux polluants. Les différents résultats obtenus montrent que ce « nanobiocapteur » pourrait être employé, à l'avenir, pour la détection rapide de tous les types d'inhibiteurs de l'ACHE (identifiés ou non), en milieu aqueux ou dans des échantillons plus complexes, avec une excellente sensibilité et une bonne reproductibilité pour une détection non sélective, qualitative ou quantitative.

VII. Biocapteur optique basé sur le Raman SERS@ACHE immobilisée

Le coût des enzymes étant non négligeable, il peut être envisagé de les utiliser pour plusieurs dosages. Pour cela, une autre méthodologie a été testée : immobiliser l'enzyme sur une surface d'or.

1. Immobilisation de l'ACHE en vue d'une réutilisation.

Dans ce travail, nous allons utiliser un biorécepteur enzymatique, immobilisé sur une surface d'or, en vue d'élaborer un biocapteur optique en résonance de plasmon de surface pour la détection des pesticides. La fonctionnalisation permet la fixation de l'enzyme utilisée et rend le biorécepteur souvent réutilisable.

1.1. Modification de la surface d'or

Nous avons fonctionnalisé la surface d'or avec le chlorure de benzènesulfonyle, en nous basant sur des travaux précédemment effectués au sein du laboratoire de chimie de l'IMMM (J. Chen et al. 2008; Kengne-Momo et al 2011; Squillace et al 2016). Pour cela, nous avons préparé la solution d'acide pour la réduction des sels d'aryldiazonium: (10mM) NaNO_2 + (10mM) $\text{H}_2\text{N-Ar-SO}_3\text{H}$ dans HCl (10 mL, 1 M)), et ensuite nous avons introduit les électrodes dans la solution. La présence de NaNO_2 en milieu acide permet de former rapidement une amine en sel d'aryldiazonium. L'électrode est modifiée en maintenant le potentiel à +2.21 V pendant 5s, -0.14 V pendant 10 s puis en cyclant 10 fois entre -0.2 V et 0.2 V à une vitesse de $100 \text{ m V} \cdot \text{s}^{-1}$. La préfonctionnalisation de la surface avec des fonctions $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ s'opère selon le schéma réactionnel suivant :

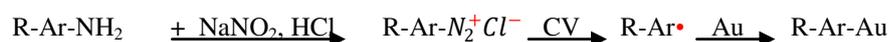


Schéma 1 : Schéma réactionnel de l'électro-greffage des sels d'aryldiazonium pour former la fonction $\text{Au-Ar-SO}_3\text{H}$.

Les résultats obtenus sur la pré-fonctionnalisation des électrodes par le radical $\text{Ar-SO}_3\text{H}$ sont représentés dans les figures 62 et 63.

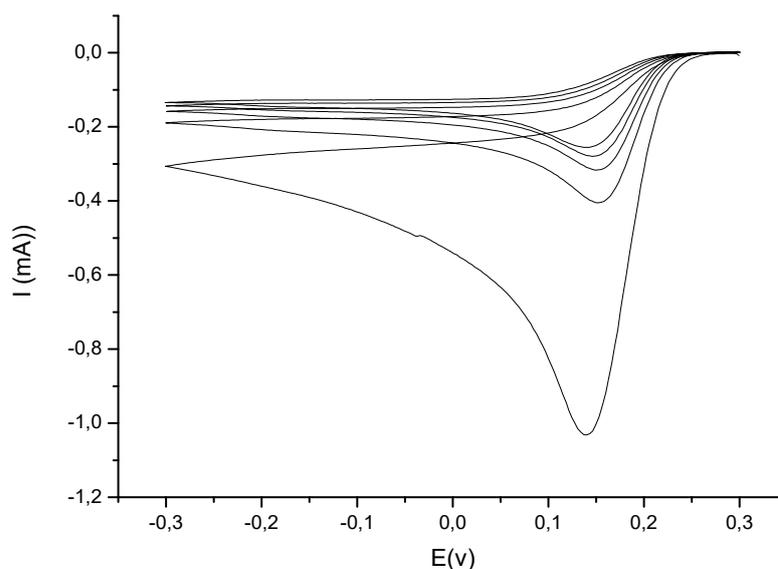


Figure 62: Voltampérogrammes cycliques de modification de la surface d'or, $V= 100\text{mVs}^{-1}$ au cours de 10 cycles.

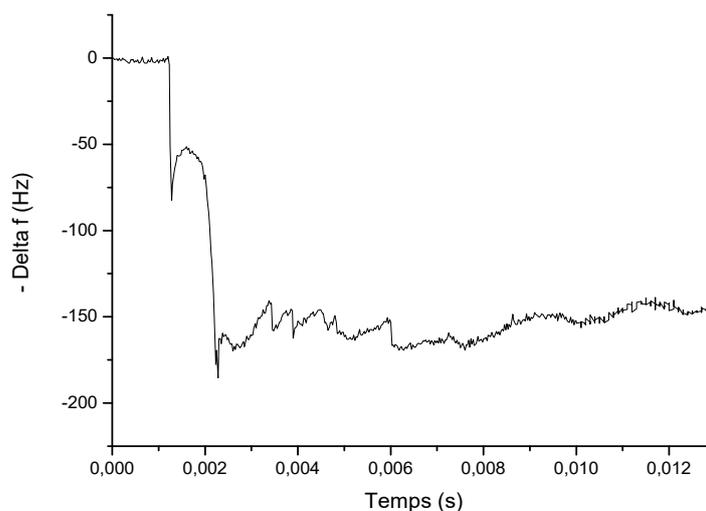


Figure 63: Suivi gravimétrique de la modification de la surface d'or.

Sur les voltammogrammes cycliques enregistrés (Figure 62), l'intensité du courant au premier balayage de potentiel représente un pic de réduction à $0.14 \text{ v}/(\text{Ag}/\text{AgCl})$ qui correspond à un courant de réduction de -1.02 mA . Cette intensité diminue de façon très significative à partir du deuxième balayage et varie ensuite peu. Ce phénomène révèle la modification presque totale de la surface au premier balayage par la passivation de l'électrode. Cette passivation entraîne une forte diminution de l'intensité du courant qui est directement reliée à la quantité de matière réduite à la surface. Elle caractérise la réduction irréversible des sels d'aryldiazonium en aryle radicalaire et la formation d'une monocouche

de chlorure de benzènesulfonyle à la surface de l'or, par une liaison covalente. Cette première vague est corroborée par une prise de masse nette sur le signal de la microbalance à cristal de quartz (QCM) (Figure 63). La QCM utilise les propriétés piézoélectriques du quartz afin de mesurer de faibles variations de masse et de viscosité proches de la surface du cristal. Au premier balayage, nous avons une grande prise de masse et ensuite une stabilité pour les autres balayages de potentiel. Ce qui signifie que la surface d'or est totalement modifiée dès le premier balayage avec une prise de masse qui peut correspondre à un recouvrement total. La variation globale de fréquence observée pendant la fonctionnalisation de la surface d'or est de l'ordre de 170 Hz et correspond à une variation de masse de l'ordre de 180 ng. Cette prise de masse a été calculée grâce à la relation de Sauerbrey suivante (Babacan et al.):

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}} \Delta m$$

Avec :

- Δf = variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz
- Δm = variation de la masse du cristal de quartz
- f_0 = fréquence de résonance propre du cristal de quartz
- A = surface active (métallisée) du cristal de quartz
- μ_q = module de cisaillement du cristal de quartz ($2,947 \cdot 10^{11} \text{g}\cdot\text{cm}^{-1}/\text{s}^2$)
- ρ_q = densité du cristal de quartz ($2,648 \text{g}/\text{cm}^3$)

1.2. Immobilisation de l'ACHE

Pour l'immobilisation de l'ACHE sur la surface de l'électrode modifiée Ar-SO₃H, l'électrode a été nettoyée par l'eau distillée et séchée. Nous avons trempé l'électrode modifiée dans une solution de dichlorométhane (CH₂Cl₂) contenant 5mM de PCI₅, pendant 3 min, pour obtenir une couche organique de type Ar-SO₂Cl.

L'électrode nouvellement modifiée est ensuite séchée afin de pouvoir déposer l'enzyme. L'immobilisation a été suivie par la microbalance à cristal de quartz (QCM). La surface d'or fonctionnalisée (Au- Ar-SO₂Cl) est montée dans une cellule électrochimique et connectée à la microbalance. 600 μL de solution de tampon PP sont introduits initialement dans la cellule pour assurer la stabilisation du signal de la microbalance.

Ensuite des injections de 20 μ l de solution d'enzyme se sont succédées. La surface est enfin démontée de la cellule électrochimique puis lavée et séchée, et ensuite conservée dans le tampon PP à 4°C. Le mécanisme de la réaction est présenté ci-dessous :



Les cinétiques correspondantes à la modification de la surface d'or par l'enzyme sont présentées sur la Figure 64.

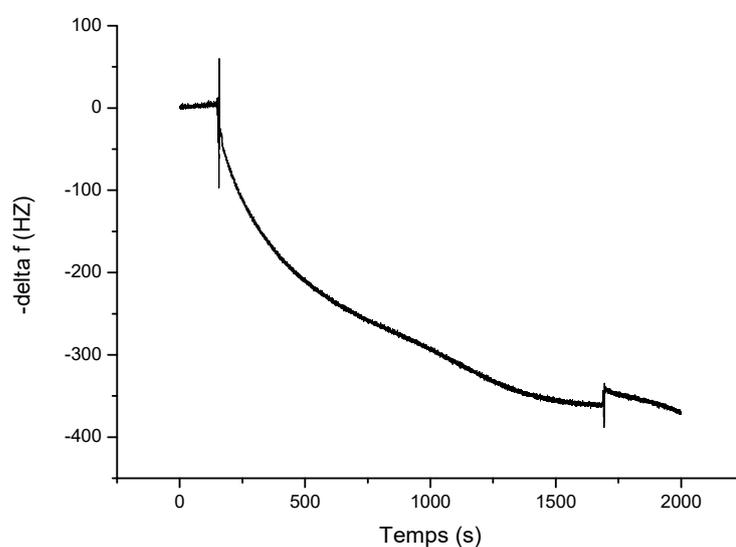


Figure 64 : Suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'enzyme ACHE

À partir de la courbe de suivi gravimétrique qui présente une variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz en fonction du temps, on remarque que l'injection de l'enzyme entraîne une variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz de l'ordre de 400 Hz. Cette variation de fréquence correspond à une variation de masse de l'ordre de 436 ng (relation de Sauerbrey). On observe sur cette courbe, un dépôt graduel de masse sur la surface. Ce qui laisse penser à une réaction thermodynamiquement stable de l'enzyme avec la surface fonctionnalisée. Pour s'assurer du couplage covalent entre l'enzyme et la surface d'or, les tests de la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE ont été réalisés en se servant de la réaction catalytique de l'ACH, en acide acétique et choline, en présence de l'ACHE.

Nous avons vu précédemment que, en présence de l'ACHE non inhibée, l'ACH est totalement transformée en choline et acide acétique (disparition de la bande de vibration Raman à 639 cm^{-1}). Nous avons déposé $5\ \mu\text{L}$ d'ACH à 0.0001M sur la surface d'or modifiée et les mesures Raman ont été réalisées (Figure 65).

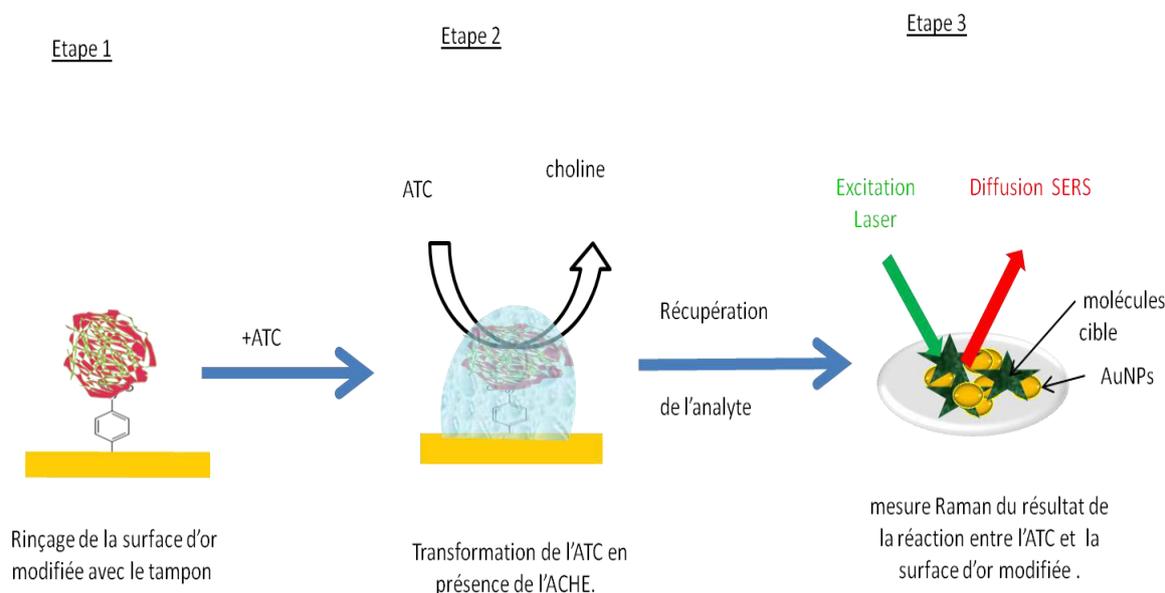


Figure 65 : Mesure de l'activité de l'ACHE immobilisée sur la surface d'or.

Avant la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE, l'électrode est rincée dans la solution tampon ayant servi pour la conservation de l'enzyme afin de supprimer les enzymes adsorbées non spécifiquement sur la surface modifiée, ainsi que les autres molécules (Figure 65 : étape 1). Notre objectif étant la réutilisation du biocapteur en vue d'un bon rendement sensibilité-coût, nous avons utilisé la surface d'or modifiée comme support d'enzyme pour la transformation de l'ACH. L'analyse directe de la surface d'or modifiée par l'ACHE, par la spectroscopie Raman, peut provoquer sa dégradation. C'est pour cette raison que nous avons conservé la surface à 4°C et récupéré l'analyte de la surface après la réaction (Figure 65 : étape 2). L'amplification du signal Raman de l'analyte a été accomplie par les nanoparticules d'or utilisées au cours des mesures précédentes (Figure 65 : étape 3). La figure 66 ci-dessous représente le spectre Raman SERS du : résultat de la réaction de l'ACH avec la surface d'or modifiée par l'ACHE et de l'ACH seul.

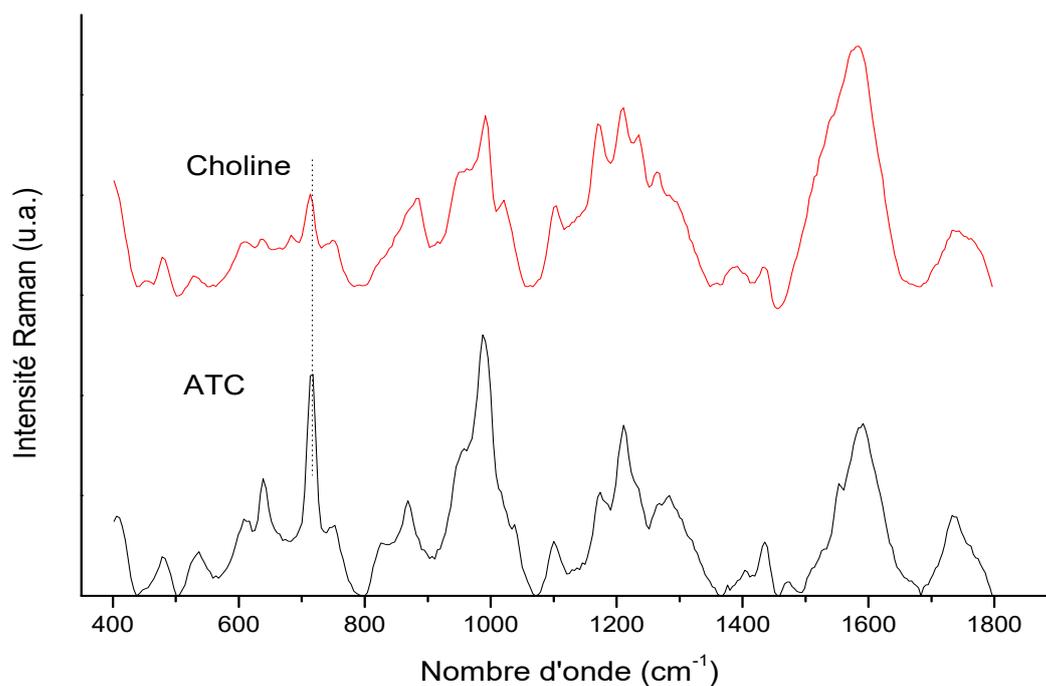


Figure 66: Spectres Raman SERS de : la choline observés suite à la transformation de l'ACH en présence de l'ACHE immobilisée sur la surface et (0.0001M) ACH (pour comparaison).

Après l'ajout des AuNPs à la solution d'analyte (obtenue par la réaction de l'ACH avec la surface modifiée par l'ACHE), on obtient un signal Raman peu intense (Figure 66, choline) correspondant au spectre de diffusion Raman SERS de la choline, avec les bandes de vibration à 714, 865, 950, 1267 et 1438 cm^{-1} caractéristiques de cette molécule (Tableau 12). Pour comparaison, nous avons aussi représenté le spectre de diffusion Raman SERS de l'ACH (Figure 66). Nous remarquons bien la différence entre le spectre de diffusion Raman SERS de l'ACH et celui de la choline. Les bandes de vibration à 639 et 1735 cm^{-1} sont caractéristiques de la partie acide acétique de la molécule ACH. Leur disparition dans le spectre d'hydrolyse de ce neurotransmetteur est directement liée à la transformation de l'ACH, comme affirmation de l'immobilisation de l'ACHE sur la surface d'or.

Lorsqu'on compare les spectres Raman SERS de la choline et de l'ACH, on observe une amplification des bandes de vibration de l'ACH beaucoup plus importante que pour la choline. Cela confirme notre hypothèse: en présence de la choline, les nanoparticules d'or s'agrègent et se précipitent, par conséquent nous n'obtenons pas une amplification importante du signal Raman de cette molécule.

2. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE.

Nous avons suivi la transformation de l'ACH en présence de l'ACHE immobilisée pour différentes durées de contact. La figure 67 illustre la superposition des spectres obtenus pour la mesure de l'activité de l'ACHE immobilisée.

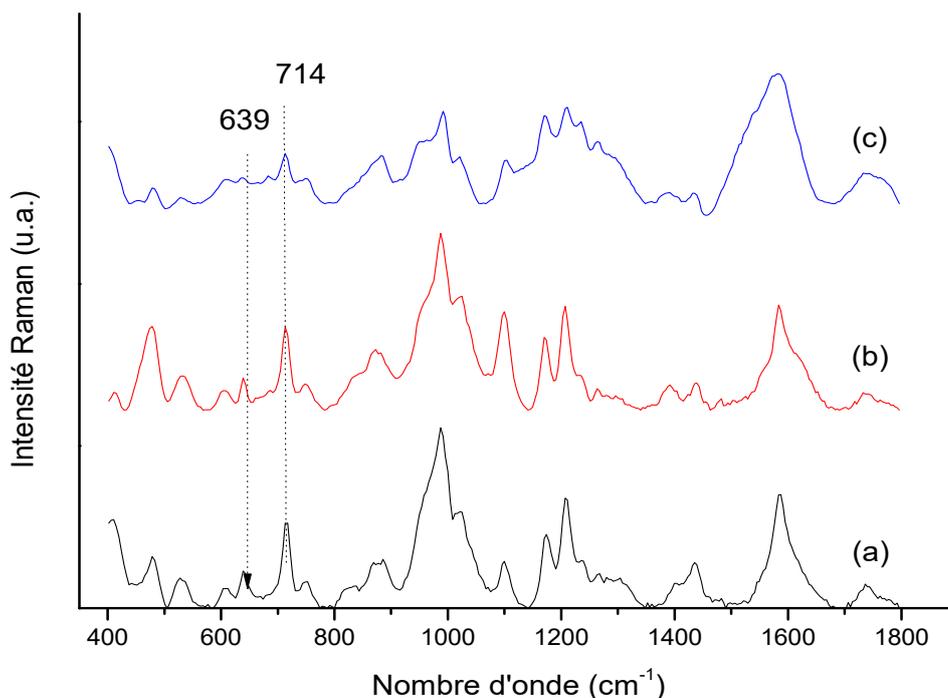


Figure 67 : Spectres Raman SERS de l'acétylcholine (ACH 0.0001M) en fonction du temps :
(a) 10 min et (b) 60 min : ACH non transformée par ACHE, (c) 3h transformation de l'ACH en présence de l'ACHE

L'intensité de la bande de vibration à 639 cm^{-1} diminue et disparaît après environ 3h de contact (Figure 67). Nous pouvons en conclure que la transformation de l'ACH (0.0001M) peut être effectuée complètement à 4°C en 3h de contact avec l'ACHE immobilisée. Nous avons utilisé ces valeurs comme conditions optimales pour la suite de nos tests de mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE.

3. Détection du paraoxon

Après la confirmation de l'immobilisation de l'ACHE sur la surface d'or nous avons utilisé ce biocapteur pour la détection du paraoxon, en nous basant sur le même principe de mesure. La solution de pesticide est préparée comme nous l'avons vu précédemment. La surface d'or modifiée et portant l'enzyme est introduite dans la solution de pesticides (1mL) pendant 30 min puis lavée au tampon et séchée. Ensuite une solution de l'ACH (0.0001M)

est déposée sur cette surface. Pour les mesures Raman nous avons suivi le même protocole décrit ci-dessous (figure 65) pour la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE immobilisée sur la surface d'or. Après la réaction de l'ACH avec la surface d'or modifiée par l'ACHE (inhibée par le paraoxon), nous avons récupéré l'analyte pour les mesures SERS.

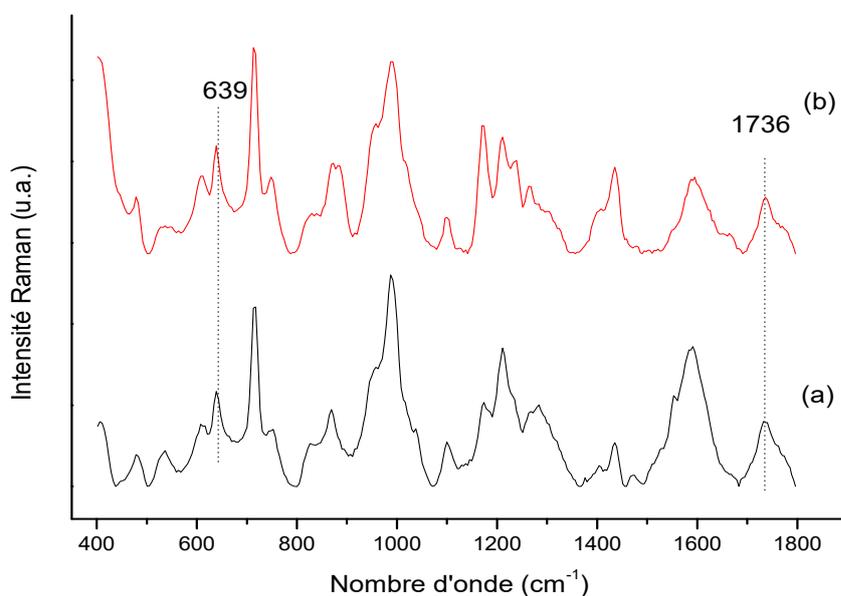


Figure 68: Spectres Raman SERS de : (a) l'acétylcholine (ACH) et (b) ACH (non transformé) observés à cause de l'inhibition de l'activité de l'ACHE par le paraoxon (4×10^{-13} M).

Comme prévu, en présence du paraoxon (4×10^{-13} M), nous avons obtenu le spectre de l'acétylcholine (Figure 68) qui est un indicateur de l'inhibition de l'activité enzymatique par le paraoxon.

Conclusion

Comme alternative, nous pouvons proposer un deuxième système de détection Raman SERS couplée à la mesure de l'activité de l'ACHE. L'immobilisation de l'ACHE sur une surface d'or fonctionnalisée, permet d'obtenir un biocapteur très performant et réutilisable. L'immobilisation de l'ACHE sur la surface a été vérifiée par la technique QCM et par mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE immobilisée.

Ce système basé sur la détection Raman SERS est plus sensible que les tests Raman permettant de détecter l'activité de l'ACHE sans immobilisation. Le fait que l'enzyme soit immobilisée sur la surface, permet facilement une inhibition par une faible concentration de pesticides. Le signal Raman SERS de l'ACH ou la choline, résultante de la mesure de

l'activité de l'ACHE, est facilement identifiable à cause de l'absence d'interférence du signal Raman avec d'autres molécules dans l'analyte (pesticides, enzyme,...).

En comparaison avec les résultats obtenus dans la littérature pour la limite de détection, à savoir :

6.5×10^{-10} mol/L (H. Zhang et al.), $9,6 \times 10^{-10}$ mol/L (P. Li et al.), la limite de détection est inférieure à 5×10^{-8} mol/L (Wang et al 2014), $0.22 \mu\text{M}$ (May et al.), $0.212 \mu\text{ mol/L}$ (Turan et al.), notre biocapteur que apparaît plus sensible puisque nous avons un seuil de détection à 4×10^{-13} mol/L .

Ces différents résultats montrent que ce « nanobiocapteur » pourrait être employé, à l'avenir, pour la détection rapide de tous les types d'inhibiteurs de l'ACHE, en milieu aqueux, avec une excellente sensibilité et une bonne reproductibilité pour une détection non sélective. L'intérêt principal par rapport à l'utilisation de l'ACHE non immobilisée est la réutilisation possible de la surface.

VIII. Autres résultats : Détection de pesticides par mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE couplée à la diffusion dynamique de la lumière.

Les nanoparticules d'or (AuNPs) et d'argent (AgNPs) possèdent des propriétés physico-chimiques très distinctes qui les rendent intéressantes pour la fabrication de nombreux biocapteurs. La taille et la forme des nanoparticules déterminent ces propriétés qui présentent une excellente biocompatibilité en utilisant des ligands appropriés (Xiangmin et al. 2013). Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont parmi les nanoparticules métalliques les plus utilisées et les plus employées dans l'élaboration des biocapteurs optiques en raison de leurs propriétés physiques et chimiques stables.

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique de diffusion de lumière quasi élastique utilisée pour déterminer le diamètre hydrodynamique moyen et la distribution de taille des nanoparticules, des polymères et des protéines (Huang et al.). Les AuNPs sont utilisés comme amplificateurs de diffusion de la lumière dans les biocapteurs établis par la DLS (Esfahani et al.; Ramanaviciene et al.). Les biocapteurs associés à la DLS sont développés en se basant sur l'agrégation des AuNPs induite par l'analyte. La mesure du changement de la taille des AuNPs provoqué par la liaison avec l'analyte a permis la détection de très faibles concentrations d'analyte, tels que les protéines, l'ADN et les ions métalliques toxiques (Gao et al. 2011; X. Liu et al. 2009; Xiang-min Miao et al. 2012; Xiong et al. 2012)

Cette étude est consacrée au développement d'une nouvelle méthode sensible pour la détection des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase en utilisant la diffusion dynamique de la lumière couplée à l'activité enzymatique de l'ACHE. Nous montrons que les paramètres physico-chimiques (stabilité, agrégation et dissolution) des nanoparticules d'or en particulier dans le milieu de contact, sont fortement influencés par l'activité enzymatique de l'ACHE.

1. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE par la DLS.

Pour garantir l'adéquation du biocapteur pour la détection des inhibiteurs de l'ACHE, un test de mesure de l'activité de cette enzyme est réalisé.

1.1. Effet de la taille des nanoparticules.

L'efficacité des nanoparticules (NP) pour absorber et diffuser la lumière dépend fortement de leur taille et de leur forme ainsi que des propriétés diélectriques de

l'environnement (Kolwas et al. 2009). Pour étudier l'effet de la taille des nanoparticules sur la sensibilité du biocapteur, des AuNPs non modifiées (trois diamètres différents) et des AgNPs non modifiées (trois diamètres différents) sont incubés avec la choline produite dans les conditions optimales : l'hydrolyse de l'ACH (1×10^{-3} M) mélangé, pendant 30 min à 37°C , avec ACHE (2×10^{-2} U.mL $^{-1}$). La concentration des nanoparticules choisie a été ajustée pour obtenir un Count Rate d'environ 200 kcps avec la plus faible concentration en Nps. Un signal DLS stable a été obtenu en fixant les concentrations de particules à 35×10^9 , $4,5 \times 10^9$ et 55×10^7 particules / ml pour des diamètres de 20, 40 et 80 nm AuNPs respectivement, et 35×10^9 particules / mL pour les AgNPs, et ces concentrations ont été désignées comme étant optimales pour la stabilité de diamètre hydrodynamique moyen (D_{hm}) et l'intensité de diffusion moyenne (I_{dm}).

La figure 69 représente la variation du D_{hm} et I_{dm} des nanoparticules en présence de choline produite par l'hydrolyse de l'acétylcholine en présence de l'ACHE. La production de la choline induit l'agrégation de toutes les nanoparticules. Le D_{hm} des NPs a accru en choline pour atteindre approximativement le même D_{hm} ($\approx 130 \text{ nm} \pm 10$) (figure 69–A). Les complexes choline@AuNPs (20 nm) présentent une intensité de diffusion de la lumière beaucoup plus forte que les autres groupes de choline-NPs (figure 69–B).

Aux mêmes concentrations de la choline, la même surface de nanoparticules a été occupée. A cause de l'excès en choline dans la solution, les nanoparticules se sont agrégées et le D_{hm} augmente. Nous savons que l'intensité de diffusion de la lumière est proportionnelle à la taille des particules, les nanoparticules les plus grandes ont une diffusion de la lumière beaucoup plus forte que les plus petites. Alors que dans notre cas, même si le D_{hm} des amas des nanoparticules agrégées est presque le même ($\approx 130 \text{ nm} \pm 10$), nous constatons que l' I_{dm} des AuNPs (40 et 80 nm) est plus faible que celle des AuNPs (20 nm). Ce qui implique que les agrégats des AuNPs (20 nm) ne présentent pas la même forme que celles des AuNPs 40 et 80 nm et donc que pour des concentrations élevées en choline, le couple choline@AuNPs (40 et 80 nm) se lie à un autre couple, formant ainsi une grappe qui précipite.

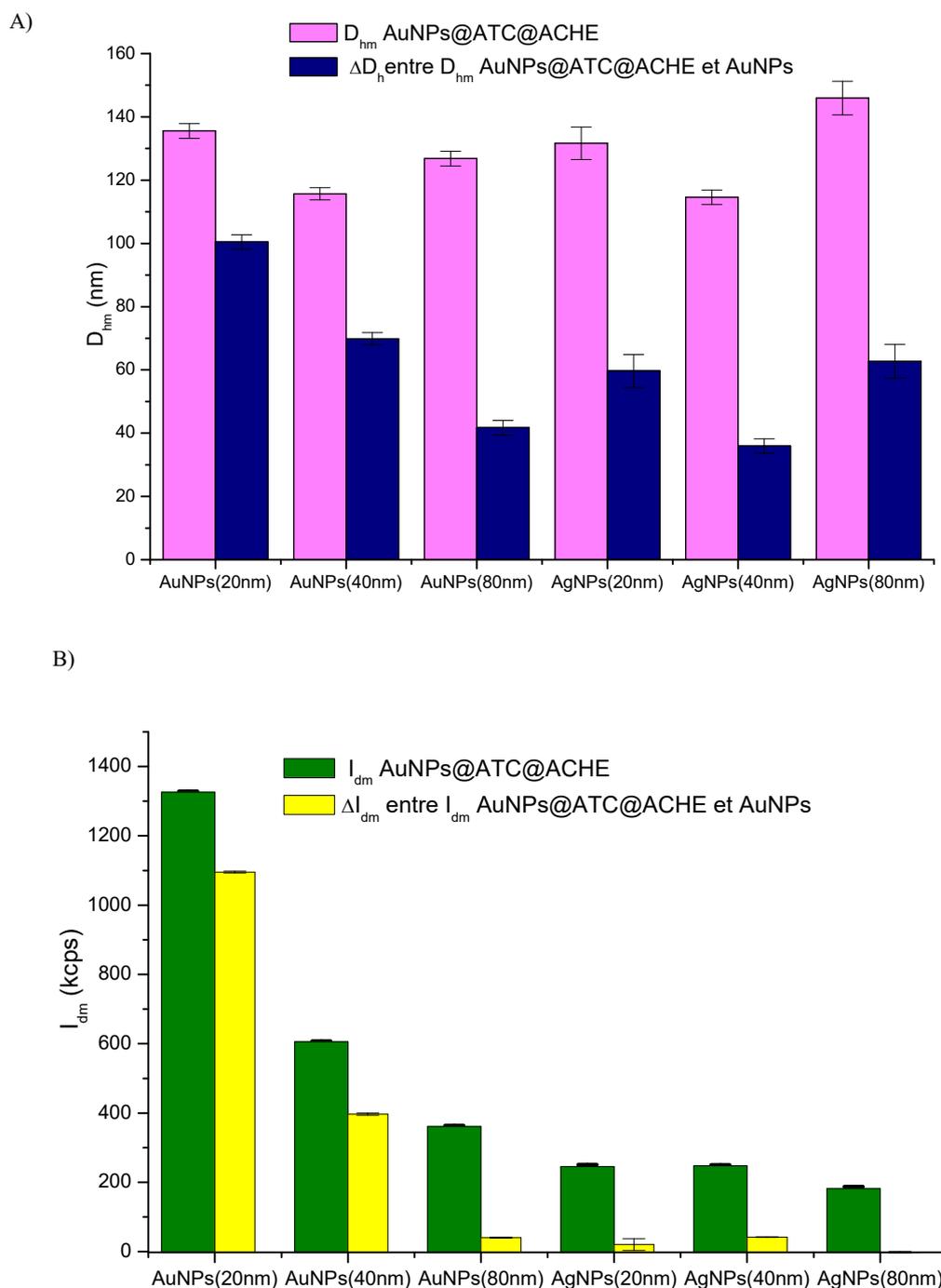


Figure 69 : Effet des nanoparticules sur la sensibilité du biocapteur. (A) variation du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules (ΔD), seul et en présence de choline produite par l'hydrolyse de l'acétylcholine avec l'ACHE. (B) (ΔI) correspondante.

Les AuNPs et AgNPs se lient facilement à la choline par des interactions électrostatiques, ce qui nous a permis de mesurer l'activité enzymatique de l'ACHE par la DLS. La sensibilité de cet essai dépend fortement de la taille et du type des NPs. Pour obtenir une bonne sensibilité, il faut avoir un changement de diamètre et d'intensité le plus

important possible. Les AuNPs (20 nm) sont choisies pour la suite de notre travail, parce qu'elles sont les plus sensibles.

1.2. Optimisation du temps d'incubation

Pour mesurer l'activité de l'ACHE par le biocapteur, une dispersion contenant des AuNPs revêtues de citrate de dimensions 20 nm est utilisée. La concentration massique d'or dans toutes les dispersions contenant des nanoparticules d'or (20 nm) est dans la gamme de $7,00 \times 10^{10}$ particules / mL. Les solutions des nanoparticules sont préparées par dilution dans le tampon PP à partir de solutions mères de particules.

Nous avons commencé à mesurer l'activité de l'ACHE en fonction de temps. Les AuNPs sont incubées dans la choline produite par l'hydrolyse de l'ACH (1×10^{-3} M) en présence de l'ACHE (2×10^{-2} U/mL) en fonction du temps d'incubation. L'ACHE et l'ACH sont mélangés et conservés durant le temps d'incubation à 37°C pour une transformation rapide de l'ACH. Lorsque ces NPs sont ajoutées à la choline ainsi produite, la liaison entre la choline et les AuNPs devrait provoquer l'agrégation des nanoparticules (Po Wang et al.).

Le D_{hm} et l' I_{dm} des AuNPs en fonction de la concentration en choline, produite à différents temps d'incubation de l'ACH et de l'ACHE, sont tracés sur la figure 70. Comme le montre cette figure, la taille des agrégats des nanoparticules et l'intensité lumineuse augmentent en fonction de la quantité de choline produite. A faible concentration de choline produite (avant 15 min d'incubation) il n'y a pas d'agrégation des particules. Par contre, un fort accroissement de taille à 30 min a été observé. Après 30 min on observe un plateau, indiquant un état d'équilibre qui correspond à la transformation totale de l'ACH en choline. Le temps de 30 mn a donc été choisi comme temps d'incubation optimal de l'ACH avec l'enzyme avant les mesures DLS.

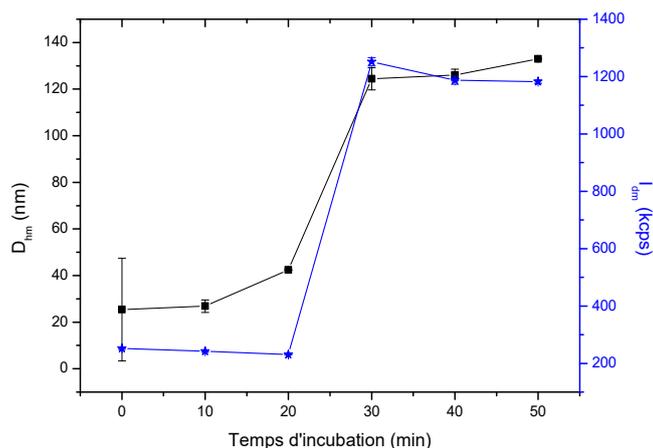


Figure 70 : Effet de la choline produite à différents temps d'incubation (0-100 min) de l'ACHE (2×10^{-2} U.mL⁻¹) avec l'ACH (1×10^{-3} M), sur la réponse du biocapteur (la variation de D_{hm} et I_{dm} des AuNPs).

1.3. Optimisation de la concentration en ACHE et ACH

L'effet de la concentration de l'ACHE sur la réponse du biocapteur a également été étudié (Figure 71). Nous remarquons que le D_{hm} et l' I_{dm} des AuNPs croissent avec l'augmentation de la quantité d'ACHE et atteignent le maximum à 2×10^{-2} U.mL⁻¹, indiquant un état d'équilibre. Les résultats sont en accord avec les précédents, en augmentant la concentration de l'ACH, la quantité de la choline produite croît. Ceci confirme que la forte concentration de la choline est capable d'agréger les nanoparticules et de diminuer leur potentiel électrostatique (C.-W. Liu et al.). Ainsi, nous avons choisi 2×10^{-2} U.mL⁻¹ d'ACHE comme concentration d'enzyme optimale pour le biocapteur.

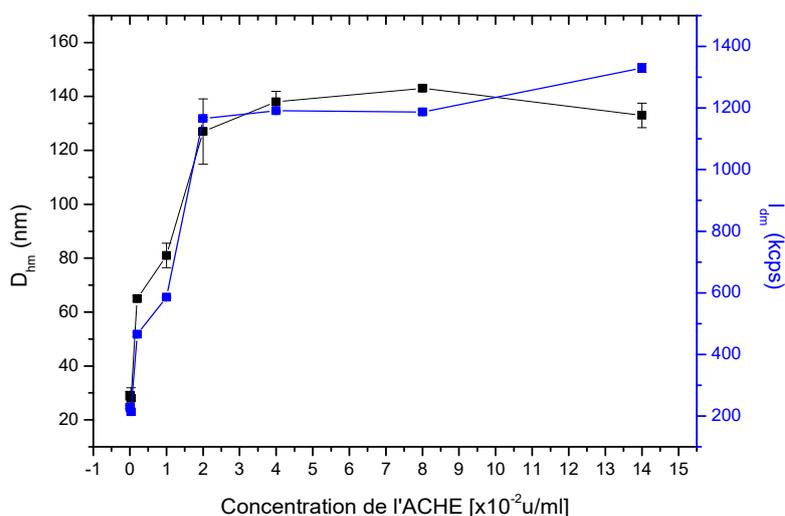


Figure 71 : Effet de l'ajout de différentes concentrations de l'ACHE à l'ACH (1×10^{-3} M) pendant 30 min à 37 °C, sur la réponse du biocapteur.

Ces résultats indiquent qu'en présence de choline et d'enzyme ACHE, l'ACH n'a pas d'effet sur le D_{hm} et I_{dm} des AuNPs et la concentration élevée en choline induit l'agrégation des AuNPs.

Des expériences d'optimisation de la concentration de l'ACH sont réalisées dans une plage de concentration de $(0 \text{ à } 2) \times 10^{-3} \text{ M}$ (Figure 72). La Figure 73-A montre le changement de couleur en fonction de la concentration (la couleur des solutions est passée du rouge au violet progressivement), ce qui a été encore confirmé par le changement de D_{hm} et de I_{dm} . Avec l'augmentation de la concentration d'ACH, la concentration de choline produite augmente induisant l'agrégation des nanoparticules.

Le D_{hm} et I_{dm} des AuNPs sont représentés en fonction de la concentration d'ACH (Figure 72-B). Le D_{hm} et I_{dm} des AuNPs augmentent lorsque la concentration de l'ACH croît, et le maximum est atteint à $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, indiquant un état d'équilibre. La valeur optimale pour la concentration d'ACH dans le présent essai était d'environ $1 \times 10^{-3} \text{ M}$. L'accroissement du D_{hm} et de I_{dm} des AuNPs avec la concentration d'ACH à faibles doses correspond à une augmentation graduelle de la couverture de surface des AuNPs par la choline produite. D'autre part, à des concentrations supérieures à l'état d'équilibre, le même degré d'agrégation des nanoparticules est induit lorsque la surface est complètement recouverte de choline. Le degré d'agrégation des AuNPs dépend de la concentration de choline, où des concentrations plus élevées de choline induisent une agrégation complète des nanoparticules.

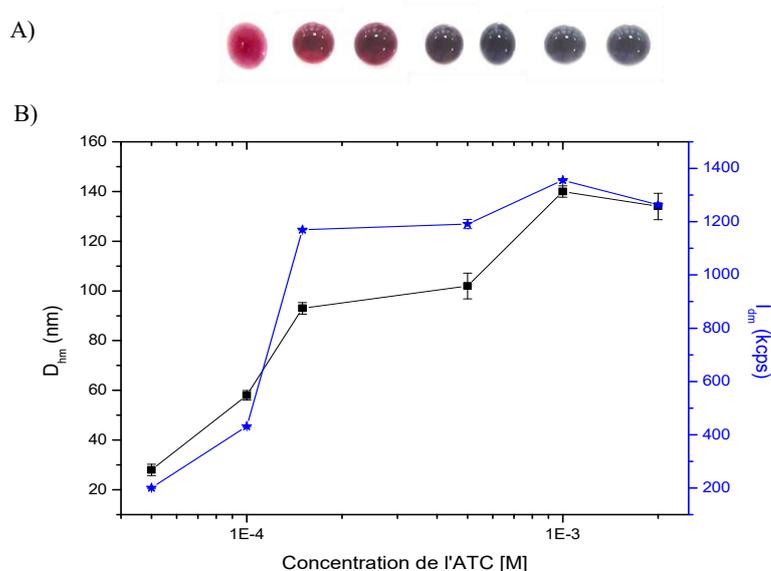


Figure 72 : Etude de la sensibilité du biocapteur à l'ACH : A) Changement de couleur des nanoparticules d'or avec l'augmentation des concentrations d'ACH, de gauche à droite ($0-2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$); B) le diamètre hydrodynamique moyen et l'intensité de diffusion moyenne des nanoparticules d'or incubées avec la choline produite par l'ACH à différentes concentrations en présence de l'ACHE. La concentration en ACHE est de $2 \times 10^{-2} \text{ U.mL}^{-1}$, et le temps d'incubation est de 30 min à 37°C .

2. Discussion

2.1. Formation du couple ACH@NPs.

La complexité de l'étude des interactions entre des molécules et des nanoparticules nécessite d'étudier l'effet de chaque molécule en mélange et isolée. Pour cette raison, nous avons aussi étudié le comportement des nanoparticules au contact de l'ACH en mesurant leur diamètre hydrodynamique moyen (D_{hm}) et leur intensité (I_{dm}). Les mesures par DLS de l'agrégation des NPs d'or sont effectuées directement après incubation des AuNPs non modifiées avec différentes concentrations d'ACH. Tous les échantillons ont été dispersés dans du PP 0,01 M (pH 8) pour un volume final de 1,0 mL. Nous avons tracé sur la figure 73 la distribution de tailles en intensité des nanoparticules seules et en présence de l'ACH (3×10^{-4} M).

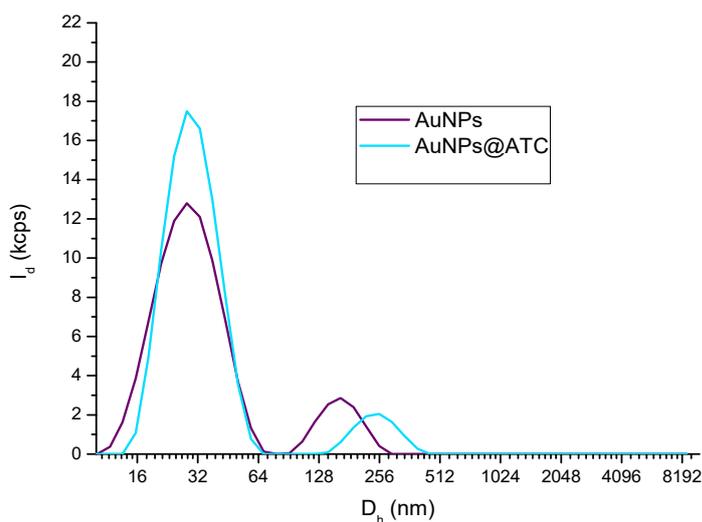


Figure 73: Distribution de tailles en intensité des nanoparticules seules et en présence de l'ACH (3×10^{-4} M).

Comme le montre la figure 73, le diamètre hydrodynamique moyen des AuNPs@ACH varie légèrement. Ceci montre qu'il y a liaison de la molécule ACH, contenant le groupement quaternaire ammonium (chargé positivement), avec les nanoparticules (chargées négativement) par attraction électrostatique (Mautner et al. 1964). Nous avons remarqué aussi une légère augmentation de l'intensité de diffusion moyenne (I_{dm}) (Tableau 15).

Tableau 15: distributions de taille et d'intensité des nanoparticules

Taille et intensité des NPs	Dh moyen (nm)	Intensité de diffusion moyenne (kcps)
AuNPs (35x10 ¹⁰ particules/ml)	33	233
AuNPs dans ACH (3x10 ⁻⁴ M)	55	340

En faisant évoluer la concentration en ACH, il est possible d'étudier les interactions physico-chimiques entre les nanoparticules et l'ACH en incubant ces dernières dans différentes concentrations de ce neurotransmetteur (de 0 à 4x10⁻³ M) (figure 74).

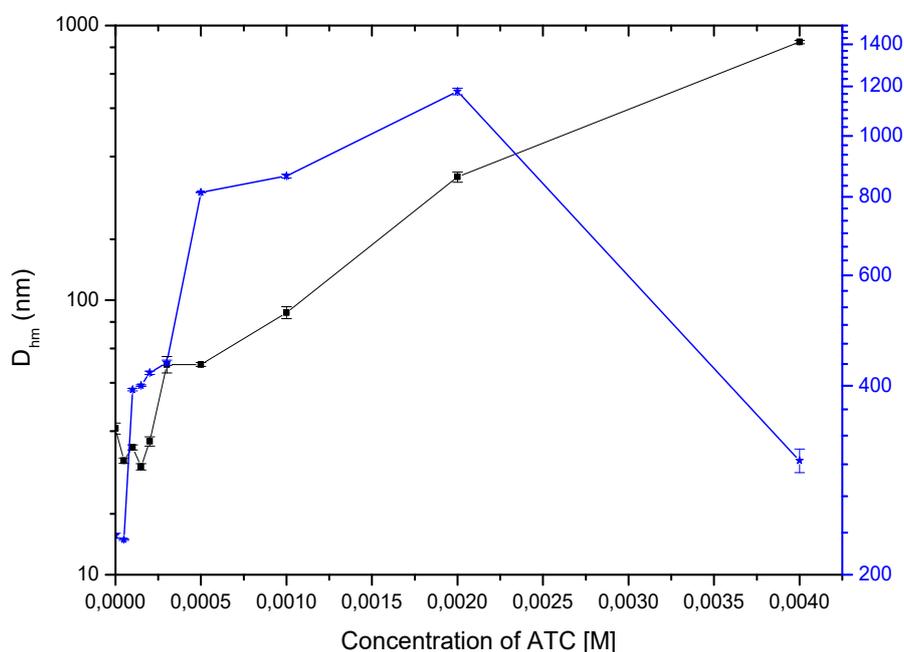


Figure 74: Effet de la concentration d'ACH (0-4x10⁻³ M) sur le diamètre hydrodynamique moyen et l'intensité de diffusion moyenne des AuNPs. L'erreur a été obtenue à partir de trois mesures indépendantes.

Comme le montre la figure 74, le D_{hm} du mélange d'AuNPs et d'ACH (de 0 à 4x10⁻⁴ M) est presque inchangé mais nous observons une amplification de l'intensité de diffusion moyenne. Celle-ci peut rendre l'ACH amplificatrice de l'intensité des nanoparticules individuelles sans agrégation. Le D_{hm} et l'I_{dm} augmentent par addition d'ACH de 3x10⁻⁴ à 2x10⁻³ M. L'agrégation des AuNPs est due à la diminution des répulsions interparticules (Liron et al 2011). Pour une concentration d'ACH supérieure à 2x10⁻³ M nous observons un début de précipitation des nanoparticules correspondant à l'augmentation de la taille des agrégats et à la diminution de l'intensité de diffusion.

Ces résultats révèlent l'instabilité des nanoparticules chargées négativement qui peut être induite par la présence d'ACH provoquant leur agrégation. En outre, la sensibilité de la DLS aux agrégations des nanoparticules est significativement plus élevée que celle aux nanoparticules individuelles. Cette sensibilité est attribuable au fait que l'intensité de diffusion de la lumière est proportionnelle à la taille des particules (Liu et al 2009).

Toutes les molécules contenant le groupement thiol peuvent facilement être absorbées sur la surface des nanoparticules par la liaison $-S$ (Ghosh et al 2007; Liu et al. 2012), qui est capable d'agréger les nanoparticules. En effet, l'ACHE se lie à la surface des nanoparticules et les protège en présence de l'ACH, et celui-ci est incapable de l'écarter de la surface ni de se lier avec eux comme une molécule chargée négativement (pas d'agrégation en présence de l'ACH non transformé).

La molécule de la choline contient le groupement quaternaire ammonium capable de réagir avec la surface d'or et aussi le groupement $-OH$ capable de se lier à la surface d'or (Okumura et al.), en induisant une agrégation des nanoparticules. Elle peut éliminer la molécule de l'ACHE de la surface d'or induisant leur agrégation à forte concentration (D. Liu et al.), où le composé AuNPs@ACHE peut être utilisé comme un composé négatif pour attirer d'autres molécules positives (choline), puisque le point isoélectrique de l'ACHE se trouve aux environs d'un $pH=5$ (nous avons un $pH=8$). Ce qui leur permet de se lier à d'autres molécules par absorption électrostatique (Hou et al.).

2.2. Formation des agrégats de nanoparticules.

Pour étudier la formation des agrégats des nanoparticules, trois solutions d'AuNPs et trois suspensions des nanoparticules d'argent (AgNPs) ont été utilisées pour l'analyse DLS en présence de l'ACH.

La figure 75 représente la variation du D_{hm} et I_{dm} des AuNPs (20, 40 et 80 nm) et des AgNPs (20, 40 et 80 nm) introduites dans l'ACH (2×10^{-3} M).

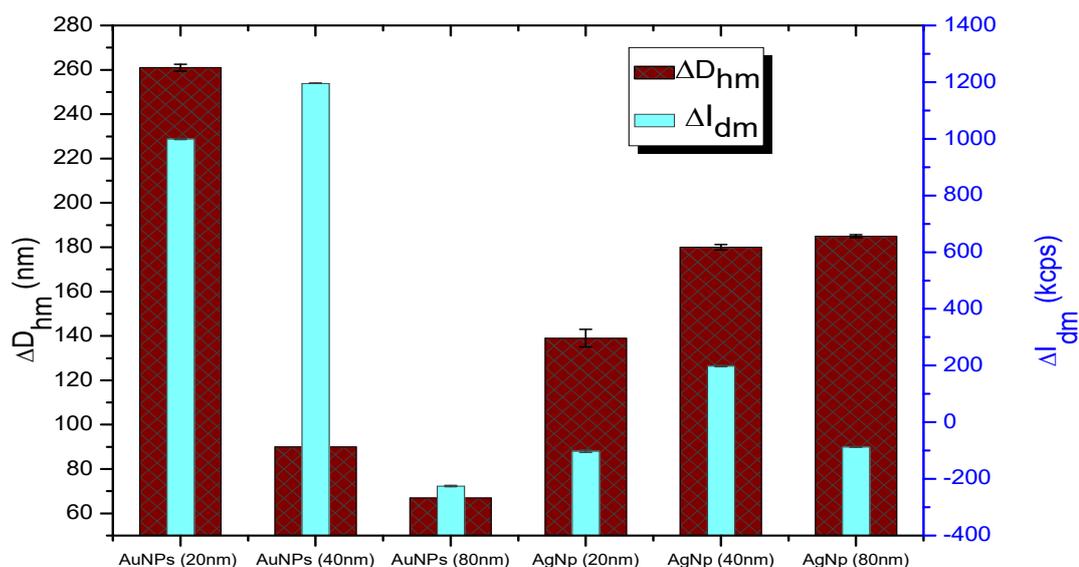


Figure 75 : Sensibilité des nanoparticules à l'ACH (2×10^{-3} mol/L). (ΔD_{hm}) Variation du diamètre hydrodynamique moyen et (ΔI_{dm}) la variation de l'intensité de diffusion moyenne des nanoparticules d'or (20, 40, 80nm) et argent (20, 40, 80nm).

Le ΔD_{hm} et la ΔI_{dm} des AuNPs (20 nm) sont plus grands que ceux des autres nanoparticules, ces nanoparticules s'agrègent dans l'ACH et leur intensité augmente. Pour les AuNPs (40 nm), nous constatons une grande variation de l' I_{dm} mais la variation du diamètre est faible par rapport à celle des AuNPs (20 nm). Pour les autres nanoparticules, l' I_{dm} décroît pour une forte agrégation. Cette dissemblance est due à la différence du mécanisme d'agrégation (Lucas et al 2011; Meakin et al. 1986).

L'agrégation consiste à former des structures plus grandes à partir de particules isolées ou d'agrégats plus petits. Il y a plusieurs processus d'agrégation possibles. Dans notre cas, c'est l'agrégation limitée par diffusion (DLA) où les particules, avant de se coller, étaient soumises à un mouvement brownien au hasard et enfin l'agrégation par réaction se fait par contact, comme une épidémie ou un feu qui se propage (Cugnet et al 2003).

Les ions présents dans l'électrolyte sont soumis d'une part au potentiel électrostatique développé par la surface et d'autre part au mouvement Brownien des particules et des agrégats. Lors des premiers instants, l'agrégation mettra en jeu des particules primaires sphériques. Cependant, ultérieurement, les collisions auront lieu entre agrégats.

Dans les solutions moins concentrées, les agrégats suivent des trajectoires déterminées au hasard (= mouvement Brownien) mais ne s'accrochent pas à chaque fois qu'ils viennent en contact. Au lieu de cela, ils continuent leur chemin et de nombreuses collisions sont nécessaires avant que deux agrégats ne s'accrochent ensemble. Ce comportement est le résultat d'une barrière d'énergie due au potentiel répulsif d'une paire particule - particule qui doit être franchie avant que les forces attractives de courte portée puissent s'exercer.

Dans le cas de solutions plus concentrées, les collisions agrégat –agrégat sont plus probables d'où la forte probabilité que les paires d'agrégats s'accrochent lorsqu'elles entrent en contact et se précipitent.

La taille de l'agrégat ne dépend pas de la densité en nombre de nanoparticules mais dépend de la densité massique des nanoparticules: plus les nanoparticules sont légères plus on a la possibilité de former des agrégats de plus grande taille et inversement. On peut avoir des agrégats plus grands mais moins intenses (faible nombre de particules, par exemple), ce qui va leur permettre de ne pas se précipiter et de diffuser plus de lumière et inversement.

Dans le cas des AuNPs 20 nm , il n'y a pas précipitation (car amplification de l' I_{dm}) malgré la grande taille les agrégats.

3. Détection du paraoxon

Ce biocapteur enzymatique est utilisé pour la détection du paraoxon. Les mesures DLS sont effectuées directement après incubation des AuNPs (20 nm) avec l'analyte. Premièrement l'ACHE est mélangée avec différentes concentrations de paraoxon (de 4×10^{-3} à 4×10^{-11} M) pendant 30 min à température ambiante et ensuite l'ACH est ajoutée, l'analyte est conservé pendant 30 min à 37°C.

Les résultats de détection du paraoxon sont représentés sur la figure 76. Comme on pouvait s'y attendre, le D_{hm} et l' I_{dm} des AuNPs non modifiées augmentent en diminuant la concentration de paraoxon. En réduisant la quantité du paraoxon, nous avons plus d'enzymes non inhibées donc plus de choline produite. Le changement de couleur des AuNPs en fonction de la concentration de pesticides est représenté sur la figure (76-A). La couleur des solutions a viré progressivement du violet au rouge en augmentant la concentration de

paraoxon, ce qui est la conséquence du changement du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules. Comme le montre la figure 76-B, le D_{hm} et l' I_{dm} diminuent avec l'augmentation de la concentration de paraoxon. Cependant les AuNPs non modifiées sont stables en présence de forte concentration de paraoxon en raison de l'inhibition de l'activité de l'ACHE, et s'agglomèrent en présence d'une faible concentration en pesticides.

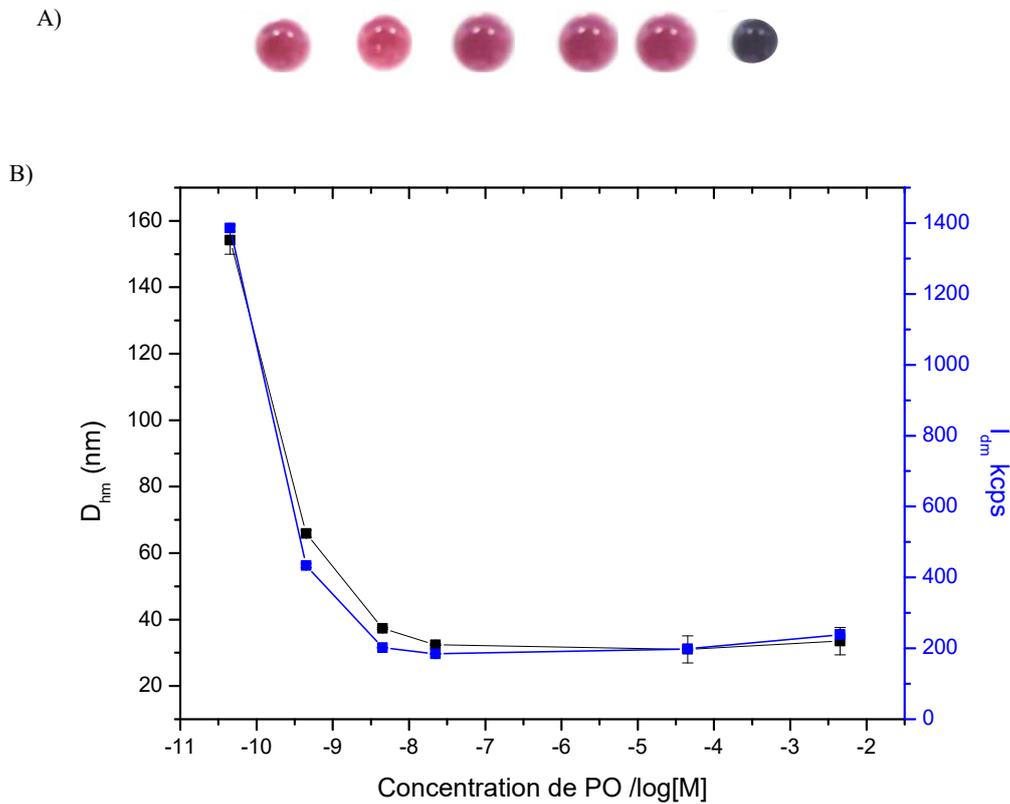


Figure 76 : Effet de l'inhibition de l'ACHE par différentes concentrations de paraoxon (4×10^{-3} à 4×10^{-11} M) sur : (A) la couleur des AuNPs et (B) le D_{hm} et I_{dm} des NPs.

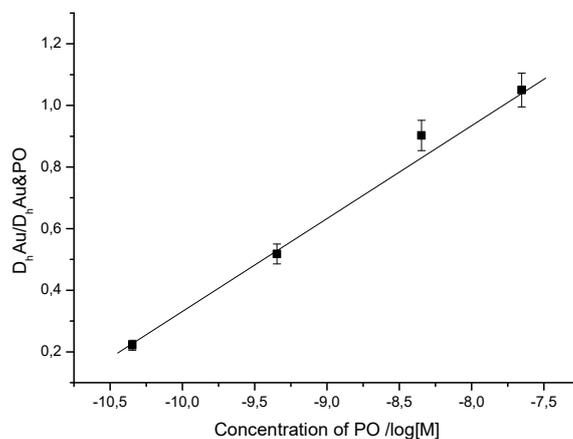


Figure 77: Courbe d'étalonnage de la variation du rapport des AuNPs, seul (D_{hm}) et des incubés dans l'analyte (D_{hm} Au@PO), en fonction de la concentration du Paraoxon.

Nous avons tracé la variation du rapport entre le D_{hm} des AuNPs, seules et les AuNPs en présence de l'analyte, en fonction de la concentration du paraoxon (de $4,5 \times 10^{-8}$ à $4,5 \times 10^{-11}$ M) sur la figure 77. En conséquence, le rapport de diamètre est directement proportionnel à la concentration de paraoxon.

Conclusion

En conclusion, nous avons développé pour la première fois (selon nos connaissances) un biocapteur enzymatique, à base de la DLS en utilisant des AuNPs (20 nm), pour mesurer l'activité de l'ACHE et détecter ces inhibiteurs. La réponse de ce biocapteur est obtenue en surveillant la variation de D_{hm} et I_{dm} en fonction de la concentration de la choline.

Les nanoparticules sont instables dans la choline, le D_{hm} croit en augmentant la concentration de la choline produite par hydrolyse de l'ACH en présence de l'ACHE. L' I_{dm} des AuNPs (20 nm) s'amplifie significativement en augmentant le degré d'agrégation des nanoparticules, contrairement aux AuNPs (40 et 80 nm) et AgNPs (20, 40 et 80 nm) qui se précipitent en accroissant leur taille.

Nous nous sommes servis de cette variation pour le contrôle de la perte d'activité de l'ACHE en présence de faibles concentrations de paraoxon.

Ce protocole optimisé est sensible, très simple. Il ne nécessite aucun processus compliqué, de modification ou prétraitement des AuNPs. La limite de détection pour ce biocapteur pourrait être améliorée en changeant quelques paramètres, telles que l'utilisation d'un volume plus élevé d'échantillons ou l'utilisation des nanoparticules avec une intensité de diffusion plus élevée.

Cependant, il est probable que l'utilisation de ce biocapteur pour tester des échantillons réels soit compliquée sans traitement de ces échantillons. La présence de certaines substances peut interagir en plus du composé cible, pour donner lieu à des réponses faussement positives ou faussement négatives. Nous espérons néanmoins que d'autres études sur cette approche contribueront à améliorer la limite de détection des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase en utilisant la DLS basée sur AuNPs.

Conclusion générale et perspectives

Ce manuscrit résume le travail de ma thèse qui a consisté au développement d'un biocapteur sensible, reproductible et spécifique pour la mesure de l'activité enzymatique de l'ACHE couplée à la diffusion Raman exaltée de surface.

Dans un premier temps, nous avons testé la détection directe des pesticides à l'aide de nanoparticules non fonctionnalisées en nous basant sur la résonance de plasmons de surfaces pour amplifier le signal Raman. Ce système a permis la détection des pesticides mais la limite de détection du paraoxon ne correspondait pas à la valeur fixée par l'organisation mondiale de la santé. En effet, pour atteindre des limites de détections plus faibles, il aurait fallu changer le type de substrat SERS actif pour un substrat propre à chaque type de molécule cible. Ceci nous a alors amené à conduire un travail sur la conception d'un biocapteur en mesurant l'activité enzymatique de l'ACHE permettant ainsi de détecter tous les potentiels inhibiteurs de cette enzyme. Nous avons privilégié des nanoparticules sphériques et non fonctionnalisées dont le but d'optimiser l'intensité du signal Raman SERS de la réaction enzymatique, afin que celle-ci soit reproductible, et d'éliminer l'interférence du surfactant dans le spectre Raman.

Nous avons démontré que les nanoparticules d'or, synthétisées par la méthode de Turkevich assurant un excellent contrôle des paramètres géométriques des nanostructures, permettent la détection du neurotransmetteur ACH pour des concentrations de l'ordre de 10^{-11} M. Nous avons mené des études pour l'optimisation du protocole de mesure de l'activité de l'ACHE, afin d'obtenir une limite de détection minimale, tout en gardant un bon niveau d'intensité SERS et une bonne reproductibilité de cette intensité. Cette approche a par ailleurs, permis de comprendre les types d'interactions entre les nanoparticules et l'analyte contenant l'ACHE, l'ACH et la choline produite par la transformation de cette dernière. Nous avons également constaté que, la sensibilité mais surtout la spécificité du biocapteur sont dépendantes de la réaction de catalyse de l'ACH.

Nous avons montré qu'une transformation de l'ACH par l'ACHE est visualisable par la disparition de ses bandes sur les spectres Raman SERS, et l'apparition des bandes de la choline produite. Dans la même étude, nous avons démontré que notre système de biocapteur

est spécifique, que le suivi et la détection de la choline produite, par différentes concentrations de l'ACHE, de l'ACH (jusqu'à 10^{-15} M) et par différents temps d'incubation, est possible. Cette technique est envisageable pour la conception d'un biocapteur permettant la détection d'un grand nombre de pesticides. Par ailleurs, cette technique utilise des nanostructures faciles à synthétiser pour de faibles coûts, ce qui ouvre la porte à une application à grande échelle.

Le biocapteur a été mis au point pour la détection d'organophosphorés (exemple le paraoxon) et carbamates (exemple le carbaryl) avec des limites de détection inférieures aux valeurs fixées par l'organisation mondiale de la santé (environ 4.0×10^{-14} M pour le Paraoxon et 1.9×10^{-9} M pour le carbaryl). Dans la suite, ce biocapteur a pu être testé pour l'analyse des échantillons plus difficiles à caractériser contenant d'autres types de polluants émergents comme les additifs dans les plastiques commerciaux.

Ces derniers résultats démontrent la possibilité d'utiliser ce biocapteur à des fins environnementales ou médicales pour la détection des inhibiteurs de l'ACHE. Par ailleurs, l'établissement d'une courbe de calibration a indiqué une relation linéaire entre le log de la concentration de pesticides et l'intensité de la bande de vibration Raman à 639 cm^{-1} de l'ACH.

En plus d'un fort niveau de sensibilité assurant la détection de pesticides en faible concentration par le suivi de l'activité de l'ACHE en solution, nous avons proposé une méthode alternative pour le même objectif par immobilisation de cette enzyme sur une surface d'or. Cette immobilisation a été vérifiée par la QCM et par la mesure de son activité (transformation de l'ACH) par spectroscopie Raman SERS, dans l'objectif de rendre le biocapteur et les enzymes en particulier, réutilisables. Pour les mesures Raman, nous avons isolé l'analyte (solution de l'ACH ajoutée à la surface fonctionnalisée), ce qui a facilité l'obtention du signal Raman par absence d'interférence d'autres molécules dans le spectre. Cette interférence a notamment été éliminée en lavant la surface avant et après chaque interaction. En effet, nous avons montré qu'en absence d'inhibiteurs (forte concentration de la choline) nous obtenions un faible signal Raman parce que la choline provoque l'agrégation des nanoparticules suite à des interactions électrostatiques. Par contre, nous avons pu obtenir un signal Raman intense de l'ACH en présence de pesticides.

Enfin, des mesures de l'activité de l'ACHE, par une technique optique de diffusion de la lumière (DLS) utilisant des nanoparticules d'or (20 nm) ont été testées. La réponse est obtenue en surveillant la variation de diamètre hydrodynamique moyen (D_{hm}) et l'intensité de diffusion moyenne (I_{dm}) en fonction de la concentration de la choline produite. Les nanoparticules sont instables dans la choline, leur D_{hm} croit lorsque la concentration de la choline produite par hydrolyse de l'ACH en présence de l'ACHE augmente. L' I_{dm} des AuNPs (20 nm) s'amplifie significativement en augmentant le degré d'agrégation des nanoparticules. En effet, la taille des nanoparticules augmente en diminuant la concentration de pesticide (paraaxon). Nous avons présenté ci-dessous une comparaison entre les trois biocapteurs développés.

Comparaison entre les trois biocapteurs développés

Type de biocapteurs	durée de traitement	réutilisation	Interférence d'autres molécules	Fiabilité	Identification des pesticides	sensibilité	coût
ACHE non immobilisée @DLS	++	non	oui	non	non	++	++
ACHE non immobilisée @SERS	+	non	Oui à haute concentration	oui	oui	+	+
ACHE immobilisée @SERS	+++	oui	non	oui	non	+++	++

Ce travail constitue une première approche de la détermination de l'activité de l'ACHE et de la détection d'inhibiteurs paraaxon et carbaryl choisis comme modèle, avec un biocapteur optique. Cette méthode basée sur un mode de détection optique est rapide, sensible et reproductible. De plus, l'utilisation de la DLS pour le suivi de l'activité enzymatique ou l'inhibition d'enzyme, est une stratégie originale car, à notre connaissance, elle ne figure pas actuellement dans la littérature. Les perspectives de ces travaux sont nombreuses.

Nos travaux se sont limités à la détection de l'activité de l'ACHE dans un milieu tamponné. Il faudrait poursuivre l'étude en présence d'autre types de pesticides, notamment en mélanges, afin d'appliquer notre stratégie dans un but d'analyse d'échantillons environnementaux. Nous avons par exemple montré qu'il était possible de détecter des

substances inhibitrices dans des plastiques après quelques jours de contact avec les enzymes, substances assez difficiles à détecter et quantifier par ailleurs. Et les résultats ont montré que selon les compositions, une inhibition était présente, montrant le relargage possible de substances toxiques par ces matériaux.

Nous pouvons aussi optimiser encore le protocole en utilisant d'autres types de nanoparticules permettant éventuellement une amplification meilleure que celle que nous avons obtenue. Nous savons aussi que la mesure de l'activité de l'ACHE n'est pas seulement utilisée comme indicateur de présence de pesticides mais aussi pour des diagnostics en médecine. Dans ce cas, notre système optique basé sur la mesure de l'activité enzymatique pourrait être adapté à des échantillons plus complexes. En effet, les interférences liées aux molécules présentes dans les milieux biologiques pourraient être évitées par l'utilisation de l'ACHE immobilisée. Pour le biocapteur basé sur la DLS, la détection de pesticides est possible, néanmoins, ce mode de détection doit être optimisé et les échantillons doivent être traités avant les mesures, pour ne pas avoir d'interférences, car la sensibilité reste faible par rapport aux biocapteurs basés sur l'effet SERS. Mais la facilité d'utilisation d'une telle stratégie ouvre des perspectives importantes.

Enfin, la poursuite de ce travail sur la détection d'inhibiteurs de l'ACHE, pourrait être envisageable par la miniaturisation et l'automatisation du système.

Références bibliographiques:

- Ahmed, J et al. "Self-Assembly of Copper Nanoparticles (Cubes, Rods and Spherical Nanostructures): Significant Role of Morphology on Hydrogen and Oxygen Evolution Efficiencies." *Solid State Sciences* 13.5 (2011): 855–861. Web.
- Aiken, J et al. "A Review of Modern Transition-Metal Nanoclusters: Their Synthesis, Characterization, and Applications in Catalysis." *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 145.1 (1999): 1–44. Web.
- Albrecht, M et al. "Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode." *Journal of the American Chemical Society* 99.15 (1977): 5215–5217. Web. 26 Aug. 2016.
- Alder, L et al. "Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS?" *Mass Spectrometry Reviews* 25.6 (2006): 838–865. Web. 21 Aug. 2016.
- Almaviva, S et al. "A New Eye-Safe UV Raman Spectrometer for the Remote Detection of Energetic Materials in Fi Ngerprint Concentrations: Characterization by PCA and ROC Analyzes." *Talanta* 144 (2015): 420–426. Web.
- Alvarez, M et al. "Development of Nanomechanical Biosensors for Detection of the Pesticide DDT." *Biosensors and Bioelectronics* 18.5–6 (2003): 649–653. Web.
- Aly, A et al. "Etude Du Mode D'action Neurotoxique D'un Repulsif, Le Deet Utilisé Seul et En Association Avec Un Insecticide Sur L'acétylcholinestérase Des Dum Neurones D'un Insecte La Blatte Periplaneta Americana." N.p., 2014. Web.
- Amine, A et al. "Enzyme Inhibition-Based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring." *Biosensors and Bioelectronics* 21.8 (2006): 1405–1423. Web.
- Anandhakumar, S et al. "Non-Enzymatic Organophosphorus Pesticide Detection Using Gold Atomic Cluster Modi Fi Ed Electrode." *Electrochemistry Communications* 38 (2014): 15–18. Print.
- Andersen, H. R et al. "Impaired Reproductive Development in Sons of Women Occupationally Exposed to Pesticides during Pregnancy." *Environmental health perspectives* 116.4 (2008): 566–72. Web. 21 Aug. 2016.
- Andrady, A et al. "Microplastics in the Marine Environment." *Marine Pollution Bulletin* 62.8 (2011): 1596–1605. Web.
- Angela, B et al. "Analysis of Ecologically Relevant Pharmaceuticals in Wastewater and Surface Water Using Selective Solid-Phase Extraction and UPLC–MS/MS." *Anal. Chem.* 80.13 (2008): 5021–5030. Print.
- Anses. *Exposition de La Population Générale Aux Résidus de Pesticides En France Synthèse et Conclusions.* france: N.p., 2010. Print.
- Anses. "Les Produits Biocides | Anses - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de L'environnement et Du Travail." N.p., 2016. Web. 15 June 2016.
- Anses. *Vers Un Portail Des Bases de Données Sur Les Propriétés Des Pesticides.* N.p., 2013. Web.
- Apfelbaum, M et al. *Risques et Peurs Alimentaires.* Ed. Odile Jacob. Paris: N.p., 1998. Print.
- Arduini, F et al. "Biosensors Based on Enzyme Inhibition." *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 140 (2014): 299–326. Web. 24 Aug. 2016.
- Arenas, J. F. et al. "Role of the Electrode Potential in the Charge-Transfer Mechanism of Surface-Enhanced Raman Scattering." *The Journal of Physical Chemistry B* 107.47 (2003): 13143–13149. Web. 28 Aug. 2016.
- Augustijn-Beckers, P. W. M. et al. "The SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision-Making. II. Additional Compounds." Springer New York, 1994. 1–82. Web. 21 Aug. 2016.
- Babacan, S et al. "Evaluation of Antibody Immobilization Methods for Piezoelectric Biosensor

- Application.” *Biosensors & bioelectronics* 15 (2000): 615–621. Print.
- Baldi, I et al. “Neurobehavioral Effects of Long-Term Exposure to Pesticides: Results from the 4-Year Follow-up of the PHYTONER Study.” *Occupational and Environmental Medicine* 68.2 (2011): 108–115. Web. 21 Aug. 2016.
- Baldi, I et al. “Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly.” *American journal of epidemiology* 157.5 (2003): 409–14. Web. 21 Aug. 2016.
- Barbillat, J et al. “Spectrométrie Raman.” *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* 9.P2865 (1999): 1–31. Web. 24 Aug. 2016.
- Bartlett, P et al. “Synthesis of Water-Soluble Undecagold Cluster Compounds of Potential Importance in Electron Microscopic and Other Studies of Biological Systems.” *Journal of the American Chemical Society* 100.16 (1978): 5085–5089. Web. 29 Aug. 2016.
- Bartolini, M et al. “Characterization of Reversible and Pseudo-Irreversible Acetylcholinesterase Inhibitors by Means of an Immobilized Enzyme Reactor.” *Journal of Chromatography A* 1144 (2007): 102–110. Web.
- Bélanger, D et al. “Electrografting: A Powerful Method for Surface Modification.” *Chemical Society Reviews* 40.7 (2011): 3995–4048. Print.
- Bi, H et al. “Performance Enhanced UV/vis Spectroscopic Microfluidic Sensor for Ascorbic Acid Quantification in Human Blood.” *Biosensors & bioelectronics* 85 (2016): 568–72. Web. 24 Aug. 2016.
- Blanc-Lapierre, A et al. “Cognitive Disorders and Occupational Exposure to Organophosphates: Results from the PHYTONER Study.” *American journal of epidemiology* 177.10 (2013): 1086–96. Web. 21 Aug. 2016.
- Bönnemann, H et al. “Nanoscope Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications.” *European Journal of Inorganic Chemistry* 2001.10 (2001): 2455–2480. Web. 30 Aug. 2016.
- Brisolari, A et al. “Immobilization of Tyrosinase from Avocado Crude Extract in Polypyrrole Films for Inhibitive Detection of Benzoic Acid.” *Chemosensors* 2.3 (2014): 182–192. Web. 23 Aug. 2016.
- Browne, M et al. “Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks.” *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011): 9175–9179. Print.
- Campion, A et al. “Surface-Enhanced Raman Scattering.” *Chemical Society Reviews* 27.4 (1998): 241. Web. 28 Aug. 2016.
- Carvalho, F et al. “Agriculture, Pesticides, Food Security and Food Safety.” *Environmental Science and Policy* 9.7–8 (2006): 685–692. Print.
- Chatonnet, A et al. “Comparison of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase.” *The Biochemical journal* 260.3 (1989): 625–34. Web. 24 Aug. 2016.
- Chen, H et al. “Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles.” *Langmuir* 24.10 (2008): 5233–5237. Web. 28 Aug. 2016.
- Chen, J et al. “Electrochemical Biosensor for Detection of BCR/ABL Fusion Gene Using Locked Nucleic Acids on 4-Aminobenzenesulfonic Acid-Modified Glassy Carbon Electrode.” *Analytical Chemistry* 80.21 (2008): 8028–8034. Print.
- Chen, L et al. “Polarization-Dependent SERS Effects of Laser-Generated Sub-100 Nm Antenna Structures.” *Nanotechnology* 25.26 (2014): 265302. Web. 28 Aug. 2016.
- Cheng, W et al. “Iodine-Induced Gold-Nanoparticle Fusion/Fragmentation/Aggregation and Iodine-Linked Nanostructured Assemblies on a Glass Substrate.” *Angewandte Chemie International Edition* 42.4 (2003): 449–452. Web. 29 Aug. 2016.
- Chu, Y et al. “Two Sharp Inequalities for Power Mean, Geometric Mean, and Harmonic Mean.” *Journal of Inequalities and Applications* 2009.1 (2009): 741923. Web. 30 Aug. 2016.

-
- Colthup, N et al. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Elsevier,. Academic Press, 1975. Web. 26 Aug. 2016.
- Convertino, A et al. “Disordered Array of Au Covered Silicon Nanowires for SERS Biosensing Combined with Electrochemical Detection.” *Scientific reports* 6 (2016): 25099. Web. 24 Aug. 2016.
- Corbett, J. R. et al. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. Academic Press Inc. (London) Ltd., 24-28 Oval Road, London NW1, 1974. Print.
- Costa, M. F et al. “On the Importance of Size of Plastic Fragments and Pellets on the Strandline : A Snapshot of a Brazilian Beach.” *Environmental Monitoring and Assessment* 168 (2010): 299–304. Web.
- Cotton, J et al. “Application de L’analyse Métabolomique À La Détection Ciblée et Globale de Contaminants Organiques Dans Des Matrices Agroalimentaires et Environnementales Par Spectrométrie de Masse À Ultra-Haute Résolution.” Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Web.
- Cotton, T. M. et al. “Distance Dependence of Surface-Enhanced Resonance Raman Enhancement in Langmuir-Blodgett Dye Multilayers.” *The Journal of Physical Chemistry* 90.23 (1986): 6071–6073. Web. 28 Aug. 2016.
- Cózar, A et al. “Plastic Debris in the Open Ocean.” (2014): 17–19. Web.
- Cras, J. J et al. “Comparison of Chemical Cleaning Methods of Glass in Preparation for Silanization.” *Biosensors & bioelectronics* 14 (1999): 683–688. Print.
- Cugnet, P et al. “Etude de L’agrégation de Particules Solides En Milieu Non Mouillant. Interpétation et Modélisation.” Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2003. Web.
- De Cheveigne, S et al. “Interaction of Acetylcholine and β -Methylacetylcholine with Aluminium Oxide Surface Studied by Inelastic Electron Tunneling Spectrometry.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94.1 (1980): 29–33. Print.
- Debbarh, A et al. *Irrigation et Environnement Au Maroc : Situation Actuelle et Perspectives I Rrigation et Environnement Au Maroc : Situation Actuelle et Perspectives*. N.p., 2007. Print.
- Dijkman, E et al. “Study of Matrix Effects on the Direct Trace Analysis of Acidic Pesticides in Water Using Various Liquid Chromatographic Modes Coupled to Tandem Mass Spectrometric Detection.” *Journal of Chromatography A* 926.1 (2001): 113–125. Web.
- Dionne, J. A. et al. “Planar Metal Plasmon Waveguides: Frequency-Dependent Dispersion, Propagation, Localization, and Loss beyond the Free Electron Model.” *PHYSICAL REVIEW B* 72.7 (2005): 75405. Print.
- Direction générale du travail. *Conditions de Travail, Bilan 2013*. Paris: N.p., 2014. Print.
- Drude, Paul. “Zur Elektronentheorie Der Metalle.” *Annalen der Physik* 306.3 (1900): 566–613. Web. 26 Aug. 2016.
- Du, D et al. “Magnetic Electrochemical Sensing Platform for Biomonitoring of Exposure to Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents Based on Simultaneous Measurement of Total Enzyme Amount and Enzyme Activity.” *Analytical Chemistry* 83.10 (2011): 3770–3777. Web. 24 Aug. 2016.
- Dulkeith, E. et al. “Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects.” *Physical Review Letters* 89.20 (2002): 203002. Web. 6 Sept. 2016.
- Dvir, H et al. “Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function.” *Chemico-biological interactions* 187.1–3 (2010): 10–22. Web. 21 Aug. 2016.
- Dyk, J S et al. “Review on the Use of Enzymes for the Detection of Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Pesticides in the Environment.” *Chemosphere* 82.3 (2011): 291–307. Web. 22 Aug. 2016.

- Eckert, S et al. "Kinetic Analysis of the Protection Afforded by Reversible Inhibitors against Irreversible Inhibition of Acetylcholinesterase by Highly Toxic Organophosphorus Compounds." *Biochemical Pharmacology* 72.3 (2006): 344–357. Web.
- ecophyto. "La FAO Met En Garde Contre Les Dangers Des Pesticides (Au Maroc...)." N.p., 2013. Web.
- ecophyto. "Les Cas D'intoxication En Nette Augmentation Au Maroc." N.p., 2013. Web. 8 Feb. 2017.
- Eddaya, T et al. "Utilisation et Risques Des Pesticides En Protection Sanitaire de La Menthe Verte Dans Le Centre-Sud Du Maroc (Use and Risks of Pesticides in Sanitary Protection of Spearmint in South-Central Morocco)." *Mater. Environ. Sci.* 6.3 (2015): 656–665. Print.
- El-alami, A et al. "Enhanced Raman Spectroscopy Coupled to Chemometrics for Identification and Quanti Fi Cation of Acetylcholinesterase Inhibitors." *Vibrational Spectroscopy* 87 (2016): 27–33. Print.
- Encyclo-ecolo. "Pesticides." *encyclopédie du développement durable* 2016. Web.
- Encyclo-ecolo. "Pesticides." *encyclopédie écologique* 2016. Web. 21 Aug. 2016.
- Esfahani, M et al. "Extinction, Emission, and Scattering Spectroscopy of 5–50nm Citrate-Coated Gold Nanoparticles: An Argument for Curvature Effects on Aggregation Milad." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2016): n. pag. Web.
- Esnault, C et al. "Electrochemically Modified Carbon and Chromium Surfaces for AFM Imaging of Double-Strand DNA Interaction with Transposase Protein." *ChemPhysChem* 14.2 (2013): 338–345. Print.
- EU law. "Directive 2005/2/CE de La Commission." *Journal officiel du Grand-Duché de Luxembourg.* N.p., 2005. Web. 28 Aug. 2016.
- EU Law. "Directive 2005/2/CE de La Commission." *Journal officiel du Grand-Duché de Luxembourg.* N.p., 2005. Web. 28 Aug. 2016.
- Everall, N et al. "Photon Migration in Raman Spectroscopy." *Applied spectroscopy* 58.5 (2004): 591–597. Print.
- Fan, Y et al. "Determination of Carbaryl Pesticide in Fuji Apples Using Surface- Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis." *LWT - Food Science and Technology* 60 (2015): 352–357. Print.
- Fan, Y et al. "Determination of Carbaryl Pesticide in Fuji Apples Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis." *LWT - Food Science and Technology* 60.1 (2015): 352–357. Web.
- Fathi, F et al. "Studies of the Interaction of Two Organophosphonates with Nanostructured Silver Surfaces." *The Analyst* 137.19 (2012): 4448. Web. 6 Sept. 2016.
- Faulds, K et al. "Comparison of Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Unaggregated and Aggregated Nanoparticles." *Analytical Chemistry* 76.3 (2004): 592–598. Web. 29 Aug. 2016.
- Fleischmann, M., P.J. H et al. "Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode." *Chemical Physics Letters* 26.2 (1974): 163–166. Web. 26 Aug. 2016.
- Fredon, Alsace. "Pesticide et Environnement." N.p., 2017. Web.
- Fukuto, T. R et al. "Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides." *Environmental health perspectives* 87 (1990): 245–54. Web. 21 Aug. 2016.
- Gao, D et al. "An Ultrasensitive Method for the Detection of Gene Fragment from Transgenics Using Label-Free Gold Nanoparticle Probe and Dynamic Light Scattering." *Analytica Chimica Acta* 696.1–2 (2011): 1–5. Web.
- Garrell, R. L et al. "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy." *Analytical Chemistry* 61.6 (1989):

- 401A–411A. Web. 28 Aug. 2016.
- Ge, X et al. “Magnetic Fe₃O₄@TiO₂ Nanoparticles-Based Test Strip Immunosensing Device for Rapid Detection of Phosphorylated Butyrylcholinesterase.” *Biosensors and Bioelectronics* 50 (2013): 486–491. Web. 24 Aug. 2016.
- Gerónimoa, E. D et al. “Presence of Pesticides in Surface Water from Four Sub-Basins in Argentina.” *Chemosphere* 107 (2014): 423–431. Print.
- Ghosh, S. K et al. “Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications.” *Chem. Rev.* 107.11 (2007): 4797–4862. Web.
- Giersig, M et al. “Preparation of Ordered Colloid Monolayers by Electrophoretic Deposition.” *Langmuir* 9.12 (1993): 3408–3413. Web. 29 Aug. 2016.
- Gill, H et al. “Chemical Reusable SERS Active Substrates for Ultrasensitive Molecular Detection.” *Sensors and Actuators B* 220 (2015): 794–798. Print.
- Greenlee, A et al. “Risk Factors for Female Infertility in an Agricultural Region.” *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 14.4 (2003): 429–36. Web. 21 Aug. 2016.
- Han, Z et al. “Radiation Guiding with Surface Plasmon Polaritons.” *Reports on Progress in Physics* 76.1 (2013): 1–37. Web. 26 Aug. 2016.
- Hayden, K. M et al. “Occupational Exposure to Pesticides Increases the Risk of Incident AD: The Cache County Study.” *Neurology* 74.19 (2010): 1524–30. Web. 21 Aug. 2016.
- Haynes, C.L et al. “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.” *Analytical Chemistry* 77.17 (2005): 338 A-346 A. Web. 28 Aug. 2016.
- Hill, C M et al. “Stereochemical Specificity of Organophosphorus Acid Anhydrolase toward P-Nitrophenyl Analogs of Soman and Sarin.” *Bioorganic chemistry* 29.1 (2001): 27–35. Web. 24 Aug. 2016.
- Horisberger, M et al. “Ultrastructural Localization of Kunitz Inhibitor on Thin Sections of Glycine Max (Soybean) Cv. Maple Arrow by the Gold Method.” *Histochemistry* 77.1 (1983): 37–50. Web. 29 Aug. 2016.
- Hostálková, A et al. “Alkaloids from Peumus Boldus and Their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibition Activity.” *Natural product communications* 10.4 (2015): 577–80. Web. 24 Aug. 2016.
- Hou, S et al. “Amperometric Acetylcholine Biosensor Based on Self-Assembly of Gold Nanoparticles and Acetylcholinesterase on the Sol-Gel/multi-Walled Carbon Nanotubes/choline Oxidase Composite-Modified Platinum Electrode.” *Biosensors and Bioelectronics* 33.1 (2012): 44–49. Web.
- Hu, L et al. “Stabilization of 2D Assemblies of Silver Nanoparticles by Spin-Coating Polymers.” *Applied Surface Science* 357 (2015): 1587–1592. Web.
- Huang, X et al. “Gold Nanoparticle-Based Dynamic Light Scattering Immunoassay for Ultrasensitive Detection of *Listeria Monocytogenes* in Lettuces.” *Biosensors and Bioelectronic* 66 (2015): 184–190. Web.
- Imai, Y et al. “Surface-Enhanced Raman Scattering of Benzoic and Thiosalicylic Acids Adsorbed on Fine Ag Particle-Impregnated Cellulose Gel Films.” *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 11.3 (1998): 273–278. Web. 28 Aug. 2016.
- INRA. *Réduire L’utilisation Des Pesticides et Limiter Leurs Impacts Environnementaux*. N.p., 2005. Web. 21 Aug. 2016.
- Jain, P et al. “Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-Enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems.” *plasmonics* (2007): 107–118. Web.
- Jambeck, J.R et al. “Plastic Waste Inputs from Land into the Ocean.” *Science (New York, N.Y.)* 347.6223 (2015): 768–772. Print.

- Jeanmaire, D.L et al. "Surface Raman Spectroelectrochemistry." *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 84.1 (1977): 1–20. Web. 26 Aug. 2016.
- Jeon, J et al. "Characterization of Acetylcholinesterase Inhibition and Energy Allocation in *Daphnia Magna* Exposed to Carbaryl." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98 (2013): 28–35. Web.
- Ji, J et al. "A Novel Recombinant Cell Fluorescence Biosensor Based on Toxicity of Pathway for Rapid and Simple Evaluation of DON and ZEN." *Scientific reports* 6 (2016): 31270. Web. 24 Aug. 2016.
- Jin, G et al. "The Development of Biosensor with Imaging Ellipsometry." *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* 3 (2004): 1975–8. Web. 24 Aug. 2016.
- Juluri, B et al. "Charge Density in Metal Nanoparticles at Plasmon Resonance | Bala's Website." *physical chemistry c* 112.19 (2008): 7309–7317. Web. 26 Aug. 2016.
- Kabbaj, M et al. "Le Maroc Autorise Des Pesticides et Insecticides Cancérigènes." 2015. Web.
- Kengne-Momo, R et al. "Mise En Oeuvre Des Surfaces Spécifiques En Vue de La D'etecion de Bactéries Pathogènes Par Diffusion Raman." Université du Maine; Université de Yaoundé I, 2011. Web.
- Kerker, M. et al. "Founding Fathers of Light Scattering and Surface-Enhanced Raman Scattering." *Applied optics* 30.33 (1991): 4699–705. Web. 28 Aug. 2016.
- Kestwal, R et al. "Fenugreek Hydrogel-Agarose Composite Entrapped Gold Nanoparticles for Acetylcholinesterase Based Biosensor for Carbamates Detection." *Analytica chimica acta* 886 (2015): 143–50. Web. 23 Aug. 2016.
- Khaksarinejad, R et al. "An Organophosphorus Hydrolase-Based Biosensor for Direct Detection of Paraoxon Using Silica-Coated Magnetic Nanoparticles." *Applied biochemistry and biotechnology* 176.2 (2015): 359–71. Web. 23 Aug. 2016.
- Kneipp, K et al. "Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)." *Physical Review Letters* 78.9 (1997): 1667–1670. Web. 26 Aug. 2016.
- Kneipp, K et al. "Surface-Enhanced Raman Scattering: A New Tool for Biomedical Spectroscopy." *Biomedical applications for lasers* 77 (1999): 0915–0924. Print.
- Kolwas, K et al. "Size Characteristics of Surface Plasmons and Their Manifestation in Scattering Properties of Metal Particles." *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 110.14–16 (2009): 1490–1501. Web.
- Kretschmann, A et al. "Toxicokinetic and Toxicodynamic Model for Diazinon Toxicity-Mechanistic Explanation of Differences in the Sensitivity of *Daphnia Magna* and *Gammarus pulex*." Kretschmann, Andreas, Roman Ashauer, Juliane Hollender, and Beate I. Escher. 2012. "Toxicokinetic and ." *Environmental Toxicology and Chemistry* 31.9 (2012): 2014–2022. Web. 6 Sept. 2016.
- Kumar, A et al. "Recent Advances in Material Science for Developing Enzyme Electrodes." *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009): 2313–2322. Web.
- Kumar, P et al. "Recent Advancements in Sensing Techniques Based on Functional Materials for Organophosphate Pesticides." *Biosensors & bioelectronics* 70 (2015): 469–81. Web. 16 Sept. 2015.
- Laariedh, F et al. "Large-Area , Cost-Effective Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Substrates Fabrication." *Microelectronic Engineering* 145 (2015): 124–127. Print.
- Lamy de la Chapelle, M et al. "Nanoparticules Métalliques." *Photoniques* 65 (2013): 31–35. Web. 29 Aug. 2016.
- Lauwerys, RR. et al. "Cholinestérasés Plasmatiques." *Toxicologie industrielle et intoxications*

- professionnelles* 2005: 774–782. Web.
- Le bris, C et al. “Comment Concilier Agronomie et Biodiversité Des Bordures de Champs En Plaine Céréalière?” *Faune sauvage* 2014: 38–44. Print.
- Le Ru, P et al. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects*. Elsevier, 2008. Web.
- Lee, P C et al. “Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols’.” *J. Phys. Chem* 86 (1982): 3391–3395. Print.
- Levchenko, V et al. “Enhancement of Luminescence of Rhodamine B by Gold Nanoparticles in Thin Films on Glass for Active Optical Materials Applications.” *Optical Materials* 34.2 (2011): 360–364. Web.
- Li, G et al. “Spherical and Planar Gold(0) Nanoparticles with a Rigid Gold(I)–Anion or a Fluid Gold(0)–Acetone Surface †.” *Langmuir* 19.16 (2003): 6483–6491. Web. 29 Aug. 2016.
- Li, H et al. “Fluorescence Resonance Energy Transfer Biosensor between Upconverting Nanoparticles and Palladium Nanoparticles for Ultrasensitive CEA Detection.” *Biosensors & bioelectronics* 86 (2016): 791–798. Web. 24 Aug. 2016.
- Li, P et al. “Polystyrene/Ag Nanoparticles as Dynamic Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates for Sensitive Detection of Organophosphorus Pesticides.” *Talanta* 127 (2014): 269–275. Web.
- Li, Q et al. “Rapid and Sensitive Detection of Pesticides by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Technique Based on Glycidyl Methacrylate – Ethylene Dimethacrylate (GMA – EDMA) Porous Material.” *Chinese Chemical Letters* 24 (2013): 332–334. Print.
- Li, X et al. “Nanostructured Photoelectrochemical Biosensor for Highly Sensitive Detection of Organophosphorous Pesticides.” *Biosensors & bioelectronics* 64 (2015): 1–5. Web. 23 Aug. 2016.
- Li H, R. L et al. “Colorimetric Detection of DNA Sequences Based on Electrostatic Interactions with Unmodified Gold Nanoparticles.” 101.39 (2004): 101:14036-9. Print.
- Liang, M et al. “Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticle Peroxidase Mimetic-Based Colorimetric Assay for the Rapid Detection of Organophosphorus Pesticide and Nerve Agent.” *Analytical chemistry* 85.1 (2013): 308–12. Web. 23 Aug. 2016.
- Lim, I. I S et al. “Interparticle Interactions in Glutathione Mediated Assembly of Gold Nanoparticles.” *Langmuir* 24.16 (2008): 8857–8863. Web.
- Liron, Z et al. “Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Cholinesterase Inhibitors.” *Analytica Chimica Acta* 703 (2011): 234–238. Web.
- Liu, C et al. “Detection of mercury(II) Based on Hg₂⁺ -DNA Complexes Inducing the Aggregation of Gold Nanoparticles.” *Chemical communications (Cambridge, England)* 19 (2008): 2242–2244. Web.
- Liu, D et al. “A Highly Sensitive Gold-Nanoparticle-Based Assay for Acetylcholinesterase in Cerebrospinal Fluid of Transgenic Mice with Alzheimer’s Disease.” *Advanced Healthcare Materials* 1.1 (2012): 90–95. Web.
- Liu, G et al. “Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents.” *Analytical chemistry* 78.3 (2006): 835–43. Web. 24 Aug. 2016.
- Liu, S et al. “Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate.” 19 (2008): 419–441. Web.
- Liu, X et al. “A Washing-Free and Ampli Fi Cation-Free One-Step Homogeneous Assay for Protein Detection Using Gold Nanoparticle Probes and Dynamic Light Scattering.” *Journal of Immunological Methods* 349.1–2 (2009): 38–44. Web.
- Lombardi, J. R et al. “Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Herzberg–

- Teller Contributions.” *The Journal of Chemical Physics* 84.8 (1986): 4174. Web. 28 Aug. 2016.
- Lucas, C et al. “Étude Du Modèle de L'agrégation Limitée Par Di Usion Interne.” Université de Paris Ouest Nanterre La Défense, 2011. Print.
- Malitesta, C et al. “Heavy Metal Determination by Biosensors Based on Enzyme Immobilised by Electropolymerisation.” *Biosensors & bioelectronics* 20.8 (2005): 1643–7. Web. 23 Aug. 2016.
- Marinakos, S et al. “Gold Nanoparticles as Templates for the Synthesis of Hollow Nanometer - Sized Conductive Polymer Capsules * *.” *Adv . Mater* 11.1 (1999): n. pag. Print.
- Marty, J et al. “Relationships between Formation of Micronuclei and DNA Adducts and EROD Activity in Newts Following Exposure to Benzo(a)pyrene.” *Environmental and molecular mutagenesis* 32.4 (1998): 397–405. Web. 24 Aug. 2016.
- Mathieu, T et al. “Thermal Stability Study of Aryl Modified Carbon Black by in Situ Generated Diazonium Salt.” *physical chemistry c* 111.12 (2007): 5394–5401. Print.
- Matuszczak, E et al. “Application of SPR Imaging Biosensor for the Measurement of 20S Proteasomes in Blood Plasma of Children with Thermal Injury.” *Annals of clinical and laboratory science* 46.4 (2016): 407–11. Web. 24 Aug. 2016.
- May, M et al. “Single-Shot ‘turn-Off’ Optical Probe for Rapid Detection of Paraoxon-Ethyl Pesticide on Vegetable Utilising Fluorescence Carbon Dots.” *Sensors & Actuators: B. Chemical* (2016): n. pag. Web.
- Mazzei, M et al. “Synthesis and Antirhinovirus Activity of 3-(Diethylamino)-5-Phenylisoxazole Derivatives.” *Farmaco (Società chimica italiana : 1989)* 51.5 (1996): 351–9. Web. 24 Aug. 2016.
- McCreery, R.L et al. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Ed. J. D. WINEFORDNER. Columbus, Ohio: N.p., 2000. Web. 28 Aug. 2016.
- Meakin, P et al. “Scaling Properties for the Surfaces of Fractal and Nonfractal Objects: An Infinite Hierarchy of Critical Exponents.” *Physical Review A* 34.4 (1986): 3325–3340. Web.
- MEEM. “Produits Biocides.” N.p., 2016. Web. 21 Aug. 2016.
- Mehrotra, P et al. “Biosensors and Their Applications.” *Journal of oral biology and craniofacial research* 6.2 (2013): 153–159. Web. 24 Aug. 2016.
- Mehta, J et al. “Progress in the Biosensing Techniques for Trace-Level Heavy Metals.” *Biotechnology advances* 34.1 (2016): 47–60. Web. 24 Aug. 2016.
- Miao, X et al. “Detection of Pb 2 + at Attomole Levels by Using Dynamic Light Scattering and Unmodified Gold Nanoparticles.” *Analytical Biochemistry* 421.2 (2012): 582–586. Web.
- Miao, X et al. “Sensitive Detection of Glucose in Human Serum with Oligonucleotide Modified Gold Nanoparticles by Using Dynamic Light Scattering Technique.” *Biosensors and Bioelectronics* 41 (2013): 880–883. Print.
- Faraday, M et al. “Gold (and Other Metals) to Light The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Email Alerting Service.” *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 1 (1857): 145–181. Web. 28 Aug. 2016.
- Ministère de l'environnement de l'énergie et de la mer. “La Biodiversité Des Sols [L'essentiel Sur..., Environnement, Le Sol] : Observation et Statistiques.” N.p., 2014. Web. 21 Aug. 2016.
- Miquel, G et al. *Rapport sur «la Qualité de L'eau et de L'assainissement En France»*. N.p., 2003. Print.
- Miras, C et al. *Gouvernance Urbaine et Accé À L'eau Potable Au Maroc*. N.p., 2005. Print.
- Mock, J et al. “Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles.” *Nano Letters* 3.4 (2003): 485–491. Web. 28 Aug. 2016.
- Moores, A et al. “The Plasmon Band in Noble Metal Nanoparticles : An Introduction to Theory and Applications.” *New Journal of chemistry* (2006): 1121–1132. Web.

- Moskovits, M et al. "Surface-Enhanced Spectroscopy." *Reviews of Modern Physics* 57.3 (1985): 783–826. Web. 28 Aug. 2016.
- Mostafalou, S et al. "Pesticides and Human Chronic Diseases: Evidences, Mechanisms, and Perspectives." *Toxicology and Applied Pharmacology* 268.2 (2013): 157–177. Web. 21 Aug. 2016.
- Mulchandani, A et al. "Amperometric Thick-Film Strip Electrodes for Monitoring Organophosphate Nerve Agents Based on Immobilized Organophosphorus Hydrolase." *Analytical chemistry* 71.11 (1999): 2246–9. Web. 24 Aug. 2016.
- Mulchandani, A et al. "Ferrocene-Conjugated M-Phenylenediamine Conducting Polymer-Incorporated Peroxidase Biosensors." *Analytical biochemistry* 267.1 (1999): 141–7. Web. 24 Aug. 2016.
- Mulchandani, P et al. "Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents. 1. Potentiometric Enzyme Electrode." *Biosensors & bioelectronics* 14.1 (1999): 77–85. Web. 24 Aug. 2016.
- Mulchandani, P et al. "Flow Injection Amperometric Enzyme Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents." *Environmental science & technology* 35.12 (2001): 2562–5. Web. 24 Aug. 2016.
- Multigner, L et al. "Synthèse Effets Retardés Des Pesticides Sur La Santé Humaine." n. pag. Print.
- Munro, C. H. et al. "Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering." *Langmuir* 11.10 (1995): 3712–3720. Web. 29 Aug. 2016.
- Namer, M et al. "The Use of Deodorants/antiperspirants Does Not Constitute a Risk Factor for Breast Cancer." *Bulletin du Cancer* 95.9 (2008): 871–880. Web.
- Nauen, R et al. "Mode of Action of Etoxazole." *Pest Management Science* 62.5 (2006): 379–382. Web. 21 Aug. 2016.
- Nie, S et al. "Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering." *Science (New York, N.Y.)* 275.5303 (1997): 1102–6. Web. 28 Aug. 2016.
- Noguez, C et al. "Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment." *J. Phys. Chem. C* 111 (2007): 3806–3819. Web.
- Okumura, M et al. "DFT Studies of Interaction between O₂ and Au Clusters. The Role of Anionic Surface Au Atoms on Au Clusters for Catalyzed Oxygenation." *Chemical Physics Letters* 346.1–2 (2001): 163–168. Web.
- Oliveira, M et al. "Single and Combined Effects of Microplastics and Pyrene on Juveniles (0 + Group) of the Common Goby Pomatoschistus Microps (Teleostei , Gobiidae)." *Ecological Indicators* 34 (2013): 641–647. Web.
- OMS. *L'utilisation Des Pesticides En Agriculture et Ses Conséquences Pour La Santé Publique*. GENEVE: N.p., 1991. Web.
- OMS. "Normes de l'OMS Sur L'eau Potable." N.p., 2017. Web.
- OMS. *Prévention Du Suicide: L'état D'urgence Mondial*. N.p., 2014. Web. 21 Aug. 2016.
- ONSSA. "Pesticides À Usage Agricole." N.p., 2016. Web. 21 Aug. 2016.
- ORP. "Les Pesticides." ANSES. N.p., 2014. Web.
- ORP. "Les Pesticides." ANSES. N.p., 2014. Web. 21 Aug. 2016.
- ORP. "Observatoire Des Résidus de Pesticides." ANSES. N.p., 2014. Web. 1 July 2016.
- Paddle, B. M et al. "Biosensors for Chemical and Biological Agents of Defence Interest." *Biosensors & bioelectronics* 11.11 (1996): 1079–113. Web. 23 Aug. 2016.
- Parrón, T et al. "Environmental Exposure to Pesticides and Cancer Risk in Multiple Human Organ Systems." *Toxicology letters* 230.2 (2014): 157–65. Web. 21 Aug. 2016.

- Paulsson, M et al. "Long-Term Toxicity of Zinc to Bacteria and Algae in Periphyton Communities from the River Gö Ta A 8 Lv, Based on a Microcosm Study." *Aquatic Toxicology* 47 (2000): 243–257. Web. 21 Aug. 2016.
- Persson, B.N.J et al. "On the Theory of Surface-Enhanced Raman Scattering." *Chemical Physics Letters* 82.3 (1981): 561–565. Web. 28 Aug. 2016.
- Pilard, J. F et al. "Chemical Synthesis at Solid Interfaces. On the Use of Conducting Polythiophenes Equipped of Adequate Linkers Allowing a Facile and Highly Selective Cathodic S-N Bond Scission with a Fully Regenerating Resin Process." *Tetrahedron* 54 (1998): 9401–9414. Print.
- Pockrand, I et al. "Surface Enhanced Raman Scattering (SERS): Annealing the Silver Substrate." *Solid State Communications* 38.12 (1981): 1159–1163. Web. 28 Aug. 2016.
- Pohanka, M et al. "Preparation and Performance of a Colorimetric Biosensor Using Acetylcholinesterase and Indoxylacetate for Assay of Nerve Agents and Drugs." *Interdisciplinary toxicology* 7.4 (2014): 215–8. Web. 24 Aug. 2016.
- Primel, Ednei G., Sergiane S. Caldas, and A.L. V. Escarrone. "Multi-Residue Analytical Methods for the Determination of Pesticides and PPCPs in Water by LC-MS/MS: A Review." *Central European Journal of Chemistry* 10.3 (2012): 876–899. Print.
- Qi, G et al. "Glucose Oxidase Probe as a Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Glucose." *Analytical and bioanalytical chemistry* (2016): n. pag. Web. 24 Aug. 2016.
- Qu, L. L et al. "Silver Nanoparticles on Cotton Swabs for Improved Surface-Enhanced Raman Scattering, and Its Application to the Detection of Carbaryl." *Microchimica Acta* 183.4 (2016): 1307–1313. Web.
- Raether, H et al. *Surface Plasmons on Smooth Surfaces*. Springer Berlin Heidelberg.: N.p., 1988. Print.
- Ramanaviciene, A et al. "Investigation of Biocatalytic Enlargement of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering and Atomic Force Microscopy." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 510 (2016): 183–189. Web.
- Rauh, V. A et al. "Brain Anomalies in Children Exposed Prenatally to a Common Organophosphate Pesticide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.20 (2012): 7871–6. Web. 21 Aug. 2016.
- Rhalem, N et al. "Facteurs Prédicatifs de Gravité de L ' Intoxication Aux Pesticides . Expérience Du Centre Antipoison Du Maroc Risk Factors for Acute Pesticide Poisoning . Poison Control Centre of Morocco Experience." *Annales de Toxicologie Analytique* 21.2 (2009): 79–84. Print.
- Ritchie, R. H et al. "Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films." *Physical Review* 106.5 (1957): 874–881. Web. 26 Aug. 2016.
- Ritchie, R.H et al. "Surface Plasmons in Solids." *Surface Science* 34.1 (1973): 1–19. Web. 28 Aug. 2016.
- Roth, J et al. "The Preparation of Protein A-Gold Complexes with 3 Nm and 15 Nm Gold Particles and Their Use in Labelling Multiple Antigens on Ultra-Thin Sections." *The Histochemical Journal* 14.5 (1982): 791–801. Web. 29 Aug. 2016.
- Rubim, J. C et al. "Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy of Tetrafluoroborate 1- N -Butyl-3-Methylimidazolium (BMIBF₄) Ionic Liquid on Silver Surfaces." *The Journal of Physical Chemistry C* 112.49 (2008): 19670–19675. Web. 26 Aug. 2016.
- Rugbjerg, K et al. "Pesticide Exposure and Risk of Parkinson's Disease--a Population-Based Case-Control Study Evaluating the Potential for Recall Bias." *Scandinavian journal of work, environment & health* 37.5 (2011): 427–36. Web. 21 Aug. 2016.
- SAGe pesticides. "Caractéristiques Des Produits Commerciaux." N.p., 2017. Web.
- Saha, K et al. "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing." *Chemical reviews* 112.5

- (2012): 2739–2779. Print.
- Saint-Petersburg State University, and Center for optical and laser materials research. “Dynamic Light Scattering.” N.p., 2012. Web. 31 Aug. 2016.
- Saïssy, J.M et al. *Intoxications Par Les Organophosphorés*. N.p., 1999. Web.
- Saïssy, J M et al. *Intoxications Par Les Organophosphorés*. N.p., 1999. Web. 21 Aug. 2016.
- Scarano, S et al. “Design of a Dual Aptamer-Based Recognition Strategy for Human Matrix Metalloproteinase 9 Protein by Piezoelectric Biosensors.” *Analytica chimica acta* 897 (2015): 1–9. Web. 24 Aug. 2016.
- Schiavon, M et al. “La Pollution de L’eau Par Les Produits Phytosanitaires Etat et Origine.” *Agronomie, EDP Sciences* 15 (1995): n. pag. Print.
- Schiffers, B et al. “L’emploi Des Pesticides Dans Les Cultures: Entre Tracteurs et Detracteurs.” 2 (2012): 80–93. Print.
- Schurr, J. M et al. “Dynamic Light Scattering of Biopolymers and Biocolloids.” *CRC critical reviews in biochemistry* 4.4 (1977): 371–431. Web. 30 Aug. 2016.
- Selim, M.T et al. “Multi-Residues Analysis of Pesticides Using Gas Chromatography Mass Spectrometry: I- Leafy Vegetables.” *Research Journal of Environmental Sciences* 5.3 (2011): 248–258. Web.
- Sénat. “La Qualité de L’eau et L’assainissement En France (Rapport).” N.p., 2017. Web.
- Siek, M et al. “Electrodeposition for Preparation of Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering-Active Silver Nanoparticle Substrates for Neurotransmitter Detection.” *Electrochimica Acta* 89 (2013): 284–291. Web.
- Simard, J et al. “Formation and pH-Controlled Assembly of Amphiphilic Gold Nanoparticles.” *Chemical Communications* 14.19 (2000): 1943–1944. Web. 29 Aug. 2016.
- Simonian, A. L et al. “Nanoparticle-Based Optical Biosensors for the Direct Detection of Organophosphate Chemical Warfare Agents and Pesticides.” *Analytica Chimica Acta* 534.1 (2005): 69–77. Print.
- Slusher, R. B et al. “Temperature Dependence and Cross Sections of Some Stokes and Anti-Stokes Raman Lines in Ice Ih.” *Applied Optics* 14.9 (1975): 2116. Web. 26 Aug. 2016.
- SOES. *L’environnement En France*. N.p., 2014. Web.
- Squillace, O et al. “Membranes Biomimétiques Fluides Ancrées Sur Électrodes Ultra-Planes.” Université Bretagne Loire, 2016. Print.
- Stachniuk, A et al. “Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food.” *Food Anal. Methods* 9.6 (2015): 1654–1665. Print.
- Su, R et al. *Determination of Organophosphorus Pesticides in Ginseng by Carbon Nanotube Envelope-Based Solvent Extraction Combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*. Vol. 1022. Elsevier B.V., 2016. Web.
- Sun, Y et al. “Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles.” *Science (New York, N.Y.)* 298.5601 (2002): 2176–9. Web. 29 Aug. 2016.
- Talsness, C. E et al. “Components of Plastic : Experimental Studies in Animals and Relevance for Human Health.” *Phil. Trans. R. Soc.* 364 (2009): 2079–2096. Web.
- Temiz, H. T et al. “Surface Enhanced Raman Spectroscopy as a New Spectral Technique for Quantitative Detection of Metal Ions.” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116 (2013): 339–347. Web.
- Testud, F et al. “Insecticides Organophosphorés, Carbamates, Pyréthrinoïdes de Synthèse et Divers.” *EMC - Pathologie professionnelle et de l ’environnement* 2.2 (2007): 1–24. Web. 21 Aug. 2016.
- Teuten, E.L et al. “Transport and Release of Chemicals from Plastics to the Environment and to

- Wildlife.” *Phil. Trans. R. Soc. B* 364 (2009): 2027–2045. Web.
- Thabet, H et al. “Intoxications Par Les Pesticides Organophosphorés : Nouveaux Concepts Organophosphorus Poisoning: New Concepts.” *Réanimation* 18 (2009): 633–639. Print.
- Thiollet-Scholtus, M et al. “Construction D’un Indicateur de Qualité Des Eaux de Surface Vis-À-Vis Des Produits Phytosanitaires À L’échelle Du Bassin Versant Viticole.” *AGRIS since*, 2014. Print.
- Toma, Met al “Polydopamine Thin Films as Protein Linker Layer for Sensitive Detection of Interleukin-6 by Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Spectroscopy.” *ACS applied materials & interfaces* (2016): n. pag. Web. 24 Aug. 2016.
- Tsuji, M et al. “Rapid Transformation from Spherical Nanoparticles, Nanorods, Cubes, or Bipyramids to Triangular Prisms of Silver with PVP, Citrate, and H₂O₂.” *Langmuir* 28.24 (2012): 8845–8861. Web. 29 Aug. 2016.
- Turan, J et al. “An Effective Surface Design Based on a Conjugated Polymer and Silver Nanowires for the Detection of Paraoxon in Tap Water and Milk.” *Sensors & Actuators: B. Chemical* 228 (2016): 278–286. Web.
- Turdean, G et al. “Biocapteurs Ampérométriques À Cholinestérases Pour La Détermination Des Pesticides Organophosphorés.” *Canadian Journal of Chemistry* 80.3 (2002): 315–331. Web. 24 Aug. 2016.
- Turkevich, J et al. “A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold.” *Anal. Chem.* 475.21 (1951): 55–75. Print.
- Turkivich, J et al. “A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold.” *Discussions of the Faraday Society* 11 (1951): 55–75. Print.
- Vimala, V et al. “Pesticides Detection Using Acetylcholinesterase Nanobiosensor.” 5.1 (2016): 1–4. Web.
- Viswanathan, S et al. “Nanomaterials for Electrochemical Sensing and Decontamination of Pesticides.” *Journal of nanoscience and nanotechnology* 15.9 (2015): 6914–23. Web. 23 Aug. 2016.
- Wang, B et al. “Synthesis of Silver Nanocubes as a SERS Substrate for the Determination of Pesticide Paraoxon and Thiram.” *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 121 (2014): 63–69. Web.
- Wang, P et al. “Plasmonic Photocatalysts: Harvesting Visible Light with Noble Metal Nanoparticles.” *physical chemistry chemical physics* 207890 (2010): 1–16. Web.
- Wang, P et al. “Construction of Au Nanoparticles on Choline Chloride Modified Glassy Carbon Electrode for Sensitive Detection of Nitrite.” *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009): 3242–3247. Web.
- Wang, X T et al. “High-Performance Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors Based on Ag Nanoparticles-Coated Si Nanowire Arrays for Quantitative Detection of Pesticides High-Performance Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors Based on Ag Nanoparticles-Coated Si Nanowire.” *Applied Physics Letters* 96.2010 (2016): 2008–2011. Print.
- WHO. *Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture*. Geneva : World Health Organization, 1990. Web. 19 Aug. 2016.
- WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009* No Title. N.p., 2010. Web.
- Wiley, B et al. “Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver.” *Chemistry - A European Journal* 11.2 (2005): 454–463. Web. 28 Aug. 2016.
- Wu, D et al. “Chemical Enhancement Effects in SERS Spectra: A Quantum Chemical Study of Pyridine Interacting with Copper, Silver, Gold and Platinum Metals.” *The Journal of Physical Chemistry C* 112.11 (2008): 4195–4204. Web. 26 Aug. 2016.

-
- Wu, S et al. "Controlled Immobilization of Acetylcholinesterase on Improved Hydrophobic Gold Nanoparticle/Prussian Blue Modified Surface for Ultra-Trace Organophosphate Pesticide Detection." *Biosensors & bioelectronics* 27.1 (2011): 82–7. Web. 23 Aug. 2016.
- Xiong, C et al. "Label-Free , Sensitive Detection of Hg (II) with Gold Nanoparticles by Using Dynamic Light Scattering Technique." *Talanta* 89 (2012): 317–321. Web.
- Yan, X et al. "A Novel Fluorescence Probing Strategy for the Determination of Parathion-Methyl." *Talanta* 131 (2015): 88–94. Web. 23 Aug. 2016.
- Yan, X et al. "Visual and Fluorescent Detection of Acetamiprid Based on the Inner Filter Effect of Gold Nanoparticles on Ratiometric Fluorescence Quantum Dots." *Analytica Chimica Acta* 852 (2014): 189–195. Print.
- Yao, Z et al. "[Correction Multiplicative Effects in Raman Spectra through Vector Angle Transformation]." *Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu* 36.2 (2016): 419–23. Web. 24 Aug. 2016.
- Ye, X et al. "Automated On-Line Column-Switching HPLC-MS/MS Method with Peak Focusing for the Determination of Nine Environmental Phenols in Urine." *Analytical Chemistry* 77.16 (2005): 5407–5413. Print.
- Yu, G et al. "Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase onto Amino Functionalized Carbon Nanotubes for the Fabrication of High Sensitive Organophosphorus Pesticides Biosensors." *Biosensors & bioelectronics* 68 (2015): 288–94. Web. 23 Aug. 2016.
- Zayats, A et al. "Nano-Optics of Surface Plasmon Polaritons." *Physics Reports* 408.3 (2005): 131–314. Web.
- Zeman, E et al. "An Accurate Electromagnetic Theory Study of Surface Enhancement Factors for Silver, Gold, Copper, Lithium, Sodium, Aluminum, Gallium, Indium, Zinc, and Cadmium." *The Journal of Physical Chemistry* 91.3 (1987): 634–643. Web. 28 Aug. 2016.
- Zhang, H et al. "Functionalized Graphene Oxide for the Fabrication of Paraoxon Biosensors." *Analytica Chimica Acta* 827 (2014): 86–94. Web.
- Zhang, Y et al. "A Novel Layer-by-Layer Assembled Multi-enzyme/CNT Biosensor for Discriminative Detection between Organophosphorus and Non-Organophosphorus Pesticides." *Biosensors & bioelectronics* 67 (2015): 287–95. Web. 23 Aug. 2016.

Thèse de Doctorat

Amal EL ALAMI

Mise en œuvre de biocapteurs en vue de la détection de pesticides et polluants dans l'eau par diffusion Raman exaltée

Implementation of biosensors for the detection of pesticides and pollutants in water by exalted Raman scattering

Résumé

La diffusion Raman exaltée de surface (SERS) est utilisée pour la mise au point d'un biocapteur capable de détecter des pesticides dans l'eau, en se basant sur le suivi de l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase (ACHE). Les nanoparticules d'or sont utilisées comme substrats SERS actifs.

Le signal Raman exalté de l'analyte est optimisé en testant plusieurs types de nanoparticules. Le Raman SERS a permis la détection directe du Paraoxon (PO) et du carbaryl (CA) et la possibilité de suivi de l'activité de l'ACHE. En absence d'inhibiteurs, la molécule d'acétylcholine (ACH) est transformée en acide acétique et en choline par l'enzyme ACHE. La mesure de l'activité de l'ACHE repose sur le suivi des concentrations en ACH car sa transformation est inhibée en présence de pesticides. Il a été ainsi possible d'établir une relation linéaire entre la concentration de pesticides et l'exaltation du signal Raman de l'ACH non transformé. La méthode a permis la détection du PO et du CA, avec une limite de détection beaucoup plus faible que la détection directe. Ce biocapteur basé sur l'activité de l'ACHE a ensuite été utilisé pour l'évaluation d'autres polluants (inhibiteurs d'ACHE) comme les additifs contenus dans les plastiques notamment.

Enfin, nous avons développé une seconde approche qui consistait à mesurer l'activité de l'ACHE en utilisant la diffusion dynamique de la lumière. En effet, nous avons montré que les paramètres physicochimiques (agrégation) des AuNPs en contact avec certaines molécules, sont fortement influencés par l'activité enzymatique de l'ACHE. C'est ce phénomène d'instabilité qui nous a permis de distinguer entre les deux cas : absence et présence de PO.

Mots clés

Nanoparticules d'or, diffusion Raman exaltée de surface, biocapteurs, acétylcholinestérase, diffusion dynamique de la lumière, pesticides.

Abstract

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) was used to develop a biosensor for the detection of pesticides through the monitoring of the enzymatic activity of acetylcholinesterase (ACHE). Gold nanoparticles (AuNPs) were used as an active SERS substrate.

The enhanced Raman signal of the analyte is optimized by testing several types of nanoparticles. Raman SERS allowed the direct detection of Paraoxon (PO) and carbaryl (CA) pesticides and the possibility of follow-up of the activity of the ACHE. In the absence of inhibitors, the acetylcholine (ACH) is transformed into acetic acid and choline by the enzyme ACHE. The measurement of ACHE activity is performed through the monitoring of ACH concentrations because its transformation is inhibited in the presence of pesticides. Results showed a linear correlation between the concentration of pesticides and the SERS signal of the untransformed ACH. The method was optimized for the quantification of paraoxon and carbaryl with a limit of quantification much lower than the one obtained with a direct detection. Their identification was also possible using chemometrics. This biosensors, based on the ACHE activities, was applied to the evaluation of emergent pollutants: additives of commercial polymers. Our results suggested that most of the tested polymers contained molecules that act as inhibitors of the ACHE.

Finally, we propose another very simple approach to measure the ACHE activity using dynamic light scattering measurements. We found that the physicochemical parameters (aggregation) of AuNPs were strongly influenced by the enzymatic activity of ACHE when in contact with specified molecules, allowing to detect the presence of PO.

Key Words:

Gold nanoparticles, Surface Enhanced Raman Scattering, biosensors, acetylcholinesterase, Dynamic Light Scattering, pesticides.