



HAL
open science

Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Electrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire et pour l'Analyse Biomédicale

Nadia El Alami El Hassani

► **To cite this version:**

Nadia El Alami El Hassani. Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Electrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire et pour l'Analyse Biomédicale. Chimie analytique. Université de Lyon; Université Moulay Ismaïl (Meknès, Maroc). Faculté des sciences, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1311 . tel-02077083

HAL Id: tel-02077083

<https://theses.hal.science/tel-02077083>

Submitted on 22 Mar 2019

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.



جامعة مولاي إسماعيل
UNIVERSITÉ MOULAY ISMAÏL



كلية العلوم
FACULTÉ DES SCIENCES

N°d'ordre NNT : 2018LYSE1311

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

en co-tutelle avec
L'Université Moulay Ismaïl-Faculté des Sciences de
Meknès

Ecole Doctorale N° 206
Ecole doctorale de chimie

Spécialité de doctorat : Biochimie Analytique et Biotechnologie

Soutenue publiquement le 19/12/2018, par :

Nadia EL ALAMI EL HASSANI

Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Electrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire et pour l'Analyse Biomédicale

Devant le jury composé de :

EL HAJJAJI, Souad
MOHSSINE, EL Hassania
KORRI-YOUSSOUFI, Hafsa
MOUMNI, Mohieddine
LEONARD, Didier
EL BARI, Nezha
ERRACHID EL SALHI, Abdelhamid
ZINE LOUKILI, Nadia

Pr, Faculté des Sciences, Rabat
Pr, IAV Hassan II, Rabat
Dr, Directrice de recherche, CNRS, Orsay
Pr, Faculté des Sciences, Meknès
Pr, Univ. Claude Bernard Lyon 1, Lyon
Pr, Faculté des Sciences, Meknès
Pr, Univ. Claude Bernard Lyon 1, Lyon
MCU, Univ. Claude Bernard Lyon 1, Lyon

Présidente
Rapporteure
Rapporteure
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse
Invitée

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOSNE

Dédicaces



*J'offre ce travail en témoignage de l'amour, de l'amitié
et de la reconnaissance que je porte à :*

Mes parents

Ma sœur et mon frère

Ma famille et amis

À tous ceux qui me sont chers...

Remerciements

Cette thèse de doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de co-tutelle entre l'Équipe de Biotechnologie et d'Analyses Agroalimentaires et Biomédicales de la Faculté des Sciences de Meknès et l'Institut des Sciences Analytiques de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Je souhaite remercier en premier lieu, ma directrice de thèse, Madame **Nezha EL BARI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès de m'avoir accueillie au sein de son équipe, de m'avoir engagée dans une thèse en co-tutelle et d'avoir su me pousser pour donner le meilleur de moi-même afin d'arriver au bout de cette aventure. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé. Je la remercie aussi pour son encadrement de qualité, ainsi que pour sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Mon estime et ma grande reconnaissance s'adressent à mon directeur de thèse **Abdelhamid ERRACHID EL SALHI**, Professeur des universités à l'Université Claude Bernard Lyon 1, de m'avoir fait confiance tout au long de ces années de thèse. Ses remarques, sa franchise, sa gentillesse sont autant d'éléments essentiels qui ont rendu mes séjours en France le plus agréable possible. Je le remercie infiniment pour tout cela. J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-directeur de thèse, Monsieur **Benachir BOUCHIKHI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès et Directeur du Laboratoire Électronique, Automatique et Biotechnologie, pour ses conseils avisés et pour son écoute qui m'ont été d'une précieuse aide pour l'aboutissement de cette thèse. Son savoir-faire et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. Mes sincères gratitudes et reconnaissances s'adressent à ma co-directrice de thèse Madame **Nadia ZINE LOUKILI**, maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour sa générosité, pour sa disponibilité et pour son support dans l'accomplissement de ce travail. Son enthousiasme et sa sympathie m'ont agréablement touchés durant mes séjours de recherche. Je la remercie aussi pour sa participation à ce jury de thèse en tant que membre invité.

J'adresse des remerciements particuliers à Madame **Souad EL HAJJAJI**, Professeur à l'Université Mohammed V de Rabat, pour l'intérêt dont elle a fait preuve à l'égard de nos travaux de recherche et pour avoir bien voulu présider mon jury de thèse. Je tiens à remercier vivement Madame **El Hassania MOHSSINE**, Professeur à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, pour avoir pris le temps d'examiner ces travaux en tant que rapporteur. Je la remercie aussi pour avoir accepté de participer au jury de

cette thèse. Je remercie également, très chaleureusement, Madame **Hafsa KORRI-
YOUSOUFI**, Directrice de recherche CNRS à l'Université Paris-Sud, pour l'intérêt qu'elle a
porté à mon travail en tant que rapporteur et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de
participer au jury de ma thèse. Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Monsieur
Mohieddine MOUMNI, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès, pour l'honneur qu'il
me fait en acceptant de rapporter mes travaux de recherche et de faire partie du jury de ma
thèse.

J'adresse aussi des remerciements particuliers à Monsieur **Didier LEONARD**, Professeur
des universités à l'Université Claude Bernard Lyon 1, d'avoir accepté d'examiner ces
travaux de recherche et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer au jury de ma
thèse. J'associe à ces remerciements Monsieur **Mohamed MAOULOUA**, pharmacien
biologiste et chef de service du laboratoire d'analyses médicales à l'Hôpital provincial
Mohamed V de Meknès, de m'avoir acceptée en stage et d'avoir contribué à son
bon déroulement au sein de son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent également à Madame **Najia HAMZAoui**, responsable des
analyses microbiologiques au sein du laboratoire d'analyses médicales à l'Hôpital provincial
Mohamed V de Meknès pour sa collaboration dans l'accomplissement de mon stage.
Un grand merci s'adresse aussi à tous ceux qui, de près ou de loin, ont suivi l'évolution de
ce travail et m'ont soutenue et encouragée en l'occurrence : **Madiha BOUGRINI, Khalid
TAHRI, Tarik SAIDI, Omar ZAIM, Mohamed MOUFID, Soukaina MOTIA,
Youssra AGHOUTANE, Alassane DIOUF**. Je remercie également, **Abdoullatif BARAKET**
(France), **Abdelhamid ELAISSARI** (France), **Ernandes TAVEIRA
TENORIO NETO** (Brésil), **Juan GALLARDO GONZALEZ** (Espagne), **Selim
BOUDJAoui** (France) de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon pour leurs
collaborations, leurs gentillesse et leurs disponibilités. Enfin, un merci tout particulier
au Partenariat Hubert Curien (PHC) Toubkal No.32567YD et à la Présidence de
l'Université Moulay Ismaïl pour la dotation relative à "Appui à la recherche", d'avoir
financé mes séjours de recherche à Lyon.

Nadia EL ALAMI EL HASSANI

Table des matières

Dédicaces.....	I
Remerciements	II
Liste des abréviations	IX
Résumé	XI
Abstract.....	XII
ملخص	XIII
Liste des publications et communications.....	XIV
Liste des Figures.....	XVII
Liste des Tableaux	XXII
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre I : état de l’art sur les capteurs et les biocapteurs	4
I.1. INTRODUCTION.....	5
I.2. SÉCURITÉ SANITAIRE DES DENRÉES ALIMENTAIRES.....	5
I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LE MIEL.....	6
I.4. RÉSIDUS D’ANTIBIOTIQUES DANS LE MIEL.....	6
I.4.1. Propriétés des antibiotiques à usage apicole.....	7
I.4.1.1. Sulfamides.....	7
I.4.1.2. Cyclines.....	8
I.4.1.3. Phénicolis	8
I.4.2. Limites maximales de résidus d’antibiotiques tolérées	9
I.5. BIOCAPTEURS.....	9
I.5.1. Généralités et historique	9
I.5.2. Définition et principe de fonctionnement d’un biocapteur	10
I.5.3. Classification des biocapteurs.....	11
I.5.3.1. Éléments de reconnaissance d’un biocapteur	11
I.5.3.2. Différents modes de transduction	16
I.6. IMMUNOCAPTEURS.....	23
I.6.1. Atouts du biorécepteur : anticorps	23
I.6.2. Techniques d’immobilisation.....	24
I.6.2.1. Immobilisations mécaniques.....	24
I.6.2.2. Immobilisation covalente.....	25
I.6.2.3. Immobilisation par affinité	26

I.7. CAPTEURS	27
I.7.1. Capteurs à base des polymères à empreintes moléculaires.....	27
I.7.2. Différentes approches d'impression	27
I.7.2.1. Approche covalente	27
I.7.2.2. Approche non covalente	28
I.7.2.3. Approche semi-covalente.....	28
I.7.3. Langue électronique à base de multi-capteurs	28
I.7.3.1. Définition	28
I.7.3.2. Principe de fonctionnement	28
I.7.3.3. Langue électronique voltammétrique	29
I.7.3.4. Analyses multivariées des données collectées par la langue électronique.....	32
I.8. NANOTECHNOLOGIE ET NANOPARTICULES DÉDIÉES AUX BIOCAPTEURS	36
I.8.1. Historique.....	36
I.8.2. Définitions.....	37
I.8.3. Procédés de synthèse des nanoparticules	37
I.8.4. Applications des nanoparticules	37
I.9. AUTRES TECHNIQUES UTILISÉES.....	38
I.9.1. Spectroscopie Ultraviolet-visible.....	38
I.9.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	39
I.9.3. Microscopie à Force Atomique.....	39
I.9.4. Microscopie électronique à balayage.....	40
I.10. RÉCAPITULATIF	41
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

PREMIÈRE PARTIE : DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DES IMMUNOCAPTEURS ET DES CAPTEURS À BASE DE POLYMÈRES A EMPREINTES MOLÉCULAIRES POUR LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DU MIEL

Chapitre II : développement et caractérisation des immunocapteurs impedimétriques pour la détection de la sulfapyridine et de la tétracycline dans le miel.....

II.1. INTRODUCTION	53
II.2. FABRICATION DU SYSTÈME BIO-MEMS À BASE DES MICROÉLECTRODES D'OR	53

II.3. PRÉPARATION DES NANOPARTICULES MAGNÉTIQUES.....	55
II.4. FABRICATION D'UN IMMUNOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DES RÉSIDUS DE LA SULFAPYRIDINE DANS LE MIEL	56
II.4.1. Nettoyage des microélectrodes.....	56
II.4.2. Fonctionnalisation de la surface des microélectrodes	57
II.4.2.1. Dépôt des nanoparticules magnétiques.....	57
II.4.2.2. Caractérisation par la Microscopie à Force Atomique	58
II.4.2.3. Caractérisations électrochimiques	59
II.4.2.4. Activation et bio-fonctionnalisation des microélectrodes modifiées	60
II.4.3. Optimisation de la concentration de l'anticorps	61
II.4.4. Détection compétitive séquentielle de la sulfapyridine.....	62
II.4.5. Sélectivité de l'immunocapteur	63
II.4.6. Application dans le miel.....	64
II.4.6.1. Méthode de recouvrement	64
II.4.6.2. Méthode des ajouts dosés	65
II.5. FABRICATION D'UN IMMUNOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE LA TÉTRACYCLINE	67
II.5.1. Élaboration de l'immunocapteur	67
II.5.1.1. Électro-adressage du sel de diazonium sur les microélectrodes d'or (méthode 1)	67
II.5.1.2. Technique de la préconcentration (méthode 2)	69
II.5.1.3. Fonctionnalisation de la surface des microélectrodes par les nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP (méthode 3).....	70
II.5.1.4. Caractérisation par la méthode de micro-tamponnage	71
II.5.2. Optimisation de la concentration de la tétracycline et de son anticorps.....	73
II.5.3. Détection compétitive séquentielle de la tétracycline	73
II.5.4. Sélectivité de l'immunocapteur	76
II.5.5. Application dans le miel.....	77
II.5.5.1. Méthode de recouvrement	77
II.5.5.2. Méthode des ajouts dosés	77
II.6. RÉCAPITULATIF	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
Chapitre III : développement des capteurs électrochimiques à base de polymères à empreintes moléculaires pour la détection de la sulfaguanidine, de la doxycycline et du chloramphénicol dans le miel.....	83

III.1. INTRODUCTION	84
III.2. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	84
III.3. DÉVELOPPEMENT D'UN CAPTEUR À BASE DES POLYMÈRES À EMPREINTES MOLÉCULAIRES POUR LA DÉTECTION DE LA SULFAGUANIDINE DANS LE MIEL.....	85
III.3.1. Protocole expérimental.....	85
III.3.1.1. Caractérisations morphologiques et chimiques.....	87
III.3.1.2. Caractérisations électrochimiques.....	90
III.3.2. Optimisation de la concentration du monomère et du temps d'extraction.....	91
III.3.3. Réponses électrochimiques des capteurs.....	92
III.3.4. Sélectivité du capteur	97
III.3.5. Répétabilité et stabilité du capteur	98
III.3.6. Application sur les échantillons de miel	98
III.4. DÉVELOPPEMENT DES CAPTEURS À BASE DES POLYMÈRES À EMPREINTES MOLÉCULAIRES POUR LA DÉTECTION DE LA DOXYCYCLINE ET DU CHLORAMPHÉNICOL DANS LE MIEL	99
III.4.1. Protocole expérimental.....	99
III.4.2. Caractérisations électrochimiques.....	100
III.4.3. Détection de la doxycycline et du chloramphénicol	100
III.4.4. Sélectivité des capteurs	104
III.4.5. Application sur les échantillons de miel	104
III.5. RÉCAPITULATIF	105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107

**DEUXIÈME PARTIE : APPLICATION DE LA LANGUE ÉLECTRONIQUE
VOLTAMMÉTRIQUE DANS LES ANALYSES AGROALIMENTAIRES ET
BIOMÉDICALES 111**

**Chapitre IV : application de la langue électronique voltammétrique pour la
caractérisation analytique et pour la classification géographique des miels de la france et
du maroc..... 112**

IV.1. INTRODUCTION.....	113
IV.2. PROVENANCE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DU MIEL	114
IV.3. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL DE LA LANGUE ÉLECTRONIQUE VOLTAMMÉTRIQUE.....	114
IV.4. DISCRIMINATION DU MIEL DE DIFFÉRENTES ORIGINES GÉOGRAPHIQUES PAR LA LANGUE ÉLECTRONIQUE VOLTAMMÉTRIQUE	115
IV.4.1. Réponses des capteurs voltammétriques.....	115

IV.4.2. Discrimination des miels par l'analyse en composantes principales	116
IV.4.3. Classification des miels par la méthode ascendante hiérarchique	117
IV.4.4. Classification des miels par les séparateurs à vastes marges	118
IV.5. CARACTÉRISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES MIELS.....	118
IV.5.1. Intensité de couleur	118
IV.5.2. Teneur en sucres réducteurs et totaux	119
IV.5.3. pH et teneur en acides	121
IV.5.4. Teneur en phénols	123
IV.5.5. Teneur en protéines	124
IV.5.6. Teneur en hydroxyméthylfurfurale	125
IV.5.7. Modélisation par la méthode de la régression à moindres carrées.....	126
IV.6. RÉCAPITULATIF	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130
Chapitre V : vers une application de la langue électronique voltamétrique pour le diagnostic rapide des infections des voies urinaires.....	132
V.1. INTRODUCTION	133
V.2. COLLECTE ET PRÉ-ANALYSE DES ÉCHANTILLONS D'URINE.....	133
V.3. EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DE L'URINE.....	134
V.3.1. Étapes de réalisation.....	134
V.3.2. Résultats de l'EBCU	135
V.4. ANALYSES PAR LA LANGUE-EV	136
V.5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES	138
V.5.1. Discrimination par l'analyse factorielle discriminante	139
V.5.2. Classification par les séparateurs à vastes marges	140
V.6. RÉCAPITULATIF	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142
CONCLUSION GENERALE	144

Liste des abréviations

μCP	: Impression par microcontact
AAM	: Acrylamide
Ab-155	: Anticorps polyclonal anti sulfapyridine
Ab-TC^{R*}	: Anticorps polyclonal anti-TC marqué à la rhodamine
ACP	: Analyse en Composantes Principales
AFD	: Analyse Factorielle Discriminante
AFM	: Microscope à force atomique
APS	: Persulfate d'ammonium
Au-SPE	: Électrodes sérigraphiées en or
Bio-MEMS	: Système micro-électromécanique biologique
BSA	: Albumine de sérum bovin
CAH	: Classification Ascendante Hiérarchique
CAP	: Chloramphénicol
CMA	: Acide 4-aminophénylacétique
CPE	: Élément à phase constante
CT	: Chlortétracycline
Da	: Dalton
DNSA	: Acide 3,5-dinitrosalicylique
DXy	: Doxycycline
EDC	: 1-éthyl-3-(3 diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDX	: Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ETA	: Éthanolamine
FAP	: Florphénicol
FT-IR	: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GAE	: Acide gallique
HMF	: Hydroxyméthylfurfurale
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
IgG	: Immunoglobulines G
IgM	: Immunoglobulines M
LD	: Limite de détection
LMR	: Limite maximale de résidus
LQ	: Limite de quantification
MEB	: Microscopie électronique à balayage
MET	: Microscopie électronique à transmission
MIP	: Polymère à empreintes moléculaires
MNP	: Nanoparticule magnétique
NaOH	: Hydroxyde de sodium
NHS	: N-Hydroxysuccinimide

NIP	: Polymère non-imprimé
NNMBA	: N, N-méthylène-bisacrylamide
ODT	: Octadecanethiol
OTS	: Octadécyltrichlorosilane
OXY	: Oxytétracycline
PAM	: Polyacrylamide
PBS	: Tampon phosphate salin
PDMS	: Polydiméthylsiloxane
PLS	: Régression à moindres carrées
PLS	: Régression à moindres carrées partiels
PVC-COOH	: Polyvinyle carboxylique
PVP	: Povidone
Py	: Pyrrole
Py-COOH	: Pyrrole carboxylique
QCM	: Microbalance à quartz
R_{ct}	: Résistance de transfert de charge
RPD	: Rapport de la performance à la déviation
R_s	: Résistance de l'électrolyte
RSD	: Écart-type relatif
SA	: Sulfacetamide
SA2-BSA	: Acide 5-[4-(amino) phénylsulfonamide]-5-oxopentanoïque couplé au BSA
SAM	: Monocouches auto-assemblées
SD	: Sulfadiazine
SDz	: Sulfadiazine
SG	: Sulfaguanidine
SMz	: Sulfamerazine
SPy	: Sulfapyridine
STz	: Sulfathiazole
SVM	: Séparateurs à Vastes Marges
SZ	: Sulfaméthoxazole
TBAFB	: Fluoroborate de tétrabutyle-ammonium
TC	: Tétracycline
TEMED	: Tétraméthyle-éthylène-diamine
TESUD	: 11-(triéthoxysilyl) undécanal
TWEEN 20	: Polyoxyéthylène (20) sorbitan monolaurate
UE	: Union européenne
UICPA	: Union internationale de chimie pure et appliquée
VC	: Voltammétrie cyclique
VDP	: Voltammétrie différentielle pulsée
VOC	: Voltammétrie à ondes carrées
W	: Impédance de diffusion Warburg

Résumé

Au cours des dernières décennies, les capteurs et les biocapteurs électrochimiques ont connu un développement considérable en raison de leur simplicité, fiabilité, rapidité et sélectivité. Ils ont constitué les alternatives les plus séduisantes pour les méthodes analytiques classiques dans des domaines aussi variés que l'agro-alimentaire, la médecine et la biologie clinique, ou le contrôle de la qualité de l'environnement. Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés, dans un premier volet, aux développements des immunocapteurs et capteurs électrochimiques à base des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour le contrôle de la qualité des miels. La première partie de ce volet concerne le développement des immunocapteurs sur des structures dites Bio-MEMS basées sur des microélectrodes en or. L'élaboration de ces immunocapteurs a été dédiée à la détection des résidus d'antibiotiques à savoir la sulfapyridine (SPy) et la tétracycline (TC). Une nouvelle structure des nanoparticules magnétiques (MNPs) revêtues du copolymère poly (acide pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylique) a été exploitée dans ces travaux pour leur réseau d'immobilisation tridimensionnel ainsi que pour leur stabilité pendant de longues périodes. La détection de la SPy et de la TC a été réalisée par différentes approches compétitives en utilisant des anticorps polyclonaux. Dans la deuxième partie de ce volet, nous avons fabriqué des capteurs à base des MIPs pour la détection de la sulfaguanidine, la doxycycline et le chloramphénicol dans le miel. Ces dispositifs ont été développés sur la surface des électrodes sérigraphiées en or en employant une matrice polymérique du polyacrylamide en présence des molécules empreintes. Les performances de ces capteurs et biocapteurs (limite de détection, sélectivité, reproductibilité, application dans les milieux réels) ont ensuite été évaluées. Dans un deuxième volet, nous nous sommes parvenus à appliquer un dispositif de la langue électronique voltammétrique (Langue-EV) pour des analyses agroalimentaires et biomédicales. Dans un premier temps, nous avons discriminé les miels issus de quatorze régions de la France et du Maroc par le dispositif de la Langue-EV. Nous nous sommes aussi parvenus à démontrer la fiabilité de ce dispositif à prédire les résultats des différents paramètres physico-chimiques d'après les réponses des méthodes analytiques utilisées. Dans un deuxième temps, nous sommes passés à l'application du dispositif de la Langue-EV en analyse biomédicale dans le but de discriminer les urines des patientes souffrants des infections urinaires avec celles des femmes saines.

Mots-clefs : Antibiotiques, Contrôle alimentaire, Miel, Nanotechnologie, Immunocapteurs, Polymères à Empreintes moléculaires, Langue électronique, Infections des voies urinaires.

Abstract

In recent decades, the use of electrochemical sensors and biosensors have grown considerably due to their simplicity, reliability, rapidity, and selectivity. They were the most attractive alternative tools for conventional analytical methods in various fields such as food control, medicine, and clinical biology or environmental control. In this research works, we focused, in the first part, on the development of immunosensors and electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers (MIPs) for the quality control of honey. In the second part, we managed to apply a voltammetric electronic tongue (VE-tongue) for food monitoring and biomedical analyzes. The first part of our research work concerns the development of immunosensors based on gold microelectrodes of the Bio-MEMS devices. The development of these immunosensors was dedicated to the detection of antibiotic residues namely sulfapyridine (SPy) and tetracycline (TC). A new structure of magnetic nanoparticles (MNPs) coated with the poly (pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylic acid) copolymer has been exploited in this work for their three-dimensional immobilization network as well as for their stability for long periods. The detection of SPy and TC was performed by different competitive approaches using polyclonal antibodies. In this part, we have also synthesized the MIP sensors dedicated to the detection of sulfaguanidine, doxycycline, and chloramphenicol in honey. These devices have been developed on the surface of the screen-printed gold electrodes by employing a polyacrylamide matrix in the presence of the target molecules. The performances of these sensors and biosensors (limit of detection, selectivity, reproducibility, applications in real samples) were then evaluated. Regarding the second part of our research works, it involved the discrimination between honeys from fourteen regions from France and Morocco. We have succeeded in demonstrating the reliability of this device in predicting the results of the different physico-chemical parameters of honey samples according to the responses of the used analytical methods. In other steps, we proceeded to the application of the VE-tongue in biomedical analyzes to discriminate urine specimens of patients suffering from urinary tract infections and those of healthy subjects.

Keywords : Antibiotics, Food Control, Honey, Nanotechnology, Immunosensors, Molecularly Imprinted Polymers, Electronic Tongue, Urinary Tract Infections.

ملخص

في العقود الأخيرة، نمت أجهزة الاستشعار الكهروكيميائية وأجهزة الاستشعار الحيوية بشكل كبير بسبب بساطتها وموثوقيتها وسرعة انتقائها. هذه الأجهزة شكلت البدائل الأكثر جاذبية للطرق التحليلية التقليدية في مجالات متنوعة مثل الأغذية الزراعية والطب والبيولوجيا السريرية ومراقبة جودة البيئة. في هذا البحث، اهتمنا في الجزء الأول، بتطوير أجهزة الاستشعار الكهروكيميائية الحيوية وأجهزة الاستشعار القائمة على أساس البوليمرات المطبوعة جزيئياً لمراقبة جودة العسل. أما في الجزء الثاني، تمكنا من تطبيق جهاز اللسان الإلكتروني لتحليلات الزراعة والطبية الإحيائية. فيما يتعلق بتصنيع أجهزة الاستشعار المناعية، قمنا في المرحلة الأولى باستخدام أنظمة إلكترونية صغيرة من الذهب التي تم تطويرها للكشف عن متبقيات المضادات الحيوية في العسل كسلفابيريدين والتتراسيكلين. في هذه الدراسات، تم استعمال هيكل جديد من الجسيمات النانوية المغناطيسية المغلفة بمزيج من حمض البيروكسيد والبيروكسيد الكربوكسيلي الذي استخدم نظراً لقدرته على تثبيت الجزيئات بطريقة ثلاثية الأبعاد وللاستقراره لفترات طويلة. الكشف عن سلفابيريدين والتتراسيكلين أجري بمناهج مختلفة تعتمد على تقنية التنافسية باستخدام أجسام مضادة متعددة النسائل. أما في المرحلة الثانية من هذا الجزء، قمنا بتصنيع أجهزة الاستشعار القائمة على أساس البوليمرات المطبوعة جزيئياً مخصص للكشف عن سلفاغوانايدين و دوكسيستيكلين والكلورامينيكول في العسل. وقد تم تطوير هذه الأجهزة على سطح أقطاب الذهب المطبوعة عن طريق استخدام مصفوفة بوليمرية مكونة من بولي أكريلاميد الذي يحتوي على الجزيئات المستهدفة. بالإضافة إلى هذا، تم تقييم أداء هذه الأجهزة الاستشعارية من خلال التحقق من حد الكشف والانتقائية وإمكانية إعادة الإنتاج والتطبيق في البيئات الحقيقية. أما بالنسبة للجزء الثاني من أعمالنا البحثية، فقد هم في بداية الأمر دراسة إمكانية التمييز بين مختلف عينات العسل المحصول عليها من أربع عشرة منطقة في فرنسا والمغرب. علاوة على ذلك، تمكنا من إثبات موثوقية هذا الجهاز في التنبؤ بنتائج الخصائص الفيزيوكيميائية لمختلف عينات العسل وفقاً لنتائج الطرق التحليلية المستخدمة. وفي مرحلة أخرى، تناولنا إمكانية التحليل الطبي الحيوي بواسطة هذا اللسان الإلكتروني من أجل التمييز بين العينات البولية للمرضى الذين يعانون من التهابات المسالك البولية وأخرى لأفراد أصحاء.

كلمات البحث: المضادات الحيوية، مراقبة الأغذية، العسل، تقنية النانو، أجهزة الاستشعار الحيوية، البوليمرات المطبوعة جزيئياً، اللسان الإلكتروني، عدوى المسالك البولية.

Liste des publications et communications

Publications

10. **N. El Alami El Hassani**, A. Baraket, S. Boudjaoui, E. Taveira Tenório Neto, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine. Development and application of a novel electrochemical immunosensor for tetracycline screening in honey using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS. *Biosensors and Bioelectronics* 130, (2019) 330-337.
9. **N. El Alami El Hassani**, E. Llobet, L.-M Popescu, M. Ghita, B. Bouchikhi, N. El Bari. Development of a highly sensitive and selective molecularly imprinted sensor for sulfaguanidine detection in honey samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 823, (2018) 647-655.
8. **N. El Alami El Hassani**, K. Tahri, E. Llobet, B. Bouchikhi, A. Errachid, N. Zine, N. El Bari. Emerging approach for analytical characterization and geographical classification of Moroccan and French honeys by means of a voltammetric electronic tongue. *Food chemistry* 243, (2018) 36-42.
7. **N. El Alami El Hassani**, A. Baraket, E. Taveira Tenorio Neto, M. Lee, J-P. Salvador, M-P., Marco, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. El Aissari, A. Errachid, N. Zine. Novel strategy for sulfapyridine detection using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS: Application to honey analysis. *Biosensors and Bioelectronics* 93, (2017) 282-288.
6. **N. El Alami El Hassani**, S. Motia, B. Bouchikhi, N. El Bari. Synthesis of highly sensitive molecular imprinted sensor for selective determination of doxycycline in honey samples. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 11, (2017) 371-374.

Publications non incluses dans la thèse

5. A. Diouf, S. Motia, **N. El Alami El Hassani**, N. El Bari, B. Bouchikhi. Development and characterization of an electrochemical biosensor for creatinine detection in human urine based on functional molecularly imprinted polymer. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 788, (2017) 44-53.
4. A. Diouf, S. Motia, **N. El Alami El Hassani**, N. El Bari, B. Bouchikhi. An electrochemical biosensor based on molecularly imprinted polymer for the quantification of creatinine in human urine samples. *International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN), 2017 ISOCs/IEEE Xplore Digital Library, Pages 1-3*. doi: 10.1109/ISOEN.2017.7968881.
3. S. Motia, **N. El Alami El Hassani**, A. Diouf, B. Bouchikhi, N. El Bari, A sensitive approach on trace analysis of methylparaben in wastewater and cosmetic products

Liste des publications et communications

using molecularly imprinted polymer, World Academy of Science, Engineering and Technology: International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering 11, (2017) 384-388.

2. M. Bougrini, K. Tahri, T. Saidi, **N. El Alami El Hassani**, B. Bouchikhi, N. El Bari. Classification of honey according to geographical and botanical origins and detection of its adulteration using voltammetric electronic tongue. Food Analytical Methods 9, (2016) 2161-2173.
1. K. Tahri, C. Tiebe, M. Bougrini, T. Saidi, **N. El Alami-El Hassani**, N. El Bari, T. Hübert, B. Bouchikhi, Characterization and discrimination of Saffron by multisensory systems, SPME-GC-MS and UV-Vis spectrophotometry. Analytical Methods 7, (2015) 10328-10338.

Communications orales

6. **N. El Alami El Hassani**, B. Bouchikhi, N. Zine Loukili, A. El Salhi Errachid, N. El Bari, Development of highly sensitive molecular imprinted polymer for selective recognition of Chloramphenicol in honey samples. Présentation orale au congrès: The 2nd International Conference on Advances in Biotechnology, 23-25 Juillet 2018, Kuala Lumpur – Malaisie.
5. **N. El Alami El Hassani**, S. Motia, B. Bouchikhi, N. El Bari, Synthesis of highly sensitive molecular imprinted sensor for selective determination of doxycycline in honey samples. Présentation orale au congrès: The 19th International Conference on Bioengineering, Biotechnology and Devices, 28-29 Mai 2017, Tokyo – Japan.

Communications orales non incluses dans la thèse

4. S. Motia, **N. El Alami El Hassani**, A. Diouf, B. Bouchikhi, N. El Bari, A sensitive approach on trace analysis of methylparaben in wastewater and cosmetic products using molecularly imprinted polymer. Présentation orale au congrès: The 19th International Conference on Bioengineering, Biotechnology and Devices, 28-29 Mai 2017, Tokyo – Japan.
3. T. Saidi, O. Zaim, M. Moufid, **N. El Alami El Hassani**, N. El Bari, R. Ionescu, B. Bouchikhi. Exhaled breath analysis based on e-nose for discriminating chronic kidney disease, diabetes mellitus and healthy states. Présentation orale au séminaire : 1st TROPSENSE Workshop, 9 Février 2016, Gdańsk – Pologne.
2. K. Tahri, C. Tiebe, M. Bougrini, T. Saidi, **N. El Alami El Hassani**, N. El Bari, T. Hübert, B. Bouchikhi. Determination of safranal concentration in saffron samples by means of VE-tongue, SPME-GC-MS, UV-Vis spectrophotometry and multivariate analysis. Présentation orale au congrès : IEEE. 01-04 Novembre 2015, Busan – Corée du Sud.

Liste des publications et communications

1. M. Bougrini, K. Tahri, T. Saidi, **N. El Alami El Hassani**, B. Bouchikhi, N. El Bari. Authenticity and classification of honeys from different geographical and botanical origins based on voltammetric electronic tongue. Présentation orale au congrès: The 4th International Conference and Exhibition on Biosensors & Bioelectronics 2015, 28 - 30 Septembre 2015, Atlanta – Etats-Unis.

Communications posters

6. **N. El Alami El Hassani**, A. Baraket, S. Boudjaoui, E. Taveira Tenório Neto, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine. Development of a novel electrochemical immunosensor for tetracycline recognition in honey samples using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS. Présentation affichée au congrès: Biosensors 2018, 12-15 Juin 2018, Miami – Etats-Unis.
5. **N. El Alami El Hassani**, A. Baraket, E. Taveira Tenorio Neto, M. Lee, J-P. Salvador, M-P., Marco, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. El Aissari, A. Errachid, N. Zine. Novel strategy for sulfapyridine detection using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS: Application to honey analysis. Présentation affichée au congrès: Biosensors 2016, Post Congress Symposium, 25-27 Mai 2016, Gothenburg – Suède.

Communications posters non incluses dans la thèse

4. A. Diouf, S. Motia, **N. El Alami El Hassani**, N. El Bari, B. Bouchikhi. An electrochemical biosensor based on molecularly imprinted polymer for the quantification of creatinine in human urine samples, Présentation affichée au congrès: The International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN), 28-31 Mai 2017, Montréal – Canada.
3. T. Saidi, K. Tahri, **N. El Alami El Hassani**, M. Bougrini, N. El Bari, R. Ionescu, B. Bouchikhi. Artificial sensory systems combined with UV-Vis spectrophotometry as a robust approach for VOCs analysis of human urine and exhaled breath. Présentation affichée au congrès : Biosensors 2016, Post Congress Symposium, 25-27 Mai 2016, Gothenburg – Suède.
2. K. Tahri, C. Tiebe, **N. El Alami-El Hassani**, T. Saidi, M. Bougrini, N. El Bari, T. Hübert, B. Bouchikhi. Geographical classification and Adulteration detection of cumin by using electronic sensing coupled to multivariate analysis. Présentation affichée au congrès : Biosensors 2016, Post Congress Symposium, 25-27 Mai 2016, Gothenburg – Suède.
1. T. Saidi, **N. El Alami El Hassani**, O. Zaim, M. Moufid, K. Tahri, A. Mouslih, S. Sabri, N. El Bari, R. Ionescu, B. Bouchikhi. Monitoring and discrimination of odour of exhaled breath of patients with renal failure and healthy subjects. Présentation affichée au congrès : Biosensors 2016, Post Congress Symposium, 25-27 Mai 2016, Gothenburg – Suède.

Liste des Figures

Figure I.1: Structure chimique des sulfamides.....	7
Figure I.2: Structure chimique des cyclines.....	8
Figure I.3 : Structure chimique des phénicols.....	9
Figure I.4: Principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	11
Figure I.5: Différents types de biorécepteurs.....	11
Figure I.6: Structure schématisée d'un anticorps.....	13
Figure I.7: Représentation schématique du principe des récepteurs membranaires.....	14
Figure I.8: Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique.....	15
Figure I.9: Représentation schématique du principe de la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires.....	16
Figure I.10: Déphasage entre la perturbation électrique en potentiel d'entrée et le signal de sortie en courant.....	19
Figure I.11: Diagramme de Nyquist du circuit de : (A) Randles-Ershler, (B) son circuit électrique équivalent.....	20
Figure I.12 : Représentation d'un voltammogramme cyclique.....	22
Figure I.13 : Schéma de mesure pour la voltammétrie à ondes carrées.....	23
Figure I.14 : Illustration de l'immobilisation d'un biorécepteur par la technique de réticulation.....	24
Figure I.15: Schéma du principe d'activation des groupements carboxyles par EDC/NHS....	25
Figure I.16 : Immobilisation d'un biorécepteur sur une électrode d'or via un lien diazonium.....	26
Figure I.17: Différentes orientations des anticorps immobilisés sur une électrode.....	26
Figure I.18: Immobilisation d'anticorps sur une électrode par le système d'affinité biotine/streptavidine.....	27
Figure I.19 : Représentation schématique de l'analogie entre (A) la langue humaine, (B) la langue électronique.....	29
Figure I.20: Schéma de la configuration à trois électrodes pour les mesures voltammétriques.....	30
Figure I.21: Électrode de référence Ag/AgCl.....	31
Figure I.22 : Variables représentatives extraites des voltammogrammes cycliques.....	33
Figure I.23: Arbre de la classification hiérarchique ascendante.....	35
Figure I.24: Hyperplan optimal, vecteurs de support et marge maximale.....	36
Figure I.25 : Schéma du principe de fonctionnement de la spectroscopie ultraviolet-visible.....	39
Figure I.26 : Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.....	40

Liste des Figures

Figure I.27 : Schéma interne d'un microscope électronique à balayage.....	41
Figure II.1: Dispositif Bio-MEMS intégré sur un substrat de silicium.....	54
Figure II.2: Étapes technologiques du procédé de la fabrication du système Bio-MEMS.	55
Figure II.3: Analyse par microscopie électronique à transmission des nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP [8].....	56
Figure II.4: (A) Profils de courant en fonction du temps de l'électrodéposition pulsée des nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP, (B) Image obtenue par le stéréomicroscope de l'électrode d'or modifiée par les PPy/PPy-COOH/MNP (en noir) comparée à celle de l'or nu (en jaune).....	58
Figure II.5: Images AFM de la surface d'or modifiée par PPy/PPy-COOH/MNP : (A) topographie bidimensionnelle (2D) de la surface, (B) topographie tridimensionnelle (3D) de la surface. Les dimensions de l'image en coordonnées X et Y sont comprises entre 4,4 μm et 5,0 μm	59
Figure II.6: (A) Voltammogrammes cycliques obtenus dans une gamme de potentiels entre -0,3 et 0,6 V avec une vitesse de balayage de 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, (B) Diagrammes de Nyquist d'une microélectrode d'or avant et après électrodéposition des PPy/PPy-COOH/MNP, fréquences entre 200 mHz et 200 kHz appliquées en circuit ouvert, avec un potentiel DC de 0,228 V/ref et un potentiel AC de 25 mV.....	60
Figure II.7: Représentation schématique de la fonctionnalisation des microélectrodes d'or par : (A) PPy/PPy-COOH/MNP (B) SA2-BSA.	61
Figure II.8: Diagrammes de Nyquist dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant la variation d'impédance par rapport aux concentrations de l'anticorps Ab-155. , fréquences entre 200 mHz et 200 kHz, potentiel DC = 0,228 V/ref et potentiel AC = 25 mV.	61
Figure II.9: (A) Diagrammes de Nyquist pour la détection compétitive séquentielle de la SPy à différentes concentrations, (B) Courbe de calibration du biocapteur, en encart : le circuit équivalent utilisé pour le montage SIE.	62
Figure II.10: Courbes de calibrations de la détection de (a) SPy, (b) STz, (c) SDz (d) SMz. .	64
Figure II.11: Diagrammes de Nyquist après dépôt de la solution de miel dilué.....	65
Figure II.12: Schéma illustrant la méthode des ajouts dosés en utilisant cinq aliquotes.	66
Figure II.13: Normalisation des données SIE montrant la variation linéaire de $\Delta R/R_0$ en fonction des concentrations de la SPy dans le miel, en utilisant les anticorps : (a) Ab-155, (b) Ab-87.	66
Figure II.14: Voltammogrammes cycliques de l'électro-adressage du sel de diazonium.....	68
Figure II.15: Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'or nu et après électro-adressage du sel de diazonium.....	68

Liste des Figures

Figure II.16: Illustration schématique des différentes étapes de bio-fonctionnalisation de la surface des microélectrodes pour la détection compétitive séquentielle de la TC.....	69
Figure II.17: Illustration schématique de la préconcentration des nanoparticules magnétiques et la détection compétitive séquentielle de la TC sur des microélectrodes d'or modifiées par électro-adressage du sel de diazonium.	70
Figure II.18: Illustration schématique des étapes de la fonctionnalisation des microélectrodes d'or par les PPy/PPy-COOH/MNP et la détection compétitive séquentielle de la TC.....	70
Figure II.19: Schéma illustrant l'aspect du micro-tamponnage pour le test de bio-reconnaissance.....	72
Figure II.20: Schéma illustrant l'image fluorescente du test de bio-reconnaissance (Ab-TC/TC) par μ CP sur un substrat en verre.	72
Figure II.21: Diagrammes de Nyquist de l'optimisation de la concentration de : (A) TC, (B) Ab-TC.....	73
Figure II.22: Diagrammes de Nyquist de la détection compétitive de la TC sur les microélectrodes fonctionnalisées par: (A) méthode 1, (B) méthode 2, (C) méthode 3, avec (a) or nu, (b) après dépôt de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de la TC, (c-g) après détection compétitive séquentielle de la TC à 1000, 100, 10, 1 et $0,1 \text{ pg.mL}^{-1}$, respectivement, (D) sensibilités des biocapteurs obtenues par la normalisation des données des diagrammes de Nyquist, en encart: circuit équivalent utilisé pour le montage SIE.	75
Figure II.23: Courbes d'étalonnage pour la détection de (a) TC, (b) DXy, (c) CT, (d) OXy...	77
Figure II.24: Normalisation des données SIE montrant la variation linéaire de $\Delta R/R_0$ en fonction des concentrations de la TC dans le miel, par utilisation des anticorps : (a) Ab-TC, (b) Ab-155.	78
Figure III.1: Représentation schématique du dispositif expérimental.....	85
Figure III.2: Voltammogrammes cycliques du procédé d'électro-polymérisation du film de MIP.....	86
Figure III.3: (A) Étapes de préparation du capteur MIP, (B) schéma du processus chimique de la formation du composite PAM/SG.....	87
Figure III.4: Spectres de la spectroscopie FT-IR de l'électrode d'or (A) nue, (B) modifiée par le film PAM/SG (MIP), (C) après extraction de la SG (NIP).	88
Figure III.5: Images MEB de l'électrode d'or (A) nue, (B) modifiée par le film PAM/SG, (C) après extraction de la SG.....	89
Figure III.6: Spectres EDX de l'électrode d'or : (A) nue, (B) modifiée par le film PAM/SG, (C) après extraction de la SG.	90

Liste des Figures

Figure III.7: (A) Diagrammes de Nyquist et (B) voltammogrammes cycliques relatifs aux différentes étapes de fabrication du capteur MIP.....	91
Figure III.8 : Effet de la concentration du monomère AAM sur la réponse du capteur MIP. .	92
Figure III.9: Effet du temps d'extraction de la SG sur la réponse du capteur MIP.....	92
Figure III.10 : Voltammogrammes d'impulsions différentielles obtenus après détection de la SG à différentes concentrations sur (A) MIP, (B) NIP, (C) Courbes d'étalonnage correspondantes.	93
Figure III.11: Diagrammes de Nyquist obtenus après détection de la SG à différentes concentrations sur (A) MIP, (B) NIP, (C) sensibilité des capteurs par la normalisation des données.....	95
Figure III.12: Structures chimiques de la (A) SG, (B) SA, (C) SZ, (D) SD.	97
Figure III.13: Variations des courants et des résistances de transfert de charges de la SG, SA, SZ et SD par des mesures de (A) SIE, (B) VDP.	97
Figure III.14: Voltammogrammes cycliques des différentes modifications des électrodes en or par (A) DXy, (B) CAP, en encart : voltammogrammes cycliques comprenant celui de l'électrode d'or nu.	100
Figure III.15: Voltammogrammes d'impulsions différentielles obtenus après détection de la DXy et du CAP à différentes concentrations par (A,C) MIP, (B,D) NIP, respectivement. ...	101
Figure III.16: Courbes de calibration des capteurs MIP et NIP de la (A) DXy, (B) CAP.	102
Figure III.17: Structures chimiques de (A) DXy, (B) OXy, (C) CAP, (D) FAP.	104
Figure III.18: Diagrammes de la sélectivité des capteurs MIPs de la (A) DXy, (B) CAP.....	104
Figure IV.1 : Carte de localisation des quatorze échantillons de miel.	114
Figure IV.2 : Réponses voltammétriques de l'électrode d'argent immergée dans les quatorze solutions de miel d'origines géographiques différentes.....	116
Figure IV.3 : Discrimination des miels de quatorze origines géographiques par l'ACP.	117
Figure IV.4 : Dendrogramme de la classification des quatorze miels de différentes origines géographiques par la CAH.	117
Figure IV.5 : Modèles PLS obtenus pour les paramètres physico-chimiques : (a) : protéine, (b) : intensité de couleur, (c) : phénol, (d) : acidité lactonique, (e) : acidité totale, (f) : acidité libre, (g) : HMF, (h) : sucres réducteurs, (i): sucres totaux et (j): saccharose.	127
Figure V.1 Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'argent relatifs aux individus (A,B) P4100 et P4360 ayant un résultat d'ECBU positif, (C,D) P4744 et P4114 ayant un résultat d'ECBU négatif.....	137

Liste des Figures

Figure V.2 : Représentations radiales des échantillons d'urine de deux individus (A) sans IVU, (B) avec IVU.	138
Figure V.3 : Diagramme de sélection des électrodes discriminantes en utilisant la base de données de la variable ΔI	139
Figure V.4 : Diagrammes de l'analyse par l'AFD des douze échantillons d'urine, (A) avant, (B) après sélection des électrodes les plus discriminantes.	140

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Différents domaines d'applications des nanoparticules.....	38
Tableau II.1 : Comparaison de diverses méthodes de détection de la sulfapyridine.	63
Tableau II.2: Détermination de la SPy dans les échantillons de miel enrichis.	65
Tableau II.3 : Comparaison de différentes méthodes de détection de la tétracycline.....	76
Tableau II.4: Détermination de la TC dans les échantillons de miel enrichis.....	77
Tableau III.1 : Comparaison de différentes méthodes de détection de la sulfaguanidine.....	96
Tableau III.2: Résultats du capteur MIP appliqué pour la détermination de la SG dans le miel.	98
Tableau III.3 : Comparaison de différentes méthodes de détection de la doxycycline et du chloramphénicol.	103
Tableau III.4: Résultats du capteur MIP appliqué pour la détermination de la DXy et du CAP dans les échantillons de miel.	105
Tableau IV.1: Matrice de confusion des quatorze miels de différentes origines géographiques identifiés par les SVMs.	118
Tableau IV.2: Résultats de l'intensité de couleur des miels analysés.....	119
Tableau IV.3: Résultats de la teneur en sucres réducteurs et en sucres totaux des miels analysés.	121
Tableau IV.4 : Résultats de la teneur en acides des miels analysés.	123
Tableau IV.5: Résultats de la teneur en phénols des miels analysés.....	124
Tableau IV.6: Résultats de la teneur en protéines des miels analysés.	125
Tableau IV.7: Résultats de la teneur en HMF des miels analysés.	126
Tableau IV.8 : Performances des modèles PLS pour les paramètres mesurés.....	128
Tableau V.1 : Résultats de l'ECBU de la population étudiée.	136
Tableau V.2 : Matrice de confusion des douze échantillons d'urine identifiées par les SVMs.	141

Introduction générale

La préoccupation croissante dans le monde entier pour limiter les contaminants des produits alimentaires, ainsi que pour fiabiliser les analyses biomédicales a créé un besoin pour le développement des méthodes rapides, sensibles et sûres permettant de détecter des composés biologiques et chimiques divers. À cet effet, les techniques électrochimiques peuvent fournir un outil peu coûteux et sensible basé sur des dispositifs portables capables de détecter rapidement un ensemble d'analytes avec une sensibilité et une spécificité élevées. De même, ces techniques ont pu avoir un impact essentiel sur de multiples domaines, notamment le diagnostic précoce de certaines maladies, la surveillance des médicaments et la détection rapide et précise des polluants environnementaux.

Récemment, les biocapteurs ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherches et de développement dans le but d'offrir des systèmes simples, fiables et peu onéreux. Ils ont connu une émergence considérable en raison de leur caractère portatif ainsi que leur simplicité, permettant la transformation d'un signal biochimique en un signal électrique facilement exploitable *in-situ*. De plus, leurs nombreuses applications potentielles que ce soit dans le contrôle agroalimentaire ou dans les domaines médicaux et environnementaux font d'eux des meilleures alternatives aux techniques analytiques traditionnelles assez compliquées. En outre, les capteurs basés sur les techniques à empreintes moléculaires ont été mis en place comme méthodes polyvalentes pour la synthèse de récepteurs artificiels encore moins coûteux que le matériel biologique tels que les anticorps. Ces matériaux disposent des capacités de reconnaissance spéciales envers un large éventail de molécules, avec une grande stabilité dans des conditions expérimentales extrêmes.

Dans ce contexte, les travaux de thèse présentés dans ce mémoire visent le développement des biocapteurs et capteurs électrochimiques utilisant différents récepteurs (anticorps dans le cas des immunocapteurs et des films à empreintes moléculaires dans le cas des capteurs biomimétiques) pour la quantification de différents résidus d'antibiotiques dans le miel. Nous avons également cherché à étudier l'utilisation pratique de ces capteurs dans l'analyse des matrices alimentaires complexes contenant plusieurs analytes tels que le miel.

Par ailleurs, un autre objectif de ce travail est d'exploiter un dispositif de la langue électronique voltammétrique à base de multi-capteurs pour, d'une part, réaliser une discrimination géographique couplée à une caractérisation de certains échantillons de miel issus de différentes

régions du Maroc et de la France et d'autre part, pour effectuer un diagnostic électrochimique des infections urinaires. L'intérêt de l'utilisation de ce dispositif dans l'analyse des miels repose sur les exigences des législations alimentaires obligeant les producteurs à déterminer l'authenticité et les origines de leurs produits, ce qui permet aux consommateurs de prendre des décisions d'achat en meilleure connaissance de cause.

Ce mémoire de thèse est subdivisé en cinq chapitres. Dans le **premier chapitre**, nous présentons un état de l'art sur les biocapteurs et les différents composants impliqués dans leurs élaborations, y compris les biorécepteurs et les transducteurs utilisés. Nous décrivons aussi les capteurs à base des polymères à empreintes moléculaires ainsi que la langue électronique basée sur de multi-capteurs, utilisée pour la discrimination et la caractérisation des solutions. Nous passons en revue également les différentes méthodes de reconnaissance de formes exploitées pour le traitement des bases de données issues de la phase de caractérisation des analytes. Ensuite, nous fournissons des notions sur la nanotechnologie, les procédés de synthèse des nanoparticules et leurs éventuelles applications dans différents domaines y compris celui des biocapteurs. Enfin, nous présentons les techniques spectrophotométriques et microscopiques utilisées.

Les différents travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont subdivisés en deux parties. Dans la première partie, nous avons présenté deux chapitres. Le **deuxième chapitre** consiste au développement des immunocapteurs électrochimiques sensibles et sélectifs ayant la capacité de détecter les résidus de la sulfapyridine et la tétracycline dans le miel. Ces deux immunocapteurs sont élaborés sur la surface des microsystèmes électromécaniques dits Bio-MEMS, basés sur des microélectrodes d'or combinées avec une nouvelle structure de nanoparticules magnétiques. Le **troisième chapitre** expose les principaux résultats obtenus au cours du développement des capteurs biomimétiques à empreintes moléculaires dits MIPs. Ce chapitre est scindé en trois grandes parties concernant la quantification des résidus d'antibiotiques dans le miel notamment la sulfaguandine, la doxycycline et le chloramphénicol.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons présenté deux chapitres. Le **quatrième chapitre** décrit les progrès dans l'utilisation d'instrument de type langue électronique voltammétrique dans une application agroalimentaire. Pour ce faire, nous discutons l'ensemble des résultats obtenus lors de la classification des échantillons de miels en fonction de leurs localités géographiques. Les réponses de la matrice des électrodes ont été exploitées afin d'établir une corrélation avec les résultats obtenus des méthodes de caractérisations physico-chimiques en se basant sur les modèles statistiques élaborés par la méthode de la régression à moindres carrées (PLS).

Le **cinquième chapitre** présente les résultats de l'analyse biomédicale par le dispositif de la Langue-EV, consistant à discriminer les échantillons d'urine des patientes atteintes d'infections urinaires et de celles qui ne le sont pas. Enfin, ce mémoire de thèse a été achevé par une conclusion générale, permettant de dégager les principaux résultats obtenus suivis par des perspectives d'avenir.

CHAPITRE I

**ÉTAT DE L'ART SUR LES CAPTEURS ET LES
BIOCAPTEURS**

I.1. Introduction

L'analyse des produits alimentaires ainsi que le diagnostic des maladies se fondent sur des méthodes conventionnelles qui sont lourdes à mettre en œuvre, nécessitant un prétraitement de l'échantillon, des équipements coûteux et des produits chimiques de haute pureté. Ce type de tests est loin d'être idéal car ils doivent être réalisés dans des laboratoires d'analyse par du personnel hautement qualifié, prenant plusieurs heures d'analyse. Par conséquent, il est moins intimidant d'avoir accès à un dispositif miniaturisé, plus simple, à moindre coût. Dans cette optique, la technologie des capteurs et biocapteurs a pu répondre à ces différentes exigences. Ce chapitre a pour objectif de dresser un état de l'art sur les systèmes des capteurs et biocapteurs. Nous passons en revue leurs principes de fonctionnement, leurs différents composants y compris les différents biorécepteurs et transducteurs utilisés. Nous présentons le domaine des nanotechnologies et des nanoparticules, leurs procédés de synthèses et leurs éventuelles applications. Enfin, nous présentons le système de la langue électronique ainsi que les méthodes statistiques employées quant aux traitements de ses données résultantes.

I.2. Sécurité sanitaire des denrées alimentaires

Aujourd'hui, la sécurité sanitaire des denrées alimentaires est parmi les grands enjeux des politiques mondiales de régulation des marchés. Cette démarche a abouti ces dernières années à un renforcement progressif des réglementations, avec notamment des restrictions pour les limites maximales de résidus des contaminants alimentaires. De plus, la qualité et la sécurité des denrées alimentaires présentes sur le marché tendent ces dernières années à être de plus en plus prises en considération par le consommateur [1]. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont défini la sécurité sanitaire des aliments comme une démarche qui englobe toutes les mesures destinées à proposer des aliments aussi sûrs que possible. Elle prend en considération tous les risques, chroniques ou aigus, susceptibles de rendre les aliments préjudiciables à la santé du consommateur [2]. Parmi les produits alimentaires les plus exposés aux législations alimentaires strictes, nous trouvons le miel. Cet aliment précieux aux multiples vertus fait l'objet de plusieurs plans annuels de contrôle des contaminants alimentaires tels que les résidus chimiques, les médicaments vétérinaires ou les contaminants environnementaux [3]. En outre, le miel a connu au fil du temps, des contrôles de qualité judicieux pour combattre les falsifications liées à son adultération ou à la tromperie sur son origine botanique et/ou géographique. Dans cette optique, le contrôle de la qualité et de l'innocuité du miel s'est considéré comme un enjeu crucial pour la préservation de la filière apicole. Ceci a nécessité la mise en œuvre des méthodes

conventionnelles qui sont lourdes à mettre en place, exigeant un prétraitement de l'échantillon, des équipements coûteux et des produits chimiques de haute pureté. Ces types de tests sont loin d'être pratiques car ils doivent être réalisés dans des laboratoires d'analyse par du personnel hautement qualifié tout en prenant plusieurs heures d'analyse. Par conséquent, il est plus judicieux d'avoir accès à une technique miniaturisée, plus simple, à moindre coût, d'où le recours aux technologies des capteurs et biocapteurs qui peuvent répondre avec efficacité à ces différentes exigences.

I.3. Généralités sur le miel

Le miel est une substance naturelle et pure, produite par l'abeille d'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des plantes, que les abeilles récoltent, transforment et laissent mûrir dans les ruches [4]. Le miel est composé de plusieurs glucides, majoritairement de glucose et de fructose. Il contient également des oligo-éléments et des vitamines telles que la vitamine B. Dans la longue tradition humaine, le miel a été utilisé non seulement comme nutriment, mais aussi comme produit thérapeutique, en fonction de la présence de divers composants antioxydants, comme les polyphénols, les acides aminés et organiques, les enzymes et les protéines [5]. Il possède également des caractéristiques qui lui confèrent des facultés antibactériennes et antiseptiques, pour soigner certaines maladies comme les oreillons et des maladies infectieuses bien déterminées. Ces différentes caractéristiques du miel sont fortement dépendantes de la source florale, de la région géographique de la production et des facteurs externes tels que les conditions environnementales et les méthodes de traitement et de stockage [6].

I.4. Résidus d'antibiotiques dans le miel

Le miel se définit comme l'aliment qui ne peut être additionné d'additifs, de conservateurs ou de substances aromatisantes, bénéficiant de l'image d'un produit naturel sain. Cependant, il existe des maladies bactériennes de la ruche appelées : maladies de couvain qualifiées comme les épizooties les plus dangereuses pour les abeilles et dont le traitement engendre la contamination des produits de la ruche. Ces maladies sont causées par les spores des bactéries *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius* qui sont extrêmement résistantes et restent infectieuses pendant des décennies dans les colonies d'abeilles. Afin de remédier à ce fléau, des dispositions légales prescrivent de brûler les ruches malades et de désinfecter ou d'éliminer les ustensiles et les outillages contaminés ainsi que de contrôler les ruchers avoisinants. Par conséquent, l'utilisation d'antibiotiques reste inefficace et donc interdite aussi

bien pour la prévention que pour la lutte. Toutefois, certains pays autorisent encore l'emploi de ces médicaments dans le traitement temporaire des maladies du couvain, ce qui peut se traduire par des teneurs très élevées en résidus dans le miel [7]. Si de faibles doses ne sont habituellement pas toxiques, elles peuvent cependant favoriser l'apparition des résistances bactériennes chez le consommateur [8]. Pour éviter ce phénomène, les antibiotiques ne doivent être consommés que dans le cas des usages thérapeutiques. En général, il y a une relation étroite entre la quantité d'antibiotiques utilisée et le degré de développement des résistances [9]. L'acquisition de cette résistance bactérienne peut être due à différents mécanismes [10], comme :

- L'apparition d'une mutation génétique des bactéries résistantes leur permettant de survivre quand elles sont placées de façon répétée dans un milieu contenant des antibiotiques ;
- Le transfert des gènes responsables de cette résistance (plasmides) entre des bactéries résistantes et celles sensibles. Cette résistance est transférable de bactérie en bactérie de la même espèce, mais aussi d'espèces voire de genres différents.

I.4.1. Propriétés des antibiotiques à usage apicole

Parmi les antibiotiques les plus répandus dans le traitement des maladies de la ruche, nous trouvons la famille des sulfamides, des cyclines et des phénicols, utilisées grâce à leurs disponibilités à faible coût, avec un large spectre d'activité.

I.4.1.1. Sulfamides

Les sulfamides sont des antibactériens contenant une fraction benzène-sulfonamide avec un groupe amine attaché au noyau benzénique. Elles ont une action bactériostatique avec un large spectre d'activités allant des germes Gram + aux germes Gram -. Leurs mécanismes d'action concernent l'inhibition compétitive de l'enzyme bactérienne dihydroptéroate synthétase [11]. Celle-ci est nécessaire pour la synthèse de l'acide folique qui est une source vitale pour que les cellules produisent des acides nucléiques, tels que l'ADN ou l'ARN et donc pour la multiplication cellulaire. (Figure I.1).

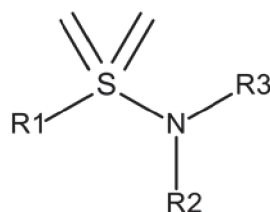


Figure I.1: Structure chimique des sulfamides.

I.4.1.2. Cyclines

Les cyclines sont des antibiotiques bactériostatiques, isolés de souches de *Streptomyces*. Ils sont reconnaissables par des structures tétracycliques communes entre tous les cyclines (Figure I.2). Ces antibiotiques sont indiqués contre de nombreuses d'infections bactériennes causées par des Gram +, Gram - et des anaérobies, mais aussi contre certains autres microorganismes comme la *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia* et les organismes protozoaires. Leurs modes d'action reposent sur l'inhibition de la synthèse des protéines en empêchant la fixation de l' aminoacyl-ARNt au site de l'accepteur ribosomique A. Cependant, leur large spectre d'action avec une absence des effets secondaires majeurs, ont conduit à leurs surutilisations dans les traitements vétérinaires et dans la croissance d'élevage [16,17]. Malgré leurs efficacités prouvées, l'utilisation intensive de ces médicaments n'est plus conseillée à cause de leurs complexations avec les ions Ca^{2+} et l'accumulation de leurs résidus dans les os des animaux, ainsi que dans le poisson, la viande, les œufs et le lait [13].

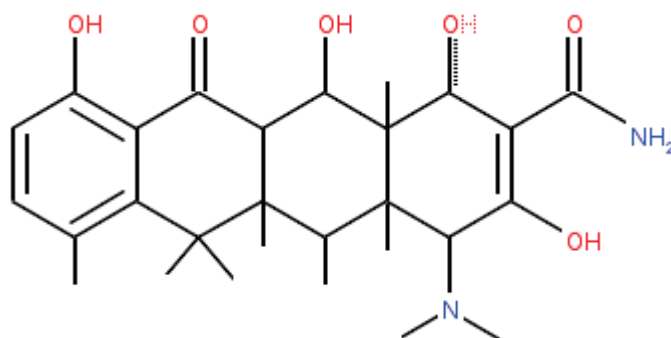


Figure I.2: Structure chimique des cyclines.

I.4.1.3. Phénicol

Les phénicol sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényle substitué (Figure I.3). Ce sont des antibiotiques potentiellement utiles en raison de leur large spectre d'activité, mais dont l'usage est actuellement interdit dans plusieurs pays à cause de leur toxicité médullaire due à l'inactivation des mitochondries des cellules de la moelle osseuse [14]. Comme les cyclines, les phénicol se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens pour inhiber la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation et donc la réaction de transpeptidation. Aujourd'hui, l'administration de fortes doses de ces antibiotiques présente de nombreux effets secondaires liés à des troubles du métabolisme de fer et à une incapacité hépatique qui peut avoir des conséquences mortelles chez les nourrissons [15].

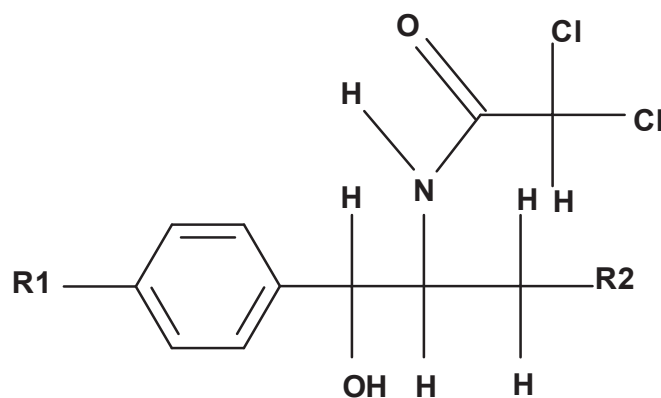


Figure I.3 : Structure chimique des phénicol.

I.4.2. Limites maximales de résidus d'antibiotiques tolérées

Les denrées alimentaires d'origine animale dont la viande, les abats, le lait, les œufs ou le miel peuvent contenir des résidus d'antibiotiques qui peuvent avoir des effets nocifs sur la santé du consommateur. Afin de protéger la santé publique leur propagation dans l'environnement doit être restreinte. Pour garantir la sécurité sanitaire des aliments et limiter l'exposition humaine aux antibiotiques, l'Union Européenne (UE) a défini que la limite maximale de résidus (LMR) des sulfamides et des cyclines ne doit pas dépasser $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans les tissus comestibles et le lait (règlement (CE) n° 470/2009) [16]. En plus pour les cyclines, leurs résidus ne doivent pas dépasser $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans les œufs et $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans le foie [17]. En ce qui concerne les phénicol, seul le thiamphénicol est autorisé d'utilisation dans les traitements vétérinaires. Pour ceci l'UE a fixé les LMR de cet antibiotique à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dans le lait, les tissus comestibles et le foie [3]. Tandis que les autres antibiotiques de la même famille y compris le chloramphénicol sont interdits d'utilisation dans tout usage vétérinaire.

Le miel est un cas particulier car le traitement de la ruche par les antibiotiques est interdit dans l'UE, donc aucune LMR n'a été établie [18]. Malgré cette interdiction, certains apiculteurs tendent toujours à utiliser ce genre de traitement pour prévenir les maladies bactériennes du couvain telles que les loques Américaine et Européenne [19]. Pour cet intérêt, certains pays, comme la Suisse, le Royaume-Uni et la Belgique, ont fixé une LMR dans le miel entre 10 et $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ [20].

I.5. Biocapteurs

I.5.1. Généralités et historique

Une révolution récente des méthodes de détection de certaines biomolécules dans les aliments, dans l'environnement ou dans des liquides biologiques (sang, urine...etc.) a été perçue

comme réponse à des demandes accrues. Ces méthodes visaient à élaborer des techniques fiables plus rapides et plus simples, capables de détecter des analytes en une seule analyse loin des méthodes d'extraction lentes, coûteuses et nécessitant des agents d'extraction nocifs [21]. Face à cette problématique, un intérêt grandissant a été porté durant ces dernières années aux nouveaux dispositifs révolutionnaires à la taille et au prix réduit dits biocapteurs autorisant l'exploration *in situ* d'un grand nombre d'échantillons et l'identification ou le dosage en parallèle d'une large gamme de substances cibles.

Le premier biocapteur développé a été l'œuvre de Leland Clark en 1956 dans le but de déterminer la concentration en oxygène dissous dans le sang [22]. Leland Clark a été connu comme le « père des biocapteurs » et son invention de l'électrode à oxygène porte son nom : *Clark electrode* [23]. En 1962, ce biocapteur a été amélioré par le même auteur afin de mesurer le taux de glucose dans le sang [24], suivi par la découverte du premier biocapteur potentiométrique permettant de détecter l'urée par Guilbault et Montalvo en 1969 [25,26]. L'année 1975, a connu la découverte du premier immunocapteur dédié au dosage de l'éthanol et l'acide lactique par Suzuki et al [27]. Au cours des dernières décennies, le domaine des biocapteurs a connu une ampleur remarquable sous la pression de leurs divers domaines d'applications. Leur caractère compact et portatif ainsi que leurs grandes spécificité et sensibilité font d'eux une des meilleures alternatives aux techniques analytiques existantes.

I.5.2. Définition et principe de fonctionnement d'un biocapteur

D'après l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un biocapteur est un dispositif intégré fournissant des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives par le biais d'un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction. Le concept biocapteur regroupe tout dispositif de mesure défini par un couple de ligands biologiques sélectifs liés à un transducteur qui transforme un phénomène biochimique en un signal mesurable [28]. Leur caractère compact, leur grande spécificité, leur sensibilité et leur portabilité sont autant de raisons permettant de penser qu'ils pourraient, à long terme, supplanter les techniques analytiques existantes.

Le principe de fonctionnement d'un biocapteur est présenté dans la Figure I.4. Le biorécepteur qui est un élément biologique sélectif (anticorps, enzymes, cellules, ADN, organites cellulaires, tissus...) catalyse des réactions biochimiques ou interfère avec des structures complémentaires permettant d'avoir des changements de propriétés physiques ou chimiques transformés en signaux électriques mesurables par le transducteur [29]. Ces signaux seront ensuite amplifiés et traités.

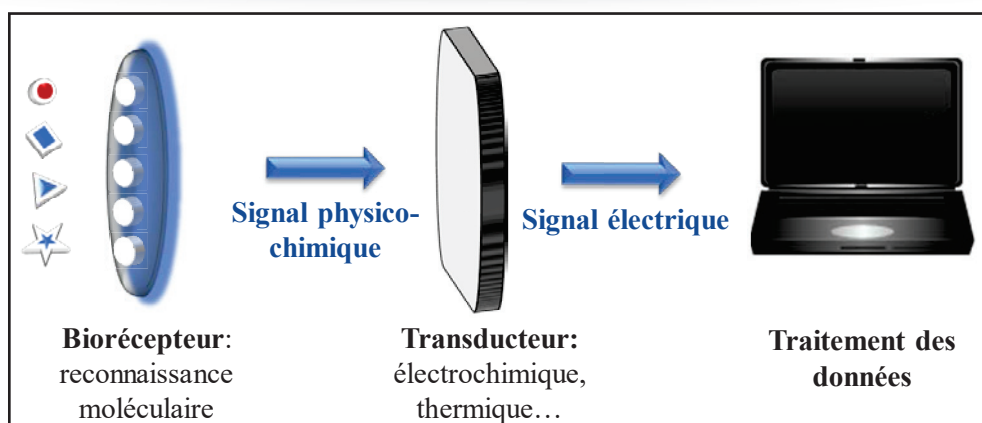


Figure I.4: Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

I.5.3. Classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés selon :

- La reconnaissance moléculaire utilisée (biorecepteur) : biocapteurs immunologiques, membranaires, à ADN, à microorganismes ou enzymatiques.
- Le transducteur associé : biocapteurs optiques, thermiques, mécaniques ou électrochimiques.

I.5.3.1. Éléments de reconnaissance d'un biocapteur

La technologie des biocapteurs est basée sur des éléments de reconnaissance biologique appelés biorecepteurs. Par définition, un biorecepteur est une entité moléculaire qui utilise un mécanisme de reconnaissance biochimique spécifique [30]. Son choix est soumis à plusieurs paramètres : sa stabilité, sa spécificité, sa durée de vie aussi bien que la facilité de son utilisation. La Figure I.5 représente la classification des biorecepteurs selon leur type d'activité (les biorecepteurs d'affinité qui normalement fixent l'analyte sans le modifier, les biorecepteurs métaboliques qui possèdent une activité catalytique et les récepteurs biomimétiques).

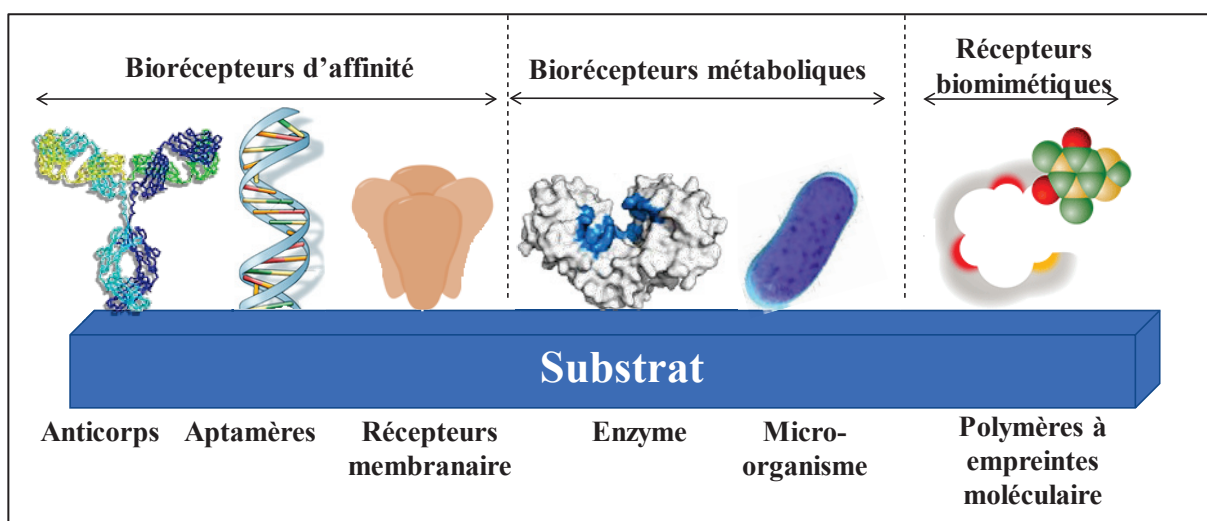


Figure I.5: Différents types de biorecepteurs.

1.5.3.1.1. Biorécepteurs d'affinité

Ce type de biorécepteur utilise des biomolécules sélectives capables de réaliser des liaisons spécifiques (anticorps, récepteurs membranaires ou des oligonucléotides) avec l'analyte cible pour produire un signal électrique mesurable. Ces biorécepteurs sont caractérisés par leurs hautes spécificités et leurs grandes affinités vis-à-vis de leurs ligands permettant de les fixer sans provoquer une réaction chimique [31]. Cette affinité extrêmement forte due à l'existence de nombreuses interactions moléculaires s'établit via des liaisons hydrogène, ioniques, de *Van der Waals* et/ou hydrophobes. Les biorécepteurs dits « naturels ».

a) Anticorps

Les anticorps (Ac) sont des glycoprotéines complexes produites par l'organisme qui reconnaissent spécifiquement un antigène (Ag), c'est-à-dire une molécule étrangère à l'organisme, formant par affinité un complexe antigène-anticorps. Ces glycoprotéines sont produites en masse par les plasmocytes qui sont des lymphocytes B au stade ultime de différenciation. Les anticorps possèdent un fragment cristallisable appelé F_c , commun aux anticorps d'une même espèce et un site d'accroche spécifique à un antigène donné appelé F_{ab} (Figure I.6). La partie de l'anticorps qui assure la fonction de reconnaissance de l'antigène s'appelle le **paratope**. Elle se trouve aux extrémités des chaînes lourdes et légères, au niveau de la partie hypervariable de l'anticorps. Alors que la partie de l'antigène reconnue par un paratope s'appelle un **épitope**. Un antigène possède plusieurs épitopes identiques ou différents reconnus par un anticorps spécifique. Il existe deux types d'anticorps : monoclonaux et polyclonaux.

- Les anticorps monoclonaux produits par un seul clone de plasmocytes ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné ;
- Les anticorps polyclonaux produits par différents clones de plasmocytes qui sont un mélange d'anticorps reconnaissant plusieurs épitopes sur un antigène donné [32].

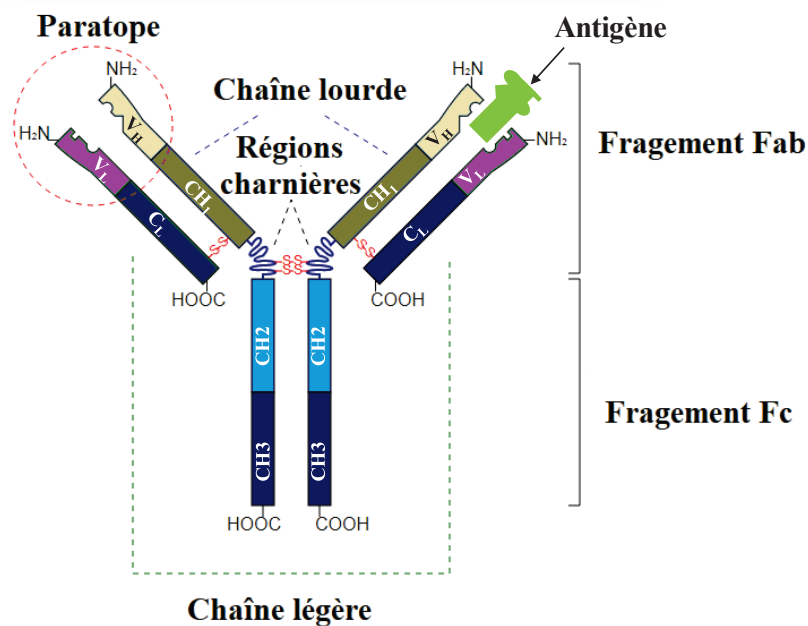


Figure I.6: Structure schématisée d'un anticorps.

Dans le domaine des biocapteurs, l'utilisation des anticorps comme éléments de reconnaissance permet de garantir une détection des analytes d'une manière robuste, sensible et rapide. Toutefois cela nécessite une affinité entre les couples anticorps/antigène qui peut être influencée par les conditions du milieu telles que le pH, la force ionique et la température [33]. Les avantages et les limitations liés aux biocapteurs basés sur le couplage Ac-Ag sont détaillés dans la revue de Saerens et al [34].

b) Récepteurs membranaires

Ce sont des protéines d'origine non-immune situées au niveau de la membrane plasmique ayant la capacité d'interagir avec plusieurs types de molécules (hormones, facteurs de croissance, neurotransmetteurs, molécules odorantes) [35]. Ces protéines sont génétiquement déterminées pour reconnaître et lier de façon stéréospécifique une molécule informationnelle du milieu extérieur (interleukine, hormone, neurotransmetteurs...). Chaque récepteur ne reconnaît en général qu'une seule molécule-signal permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée impliquée dans la vision, le goût, l'odorat, les fonctions nerveuses, le métabolisme et la régulation immunitaire (Figure I.7). Le développement des biocapteurs à base de récepteurs membranaires représente un défi ainsi que la réussite de l'immobilisation de ce type de molécule sur la surface d'un transducteur reste l'étape la plus délicate [36]. De nos jours, un nombre limité de techniques a contribué à la progression des biocapteurs avec ce type de biorécepteur [37–39].

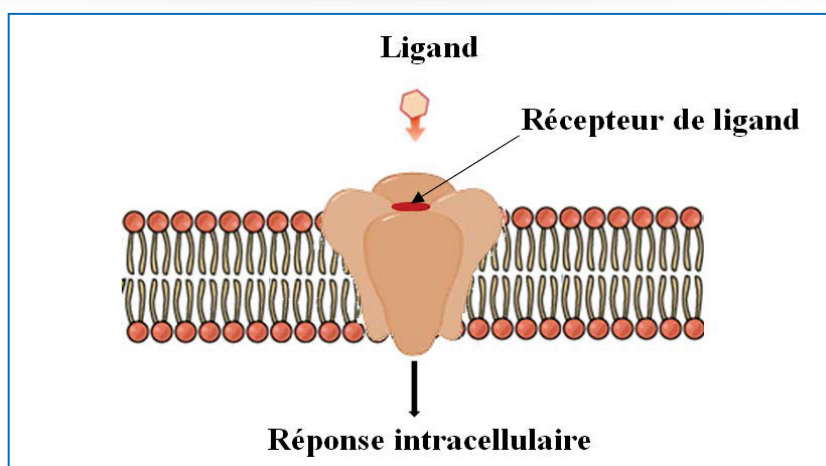


Figure I.7: Représentation schématique du principe des récepteurs membranaires.

c) Acides nucléiques

Ce sont des oligonucléotides constituant l'information génétique cellulaire, formés de deux brins d'acides nucléiques complémentaires enroulés en double hélice. Le type de biocapteur y associé est basé sur l'immobilisation des acides nucléiques sous forme de double ou simple brin sur un transducteur physique.

Le principe de fonctionnement de ces biocapteurs est fondé sur le phénomène d'hybridation entre des séquences complémentaires des brins d'acides nucléiques immobilisés sur la surface qui vont s'associer spécifiquement à des brins d'acides nucléiques cibles complémentaires présents dans un échantillon. Les biocapteurs à base des aptamères présentent plusieurs avantages, du fait qu'ils sont stables, faciles à synthétiser, moins onéreux que les anticorps et ils peuvent être stockés pendant une longue période et sont capable de former des liaisons spécifiques avec leurs molécules cibles [40]. Ce type de biocapteur a suscité l'attention de nombreux chercheurs pour la détection de pathogènes [41–43] et de substances toxiques [44] ainsi que l'analyse des denrées alimentaires et le contrôle environnemental [45].

1.5.3.1.2. Biorécepteurs métaboliques

Contrairement aux biorécepteurs d'affinité, les biorécepteurs métaboliques sont caractérisés par le pouvoir de catalyser une réaction dans laquelle l'analyte cible est métabolisé.

a) Enzymes

Les enzymes sont des protéines ayant des propriétés catalytiques capables d'accélérer la vitesse d'une réaction tout en se trouvant inchangées en fin de réaction. Les molécules transformées au cours de la réaction enzymatique sont appelées substrats et celles obtenues en fin de réaction sont appelées produits (Figure I.8). Les enzymes ont été adoptées pour la fabrication des premiers biocapteurs et restent largement utilisées en vue d'applications dans les analyses agroalimentaires, environnementales [46,47] et biomédicale [48].

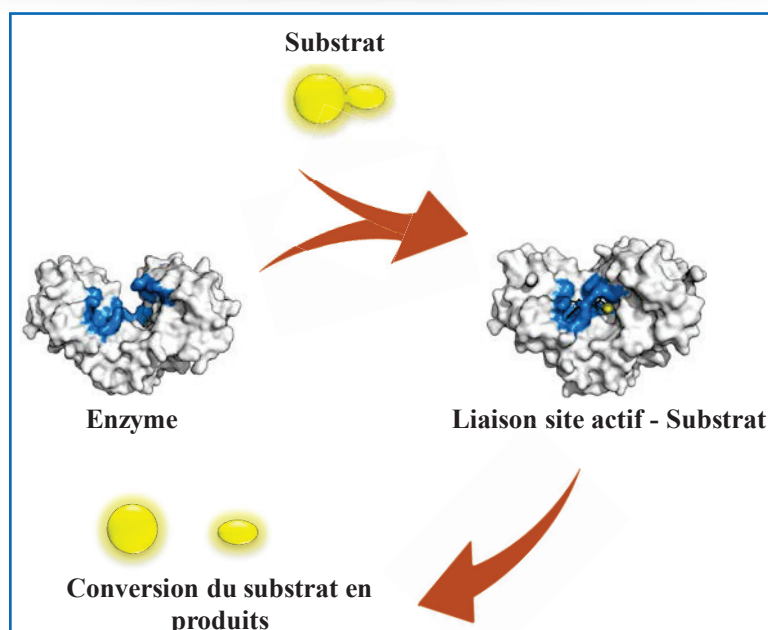


Figure I.8: Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique.

b) Microorganismes

Les microorganismes utilisés dans l'élaboration de ce type de biocapteurs sont essentiellement des bactéries, des levures et des champignons [49]. Ces systèmes de reconnaissance moléculaire ont l'avantage de ne pas nécessiter des étapes d'extraction et de purification des enzymes, avec l'avantage de s'adapter facilement à des modifications de pH et de température. Leur sélectivité et leur sensibilité sont, toutefois, le plus souvent limitées à cause de leur faible spécificité vis-à-vis des interférents. Quelques travaux ont illustré le développement de biocapteurs microbiens dans les domaines agroalimentaire [50] et environnemental [51].

1.5.3.1.3. Récepteurs mimétiques-Polymères à empreintes moléculaires

Également appelés Polymères à Empreintes Moléculaires (MIPs), ils sont des récepteurs synthétiques qui imitent le comportement des biorécepteurs naturels. Leur fonctionnement repose sur le principe de l'impression moléculaire. Celle-ci est basée sur la co-polymérisation des monomères fonctionnels et de leur agent réticulant autour de la molécule cible (Figure I.9). L'extraction de la molécule cible de la matrice du polymère induit à la formation des cavités spécifiques en forme et en fonctionnalité capable de reconnaître une molécule semblable dans des mélanges complexes [52]. C'est ces empreintes qui confèrent au polymère sa possibilité de reconnaître et d'interagir spécifiquement avec la molécule cible lorsqu'il y sera exposé. Les sites de reconnaissance des MIPs miment les sites de liaison des entités biologiques telles que les anticorps et les enzymes et se caractérisent par une grande stabilité, ainsi qu'une facilité de préparation à faible coût [53]. Le(s) monomère(s) fonctionnel(s), l'agent réticulant et la

technique de polymérisation utilisée sont choisis et optimisés en fonction de la molécule cible, dans le but d'obtenir la meilleure sélectivité, la capacité d'absorption maximale et des propriétés physicochimiques adaptées à l'application envisagée.

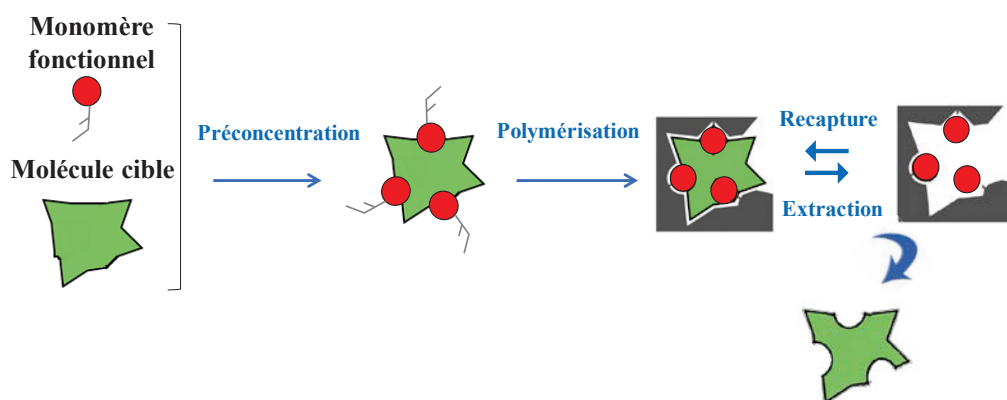


Figure I.9: Représentation schématique du principe de la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires.

I.5.3.2. Différents modes de transduction

Dans le domaine des biocapteurs, différents systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de transformer la reconnaissance moléculaire issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur en un signal électrique exploitable. Le type de transducteur est choisi selon les modifications biochimiques générées par le biorécepteur. L'adéquation entre ces deux entités permet d'obtenir un signal sensible, facilement exploitable et avec un bruit de fond minimal ce qui assure un meilleur seuil de détection et améliore ainsi l'efficacité du biocapteur [54]. La nature du transducteur sert souvent de base pour la classification des différents biocapteurs. De nombreux transducteurs ont été employés pour développer les biocapteurs, notamment les transducteurs optiques, thermiques, mécaniques et électrochimiques.

I.5.3.2.1. Transducteurs optiques

Les transducteurs optiques sont devenus populaires durant ces dernières années avec plusieurs dispositifs commercialement disponibles. Ils se sont basés sur certains phénomènes tels que la fluorescence, l'ellipsométrie [55], la résonance plasmonique de surface [56], le radiomarquage et les ondes évanescentes, la variation de l'indice de réfraction, ou d'autres paramètres optiques [57]. Ce type de transducteur permet d'effectuer des mesures *in situ* et en temps réel avec une bonne sensibilité, une robustesse et des faibles temps de réponse. Une autre particularité est leur miniaturisation ainsi que leur capacité de détection simultanée de plusieurs analytes.

1.5.3.2.2. Transducteurs thermiques

Les transducteurs thermiques aussi appelés capteurs enthalpimétriques ont été développés dans les années 1974 [58]. Ils sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à des réactions exo ou endothermiques. Leur principe est basé sur l'immobilisation des récepteurs biologiques qui sont reliés à un microcalorimètre ou à une résistance thermique capable de mesurer les changements d'enthalpie ou de température dues aux réactions avec l'analyte [59].

1.5.3.2.3. Transducteurs mécaniques

Au cours des dernières années, différents transducteurs mécaniques ont été largement répandus en tant que systèmes de détection de biocapteurs parmi lesquels nous trouvons les transducteurs basés sur l'effet piézoélectrique et les microsystèmes biologiques électromécaniques.

a) Transducteurs basés sur l'effet piézoélectrique

Ce type de transducteur a été mis au point par Shons et al. en 1972 [60] et il repose sur le phénomène piézoélectrique, qui induit à l'apparition d'un potentiel électrique à la surface d'un matériau lorsque celui-ci subit une contrainte mécanique. Le biocapteur à effet piézoélectrique le plus utilisé est connu sous le nom de microbalance à quartz (QCM). Il est basé sur la mesure de l'oscillation d'un cristal de quartz immergé dans un liquide et sur lequel est immobilisé le composé biologique. Par la suite ce système entraîne un changement de masse à la surface du cristal provoquant un changement quantifiable de la fréquence de résonance. Depuis plusieurs études ont été consacrées à son utilisation dans la détection des marqueurs tumoraux [61], des résidus de pesticides [62], des toxines alimentaires [63], ...etc.

b) Transducteurs basés sur les microsystèmes électromécaniques

Les microsystèmes biologiques électromécaniques dits Bio-MEMS ou Biological Micro-Electro-Mechanical-Systems en Anglais sont des systèmes mécaniques de taille nanométrique permettant la conversion des interactions biomoléculaires en une grandeur mécanique [64]. La fabrication de ce système se base sur la fixation d'une micro-biomembrane, formant l'élément sensible du Bio-MEMS sur un substrat de silicium. Lorsque la biomembrane est en contact avec une solution aqueuse contenant des espèces à détecter (cible), celles-ci sont captées par des molécules fonctionnalisant sa surface appelées sondes et conduisant à son alourdissement. La quantité d'analytes présente dans le liquide est estimée par la mesure de la variation de fréquence de résonance issue des vibrations de cette membrane.

Les Bio-MEMS présentent plusieurs avantages qui se manifestent dans leur grande sensibilité, un rapport signal sur bruit élevé ainsi qu'une insertion facile de plusieurs capteurs sur une surface réduite. Récemment, ce dispositif affirme une grande capacité d'application notamment dans le développement des biocapteurs dans le domaine agroalimentaire [65] et médical [66].

1.5.3.2.4. Transducteurs électrochimiques

Les transducteurs électrochimiques transforment l'interaction électrochimique entre l'analyte et l'électrode en un signal porteur d'information. Leur principe de fonctionnement est basé sur le fait que certaines molécules électro-actives en solution peuvent échanger les électrons avec la surface de l'électrode selon le potentiel auquel cet échange a lieu. Les transducteurs électrochimiques restent les plus utilisés grâce à leurs principaux avantages liés à leur simplicité, leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. Dans cette catégorie nous distinguons: les transducteurs potentiométriques, ampérométriques, impédimétriques, conductimétriques et voltammétriques.

a) Transducteurs potentiométriques

Ce type de transducteur est basé sur la mesure de la différence du potentiel établi entre une électrode de référence à potentiel constant et une électrode indicatrice sous une intensité de courant nulle. Les potentiels mesurés sont proportionnels à la concentration de l'analyte dans la solution qui est généralement le substrat d'une enzyme, d'une cellule entière, d'un anticorps, ou d'une ADN.

b) Transducteurs ampérométriques

Ces transducteurs mesurent le courant généré par une réaction d'oxydo-réduction entre une électrode de travail et une électrode de référence à un potentiel constant. La valeur de ce courant est proportionnelle à la concentration d'analyte en solution. Ce type de transducteur est caractérisé par sa haute sensibilité et sa large gamme de linéarité comparé aux transducteurs potentiométriques.

c) Transducteurs conductimétriques

Les transducteurs conductimétriques sont des alternatives aux potentiométriques et ampérométriques, leur principe repose sur la mesure des propriétés conductimétriques d'un milieu entre deux électrodes parcourues par un courant alternatif. La conductivité d'un milieu est linéairement liée à la nature des ions en solution (leur charge et leur mobilité) et de leurs concentrations [67].

d) Transducteurs impédimétriques

Le principe de ce type de transducteur repose sur la technique de la spectroscopie d'impédance basée sur l'application d'une contrainte sous forme d'une variation sinusoïdale en tension de quelques millivolts d'amplitude, entre l'électrode de référence et l'électrode de travail et la mesure du courant généré entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire en fonction de la fréquence. Cette variation de potentiel d'entrée est de la forme :

$$E = V_a \sin(\omega t)$$

Avec :

ω : vitesse angulaire = $2 \times \pi \times f$

ωt : angle de phase.

La réponse sinusoïdale de sortie est obtenue en courant et accompagnée d'un déphasage (φ) dépendant des éléments électriques présents dans le système (Figure I.10).

$$I = I_a \sin(\omega t + \varphi)$$

Avec :

φ : le déphasage entre les deux signaux

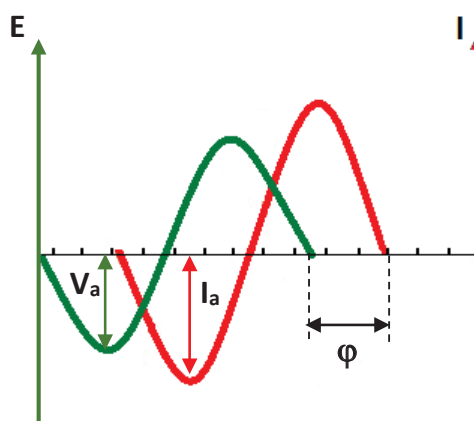


Figure I.10: Déphasage entre la perturbation électrique en potentiel d'entrée et le signal de sortie en courant.

Le rapport du potentiel appliqué à l'intensité du courant mesurée indique l'impédance du système électrochimique traduite par un circuit électrique équivalent.

$$Z = \frac{E}{I} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \times \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \times (\cos \varphi + j \sin \varphi)$$

La fonction de transfert dans le domaine de fréquence étant un nombre complexe, il est utile de la présenter en traçant la partie imaginaire en fonction de la partie réelle. En électrochimie, il est d'usage de tracer plutôt $-I_m(Z)$ en fonction de $R_e(Z)$ (Figure I.11(A)) Cette mesure, valable pour une seule fréquence, permet de contrôler le transfert de charge entre

l'électrode et l'électrolyte, elle va alors être répétée sur toute une gamme fréquentielle afin d'avoir une image complète du système électrochimique étudié. L'ensemble des points obtenus constitue le spectre/diagramme d'impédance électrochimique appelé digramme de Nyquist.

Les transducteurs impédimétriques s'appliquent avantagement aux réactions immunologiques dont l'impédance peut être classée en deux catégories principales [68] :

- **Impédance capacitive :**

C'est le cas d'utilisation d'une couche diélectrique où l'électrode de travail se comporte comme un isolant plus ou moins parfait, avec une absence d'un couple redox dans la solution de mesure. Dans une telle situation, le paramètre mesuré est la capacité et les interactions immunes générées causent une diminution de sa valeur.

- **Impédance faradique :**

C'est le cas d'utilisation d'une électrode de travail partiellement ou complètement couverte par une couche non isolante, capable d'interagir avec le couple redox présent dans la solution de mesure. Dans ce cas, le paramètre mesuré est la résistance de transfert de charge et les interactions immunes générées causent une augmentation de sa valeur.

La cellule électrochimique, étudiée par spectroscopie d'impédance, peut être représentée par un circuit électrique équivalent comprenant des éléments simples, en parallèle ou en série de telle façon à ce que le courant total traversant l'interface de l'électrode de travail est la somme de contributions distinctes du processus faradique présenté par le courant d'électrolyse I_F et de la charge interfaciale donnant naissance au courant capacitif I_C . Le circuit électrique équivalent au dispositif de la cellule électrochimique est communément appelé circuit de "Randles-Ershler" (Figure I.11(B)).

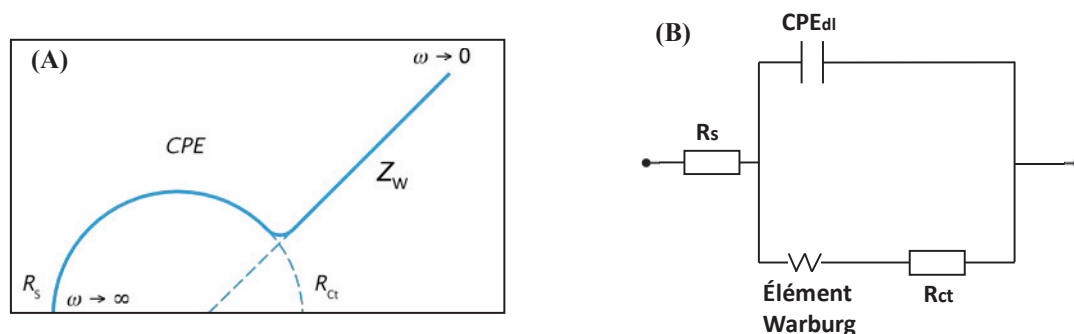


Figure I.11: Diagramme de Nyquist du circuit de : (A) Randles-Ershler, (B) son circuit électrique équivalent.

- **Élément à Phase Constante (CPE) :** Les condensateurs sont remplacés en électrochimie par des éléments appelés éléments à phase constante (EPC, ou CPE

(constant phase element en Anglais)). Ces éléments traduisent la valeur de la capacité non parfaite (due au caractère rugueux de la surface de l'électrode) existante à l'interface électrode/électrolyte nommée double couche formée lorsque les ions de la solution s'approchent de la surface de l'électrode. La valeur du CPE dépend de nombreuses variables notamment le potentiel de l'électrode, la température, les concentrations ioniques, les types d'ions, les couches d'oxyde, la rugosité de l'électrode, l'adsorption d'impuretés, ... etc.

- **Impédance de diffusion Warburg (W)** : Elle caractérise l'évolution du courant faradique en fonction des variations de concentration (ou d'activité) des espèces. Elle traduit en quelque sorte l'influence du transport de matière vers l'électrode. Aux hautes fréquences, l'impédance de Warburg est faible car les réactifs diffusants n'ont pas besoin de se déplacer très loin. Aux basses fréquences, les réactifs doivent diffuser plus loin, augmentant l'impédance de Warburg.
- **Résistance de transfert de charge (R_{ct})** : Elle correspond à la résistance équivalente au transfert de charge électronique entre les espèces réductrices et oxydantes si l'on suppose que les activités de celles-ci sont constantes. Cette résistance informe donc sur les cinétiques redox.
- **Résistance de l'électrolyte (R_s)** : La résistance interne de la cellule due principalement à la conductance de l'électrolyte résulte de la mobilité des ions à l'intérieur de la solution.

e) Transducteurs voltammétriques

Les transducteurs voltammétriques sont fréquemment employés, grâce à leurs robustesse, simplicité et haute sensibilité [69]. Ils sont basés sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel E entre l'électrode de travail et celle de référence. En voltammétrie, le potentiel E appliqué à l'électrode de travail varie en fonction du temps et le courant i est mesuré entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire en fonction du potentiel E . Les courbes $i=f(E)$ obtenues sont appelées voltammogrammes qui sont la somme d'un courant capacitif dû à la charge de l'électrode et à un courant faradique, résultant d'un transfert d'électrons entre l'électrode de travail et la solution d'analyte.

En effet, différentes techniques de voltammétrie peuvent être mises en œuvre pour étudier la réponse d'un système électrochimique soumis à une polarisation. Les plus utilisées sont la voltammétrie cyclique, la voltammétrie différentielle pulsée et la voltammétrie à ondes carrées.

▪ Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (VC) est la technique d'analyse électrochimique, la plus utilisée grâce à sa simplicité de mise en œuvre et la richesse des informations collectées pour l'étude de processus redox. Son principe repose sur le balayage d'un potentiel variable, à vitesse constante, de façon répétée en cycle fermé entre deux bornes appelées "potentiels d'inversion" [70]. Le voltammogramme cyclique résultant forme un ou plusieurs pics en relation avec le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction (Figure I.12). Ce type de voltammétrie est utilisé pour l'analyse des propriétés redox des composés chimiques à l'interface de l'électrode en solution.

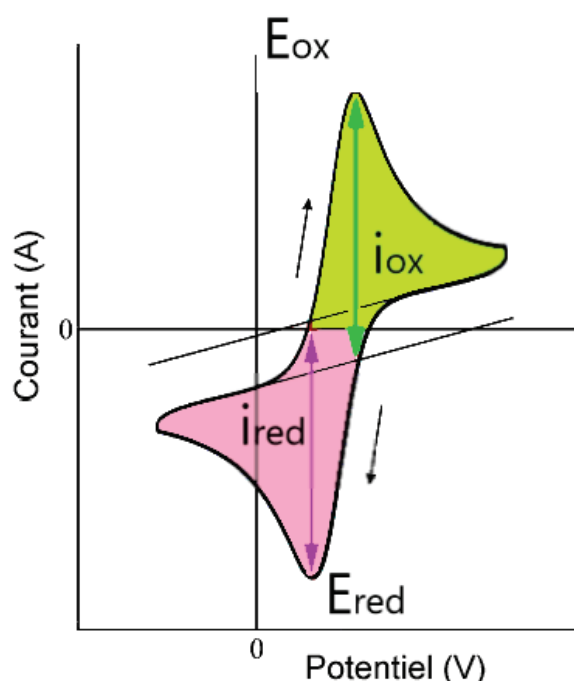


Figure I.12 : Représentation d'un voltammogramme cyclique.

▪ Voltammétrie différentielle pulsée

La voltammétrie différentielle pulsée (VDP) est une technique largement utilisée pour quantifier les niveaux des traces d'espèces organiques et inorganiques [71–73]. Cette technique repose sur l'application d'une série d'impulsions de potentiel et la mesure de la différence de courant avant et après le saut. Chaque différence de courant mesurée est représentée en fonction du potentiel atteint par le saut, ce qui revient à représenter la dérivée de la courbe $I = f(E)$ lorsque l'intervalle entre deux mesures tend vers zéro. Le voltammogramme résultant est en forme gaussienne du pic de courant, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des composés à quantifier.

▪ Voltammétrie à ondes carrées

La voltammétrie à ondes carrées (VOC) est basée sur la combinaison d'une modulation d'onde carrée de période $1/f$ avec une rampe en escalier. Le signal d'excitation obtenu est une superposition en "escalier de potentiel" d'une onde carrée symétrique d'amplitude ΔE_s en phase avec la fréquence des "marches de l'escalier" (Figure I.13). Le courant est échantillonné pendant des intervalles de temps très courts à la fin de chaque impulsion là où le courant de charge est pratiquement constant. Le voltammogramme résultant correspond donc à la différence des courants anodiques et cathodiques échantillonnés ($\Delta i = i_1 - i_2$), éliminant le courant capacitif. La hauteur de pic est donc proportionnelle à la concentration de l'espèce électro-active.

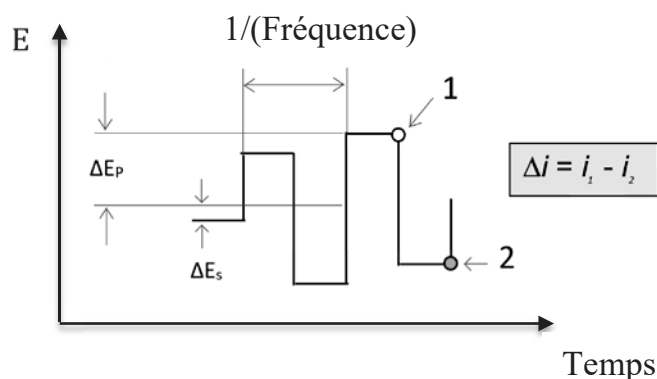


Figure I.13 : Schéma de mesure pour la voltammétrie à ondes carrées.

I.6. Immunocapteurs

Un immunocapteur est un biocapteur qui utilise des anticorps ou antigènes comme des ligands biologiques (biorécepteur). Les immunocapteurs font l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche et de développement dans le monde. Ce type de biocapteur a permis d'accroître les champs d'applications des outils immunologiques offrant des systèmes simples, fiables et peu onéreux dédiés aux analyses de routine et de recherche en sciences biologiques et médicales.

I.6.1. Atouts du biorécepteur : anticorps

Bien qu'il existe de nombreuses protéines dans la nature qui permettent des liaisons d'affinité spécifiques (les récepteurs membranaires par exemple), les propriétés spéciales des anticorps en font le choix le plus populaire pour les essais de liaison aux protéines. Les avantages des anticorps sont nombreux. Ils sont stables, solubles, sélectifs. Leur préparation et leur immobilisation sont bien décrites. Ils sont disponibles sous forme de mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes d'un même antigène, dénommés anticorps polyclonaux, ou pur reconnaissant un seul épitope (anticorps monoclonaux).

I.6.2. Techniques d'immobilisation

Dans le cas des immunocapteurs, l'immobilisation du biorécepteur, que ce soit un anticorps ou un antigène, sur la surface d'un substrat, constitue une étape clef. Celle-ci est particulièrement importante en raison de la nature métastable des protéines, nécessitant une immobilisation délicate qui retient l'activité maximale de leurs fonctions biologiques sur la surface du transducteur. Différentes méthodes ont été proposées pour attacher les biorécepteurs sur des surfaces fonctionnalisées. Elles reposent généralement sur des interactions entre la protéine et les groupements chimiques présents sur les surfaces par différentes méthodes telles que l'adsorption, le couplage covalent, l'encapsulation.

I.6.2.1. Immobilisations mécaniques

I.6.2.1.1. Adsorption physique

L'adsorption physique de l'anticorps (Ac) ou de l'antigène (Ag) est réalisée sur la surface d'un substrat préalablement fonctionnalisé afin de générer des groupements fonctionnels (carboxyliques, amines ou hydroxyles). Elle est basée sur les forces attractives de *Van der Waals* qui sont les plus anciennes et les plus simples méthodes d'immobilisation. Elle ne nécessite pas de modification chimique du ligand (Ag ou Ac) et permet ainsi une régénération du biorécepteur. L'avantage majeur de cette méthode est sa simplicité. Cependant, le détachement du ligand adsorbé est possible si des changements de pH, de la force ionique ou de la température interviennent au cours des manipulation [74].

I.6.2.1.2. Immobilisation par réticulation

L'immobilisation par réticulation est un procédé d'association des différentes unités biocatalytiques ou de protéines à l'aide d'un agent réticulant, souvent le glutaraldéhyde [75], ou un autre agent bifonctionnel comme l'héxaméthylènediamine [76]. Le bloc protéique formé est maintenu sur la surface de l'électrode par des forces de *Van der Waals* (Figure I.14). L'avantage majeur de cette technique est reposé sur la robustesse des liaisons établies. Cependant, il existe des limitations majeures de la réticulation qui résident dans la perte d'activité du ligand en cas de modification chimique de son site actif ou de changement de conformation [77].

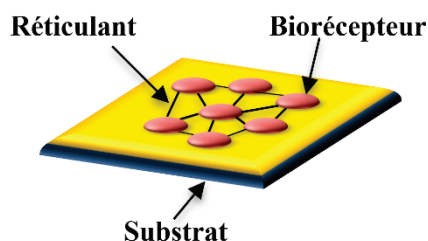


Figure I.14 : Illustration de l'immobilisation d'un biorécepteur par la technique de réticulation.

I.6.2.2. Immobilisation covalente

L'immobilisation covalente est une technique de couplage basée sur la réaction entre un groupement fonctionnel du ligand (non essentiel pour son activité catalytique) et des groupements réactifs de la surface du substrat. Parmi les liaisons covalentes utilisées pour l'immobilisation des ligands, nous trouvons les liaisons amide, par le sel de diazonium et par affinité.

I.6.2.2.1. Liaison amide

Ce type de liaison est largement utilisé dans le développement des immunocapteurs afin de lier une fonction amine du biorécepteur à une fonction carboxylique présente sur la surface du substrat. A cet effet, les carbodiimides comme le 1-éthyl-3-(3 diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) sont généralement adoptés afin de générer une liaison peptidique en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS). L'EDC réagit donc avec les groupes carboxyliques pour former l'intermédiaire O-acylisourée actif, qui est facilement déplacé par une attaque nucléophile des amines primaires que possèdent les anticorps ou les antigènes qui vont être immobilisés sur la surface du substrat [78]. Cependant, l'intermédiaire O-acylisourée est instable dans les solutions aqueuses. Il se hydrolyse en absence d'une interaction avec un amine, en régénérant des carboxyles et en libérant une urée N-non substituée [79].

Pour cette raison, l'ajout du réactif NHS dans le mélange réactionnel est souvent inclut dans les protocoles de couplage par EDC afin d'améliorer l'efficacité de la réaction. Dans ce sens, le EDC couple le NHS aux groupements carboxyles, formant un ester NHS qui est considérablement plus stable que l'intermédiaire O-acylisourée tout en permettant une conjugaison efficace aux amines primaires des ligands à un pH physiologique de 7,4 (Figure I.15).

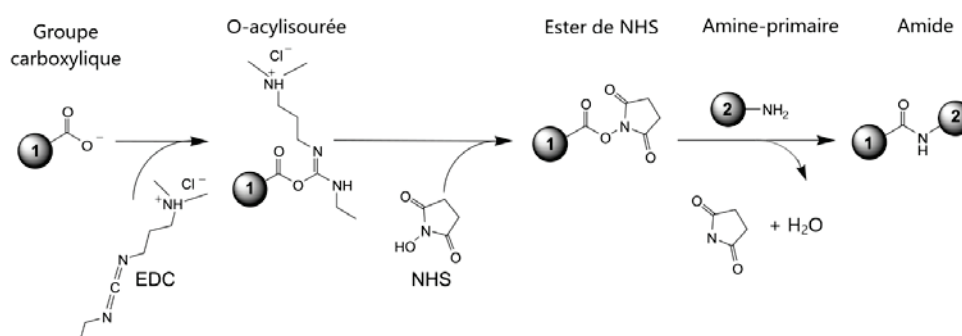


Figure I.15: Schéma du principe d'activation des groupements carboxyles par EDC/NHS.

I.6.2.2.2. Liaison par le sel de diazonium

Les sels de diazonium peuvent être formés à partir de dérivés de l'aniline, dans une solution d'acide nitreux formée par un mélange de l'acide chlorhydrique (HCl) et de nitrite de

sodium (NaNO_2). Le procédé de sa formation réside dans l'élaboration d'un cation diazonium instable très réactif et facilement hydrolysable à température ambiante permettant de former une liaison covalente à la surface du substrat. Ce sel de diazonium peut alors être électro-réduit par apport d'un électron, afin de conduire à la libération du diazote et à la formation d'un radical intermédiaire radicalaire de forte réactivité (Figure I.16). Ce dernier se greffe, sur la surface de l'électrode qui a fourni l'électron nécessaire à son électro-réduction avant le couplage avec la molécule à immobiliser [80].

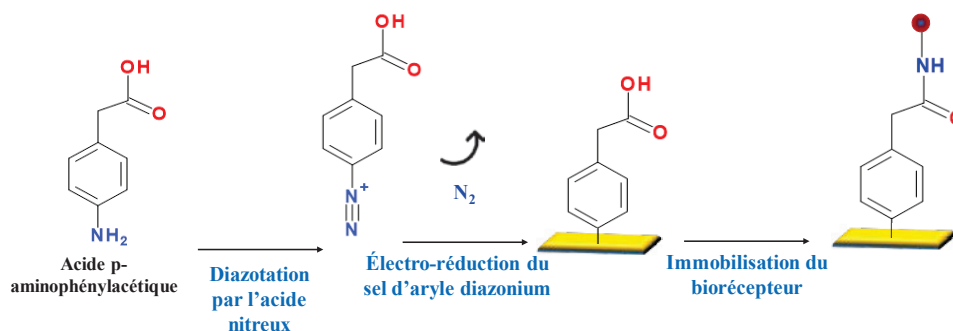


Figure I.16 : Immobilisation d'un biorécepteur sur une électrode d'or via un lien diazonium.

I.6.2.3. Immobilisation par affinité

Cette technique permet de contrôler la manière d'immobilisation d'une protéine car dans certains cas, une mauvaise orientation produit une perte partielle ou totale de son activité. Le cas le plus évident est celui des anticorps nécessitant une immobilisation idéale par la partie constante Fc afin d'assurer la reconnaissance de l'antigène par les différents paratopes (Figure I.17).

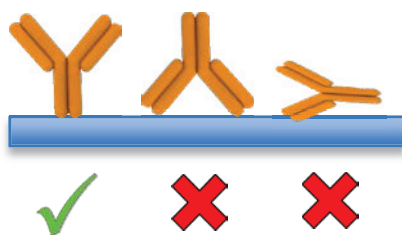


Figure I.17: Différentes orientations des anticorps immobilisés sur une électrode.

Parmi les liaisons d'affinité les plus connues nous trouvons celle de la biotine/streptavidine. La streptavidine est une protéine tétramérique de 52,8 kDa purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Cette protéine a une affinité exceptionnellement forte pour la biotine (4 biotines par streptavidine) formant l'une des plus fortes liaisons non-covalentes existantes dans la nature avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-14} mol/L

[81]. L'immobilisation d'une protéine biotinylée sur la surface d'une électrode préalablement modifiée à la streptavidine est donc réalisée par une simple mise en contact (Figure I.18).

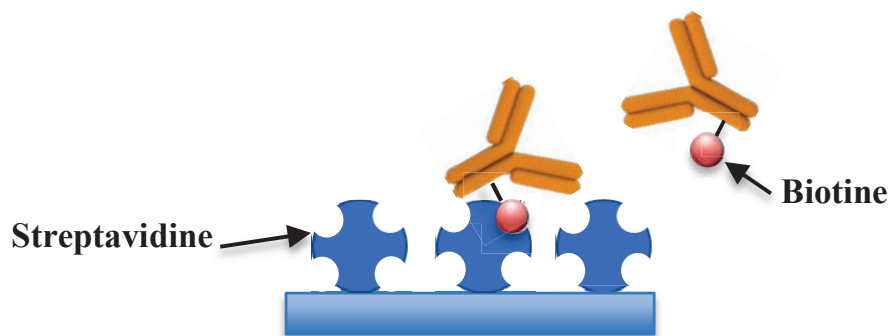


Figure I.18: Immobilisation d'anticorps sur une électrode par le système d'affinité biotine/streptavidine.

I.7. Capteurs

I.7.1. Capteurs à base des polymères à empreintes moléculaires

Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) sont des réseaux de polymères réticulés où sont créées des cavités spécifiques à un type particulier de molécules. L'affinité entre les polymères et leurs molécules cibles est de la même sorte que l'affinité observée entre un anticorps et son antigène, ou entre les enzymes et leurs substrats dans les systèmes biologiques. À cet effet, un choix judicieux du monomère fonctionnel est nécessaire une fois la structure et les paramètres physico-chimiques de la molécule cible ont été déterminés. Ce choix est très important afin de déterminer en partie la qualité des sites de reconnaissance des MIPs.

I.7.2. Différentes approches d'impression

I.7.2.1. Approche covalente

Cette approche a été développée pour la première fois par G. Wulff [82]. Elle consiste à créer des liaisons fortes entre la molécule cible de la famille des alcools, des aldéhydes, des cétones, des amines ou des acides carboxyliques et le monomère fonctionnel, via des fonctions chimiques compatibles. La liaison formée avec le réseau du polymère, de force entre 670 et 3360 kJ/mol est de nature réversible permettant de cliver et de recapturer facilement la molécule cible. L'avantage majeur de cette technique réside dans la formation des sites de reconnaissance homogènes en raison de la stabilité des liaisons covalentes tout en évitant les interactions faibles et non spécifiques avec le solvant.

I.7.2.2. Approche non covalente

La synthèse des MIPs de façon non covalente a été introduite en 1981 par K. Mosbach et al. [83] et est aujourd'hui la méthode de synthèse des MIPs la plus répandue. Son principe repose sur l'établissement des liaisons de type hydrogène ou liaisons de *Van der Waals* entre le monomère fonctionnel et la cible pendant la polymérisation, mais aussi lors de la phase de reconnaissance. Il existe un grand nombre de monomères fonctionnels disponibles qui peuvent être utilisés, la plupart sont commerciaux de type acrylique ou vinylique, offrant de nombreuses possibilités de synthèse de MIPs afin d'en optimiser les propriétés. Cette approche est considérée de nos jours comme une technique très prometteuse pour mimer la sélectivité des systèmes de reconnaissance biologiques naturels, qui emploient eux-mêmes des interactions non-covalentes. Cependant, elle conduit à des cavités moins bien définies dans le cas de molécules très polaires ne pouvant développer que des liaisons hydrogène. Par conséquent, les approches covalentes et non covalentes peuvent être employées soit simultanément lors de la recapture ou à des étapes différentes, on parle de l'approche semi-covalente.

I.7.2.3. Approche semi-covalente

Cette approche est basée sur la fusion des deux précédentes, consistant à la synthèse des MIPs de façon covalente et la recapture de la cible par le biais d'une technique non covalente. Cette méthode permet à la fois de combiner entre les avantages des deux méthodes, permettant de créer des cavités spécifiques et homogènes lors de l'étape de polymérisation et de recapturer la molécule cible sans les contraintes cinétiques existant parfois en mode covalent [84–86].

I.7.3. Langue électronique à base de multi-capteurs

I.7.3.1. Définition

Une langue électronique est un dispositif qui permet de détecter et de reconnaître les saveurs en se basant sur le principe du système gustatif humain [87]. Il est constitué d'un réseau de capteurs, dont les réactions permettent d'obtenir un signal, qui est identifié et classé dans une bibliothèque d'empreintes par des analyses multivariées des données, ce qui permet par la suite d'établir différents graphiques (visualisation) [88].

I.7.3.2. Principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement de la langue électronique est similaire à celui du sens gustatif. Sur la langue humaine, six zones sont susceptibles de détecter certaines saveurs à savoir : le sucré, le salé, l'acide et l'amer. Cependant, la reconnaissance de ces saveurs est liée à un réseau de neurones qui fournit au reste du cerveau une information plus riche basée sur les différentes proportions de ces saveurs. Par conséquent, les composés chimiques responsables

du goût sont perçus par les récepteurs gustatifs humains et de façon similaire les capteurs de la langue électronique identifient les composés dissous dans les liquides et responsables du goût [89]. La langue électronique est donc constituée d'un ensemble de zones sensibles portant un revêtement composé d'un récepteur et capable d'interagir avec le milieu étudié en mesurant l'intensité d'un signal généré [90] (Figure I.19). Les applications potentielles des langues électroniques dépendent des différents systèmes de transductions utilisés (la potentiométrie, l'ampérométrie, la conductimétrie et la voltammétrie) et des types d'interactions mises en jeu lors de la reconnaissance [91].

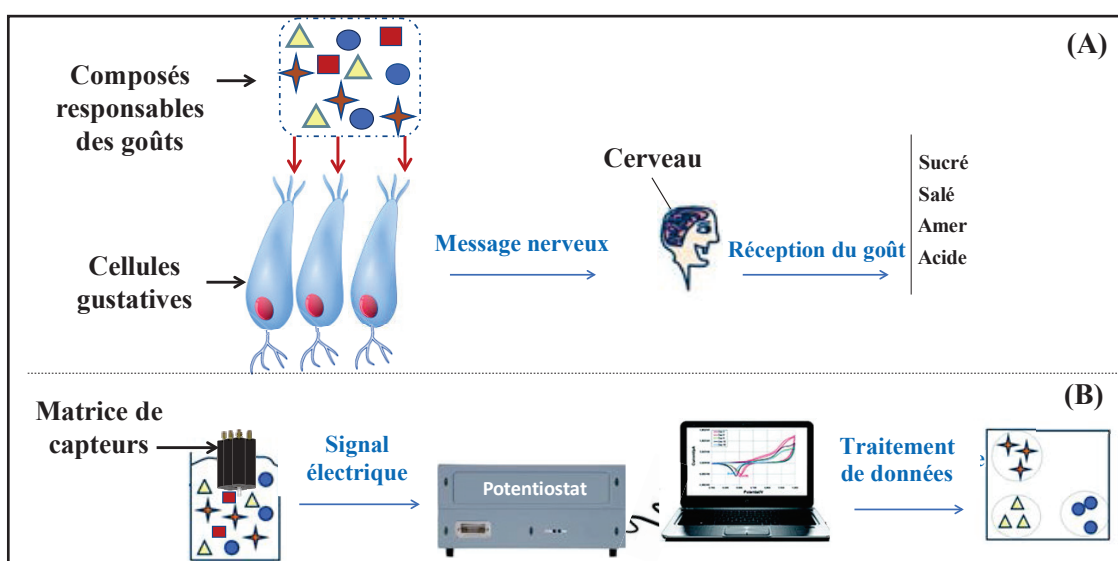


Figure I.19 : Représentation schématique de l'analogie entre (A) la langue humaine, (B) la langue électronique.

I.7.3.3. Langue électronique voltammétrique

Ce type de dispositif se base sur les analyses électrochimiques à l'aide d'un montage à trois parties essentielles qui sont :

- Matrice de capteurs formée des électrodes de travail, d'une électrode de référence et d'une électrode auxiliaire ;
- Cellule de mesure électrochimique ;
- Système d'acquisition et de traitement des données (Figure I.20).

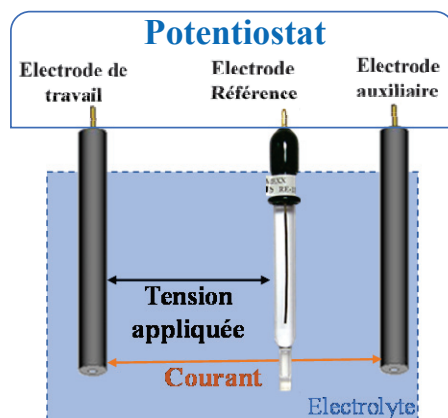


Figure I.20: Schéma de la configuration à trois électrodes pour les mesures voltamétriques.

1.7.3.3.1. Matrice des électrodes électrochimiques voltamétriques

Le système de la langue électronique est constitué des électrodes électrochimiques reliées par l'intermédiaire de collecteurs de courant à une alimentation électrique. Afin d'effectuer une réaction électrochimique donnée, le choix des matériaux des électrodes de travail de référence et auxiliaire constituant la cellule électrochimique est très important.

a) Électrodes de travail

Les électrodes de travail sont celles dont la surface sert de site pour la réaction d'oxydation ou de réduction de l'analyte suite à la variation de potentiel. Ce sont des électrodes qui doivent se caractériser par une grande stabilité dans le temps, avec un bon rapport signal/bruit du fond. De plus, les solutés à analyser doivent y développer une cinétique de réaction électrochimique rapide dans un large domaine de potentiel accessible [92].

b) Électrode auxiliaire

L'électrode auxiliaire ou contre-électrode est choisie de telle façon à assurer le passage du courant engendré par les réactions étudiées à l'électrode de travail dans la cellule électrochimique ainsi que sa mesure. Les propriétés électrochimiques de cette électrode n'affectent pas le comportement de celle du travail par la production d'espèces qui engendreront des réactions parasites. En plus, l'inclusion de l'électrode auxiliaire dans le montage à trois électrodes à l'avantage de minimiser les effets de la chute ohmique, ce qui a pour conséquence de diminuer la déformation des voltammogrammes générés.

c) Électrode de référence

C'est une électrode dont le potentiel est fixe, permettant d'appliquer une différence de potentiel exacte entre cette électrode et l'électrode de travail et faire varier de façon exacte et connue le potentiel appliqué à cette dernière. Nous pouvons classer les électrodes de référence

suivant les équilibres susceptibles d'être réalisés à leur surface [93]. Il existe plusieurs types d'électrodes de références employées dans les cellules électrochimiques à trois électrodes à savoir :

- Électrode normale à hydrogène ;
- Électrode de référence cuivre-sulfate de cuivre saturé ;
- Électrode de référence au calomel saturé ;
- Électrode de référence argent-chlorure d'argent ;

L'électrode de référence couramment utilisée est celle au chlorure d'argent (Ag/AgCl) avec un potentiel fixé par l'équilibre rédox entre l'argent métallique (Ag) et les ions Ag^+ dont la concentration est fixée par la solubilité du chlorure d'argent (AgCl).

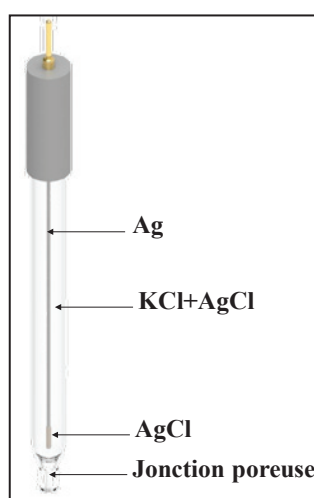


Figure I.21: Électrode de référence Ag/AgCl.

1.7.3.3.2. Système d'acquisition de données-Potentiostat

Le potentiostat est l'appareil électronique destiné à l'étude des phénomènes électrochimiques dans une cellule contenant des électrodes immergées dans une solution. Dans le cas de la langue électronique voltammétrique, cet appareil permet de porter l'électrode de travail à un potentiel donné par rapport à une électrode de référence. L'électrode de travail est chimiquement inerte car elle ne réagit ni avec la solution ni par application d'un potentiel. Par contre, des substances présentes en solution peuvent être oxydées ou réduites à sa surface, favorisant la circulation d'un courant entre la solution et l'électrode. Par ailleurs, le courant généré est soit positif, si les électrons passent de la solution à l'électrode (substance oxydée), ou négatif quand les électrons passent de l'électrode dans la solution (substance réduite). Afin de maintenir l'électrode de travail à un potentiel constant, le potentiostat empêche le passage de courant par l'électrode de référence, en balayant un potentiel entre l'électrode de travail et celle de référence et en collectant le courant circulant entre l'électrode de travail et celle auxiliaire [94]. Dans le cadre de ces travaux de recherche, les mesures de la voltammétrie cyclique ont

été réalisées à l'aide d'un potentiostat PalmSens (Eindhoven, Hollande), doté d'un logiciel d'acquisition et de représentation des données. Les cyclo-voltammogrammes obtenus sont donc enregistrés directement par le logiciel PSTrace5.2 relié à un ordinateur de mesure.

I.7.3.4. Analyses multivariées des données collectées par la langue électronique

Les analyses multivariées des données fournies par le système de la langue électronique sont indispensables pour leur traitement. Elles sont très diverses selon l'objectif recherché et la nature des variables utilisées. Nous pouvons identifier des méthodes descriptives, visant à structurer et résumer l'information et celle explicatives visant à expliquer une ou des variables dites « dépendantes » par un ensemble de variables explicatives dites « indépendantes ». Toutefois, avant l'établissement de ces méthodes, le traitement des données constitue une phase primordiale. Il regroupe plusieurs étapes allant de l'extraction des variables jusqu'à la normalisation en passant, bien entendu, par l'organisation de la base de données.

I.7.3.4.1. Prétraitement de données

L'extraction de paramètres pertinents sous formes de variables représentatives constitue une étape clef dans les procédures de traitement de données, visant à diminuer la masse importante de données à traiter et à éviter la redondance qui entrave à une bonne discrimination ou identification. Dans le cas de la langue électronique voltammétrique, les réponses contiennent des centaines de mesures ce qui cause un chevauchement régulier des régions ayant des caractéristiques stationnaires. Pour ce fait et afin d'éviter la répétition des informations et d'exploiter au maximum les données fournies par chaque voltammogramme, trois variables représentatives ont été extraites pour chaque échantillon analysé [89]:

- $\Delta I = I_{\max} - I_{\min}$: la différence entre la valeur maximale et minimale du courant;
- Pt_{ox} : la pente maximale de la courbe du courant dans la phase d'oxydation;
- Pt_{red} : la pente maximale de la courbe du courant dans la phase de réduction (Figure I.22).

Comme la matrice de la langue électronique contient sept capteurs voltammétriques, chaque mesure a été décrite par 21 variables.

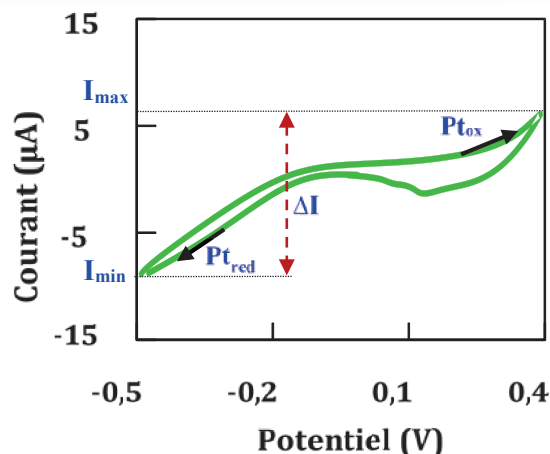


Figure I.22 : Variables représentatives extraites des voltammogrammes cycliques.

À partir de la base de données établie, nous pouvons appliquer les différentes méthodes multivariées de l'analyse de données en vue de la discrimination et de l'identification des composés qu'on compte analyser. De manière générale, l'analyse de données permet d'effectuer une étude globale de toutes les variables caractérisant des observations pour mettre en évidence des liaisons, des ressemblances ou des différences en elles.

1.7.3.4.2. Organisation et normalisation de la base de données

Les variables de natures différentes peuvent avoir des échelles et des unités de mesure distinctes bien qu'elles se réfèrent à des objets comparables. À cet effet, l'étape de normalisation des bases de données est souvent requise afin d'éviter un chevauchement dans la classification ou l'identification. Étant donné que les méthodes de normalisation peuvent influencer le résultat du classifieur [95], il n'existe pas aujourd'hui de lignes directrices générales favorisant une méthode par rapport à une autre. L'approche que nous avons adoptée dans nos travaux de recherche est une normalisation centrée réduite basée sur un centrage et réduction des données, en fixant la moyenne à l'origine et l'écart type des données à 1. Cette approche a comme objectif de prendre en compte les diversités des données générées par les variables des différentes électrodes et d'aboutir à un modèle cohérent de représentation capable d'unifier tous les contenus [96].

1.7.3.4.3. Méthodes de reconnaissance de formes

a) Analyse en Composantes Principales

L'analyse en composantes principales (ACP ou PCA en anglais) est la méthode de classification la plus courante. Son principe est basé sur la construction d'un système de représentation de dimension réduite qui préservera les distances entre les individus. C'est une méthode sans phase d'apprentissage dite non supervisée, visant à décrire les données d'entrée, à savoir la matrice de covariance X de dimension (N, k) où N est le nombre de mesures et k le

nombre de variables considérées [97]. Cette technique permet de visualiser l'appartenance des échantillons à des groupes distincts, avec apparition des valeurs anormalement éloignées des autres considérées comme aberrantes. Par ailleurs, le signe des termes non diagonaux nous informe sur la nature de la corrélation, à savoir qu'un signe positif indique l'évolution de deux variables dans le même sens, ainsi qu'un signe négatif informe sur une variation inverse des deux variables. D'où la nécessité du calcul des valeurs propres et les vecteurs propres de cette matrice de covariances, en prenant soin de normaliser à 1 la norme des vecteurs propres.

b) Analyse Factorielle Discriminante

L'analyse factorielle discriminante (AFD) est une technique d'analyse des données qui vise à décrire, expliquer et prédire l'appartenance d'un individu à des groupes prédéfinis. À l'origine, cette méthode a été étudiée par Ronald Fisher dès 1936 [98], dans le but de reconnaître le type de la fleur d'iris à l'aide de la longueur de ses pétales et sépales. Deux modèles de l'AFD sont possibles :

- Modèle descriptif, qui comme l'ACP, a pour objectif de proposer un nouveau système de représentation des variables latentes formées à partir de combinaisons linéaires des variables prédictives, qui permettent de discerner le plus possible les groupes d'individus.
- Modèle prédictif, consistant à construire une fonction de classement (règle d'affectation, ...etc.) permettant de prédire la classe dans laquelle appartient un individu à partir des valeurs prises par les variables prédictives.

c) Classification Ascendante Hiérarchique

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est une méthode de partition qui cherche à ce que les individus regroupés au sein d'une même classe (homogénéité intra-classe) soient les plus semblables possible, tandis que les classes formées auront plus de dissimilarités (hétérogénéité inter-classe).

Le principe de la CAH est de rassembler des individus selon un critère de ressemblance défini au préalable sous la forme d'une matrice de distances existantes entre ces individus pris deux à deux. Cette classification est dite ascendante car elle part des observations individuelles qui se rassemblent par la suite de manière itérative afin de produire un dendrogramme ou arbre de classification. Elle est hiérarchique car elle produit des classes ou groupes de plus en plus vastes, incluant des sous-groupes en leur sein. En découpant cet arbre à une certaine hauteur choisie, on produira la partition désirée. La Figure **I.23** fournit un exemple illustratif d'un dendrogramme dont la racine correspond à la classe regroupant l'ensemble des individus.

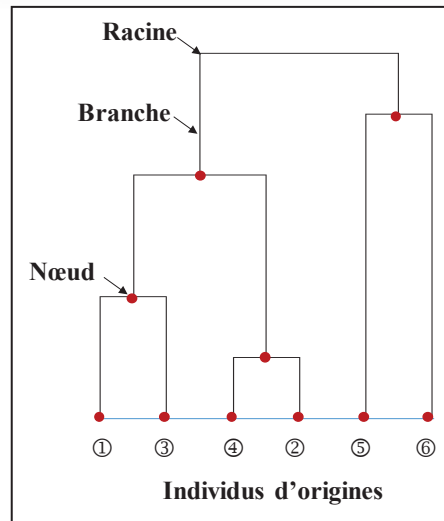


Figure I.23: Arbre de la classification hiérarchique ascendante.

Cependant, le choix d'une méthode d'agrégation pour la construction du dendrogramme est essentiel. La méthode la plus connue étant celle de Ward [99]. De manière simplifiée, cette méthode cherche à minimiser l'inertie intra-classe et à maximiser l'inertie inter-classe afin d'obtenir les classes les plus homogènes possible (minimiser l'augmentation de la somme des carrés).

d) Séparateurs à Vastes Marges

Les machines à vecteurs de support ou Séparateurs à Vastes Marges (SVM) sont une classe de techniques d'apprentissage statistique introduite par Vladimir Vapnik au début des années 90 [100]. C'est une méthode de classification supervisée basée sur la notion de marge maximale qui est la distance entre la frontière de séparation et les échantillons les plus proches appelés vecteurs supports (Figure I.24). Le principe de cette méthode est de produire une fonction de décision qui minimise l'erreur empirique à travers l'exploitation des espaces d'hypothèses vastes et de natures différentes. Dans les SVM, la frontière de séparation optimale est choisie comme celle qui maximise la marge en formulant le problème non linéaire comme un problème d'optimisation quadratique, pour lequel il existe des algorithmes connus.

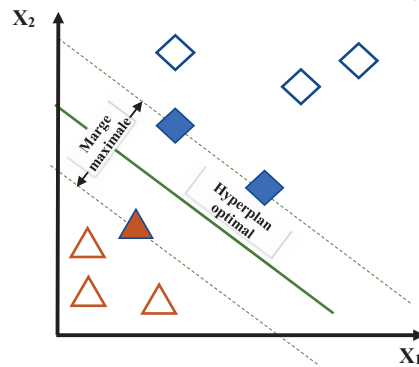


Figure I.24: Hyperplan optimal, vecteurs de support et marge maximale.

e) Régression à Moindres Carrées Partiels

La régression à moindres carrés partiels (PLS pour Partial Least Squares), est une méthode d'analyse quantitative supervisée fonctionnant selon le même principe que l'ACP. Cependant, au lieu de trouver des hyperplans de variance maximale entre la réponse et les variables indépendantes, elle trouve un modèle de régression linéaire en projetant les variables observables (X) et les variables prédites (Y) dans un nouvel espace. Son principe est de créer à partir d'un Tableau de n observations décrites par p variables, un ensemble de h composantes avec $h < p$ [101]. La détermination du nombre de composantes à retenir est en général fondée sur un critère mettant en jeu une validation croisée. Son utilisation est recommandée dans le cas où un grand nombre de variables explicatives est employé, ou lorsqu'il y a de fortes colinéarités entre les variables.

I.8. Nanotechnologie et nanoparticules dédiées aux biocapteurs

I.8.1. Historique

Lors d'une conférence tenue en 1959, le physicien Richard Feynman avait déclaré que : "*Les principes de la physique, pour autant que nous puissions en juger, ne s'opposent pas à la possibilité de manipuler des choses atome par atome*". Par cette déclaration, le physicien américain suggérait à la communauté scientifique d'explorer l'univers de l'infiniment petit. Le terme « nanotechnologie » fut utilisé donc pour la première fois en 1974 par Norio Tanigushi [102]. Dans les années 1980, le nanomonde s'est ouvert réellement aux chercheurs avec la découverte du microscope à effet tunnel, puis celle du microscope à force atomique (AFM). La conception, la fabrication et la manipulation d'objets, de matériaux et de machines de dimensions nanométriques ont permis alors à manipuler les atomes un à un et de faire un progrès dans les différents domaines de la science.

I.8.2. Définitions

La nanotechnologie se définit comme la totalité des études et des procédés de fabrication, de création ou de manipulation des particules et des matériaux ayant au moins une dimension nanométrique, normalement de 1 à 100 nm. L'intérêt de la nanotechnologie repose essentiellement sur les propriétés que certaines particules peuvent démontrer uniquement lorsqu'elles sont de dimensions nanométriques. Ces propriétés incluent des effets chimiques, biologiques, électroniques, rhéologiques, magnétiques, optiques (photoniques), mécaniques et structuraux [103].

Quant aux nanoparticules, ce sont des éléments ayant une taille nanométrique. Elles sont donc plus grandes que des atomes et plus petites qu'une cellule. Leurs propriétés physiques, chimiques, voire biologiques découlent spécifiquement de cette taille nanométrique [104]. Les nanoparticules sont classées parmi les matériaux les plus prometteurs, elles sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux domaines (textile, pharmacie, agroalimentaire, cosmétique, peinture, électronique, informatique...etc.).

I.8.3. Procédés de synthèse des nanoparticules

Il existe différentes approches pour la synthèse des nanoparticules : essentiellement par la méthode ascendante ou la méthode descendante.

- Par l'**approche ascendante** (*bottom-up*), les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule.
- Dans l'**approche descendante** (*top-down*), une grande structure est graduellement sous-dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations.

Les deux approches, ascendante et descendante, tendent à converger en termes de dimension des particules synthétisées. Cependant, l'approche ascendante présente l'avantage de produire des nanoparticules d'une grande homogénéité avec une meilleure dispersion granulométrique. Quant à l'approche descendante, elle permet une production plus volumineuse, malgré l'inconvénient de l'agglomération des nanoparticules rendant en général le contrôle de l'état nanométrique plus délicat [103].

I.8.4. Applications des nanoparticules

À l'échelle «nano», les substances ont un comportement optique, électrique, magnétique et de diffusion qui diffère de celui qu'elles développent habituellement dans le monde «macro». Cette technologie se situe à l'interface de la biologie, de la chimie, de la physique, de la science des matériaux et de l'informatique puisqu'elle a vocation de contrôler et de manipuler de façon

précise et « individuelle » des atomes et les matériaux qui résultent de leurs « assemblages ». Dans le domaine des biocapteurs, les nanoparticules sont exploitées essentiellement pour aider à l'augmentation du rapport signal sur bruit, à la diminution des temps de réponse et à l'amplification significative du signal de détection en augmentant la surface d'échange entre le substrat et l'analyte [105,106]. Bien que la recherche en soit à ses débuts, les nanoparticules ont déjà été utilisées dans le cadre de plusieurs domaines comme ce qui est illustré dans le Tableau I.1.

Tableau I.1 : Différents domaines d'applications des nanoparticules.

Domaines	Applications	Références
Agroalimentaire	- Emballages alimentaires - Supports de vitamines et d'acidifiants dans les aliments	[107,108]
Cosmétique	- Crèmes solaires - Agents épaississant et abrasif doux des dentifrices	[109]
Pharmaceutique	- Supports de principes actifs et excipients dans les médicaments	[110]
Biomédical	- Radiographie médicale - Traitement par hyperthermie contre les cellules cancéreuses.	[111]
Chimie	- Agents matant des peintures	[112]
Électronique	- Amélioration des performances des composants électroniques	[113]
Biocapteur	- Fonctionnalisation de la surface des substrats	[114]

I.9. Autres techniques utilisées

I.9.1. Spectroscopie Ultraviolet-visible

La spectroscopie ultraviolet-visible est une technique d'analyse quantitative et d'identification des espèces chimiques, qui consiste à mesurer l'absorbance d'une solution à des longueurs d'onde situées dans le domaine de l'ultraviolet (100 - 400 nm), du visible (400 - 750 nm) ou du proche infrarouge (750 - 1400 nm). Son principe repose sur la transition d'électrons de valence des molécules à doser qui passent d'un état fondamental à un état excité

après absorption d'un photon dans le domaine UV-visible. Cette technique consiste à faire traverser une cuvette contenant la solution chimique à analyser par une radiation électromagnétique d'intensité I_0 et de longueur d'onde λ et en mesurer l'intensité de la lumière sortante I . Par la suite, nous comparons l'intensité sortante par rapport à l'intensité entrante afin d'introduire la grandeur absorbance, qui peut être définie par l'équation suivante : $A_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$. Ainsi, plus l'absorbance est grande, plus l'espèce chimique a absorbé cette radiation [115].

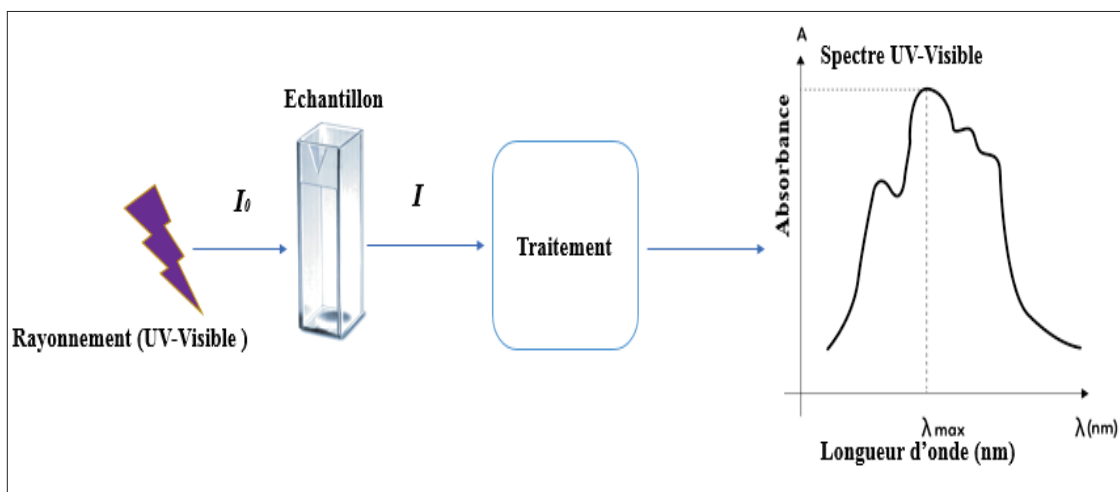


Figure I.25 : Schéma du principe de fonctionnement de la spectroscopie ultraviolet-visible.

I.9.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FT-IR : *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) est une technique basée sur l'interaction entre un rayonnement infrarouge et le matériau analysé. Elle est basée sur les ondes infrarouges qui vont de 12 800 à 10 cm^{-1} et qui sont divisées en trois groupes : le proche infrarouge, le moyen infrarouge et l'infrarouge lointain. La FT-IR utilise quant à elle, le moyen infrarouge qui s'étend de 4 000 à 400 cm^{-1} (2,5 à 25 μm) et c'est dans ce domaine que la majorité des composés organiques produisent un spectre d'absorption unique [116]. Quand une onde infrarouge est envoyée sur une molécule, cette dernière absorbe une partie de l'onde qui correspond aux liaisons présentes dans la molécule. L'absorption du rayonnement infrarouge ne peut avoir lieu que si la longueur d'onde correspond à l'énergie associée à un mode particulier de vibrations de cette molécule. La FT-IR peut donc être considérée davantage comme une machine qui donne une idée sur les composants organiques d'un échantillon, mais qui ne peut pas à elle seule déterminer la constitution exacte de celui-ci.

I.9.3. Microscopie à Force Atomique

La Microscopie à Force Atomique (AFM) est une technique permettant de visualiser avec une résolution nanométrique ou micrométrique la morphologie tridimensionnelle de la

surface d'un matériau. Le principe de l'AFM est basé sur l'interaction entre la surface de l'échantillon à analyser et une pointe sonde fixée sous un micro-levier. La pointe balaye la surface et suit la topographie de l'échantillon, donnant une image tridimensionnelle du matériau analysé (Figure I.26). Cette technique permet l'observation des surfaces en air et en milieu liquide.

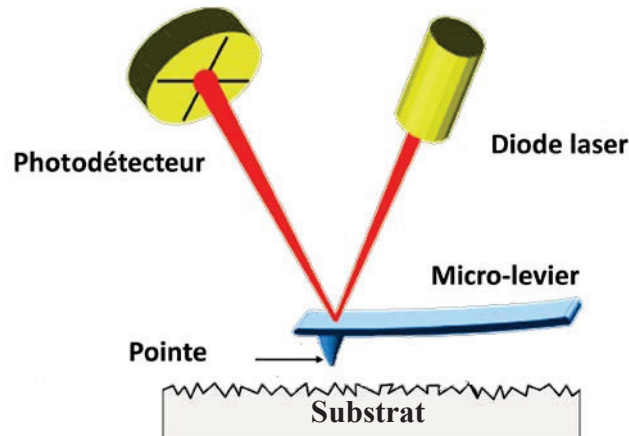


Figure I.26 : Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

I.9.4. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Son principe est reposé sur le balayage de la surface d'un échantillon par un fin faisceau d'électrons dont l'énergie peut varier de quelques centaines d'électrons-volts (eV) à 40 keV [117]. Sous l'impact de ce faisceau d'électrons, de diverses interactions électrons-matière résulte de l'émission de différents signaux. Ces derniers sont collectés pour former une image de la surface de l'objet à observer ou pour faire une analyse chimique de cette même surface.

Il existe trois signaux émis en MEB qui sont :

- Les électrons secondaires qui ont une énergie de 0 à 50 eV (contraste essentiellement topographique);
- Les électrons rétrodiffusés qui ont une énergie élevée voisine de l'énergie du faisceau incident (contraste topographique et/ou chimique);
- Les photons X caractéristiques de la chimie de l'échantillon (analyse chimique) (Figure I.27).

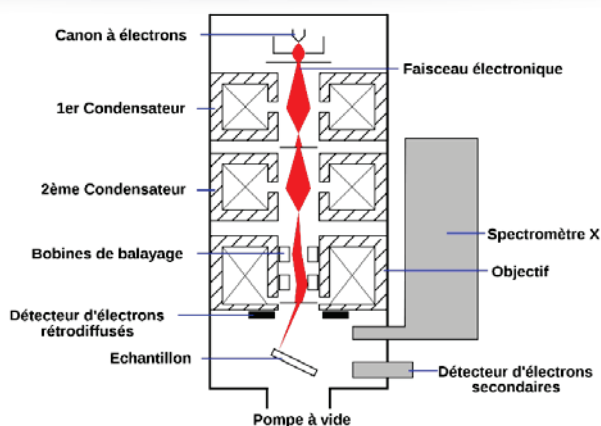


Figure I.27 : Schéma interne d'un microscope électronique à balayage.

I.10. Récapitulatif

Le domaine des capteurs et biocapteurs a connu durant les dernières décennies un progrès remarquable, basé sur l'intérêt des chercheurs à développer des techniques rapides et fiables permettant de garantir une salubrité des denrées alimentaires et une rapidité des analyses biomédicales. Au début de ce chapitre, nous avons donné un aperçu général sur la sécurité sanitaire des produits alimentaires en l'occurrence le miel. Nous avons présenté aussi les causes et la nature des résidus d'antibiotiques dans le miel. Ensuite, nous avons discuté des généralités sur le système de la langue électronique qui est basé généralement sur des capteurs électrochimiques, ainsi que les méthodes de reconnaissances de formes employées pour le traitement de données résultantes. Par ailleurs, en ce qui concerne les biocapteurs, nous avons commencé par rappeler leur principe de fonctionnement ainsi que leurs principales composantes. Par la suite, nous avons abordé les immunocapteurs et les polymères à empreintes moléculaires comme différents types de biocapteurs qui ont fait l'objet de diverses études développées dans cette thèse. Enfin, nous avons présenté une partie sur la nanotechnologie et les nanoparticules, y compris leurs procédés de synthèses et leurs éventuelles applications.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Henson, J. Humphrey, Les impacts des normes privées de sécurité sanitaire des aliments sur la chaîne alimentaire et sur les processus publics de normalisation., (2009).
- [2] Programme Salubrité des aliments, Stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments : une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé., (2002).
- [3] A. Thrasyvoulou, C. Tananaki, G. Goras, E. Karazafiris, M. Dimou, V. Liolios, D. Kanelis, S. Gounari, Legislation of honey criteria and standards, *J. Apic. Res.* 57 (2018) 88–96.
- [4] C. Alimentarius, Revised codex standard for honey, *Codex Stan.* 12 (2001) 1982.
- [5] A. Oryan, E. Alemzadeh, A. Moshiri, Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: a narrative review and meta-analysis, *J. Tissue Viability.* 25 (2016) 98–118.
- [6] H.A. Alzahrani, R. Alsabehi, L. Boukraâ, F. Abdellah, Y. Bellik, B.A. Bakhotmah, Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins, *Molecules.* 17 (2012) 10540–10549.
- [7] C. Nakajima, A. Okayama, T. Sakogawa, A. Nakamura, T. (Research I. for A.S. in B. and T. Hayama, Drug disposition in honey-bees and hives: method to attain a high distribution in broods and low residue in honey, *J. Vet. Pharmacol. Ther. U. K.* (1997).
- [8] C. Chauvin, P.-A. Beloeil, J.-P. Orand, P. Sanders, F. Madec, A survey of group-level antibiotic prescriptions in pig production in France, *Prev. Vet. Med.* 55 (2002) 109–120.
- [9] C.J. Teale, Antimicrobial resistance and the food chain, *J. Appl. Microbiol.* 92 (2002) 85S-89S.
- [10] F.C. Tenover, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Infect. Control.* 34 (2006) S3–S10.
- [11] A. Achari, D. O Somers, J.N. Champness, P.K. Bryant, J. Rosemond, D.K. Stammers, Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 4 (1997) 490–497. doi:10.1038/nsb0697-490.
- [12] V. Economou, P. Gousia, Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria, *Infect. Drug Resist.* 8 (2015) 49.
- [13] M.L. Nelson, A. Dinardo, J. Hochberg, G.J. Armelagos, Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE, *Am. J. Phys. Anthropol.* 143 (2010) 151–154.
- [14] I. Goyer, M. Iseppon, C. Thibault, R. Abaji, M. Krajinovic, J. Autmizguine, Lactic acidosis with chloramphenicol treatment in a child with cystic fibrosis, *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol. J. Ther. Popul. Pharmacologie Clin.* 24 (2017) 40–45.

- [15] M.H. Wilcox, Chapter 16 - Chloramphenicol and thiamphenicol, in: R.G. Finch, D. Greenwood, S.R. Norrby, R.J. Whitley (Eds.), *Antibiot. Chemother.* Ninth Ed., W.B. Saunders, London, 2010: pp. 245–249.
- [16] Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council (Text with EEA relevance), 2009. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/470/oj/eng> (accessed June 7, 2018).
- [17] European Commission, European Commission (1999) *Off J Eur Union* L 60:16–52, in: 1999.
- [18] İ. Kivrak, Ş. Kivrak, M. Harmandar, İ. Kivrak, Ş. Kivrak, M. Harmandar, Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS, *Food Sci. Technol.* 36 (2016) 90–96. doi:10.1590/1678-457X.0037.
- [19] E. Dubreil-Chéneau, Y. Pirotais, E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for monitoring plans: Validation according to European Union Decision 2002/657/EC, *J. Chromatogr. A.* 1339 (2014) 128–136. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.003.
- [20] Ż. Bargańska, J. Namieśnik, M. Ślebioda, Determination of antibiotic residues in honey, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1035–1041.
- [21] N. J. Ronkainen, H. Brian Halsall, W. R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763.
- [22] Leland Clark, Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, *Trans. - Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 2 (1956) 41.
- [23] W.R. Heineman, W.B. Jensen, Obituary L. Clark. (1918–2005), *Biosens. Bioelectron.* 8 (2006) 1403–1404.
- [24] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45.
- [25] G.G. Guilbault, J.G. Montalvo, A urea-specific enzyme electrode, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 2164–2165.
- [26] G.G. Guilbault, J.G. Montalvo, An improved urea specific enzyme electrode, *Anal. Lett.* 2 (1969) 283–293.

- [27] S. Suzuki, F. Takahashi, I. Satoh, N. Sonobe, Ethanol and lactic acid Sensors using electrodes coated with dehydrogenase—collagen membranes, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48 (1975) 3246–3249.
- [28] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121–131.
- [29] D. DUPONT, Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire, *Tech. Ing. Agroaliment.* 3 (2005).
- [30] V. Perumal, U. Hashim, Advances in biosensors: Principle, architecture and applications, *J. Appl. Biomed.* 12 (2014) 1–15.
- [31] B. Prieto-Simon, M. Campas, J.-L. Marty, Biomolecule immobilization in biosensor development: tailored strategies based on affinity interactions, (2008).
- [32] E.A. Greenfield, *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
- [33] A. K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof, Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview, *Analyst.* 138 (2013) 1619–1627.
- [34] D. Saerens, L. Huang, K. Bonroy, S. Muyldermans, Antibody fragments as probe in biosensor development, *Sensors.* 8 (2008) 4669–4686.
- [35] T. Galvez, J.-P. Pin, Comment fonctionne un récepteur couplé aux protéines G ? Le cas des récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA, *médecine/sciences.* 19 (2003) 559–565.
- [36] E. Reimhult, K. Kumar, Membrane biosensor platforms using nano-and microporous supports, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 82–89.
- [37] I. Navratilova, M. Dioszegi, D.G. Myszka, Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology, *Anal. Biochem.* 355 (2006) 132–139.
- [38] K. Miyano, Y. Sudo, A. Yokoyama, K. Hisaoka-Nakashima, N. Morioka, M. Takebayashi, Y. Nakata, Y. Higami, Y. Uezono, History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay, *J. Pharmacol. Sci.* 126 (2014) 302–309.
- [39] R. Sleno, D. Devost, D. Pétrin, A. Zhang, K. Bourque, Y. Shinjo, J. Aoki, A. Inoue, T.E. Hébert, Conformational biosensors reveal allosteric interactions between heterodimeric AT1 angiotensin and prostaglandin F₂ α receptors, *J. Biol. Chem.* (2017)–M117.
- [40] S. Song, L. Wang, J. Li, C. Fan, J. Zhao, Aptamer-based biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 108–117.

- [41] S. Ranjbar, S. Shahrokhian, F. Nurmohammadi, Nanoporous gold as a suitable substrate for preparation of a new sensitive electrochemical aptasensor for detection of *Salmonella typhimurium*, *Sens. Actuators B Chem.* 255 (2018) 1536-1544.
- [42] S. Brosel-Oliu, R. Ferreira, N. Uria, N. Abramova, R. Gargallo, F.-X. Muñoz-Pascual, A. Bratov, Novel impedimetric aptasensor for label-free detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Sens. Actuators B Chem.* 255 (2018) 2988-2995
- [43] S. Wu, N. Duan, Y. Qiu, J. Li, Z. Wang, Colorimetric aptasensor for the detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium using ZnFe₂O₄-reduced graphene oxide nanostructures as an effective peroxidase mimetics, *Int. J. Food Microbiol.* 261 (2017) 42–48.
- [44] H. Badie Bostan, N.M. Danesh, G. Karimi, M. Ramezani, S.A. Mousavi Shaegh, K. Youssefi, F. Charbgoon, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Ultrasensitive detection of ochratoxin A using aptasensors, *Biosens. Bioelectron.* 98 (2017) 168–179.
- [45] R. Rapini, G. Marrazza, Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment: Recent advances, *Bioelectrochemistry.* 118 (2017) 47–61.
- [46] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, G. Palleschi, Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1405–1423.
- [47] R. Monosik, M. Stredansky, J. Tkac, E. Sturdik, Application of enzyme biosensors in analysis of food and beverages, *Food Anal. Methods.* 5 (2012) 40–53.
- [48] G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M.I. Demartis, V. Fiore, others, Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids, *Sensors.* 16 (2016) 780.
- [49] L. Goers, C. Ainsworth, C.H. Goey, C. Kontoravdi, P.S. Freemont, K.M. Polizzi, Whole-cell *Escherichia coli* lactate biosensor for monitoring mammalian cell cultures during biopharmaceutical production, *Biotechnol. Bioeng.* 114 (2017) 1290–1300.
- [50] A.N. Reshetilov, O.N. Ponamoreva, V.A. Arlyapov, V.A. Alferov, T.V. Rogova, I.V. Blokhin, I.F. Chepkova, Microbial biosensors to express determine bod in effluents from food industry enterprises, *Water: chemistry and ecology.* 3 (2008) 23–30.
- [51] L.T. Bereza-Malcolm, G. Mann, A.E. Franks, Environmental sensing of heavy metals through whole cell microbial biosensors: a synthetic biology approach, *ACS Synth. Biol.* 4 (2014) 535–546.

- [52] R. Gui, H. Jin, H. Guo, Z. Wang, Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018) 56–70.
- [53] M. Lutfi Yola, N. Atar, A Review: molecularly imprinted electrochemical sensors for determination of biomolecules/drug, *Current Analytical Chemistry* 13 (2017) 13-17.
- [54] A.T. Mai, Développement de biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection de polluants organiques en phase aqueuse, Thèse d'Université, Université Claude Bernard-Lyon I, 2004.
- [55] A. Sinibaldi, A. Anopchenko, R. Rizzo, N. Danz, P. Munzert, P. Rivolo, F. Frascella, S. Ricciardi, F. Michelotti, Angularly resolved ellipsometric optical biosensing by means of Bloch surface waves, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3965–3974.
- [56] J. Lu, D. Spasic, F. Delport, T. Van Stappen, I. Detrez, D. Daems, S. Vermeire, A. Gils, J. Lammertyn, Immunoassay for detection of infliximab in whole blood using a fiber-optic surface plasmon resonance biosensor, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3664–3671.
- [57] M. Mutlu, *Biosensors in food processing, safety, and quality control*, CRC Press, 2016.
- [58] K. Mosbach, B. Danielsson, An enzyme thermistor, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* 364 (1974) 140–145.
- [59] S. Casadio, J.W. Lowdon, K. Betlem, J.T. Ueta, C.W. Foster, T.J. Cleij, B. van Grinsven, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, M. Peeters, Development of a novel flexible polymer-based biosensor platform for the thermal detection of noradrenaline in aqueous solutions, *Chem. Eng. J.* 315 (2017) 459–468.
- [60] A. Shons, F. Dorman, J. Najarian, An immunospecific microbalance, *J. Biomed. Mater. Res.* 6 (1972) 565–570.
- [61] L. Su, C.-C. Fong, P.-Y. Cheung, M. Yang, Development of novel piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator for detection of cancer markers, *Biosens. Biodetection*, Humana Press, New York, NY, 2017: pp. 277–291.
- [62] G. Marrazza, Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review, *Biosensors.* 4 (2014) 301–317.
- [63] R. Chauhan, P.R. Solanki, J. Singh, I. Mukherjee, T. Basu, B.D. Malhotra, A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut, *Food Control.* 52 (2015) 60–70.
- [64] A. Folch, *Introduction to bioMEMS*, CRC Press, 2016.
- [65] N.E.A.E. Hassani, A. Baraket, E.T.T. Neto, M. Lee, J.-P. Salvador, M. Marco, J. Bausells, N.E. Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine, Novel strategy for

- sulfapyridine detection using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS: Application to honey analysis, *Biosens. Bioelectron.* 93 (2017) 282–288.
- [66] P.A. Oberg, T. Togawa, F.A. Spelman, *Sensors applications, Sensors in Medicine and Health Care*, John Wiley & Sons, 2006.
- [67] I. Žura, D. Babić, M.D. Steinberg, I. Murković Steinberg, Low-cost conductometric transducers for use in thin polymer film chemical sensors, *Sens. Actuators B Chem.* 193 (2014) 128–135.
- [68] H. Imen, *Etudes physico-chimique de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales*, Thèse d'Université, Université Claude Bernard Lyon, 2009.
- [69] D.K. Gosser, *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*, VCH, 1993.
- [70] D.H. Evans, K. Hu, Inverted potentials in two-electron processes in organic electrochemistry, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92 (1996) 3983–3990.
- [71] L. Xiao, H. Xu, S. Zhou, T. Song, H. Wang, S. Li, W. Gan, Q. Yuan, Simultaneous detection of Cd(II) and Pb(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry at a nitrogen-doped microporous carbon/Nafion/bismuth-film electrode, *Electrochimica Acta.* 143 (2014) 143–151.
- [72] H. El-Mai, E. Espada-Bellido, M. Stitou, M. García-Vargas, M.D. Galindo-Riaño, Determination of ultra-trace amounts of silver in water by differential pulse anodic stripping voltammetry using a new modified carbon paste electrode, *Talanta.* 151 (2016) 14–22.
- [73] Z. Wang, H. Zhang, Z. Wang, J. Zhang, X. Duan, J. Xu, Y. Wen, Trace analysis of Ponceau 4R in soft drinks using differential pulse stripping voltammetry at SWCNTs composite electrodes based on PEDOT:PSS derivatives, *Food Chem.* 180 (2015) 186–193.
- [74] E.P. Meulenbergh, *Antibodies applications and new developments*, Bentham Science Publishers, 2012.
- [75] E. Makhneva, A. Manakhov, P. Skládal, L. Zajíčková, Development of effective QCM biosensors by cyclopropylamine plasma polymerization and antibody immobilization using cross-linking reactions, *Surf. Coat. Technol.* 290 (2016) 116–123.
- [76] Y. Bai, C.G. Koh, M. Boreman, Y.-J. Juang, I.-C. Tang, L.J. Lee, S.-T. Yang, Surface modification for enhancing antibody binding on polymer-based microfluidic device for enzyme-linked immunosorbent assay, *Langmuir.* 22 (2006) 9458–9467.
- [77] S.S. Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, 1991.

- [78] D.H.-K. Ma, J.-Y. Lai, H.-Y. Cheng, C.-C. Tsai, L.-K. Yeh, Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells, *Biomaterials*. 31 (2010) 6647–6658.
- [79] C. Picart, J.-C. Voegel, B. Frisch, P. Schaaf, G. Decher, F. Cuisinier, Method for preparing crosslinked polyelectrolyte multilayer films, US20140328883A1, 2014.
- [80] P. Viel, T. Berthelot, Procédé pour fonctionnaliser une surface avec un objet ou une molécule d'intérêt, EP2720806A1, 2014.
- [81] M. Howarth, D.J.-F. Chinnapen, K. Gerrow, P.C. Dorrestein, M.R. Grandy, N.L. Kelleher, A. El-Husseini, A.Y. Ting, A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site, *Nat. Methods*. 3 (2006) 267–273.
- [82] B. Sellergren, *Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry*, Elsevier, 2000.
- [83] R. Arshady, K. Mosbach, Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Makromol. Chem. Macromol. Chem. Phys.* 182 (1981) 687–692.
- [84] P. Qi, J. Wang, L. Wang, Y. Li, J. Jin, F. Su, Y. Tian, J. Chen, Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols, *Polymer*. 51 (2010) 5417–5423.
- [85] M. Dabrowski, M. Cieplak, P.S. Sharma, P. Borowicz, K. Noworyta, W. Lisowski, F. D'Souza, A. Kuhn, W. Kutner, Hierarchical templating in deposition of semi-covalently imprinted inverse opal polythiophene film for femtomolar determination of human serum albumin, *Biosens. Bioelectron.* 94 (2017) 155–161.
- [86] M. Cieplak, K. Szwabinska, M. Sosnowska, B.K. Chandra, P. Borowicz, K. Noworyta, F. D'Souza, W. Kutner, Selective electrochemical sensing of human serum albumin by semi-covalent molecular imprinting, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 960–966.
- [87] L.-A. Garçon, Développement de langue électronique : étude de mélanges complexes et de bactéries, Thèse d'Université, Université Grenoble Alpes, 2015.
- [88] M. del Valle, Materials for electronic tongues: smart sensor combining different materials and chemometric tools, in: *mater. Chem. Sens.*, Springer, Cham, 2017: pp. 227–265.
- [89] Z. Haddi, Conception et développement d'un système multicapteurs en gaz et en liquide pour la sécurité alimentaire, Thèse d'Université, Université Claude Bernard - Lyon I, 2013.
- [90] T. Nakamoto, *Essentials of machine olfaction and taste*, Wiley, 2016.
- [91] F. Winkvist, P. Wide, I. Lundström, An electronic tongue based on voltammetry, *Anal. Chim. Acta.* 357 (1997) 21–31.

- [92] W.R. Heinemann, P.T. Kissinger, Laboratory techniques in electroanalytical chemistry, Marcek-Dekker N. Y. (1984).
- [93] M.W. Shinwari, D. Zhitomirsky, I.A. Deen, P.R. Selvaganapathy, M.J. Deen, D. Landheer, Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications, *Sensors*. 10 (2010) 1679–1715.
- [94] A.A.N. EC08, Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT)–electrochemical cell setup, Metrohm Autolab BV. (2011) 1–3.
- [95] S.M. Scott, D. James, Z. Ali, Data analysis for electronic nose systems, *Microchim. Acta*. 156 (2006) 183–207.
- [96] Z. Haddi, A. Sbartai, P. Namour, N. El Bari, B. Bouchikhi, N. Jaffrezic-Renault, Conception et développement d'une langue électronique voltammétrique pour la détection des métaux lourds, *Instrum. Mes. Métrologie*. 14 (2014) 115–131.
- [97] C. Duby, S. Robin, Analyse en composantes principales, *Inst. Natl. Agron. Paris-Grignon*. 80 (2006).
- [98] R.A. Fisher, Uncertain Inference, *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 71 (1936) 245–258.
- [99] A. El-Hamdouchi, P. Willett, Hierarchic document classification using Ward's clustering method, in: *Proc. 9th Annu. Int. ACM SIGIR Conf. Res. Dev. Inf. Retr.*, ACM, 1986: pp. 149–156.
- [100] V. Vapnik, The support vector method of function estimation, in: *Nonlinear Model.*, Springer, 1998: pp. 55–85.
- [101] M. Tenenhaus, *La régression PLS: théorie et pratique*, Editions technip, 1998.
- [102] N. TANIGUCHI, On the Basic concept of nanotechnology, *Proceeding ICPE*. (1974).
- [103] C. Ostiguy, B. Roberge, C. Woods, B. Soucy, Les nanoparticules de synthèse: connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST, *Seconde Édition IRSST Études Rech. R-646*. (2010).
- [104] H.-B. Benoît, *Les nanoparticules*, EDP Sciences, 2012.
- [105] K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello, Gold nanoparticles in chemical and biological sensing, *Chem. Rev.* 112 (2012) 2739–2779.
- [106] T.A.P. Rocha-Santos, Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles, *TrAC Trends Anal. Chem.* 62 (2014) 28–36.
- [107] D. de Britto, M.R. de Moura, F.A. Aouada, L.H.C. Mattoso, O.B.G. Assis, N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system, *Food Hydrocoll.* 27 (2012) 487–493.
- [108] A.S. Tsagkaris, S.G. Tzegkas, G.P. Danezis, Nanomaterials in food packaging: state of the art and analysis, *J. Food Sci. Technol.* 55 (2018) 2862–2870.

- [109] P. Tucci, G. Porta, M. Agostini, D. Dinsdale, I. Iavicoli, K. Cain, A. Finazzi-Agró, G. Melino, A. Willis, Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e549.
- [110] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 941–951.
- [111] K. McNamara, S.A.M. Tofail, Nanoparticles in biomedical applications, *Adv. Phys. X.* 2 (2017) 54–88.
- [112] D. Meinhard, R. Schubert, E. Bilz, S. Reemers, Process for scratch- and abrasion-resistant coating and physical matting of plastics substrates, more particularly polymethyl methacrylate, with nanocomposite coating material, US20130129980A1, 2013.
- [113] J. Miao, M. Miyauchi, T.J. Simmons, J.S. Dordick, R.J. Linhardt, Electrospinning of nanomaterials and applications in electronic components and devices, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 5507–5519.
- [114] J.M. George, A. Antony, B. Mathew, Metal oxide nanoparticles in electrochemical sensing and biosensing: a review, *Microchim. Acta.* 185 (2018) 358.
- [115] D.D. BENEDETTO, P. BREUIL, Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, in: *Spectrophotométrie D'absorption Dans L'ultraviolet Visible*, 2007.
- [116] P.R. Griffiths, J.A.D. Haseth, *Fourier transform infrared spectrometry*, 2nd Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J, 2007.
- [117] F. Brisset, G. national de M.E. à B. et de microanalyse, *Microscopie électronique à balayage et microanalyses*, EDP Sciences, 2012.

PREMIÈRE PARTIE :

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DES IMMUNOCAPTEURS ET DES CAPTEURS À BASE DE POLYMÈRES A EMPREINTES MOLÉCULAIRES POUR LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DU MIEL

CHAPITRE II

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DES IMMUNOCAPTEURS IMPEDIMETRIQUES POUR LA DÉTECTION DE LA SULFAPYRIDINE ET DE LA TÉTRACYCLINE DANS LE MIEL

II.1. Introduction

Les sulfamides et les cyclines sont deux familles d'antibiotiques vétérinaires dédiés à des fins prophylactiques et thérapeutiques. Parmi ces antibiotiques nous trouvons, la sulfapyridine (SPy) et la tétracycline (TC) qui sont largement utilisées dans les traitements vétérinaires, pour leurs bons effets promoteurs de croissance aidant à surmonter les défis de la santé animale et de la sécurité alimentaire [1].

La détection des résidus d'antibiotiques à de faibles concentrations dans les produits d'origines animales nécessite des étapes de préparation des échantillons de manières efficaces. Diverses méthodes analytiques existent actuellement pour la détection et la quantification des antibiotiques, basées essentiellement sur les immunodosages enzymatiques [2,3] et la chromatographie à haute performance ou couplée à la spectroscopie de masse [4,5].

Néanmoins, la plupart de ces méthodes impliquent généralement l'utilisation de procédures d'extraction, très longues, des coûts élevés ainsi que des compétences techniques rigoureuses [6]. Au cours de la dernière décennie, il a été démontré que les immunocapteurs optiques et électrochimiques peuvent être des excellents outils pour détecter les contaminants dans les aliments et les matrices environnementales [7], en raison de leur simplicité, de leur faible coût et de la possibilité d'être employés dans des analyses *in situ*. Dans le cadre de ce chapitre, des immunocapteurs électrochimiques comme étant un type de biocapteur ont été développés et mis au point pour la détection des résidus de la SPy et la TC dans des échantillons de miel.

II.2. Fabrication du système Bio-MEMS à base des microélectrodes d'or

Les microsystèmes biologiques électromécaniques (Bio-MEMS) utilisés dans nos travaux de recherche ont été fabriqués au Centre National de Microélectronique de Barcelone en Espagne (CNM). Ces dispositifs ont été conçus sur des substrats en silicium de type p dopés avec le bore. La taille de leur surface est de 7,3 mm × 4,0 mm. Elle comprend huit microélectrodes de travail en or de surface 225 nm², une microélectrode de référence en argent, une microélectrode auxiliaire en platine et dix plots de contact pour les connexions électriques (Figure II.1).

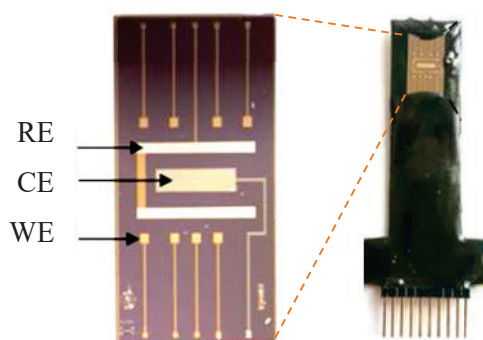


Figure II.1: Dispositif Bio-MEMS intégré sur un substrat de silicium.

Les principales étapes du procédé technologique de la fabrication des dispositifs Bio-MEMS sont résumées dans la Figure II.2 et illustrée comme suit :

- **Étape 1 :** Dépôt d'une couche de dioxyde de silicium d'une épaisseur de 8000 Å sur un substrat en silicium ;
- **Étape 2 :** Dépôt séquentiel des couches de titane (Ti), du nickel (Ni) et de l'or (Au) à des épaisseurs de 1000, 1500 et 500 Å, respectivement. L'utilisation du Ti dans cet étape est primordiale afin d'adhérer l'or sur la surface du substrat, alors que la couche du Ni a été introduite pour éviter la diffusion du Ti dans l'Or ;
- **Étape 3 :** Réalisation d'une photolithographie sur une couche de la résine photosensible négative en utilisant un masque pour la gravure des microélectrodes en or ;
- **Étape 4 :** Dépôt de la couche de passivation constituée d'un mélange du dioxyde de silicium SiO_2 (4000 Å) et du nitrure de silicium Si_3N_4 (4000 Å) ;
- **Étape 5 :** Dépôt d'une couche de platine (Pt) sur une couche de Ti, les deux à des épaisseurs de 1500 et 150 Å, respectivement. Ceci a été réalisé par la méthode lift-off qui consiste à déposer un masque de résine photosensible, avant de déposer le métal seulement dans la partie désirée. En disparaissant, la résine élimine le métal qui a été déposé sur sa surface, laissant derrière elle le motif métallique de l'électrode auxiliaire en platine.
- **Étape 6 :** Dépôt d'une couche d'argent (Ag) sur une couche de Ti, les deux à des épaisseurs de 1500 et 150 Å, respectivement par la méthode lift-off, suivi d'une élimination de l'excès de la couche Ag/Ti sur le dessus de la résine photosensible.

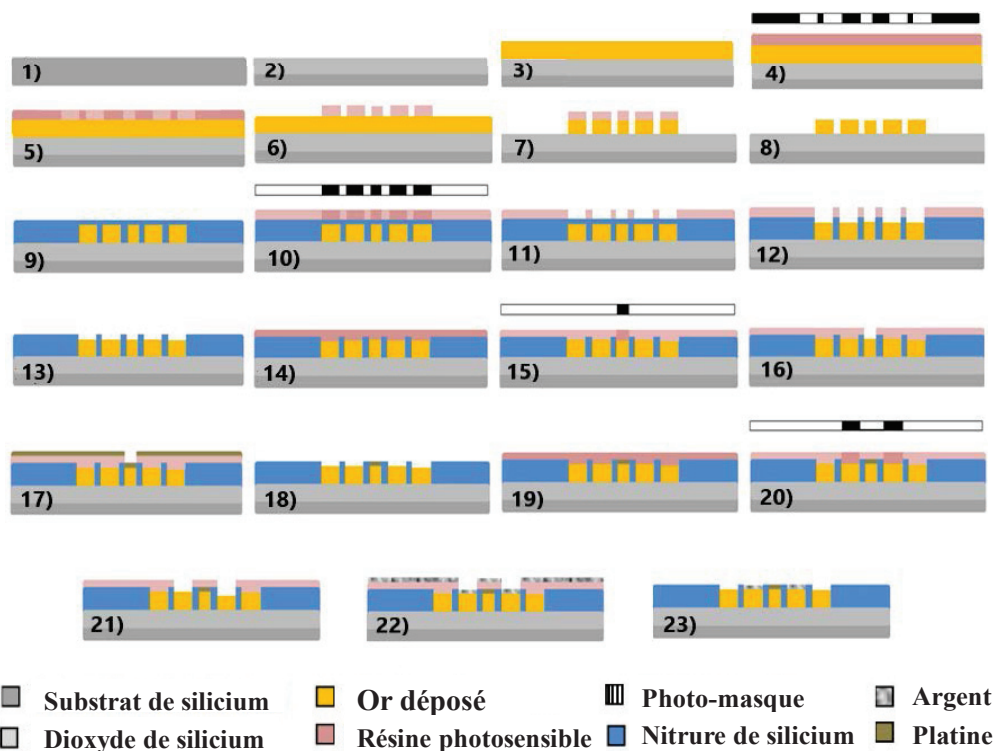


Figure II.2: Étapes technologiques du procédé de la fabrication du système Bio-MEMS.

II.3. Préparation des nanoparticules magnétiques

L'utilisation de nanoparticules superparamagnétiques (MNP) a été privilégiée dans cette étude. Ces MNP sont basées sur des structures cœur-coquilles (en anglais *Core-shell*) afin d'améliorer la stabilité chimique du noyau magnétique. En plus, la coquille a été modifiée par des groupes fonctionnels d'un polymère conducteur qui est le polypyrrole, dans le but d'offrir des interactions et des applications spécifiques. En outre, divers avantages sont liés à l'utilisation de cette structure de MNP à savoir : leurs propriétés catalytiques qui permettent l'amplification du signal de la sonde redox, ainsi que leur élargissement de la surface totale de la bio-fonctionnalisation. Ceci induit une amélioration de la sensibilité du biocapteur, une grande stabilité chimique dans le temps et la possibilité de sa régénération sous un champ magnétique.

Les nanoparticules utilisées dans ce travail ont été synthétisées par le laboratoire d'Automatique et de Génie des procédés (LAGEP) appartenant à l'université Lyon 1 sous la supervision du Pr. Abdelhamid Elaissari, en utilisant la technique de polymérisation en émulsion ensemencée décrite par Tenorio-Neto et al., [8]. Brièvement, cette polymérisation a été effectuée dans un réacteur en verre de 25 mL en utilisant un agitateur à pâles en téflon. Une masse de 1,52 g d'une émulsion magnétique (EM), constituée de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (III) Fe_2O_3 , stabilisées avec l'acide oléique, l'octane et le sulfate de dodécyl de

sodium et ayant une teneur totale en solides de 7,9%, a été ajoutée dans le réacteur. Le surnageant a été retiré après 5 min de séparation magnétique. Ensuite, 10 mL d'une solution aqueuse contenant 20 mg de povidone (agent stabilisant) ont été ajoutés dans le réacteur et l'EM a été redispersée sous agitation continue à une vitesse de 300 tr/min pendant 4 h. Juste après, 8,5 μL du pyrrole (Py, 16 mmol) préalablement purifié par passage à travers une colonne d'alumine basique activée et 18 mg de l'acide pyrrole -2-carboxylique (Py-COOH, 16 mmol) ont été ajoutés dans le réacteur en présence de 90 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ utilisé comme agent initiateur. Cette réaction a été maintenue sous agitation pendant 12 h à température ambiante afin d'obtenir des nanoparticules magnétiques de poly(pyrrole-co-pyrrole-2-acide carboxylique) (PPy/PPy-COOH/MNP). Les nanoparticules préparées ont été ensuite caractérisées par la microscopie électronique à transmission (MET) qui a révélé une homogénéité de taille (entre 250 et 290 nm) comme le montre la Figure II.3.

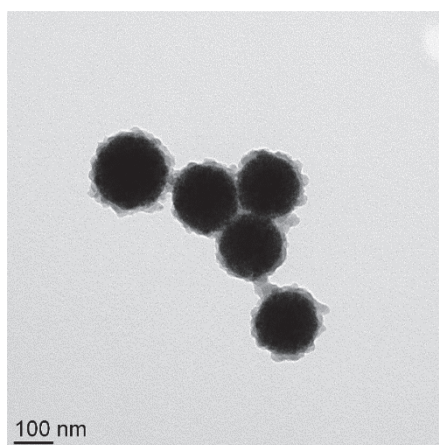


Figure II.3: Analyse par microscopie électronique à transmission des nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP [8].

II.4. Fabrication d'un immunocapteur pour la détection des résidus de la sulfapyridine dans le miel

II.4.1. Nettoyage des microélectrodes

Le nettoyage de la surface des dispositifs Bio-MEMS utilisés dans ce travail joue un rôle primordial dans l'élimination des substances organiques adhérentes à la surface et qui peuvent influencer l'exactitude des résultats électrochimiques obtenus. Pour ce faire, deux techniques de nettoyage des microélectrodes ont été adoptées :

- La première dans un sonicateur pendant 10 min, par utilisation des ondes ultrasonores élastiques à une fréquence de 30 kHz. Ce type de nettoyage est considéré aujourd'hui comme la méthode la plus moderne et efficace dans les procédés de précision. Son fonctionnement est basé sur la génération d'une énergie électrique à haute fréquence qui

va être transmise aux transducteurs. Ceux-ci transforment cette énergie en vibrations, puis la transmettent au bain de nettoyage. Dans le liquide de nettoyage (éthanol ou acétone), les ondes ultrasonores déclenchent successivement des phases de compression et de décompression complexes ; c'est ce que l'on appelle la cavitation. La décompression provoque la formation d'une multitude de bulles microscopiques qui viennent ensuite imploser violemment au cours de la phase de compression. Cette action provoque des turbulences comparables à de minuscules brosses agissant au niveau des pièces à nettoyer. Parallèlement, la pulsation des micro-courants générés simultanément assure l'éloignement continu des impuretés de la surface des microélectrodes à nettoyer.

- La deuxième dans un nettoyeur UV-Ozone de la marque ProCleaner™ Plus de BioForce fonctionnant comme un réacteur à plasma oxygène activé par la lumière ultra-violette. Le plasma est donc créé grâce à une source de lumière ultra-violette qui va être absorbée par l'oxygène présent dans l'atmosphère de la chambre de nettoyage et qui va se dissocier pour former de l'oxygène atomique et l'ozone. Ce rayonnement ultra-violet permet en effet de dissocier les composés organiques qui vont se décrocher de la surface des microélectrodes et être évacués. Les substrats sont par la suite rincés par de l'eau distillée et séchés sous un flux d'azote.

II.4.2. Fonctionnalisation de la surface des microélectrodes

II.4.2.1. Dépôt des nanoparticules magnétiques

Après l'étape de nettoyage, la fonctionnalisation des microélectrodes en or par les nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP (40 μ L de la solution dont la préparation est décrite dans le paragraphe II.3) a été réalisée par un électro-dépôt en utilisant la technique de la chronoampérométrie pulsée. Deux potentiels en répétition continue ont été appliqués : le premier potentiel $E_1 = -1,5$ V pendant $t_1 = 0,1$ s, induisant un processus d'électrodéposition cathodique, tandis que le second potentiel $E_2 = 1,0$ V pendant $t_2 = 0,1$ s provoquant une oxydation de la surface des électrodes et notamment le nettoyage des éventuelles espèces étrangères déposées. Ce processus a été itéré 10 fois (Figure II.4(A)), l'amplitude du processus de charge-décharge reste pratiquement inchangée pendant le cycle prolongé, indiquant que la surface de l'électrode présente un dépôt homogène des PPy/PPy-COOH/MNP, comme illustré dans la Figure II.4(B).

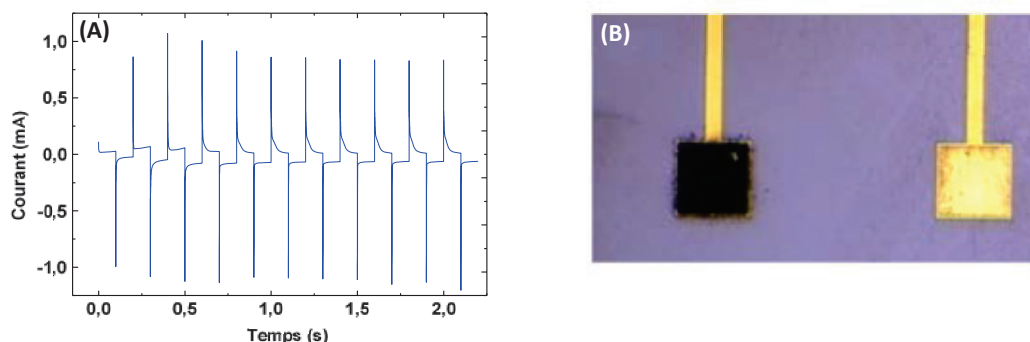


Figure II.4: (A) Profils de courant en fonction du temps de l'électrodéposition pulsée des nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP, (B) Image obtenue par le stéréomicroscope de l'électrode d'or modifiée par les PPy/PPy-COOH/MNP (en noir) comparée à celle de l'or nu (en jaune).

II.4.2.2. Caractérisation par la Microscopie à Force Atomique

La topologie et la rugosité de la surface des microélectrodes d'or modifiées par les nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP ont été étudiées par Microscopie à Force Atomique (AFM). Cette caractérisation a été effectuée par un microscope AFM de la marque Nano Observer de la compagnie CSI, France, avec une surface maximale de balayage de $110 \mu\text{m}^2$. Les mesures ont été faites en utilisant une pointe en silicone, fixée sous un micro-levier, fournie par (ScienTecAppNano) de tailles : longueur (L) = $125 \mu\text{m}$, largeur (W) = $35 \mu\text{m}$ et l'épaisseur (T) = $4,5 \mu\text{m}$, avec une fréquence caractéristique comprise entre 200 et 400 kHz. Les images de balayage ont été effectuées en mode enregistrement avec une vitesse de 0,5 ligne/s et une résolution de 1024 lignes. Ensuite, les échantillons ont été analysés dans une zone de $5,0 \mu\text{m} \times 4,4 \mu\text{m}$.

L'image de la topographie bidimensionnelle (2D) de la surface du film PPy/PPy-COOH/MNP (Figure II.5(A)) montre la morphologie granulaire poreuse typique de ce composite, indiquant que la surface est totalement homogène avec la présence de formes sphériques dues à la présence des nanoparticules magnétiques. Ceci a été clairement confirmé par l'image de la topographie tridimensionnelle (3D), avec une rugosité de surface de 8,4 nm (Figure II.5(B)). La caractérisation par l'AFM a donc confirmé que les PPy/PPy-COOH/MNP étaient bien immobilisées sur la surface des microélectrodes.

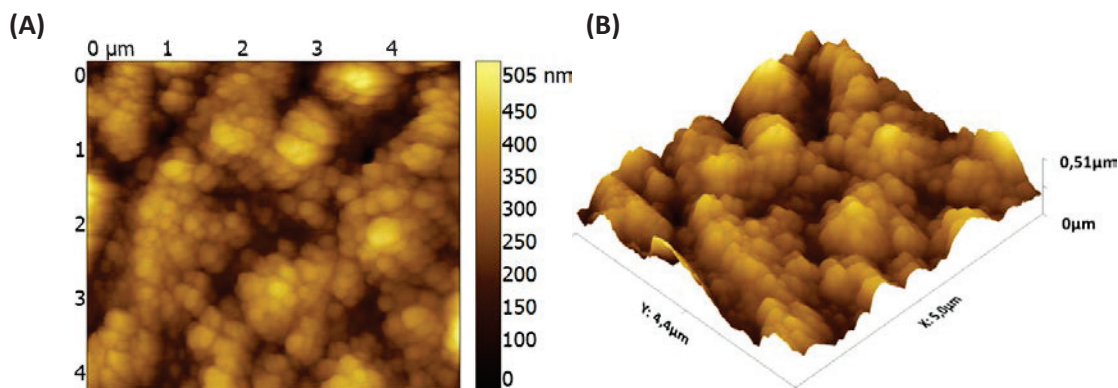


Figure II.5: Images AFM de la surface d'or modifiée par PPy/PPy-COOH/MNP : (A) topographie bidimensionnelle (2D) de la surface, (B) topographie tridimensionnelle (3D) de la surface. Les dimensions de l'image en coordonnées X et Y sont comprises entre 4,4 µm et 5,0 µm.

II.4.2.3. Caractérisations électrochimiques

Le comportement des microélectrodes modifiées par PPy/PPy-COOH/MNP a été caractérisé par la voltammétrie cyclique (VC) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) en utilisant un potentiostat multi-canal (VMP3 Bio-logic-Science Instrumentation (France)). Toutes les mesures ont été réalisées dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ à une concentration de 5,0 mM, préparée dans un tampon phosphate (PBS, pH 7,4). Pour les mesures de la VC, le potentiel a été balayé entre -0,3 et 0,6 V avec une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Alors que pour la SIE, une gamme de fréquences entre 200 mHz et 200 kHz a été utilisée dans un circuit ouvert, avec un potentiel DC de 0,228 V/ref et un potentiel AC de 25 mV. La Figure II.6(A) présente les voltammogrammes cycliques obtenus. Comme nous pouvons observer, les courants d'oxydation et de réduction ont fortement augmenté après le dépôt des PPy/PPy-COOH/MNP par rapport à ceux de l'électrode en or nu. Ceci est dû aux propriétés conductrices du poly(acide pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylique) couvrant la surface des nanoparticules. Ces résultats ont été confirmés par les mesures de la SIE (Figure II.6(B)), où nous notons une diminution significative du diamètre des demi-cercles des courbes de Nyquist après dépôt des PPy/PPy-COOH/MNP indiquant ainsi une cinétique de transfert de charge plus rapide que celle de l'électrode en or nu.

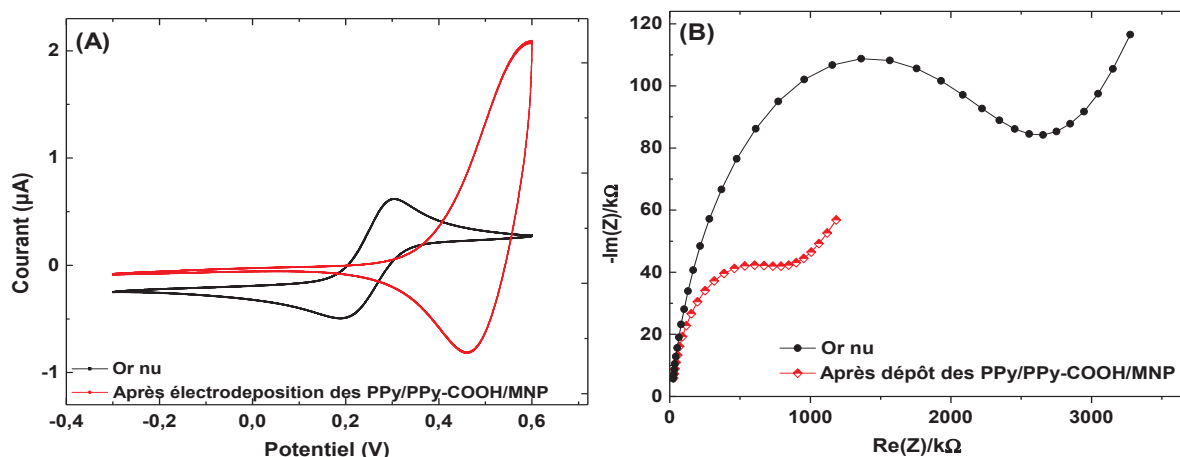


Figure II.6: (A) Voltammogrammes cycliques obtenus dans une gamme de potentiels entre -0,3 et 0,6 V avec une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, (B) Diagrammes de Nyquist d'une microélectrode d'or avant et après électrodéposition des PPy/PPy-COOH/MNP, fréquences entre 200 mHz et 200 kHz appliquées en circuit ouvert, avec un potentiel DC de 0,228 V/ref et un potentiel AC de 25 mV.

II.4.2.4. Activation et bio-fonctionnalisation des microélectrodes modifiées

Généralement pour les immunocapteurs, les anticorps sont d'abord immobilisés et ensuite les antigènes sont détectés à différentes concentrations [9]. Toutefois, il est intéressant de mentionner que dans la présente étude la technologie de détection a été inversée. A cet effet, une détection compétitive a été adoptée entre l'acide 5- [4- (amino) phénylsulfonamide] -5-oxopentanoïque (SA2-BSA) (antigène synthétique) immobilisée sur les microélectrodes fonctionnalisées et la SPy (antigène cible) en solution avec leur anticorps spécifique (Ab-155). Cette approche a été adoptée à cause de la faible masse molaire de la SPy (249 Da) par rapport à celui de l'anticorps Ab-155 (150000 Da) améliorant ainsi le signal de détection de la SPy à des concentrations faibles.

Pour initier cette étape, les groupes carboxyliques du PPy-COOH, ont été activés, par un mélange de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC; 0,4 M) et du N-hydroxysuccinimide (NHS; 0,1 M), préparé dans l'éthanol absolu pendant 1 h à température ambiante. Ensuite la bio-fonctionnalisation de la surface des microélectrodes activées a été effectué pendant 30 min par immobilisation de 40 µL d'une solution de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de l'acide 5-[4-(amino) phénylsulfonamide]-5-oxopentanoïque couplé à l'albumine du sérum bovin (SA2-BSA), utilisé comme compétiteur de la SPy (Figure II.7). Cet antigène ainsi que son antisérum polyclonal sélectif à la classe des sulfonamides appelé Ab-155 ont été produit à l'institut de la chimie avancée de Catalogne. Le biocapteur formé a été ensuite incubé dans une solution contenant 1% de l'éthanolamine (ETA) dans du PBS (pH 7,4), pendant 10 min à température ambiante, afin de bloquer les sites carboxyliques qui n'ont pas réagi avec l'antigène

SA2-BSA. Cette étape est très importante pour éviter toute adsorption non spécifique. Finalement, le biocapteur a été rincé avec le PBS.

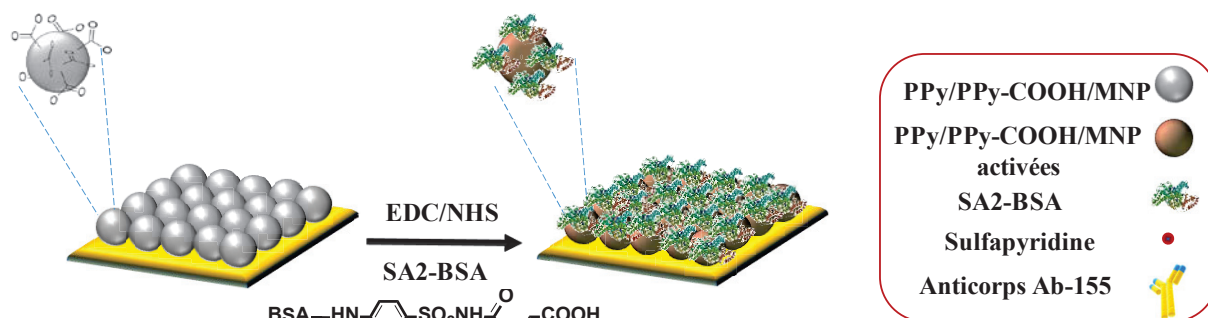


Figure II.7: Représentation schématique de la fonctionnalisation des microélectrodes d'or par : (A) PPy/PPy-COOH/MNP (B) SA2-BSA.

II.4.3. Optimisation de la concentration de l'anticorps

La concentration optimale des anticorps qui réagiront complètement avec la SA2-BSA immobilisée sur les microélectrodes en or, a été optimisée au préalable avant le processus de détection de la SPy. La Figure II.8 montre les diagrammes de Nyquist correspondants à l'interaction antigène-anticorps pour les différentes concentrations d'anticorps Ab-155. Nous observons une saturation de détection à la concentration $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Cette concentration est le minimum qui peut saturer la surface des microélectrodes et elle sera utilisée dorénavant pour le reste de la détection compétitive de la SPy.

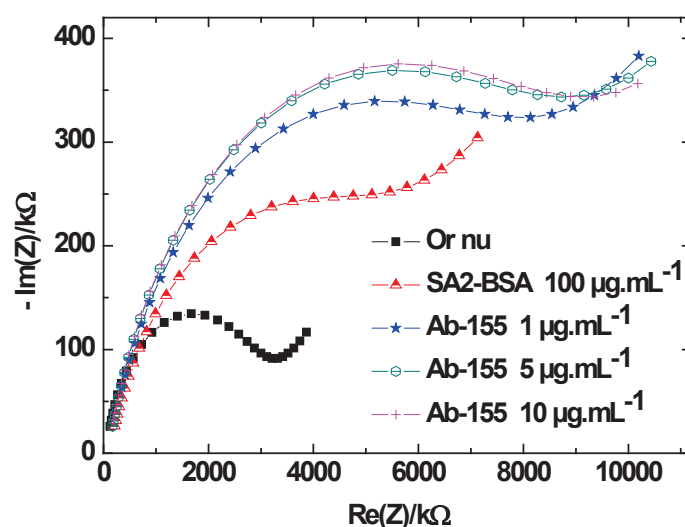


Figure II.8: Diagrammes de Nyquist dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant la variation d'impédance par rapport aux concentrations de l'anticorps Ab-155. , fréquences entre 200 mHz et 200 kHz , potentiel DC = $0,228 \text{ V/ref}$ et potentiel AC = 25 mV .

II.4.4. Détection compétitive séquentielle de la sulfapyridine

Les biocapteurs bio-fonctionnalisés précédemment, ont été incubés dans un mélange contenant l'anticorps polyclonal Ab-155 à une concentration fixe de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et des concentrations décroissantes des solutions standards de la SPy allant de 50 ng.mL^{-1} à $0,002 \text{ ng.mL}^{-1}$, pendant 30 min à une température de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Après chaque incubation, le biocapteur a été rincé avec le PBST (10 mM du PBS + 0,05% du tween 20) et analysé par des mesures de la SIE. La quantification de la SPy à diverses concentrations est représentée sur la Figure II.9. Comme nous pouvons le voir sur la Figure II.9 (A), les demi-cercles des diagrammes de Nyquist augmentent en diminuant les concentrations de la SPy. Comme prévu, la diminution de la concentration de cette dernière produit une augmentation de la résistance du transfert de charge due à la présence des anticorps libres qui réagissent avec la SA2-BSA immobilisée sur la surface des microélectrodes.

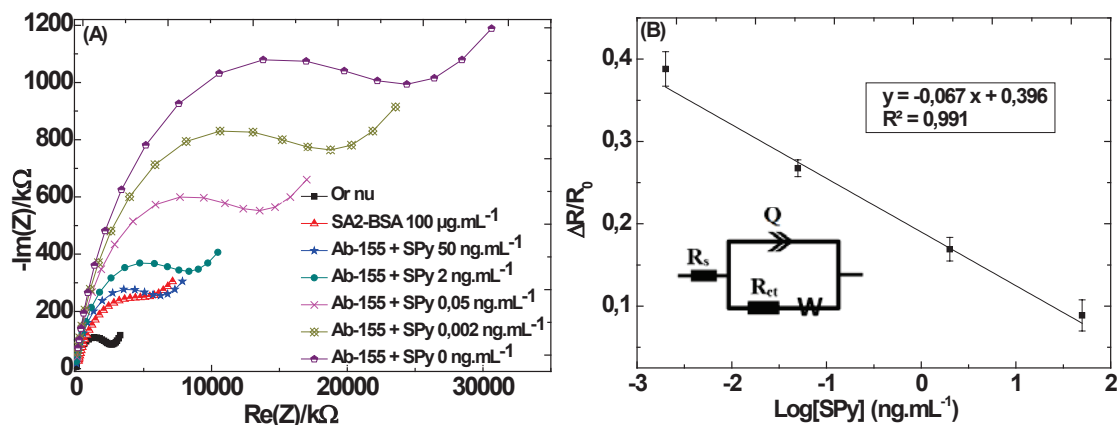


Figure II.9: (A) Diagrammes de Nyquist pour la détection compétitive séquentielle de la SPy à différentes concentrations, (B) Courbe de calibration du biocapteur, en encart : le circuit équivalent utilisé pour le montage SIE.

Les demi-cercles des diagrammes de Nyquist ont été obtenus par le logiciel EC-Lab en utilisant le circuit équivalent de Randles montré dans l'encart de la Figure II.9(B). Un excellent ajustement entre les spectres simulés et expérimentaux a été obtenu pour chaque concentration de la SPy. Les données normalisées montrent l'équation linéaire régie par : $y = -0,067x + 0,396$, avec un coefficient de détermination de 0,991 (Figure II.9(B)). Avec cet immunocapteur nous avons obtenu une limite de détection (LD) de $0,0004 \text{ ng.mL}^{-1}$ [10], qui est environ 25 000 fois inférieure aux limites de résidus de la SPy tolérées par la législation suisse, britannique et belge. La comparaison entre la LD que nous avons trouvée et celles obtenues dans la littérature est présentée dans le Tableau II.1. Ce dernier indique que l'immunocapteur développé permet d'avoir une faible limite de détection dans une large gamme de concentrations linéaires.

Tableau II.1 : Comparaison de diverses méthodes de détection de la sulfapyridine.

Méthode	Gamme de linéarité (ng.mL ⁻¹)	LD (ng.mL ⁻¹)	Milieu réel	Référence
Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection de fluorescence	2-200	0,8	Miel	[11]
Chromatographie en phase liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem	0,006-0,250	0,012	Eau de rivière	[12]
Immunocapteur ampérométrique	0,6-64,2	0,15	Lait	[13]
Immunocapteur optique	0,7–21,0	0,2	Lait	[14]
Immunocapteur électrochimique magnétique	0,2-32,0	0,07	Miel	[15]
Immunocapteur Coulombimétrique	0-100	0,018	Miel	[16]
Capteur électrochimique	1,5–40,1	12,3	Plasma humain	[17]
Notre immunocapteur	50-0,002	0,0004	Miel	[10]

Ce Tableau confirme la grande sensibilité et la fiabilité de notre immunocapteur à détecter de faibles concentrations en résidus de la SPy, en comparaison avec les techniques analytiques de référence en l'occurrence les techniques chromatographiques [11,12] et celles basées sur d'autres types de biocapteurs [13-17]. À cet effet, les résultats obtenus par cet immunocapteur se sont avérés être très prometteurs pour le contrôle de la qualité du miel.

II.4.5. Sélectivité de l'immunocapteur

L'étude de la sélectivité de l'immunocapteur doit être vérifiée expérimentalement, en raison des réactions croisées avec les anticorps Ab-155 peuvent avoir avec les antibiotiques de la même famille des sulfamides. Pour cela des sulfamides ayant des structures chimiques analogues à celle de la SPy, à savoir la sulfadiazine (SDz), la sulfathiazole (STz) et la sulfamérazine (SMz) ont été choisis. Des mesures par la SIE ont été réalisées en utilisant le

même protocole expérimental basé sur la bio-fonctionnalisation de la surface des microélectrodes par PPy/PPy-COOH/MNP/SA2-BSA et décrit dans le paragraphe II.4.2. Les détections de la SDz, STz et SMz ont été faites par la méthode compétitive séquentielle dans la même gamme de concentrations allant de 50 à 0,002 ng.mL⁻¹. Par conséquent, nous avons obtenu pour les différentes molécules interférentes, des courbes d'étalonnage avec des pentes inférieures à celle de la SPy, indiquant que le biocapteur développé présente une meilleure sélectivité pour cette dernière (Figure II.10). Par ailleurs, une légère réponse a été observée pour ces interférents en raison de quelques similitudes entre leurs formules chimiques et celle de la SPy.

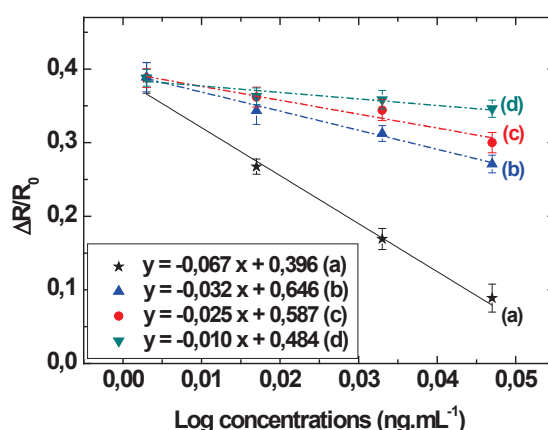


Figure II.10: Courbes de calibrations de la détection de (a) SPy, (b) STz, (c) SDz (d) SMz.

II.4.6. Application dans le miel

II.4.6.1. Méthode de recouvrement

Afin de démontrer la fiabilité du biocapteur développé, une étude de recouvrement a été réalisée par la technique d'addition standard, en comparant les résultats obtenus en présence des solutions standards et ceux issus des échantillons de miel après enrichissement par la SPy à différentes concentrations. À cet effet, un échantillon de miel garanti sans résidus d'antibiotique a été préparé comme suit : 1 g de miel a été dissous dans 1 mL d'éthanol et maintenu dans un sonicateur pendant 20 min, afin de libérer les conjugués SPy-sucres formés à travers le groupe amine dans le cycle aniline. Afin de réduire l'effet de matrice, la solution de miel a été diluée avec le PBS (1:10, v/v) [16]. Cette solution a été dopée ensuite avec les différents mélanges de l'anticorps Ab-155 et de la SPy dans une gamme de concentrations ascendante allant de 50 à 0,002 ng.mL⁻¹. Les concentrations enrichies et les concentrations trouvées par le biocapteur sont indiquées dans le Tableau II.2. La comparaison entre les deux concentrations indique que les taux de recouvrement sont entre 73% et 90%, avec un écart-type relatif (RSD) compris entre

1% et 15%, indiquant que ce biocapteur peut être utilisé pour détecter les résidus de la SPy dans une matrice réelle.

Tableau II.2: Détermination de la SPy dans les échantillons de miel enrichis.

Échantillon	C _{ajoutée} (ng.mL ⁻¹)	C _{trouvée} (ng.mL ⁻¹)	Recouvrement (%)	RSD (%)
1	50,0	45,2	90,4	1
2	2,0	1,8	90,0	9
3	0,050	0,036	73,4	15
4	0,0020	0,0016	80,0	9

II.4.6.2. Méthode des ajouts dosés

La première étape de cette étude consiste à vérifier l'effet d'adsorption du miel dilué sur la surface des microélectrodes fonctionnalisées par la SA2-BSA. Pour cela, un test a été réalisé en incubant le biocapteur fabriqué dans une solution de miel dilué 10 fois dans le tampon PBS (1:10, v/v). La Figure II.11 montre un saut considérable entre le demi-cercle du diagramme de Nyquist correspondant à la SA2-BSA et le premier dépôt du miel dilué. Nous observons le même saut après plusieurs rinçages. Cela prouve que les composants du miel sont fortement adsorbés sur la surface de l'électrode et qu'ils ne peuvent pas être éliminés par un simple rinçage (effet matrice du miel).

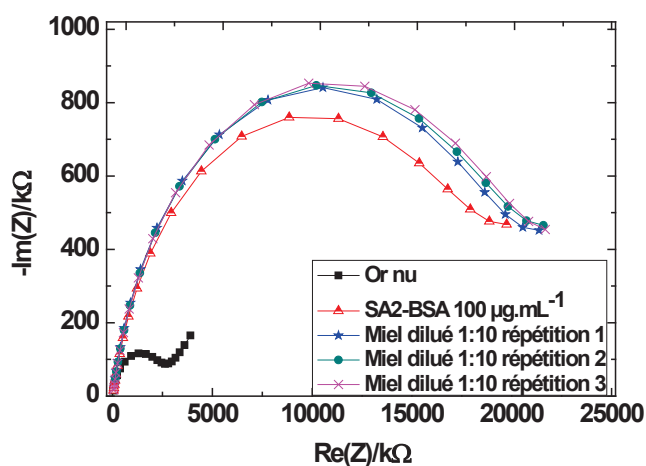


Figure II.11: Diagrammes de Nyquist après dépôt de la solution de miel dilué.

La deuxième étape consiste en l'utilisation de la méthode des ajouts dosés pour déterminer la concentration de la SPy dans un échantillon de miel à titre inconnu. Le principe de cette étude est de s'affranchir de l'effet matrice du miel dilué en le dopant par différentes

concentrations de la SPy dans le but d'avoir les concentrations finales de (0,05; 0,03; 0,01; 0,002 et 0 ng.mL⁻¹) en présence de l'anticorps Ab-155 (10 µg.mL⁻¹) (Figure II.12).

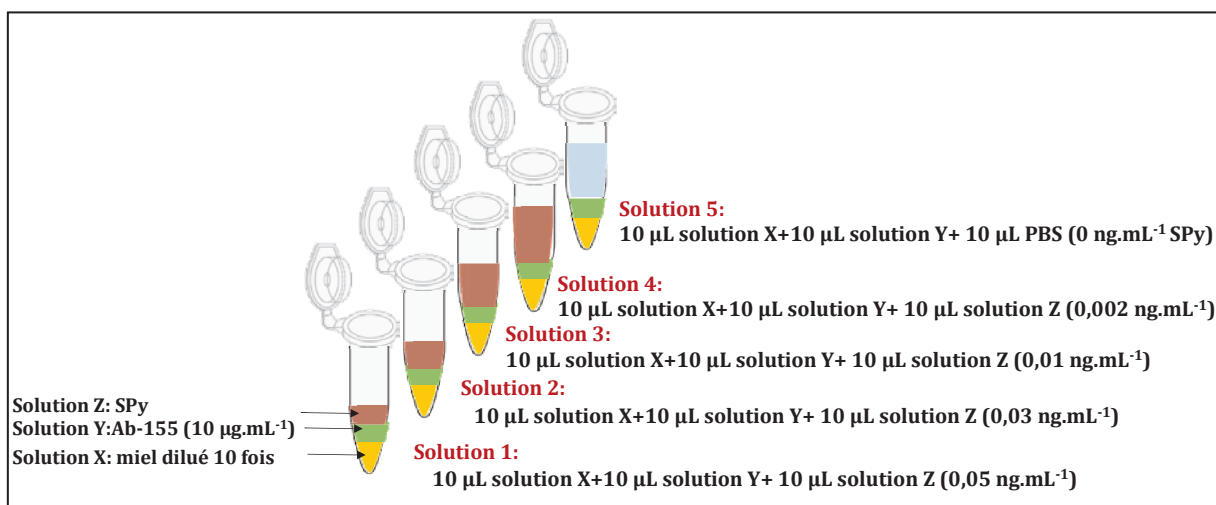


Figure II.12: Schéma illustrant la méthode des ajouts dosés en utilisant cinq aliquotes.

Pour chaque solution préparée, des mesures par la SIE ont été effectuées. La Figure II.13 montre la variation de la variation de résistance de transfert de charges $\Delta R/R_0$ en fonction des concentrations de chaque solution. L'intersection de l'extrapolation de la droite obtenue avec l'axe des abscisses permet de déterminer la concentration de la SPy dans l'échantillon à titre inconnue de miel qui est de 0,0697 ng.mL⁻¹. Cette valeur reste inférieure à la limite maximale de résidus (LMR) fixée par la Suisse, le Royaume-Uni et la Belgique qui se situe entre 10 et 50 ng.mL⁻¹ [18].

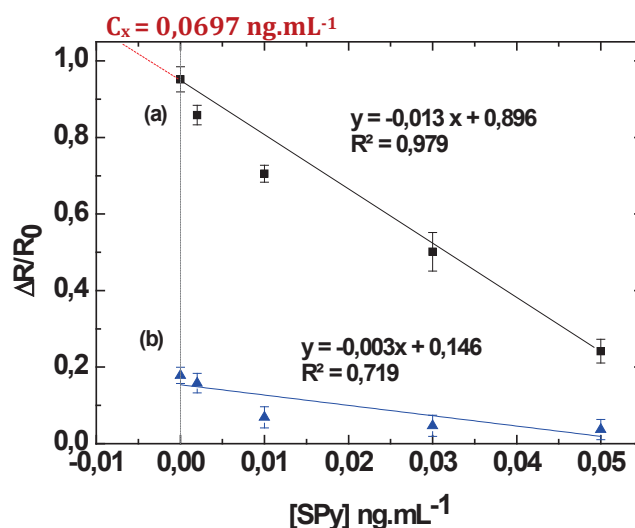


Figure II.13: Normalisation des données SIE montrant la variation linéaire de $\Delta R/R_0$ en fonction des concentrations de la SPy dans le miel, en utilisant les anticorps : (a) Ab-155, (b) Ab-87.

Un test négatif a été effectué afin de confirmer le résultat obtenu précédemment. Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans la Figure II.12 mais en remplaçant cette fois l'anticorps Ab-155 avec un autre anticorps polyclonal qui est l'Ab-87 non spécifique à la SPy. La comparaison entre les droites (a) et (b) montre clairement une sensibilité plus élevée de ce biocapteur pour la SPy lors de l'utilisation de l'anticorps Ab-155 par rapport à l'anticorps Ab-87. Ceci confirme que ce qui a été détecté précédemment est bel et bien la SPy et non pas une adsorption non spécifique.

II.5. Fabrication d'un immunocapteur pour la détection de la tétracycline

II.5.1. Élaboration de l'immunocapteur

Le développement de ce biocapteur a été effectué par trois méthodes distinctes dans un objectif d'améliorer la sensibilité du capteur. Ces méthodes sont basées sur la détection compétitive séquentielle pour la même raison discutée dans le paragraphe II.4.4. Les dispositifs Bio-MEMS sont les mêmes que ceux utilisés pour la détection de la sulfapyridine. Avant toute fonctionnalisation, la surface des microélectrodes en or a été nettoyée dans un bain à ultrasons et dans un nettoyeur UV-Ozone suivant le protocole déjà décrit dans le paragraphe II.4.1.

II.5.1.1. Électro-adressage du sel de diazonium sur les microélectrodes d'or (méthode 1)

L'électro-adressage de la molécule cible par le biais du sel organique de diazonium est une des méthodes qui a été introduite dans ce travail, afin de répondre au besoin de la fonctionnalisation sélective de la surface des microélectrodes étroitement situées. Cette technique, adoptée pour la première fois par Delamar et al. en 1992 [19], consiste à réduire un sel de diazonium et à créer un aryl radical centré après l'élimination spontanée d'azote (N_2). Le radical aryl résultant peut alors former une liaison covalente avec une surface conductrice ou semi-conductrice, donnant des surfaces bio-fonctionnelles très stables.

À cet effet, les microélectrodes nettoyées ont été traitées, pendant 15 min à 4 °C, par une solution de l'acide 4-aminophénylacétique (CMA, 3 mM) préalablement diazotée dans une solution aqueuse contenant un mélange de HCl (20 mM) et du $NaNO_2$ (20 mM). L'électro-adressage du sel de diazonium a été réalisé par la VC dans un intervalle de potentiel entre -1,0 et 0,3 V avec une vitesse de balayage de 80 $mV.s^{-1}$ et 9 cycles de répétition. (Figure II.14).

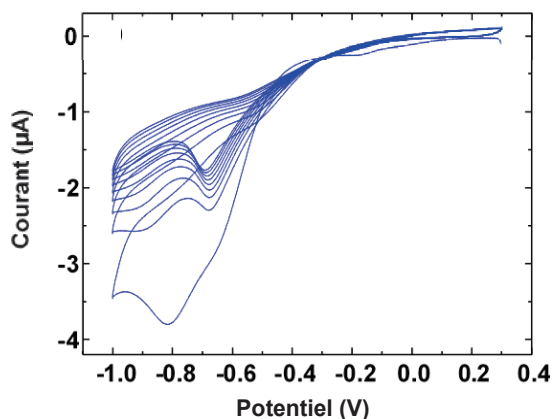


Figure II.14: Voltammogrammes cycliques de l'électro-adressage du sel de diazonium.

D'après cette figure, le cycle initial de l'électro-adressage montre une onde cathodique large et irréversible avec un potentiel de pic à -0,8 V révélant le début de la diazotation (réduction) du sel de diazonium sur la surface des microélectrodes d'or. Ce même pic a été maintenu inchangé lors des autres cycles du dépôt du sel de diazonium. Par ailleurs, le comportement des microélectrodes modifiées par le sel de diazonium a été vérifié par des analyses par la VC. La Figure II.15 montre le résultat obtenu illustrant une diminution importante du pic-à-pic des voltammogrammes cycliques après électrodéposition du sel de diazonium vis-à-vis de ceux relatifs aux microélectrodes d'or nu.

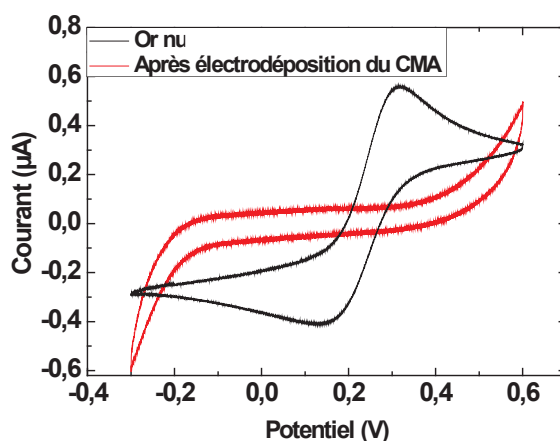


Figure II.15: Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'or nu et après électro-adressage du sel de diazonium.

Afin d'activer les groupements carboxyliques formés sur la surface des microélectrodes, celles-ci ont été incubées dans un mélange de 0,4 M de l'EDC et 0,1 M du NHS préparé dans l'éthanol, pendant 1 h à température ambiante. Par la suite, la surface modifiée des microélectrodes a été incubée dans 40 µL d'une solution de la TC à une concentration de 100 µg.mL⁻¹ pendant 30 min à 4 °C, puis dans un mélange PBS/ETA (1% v/v) pendant 10 min à

température ambiante pour la désactivation des groupes carboxyliques qui n'ont pas réagi. Les dispositifs sont ainsi prêts pour la détection compétitive séquentielle de la TC (Figure II.16).

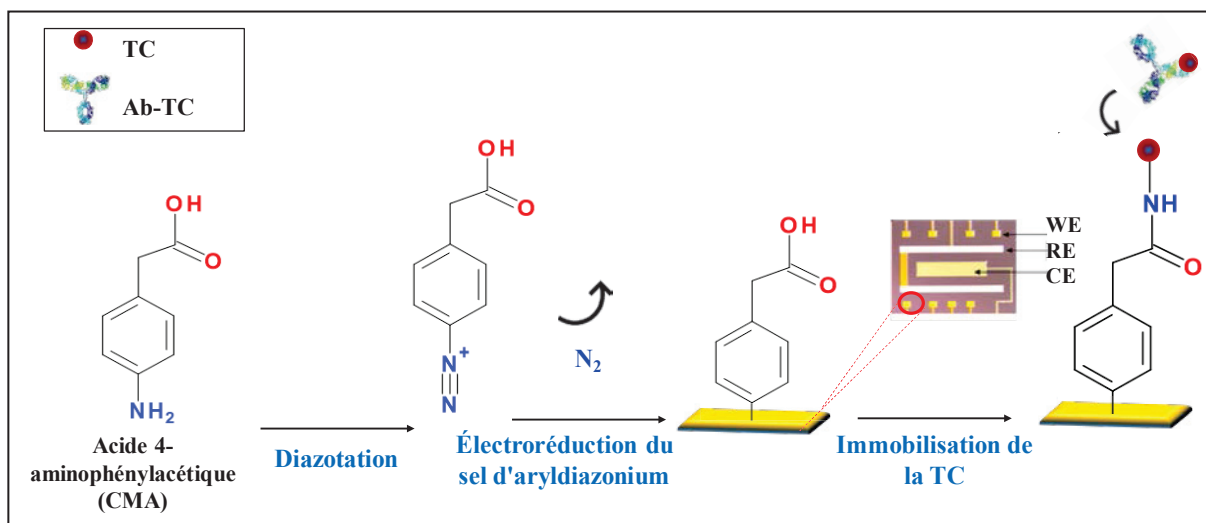


Figure II.16: Illustration schématique des différentes étapes de bio-fonctionnalisation de la surface des microélectrodes pour la détection compétitive séquentielle de la TC.

II.5.1.2. Technique de la préconcentration (méthode 2)

La deuxième méthode, consiste en l'utilisation de nanoparticules magnétiques couvertes par le copolymère PPy/PPy-COOH déjà décrites dans le paragraphe II.3. Une préconcentration préalable de ces PPy/PPy-COOH/MNP en présence de la TC et de son anticorps polyclonal Ab-TC a été utilisée pour éliminer les substances non incluses dans les réactions immunologiques et pour augmenter la sensibilité de la détection même en présence de très faibles concentrations. Pour ceci, un volume de 100 μL des nanoparticules magnétiques en solution a été lavé trois fois avec le tampon PBS (pH 7,4) dans un champ magnétique afin de séparer les nanoparticules du surnageant. Ensuite, l'activation des groupes carboxyliques issus du PPy-COOH a été réalisée par incubation des nanoparticules dans un mélange de 250 μL d'EDC (100 mM) et de 250 μL du NHS (100 mM), en rotation à température ambiante pendant 90 min. Le mélange réactionnel a été ensuite rincé trois fois avec le HCl (1 mM) à 4 $^{\circ}\text{C}$ dans un champ magnétique. Subséquemment, l'anticorps Ab-TC a été immobilisé sur les nanoparticules activées par incubation pendant 2 h à 4 $^{\circ}\text{C}$. Les nanoparticules enrobées d'anticorps (Ab-TC/PPy/PPy-COOH/MNP) ont été par la suite lavées trois fois avec le tampon PBS (pH 7,4) puis incubées pendant 10 min dans une solution de PBS/éthanolamine (1%, v/v) afin de désactiver les groupes acides carboxyliques n'ayant pas réagi. Finalement, les Ab-TC/PPy/PPy-COOH/MNP ont été séparées du surnageant et remises en suspension dans 500 μL de tampon PBS. Simultanément, les microélectrodes d'or ont été fonctionnalisées par le sel de diazonium et la TC comme décrit

au paragraphe II.5.1.1 avant de détecter par compétition l'excès de la TC qui n'a pas réagi avec l'anticorps Ab-TC immobilisé sur la surface des nanoparticules préparées (Figure II.17).

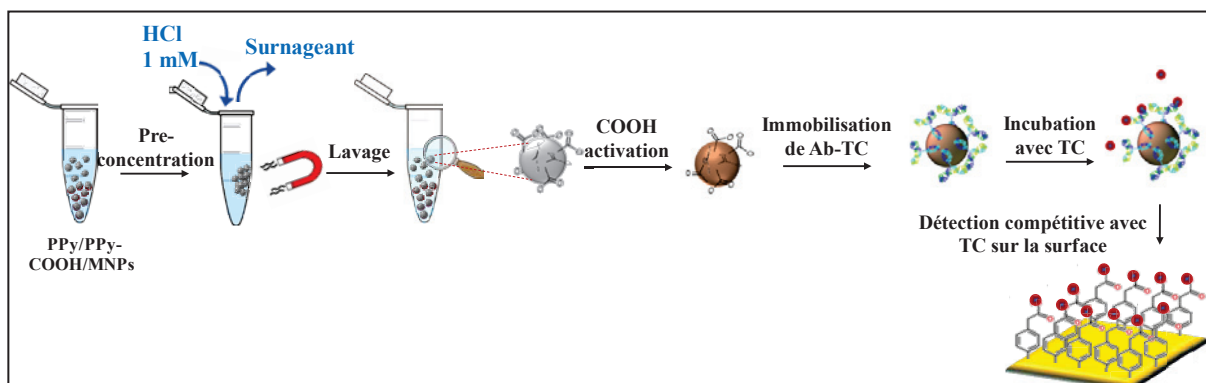


Figure II.17: Illustration schématique de la préconcentration des nanoparticules magnétiques et la détection compétitive séquentielle de la TC sur des microélectrodes d'or modifiées par électro-adressage du sel de diazonium.

II.5.1.3. Fonctionnalisation de la surface des microélectrodes par les nanoparticules PPy/PPy-COOH/MNP (méthode 3)

La troisième méthode de préparation de ce biocapteur, est basée sur l'électrodéposition des PPy/PPy-COOH/MNP directement sur les microélectrodes en or, en utilisant la technique de chronoampérométrie pulsée comme décrit dans le paragraphe II.4.2.1. Cette étape est suivie par l'incubation successive des microélectrodes dans un mélange EDC/NHS (0,4 M / 0,1 M), dans une solution de la TC (100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) et enfin dans un mélange de PBS/éthanolamine (1% v/v). Finalement, l'immunocapteur fabriqué a été rincé avec le tampon PBS et utilisé pour la détection compétitive séquentielle de la TC (Figure II.18).

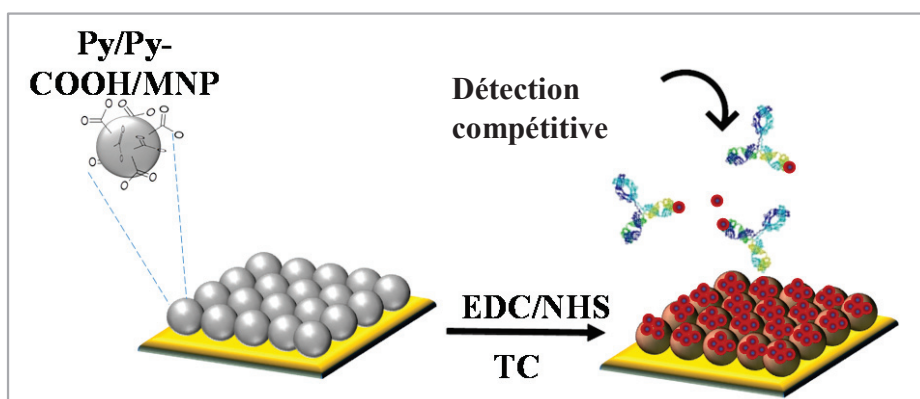


Figure II.18: Illustration schématique des étapes de la fonctionnalisation des microélectrodes d'or par les PPy/PPy-COOH/MNP et la détection compétitive séquentielle de la TC.

II.5.1.4. Caractérisation par la méthode de micro-tamponnage

L'impression par microcontact (Microcontact Printing ou μ CP) est une technique de la lithographie douce qui est mise au point par George Whitesides en 1993 [20]. Elle est très utilisée de nos jours pour former des motifs avec un tampon en élastomère encre par un alcane thiol qui attire les cellules alors que le substrat, généralement en verre ou en silicium, est recouvert d'un matériau repoussant ces cellules. Dans le présent travail, la technique μ CP a été utilisée pour examiner la bio-reconnaissance entre l'anticorps polyclonal Ab-TC et son antigène correspondant qui est la TC.

Tout d'abord, un tampon a été fabriqué à partir d'un mélange du polydiméthylsiloxane (PDMS) et son agent de durcissement (10:1, m/m). Ce mélange est versé dans un moule en silicium silanisé qui contient des reliefs micros piliers puis laissé sécher pendant 24 h à température ambiante (Figure II.19 (a), (b), (c)). Le tampon PDMS obtenu est ensuite encre avec un mélange d'octadécyltrichlosilane (OTS) à 5 μ M et de tétrachlorure de carbone à 4 mM (afin d'augmenter l'hydrophobicité de l'OTS) dans l'heptane pendant 1 min (Figure II.19(d)). Ensuite, le tampon est mis en contact avec un substrat en verre préalablement activé (Figure II.19(e)). Les molécules d'OTS sont donc transférées du tampon vers le substrat au niveau des zones de contact tampon/substrat. Après avoir tamponné le substrat en verre, celui-ci est mis à l'étuve à 100 °C pendant 45 min afin d'améliorer l'adhérence d'OTS sur sa surface. Le substrat est ensuite immergé dans une solution d'éthanol contenant 1% de 11-(triéthoxysilyl)undecanal (TESUD) pendant 30 min (Figure II.19(f)). Ensuite, la surface du substrat a été incubée dans 250 μ L de l'anticorps Ab-TC (10 μ g.mL⁻¹) dilué dans 4 mM de cyanoborohydrure de sodium en tant qu'agent réducteur utilisé pour éviter de réduire de manière défavorable les aldéhydes en hydroxyles non réactifs et pour permettre une liaison covalente de l'Ab-TC avec l'amine de TESUD (Figure II.19(g)). Finalement, les surfaces fonctionnalisées ont été incubées dans une solution de la TC (0,1 pg.mL⁻¹) pendant 30 min (Figure II.19(h)) et une réaction immunologique en sandwich a été effectuée par ajout de 250 μ L de l'anticorps polyclonal anti-TC marqué à la rhodamine Ab-TC^{R*} (Figure II.19(i)).

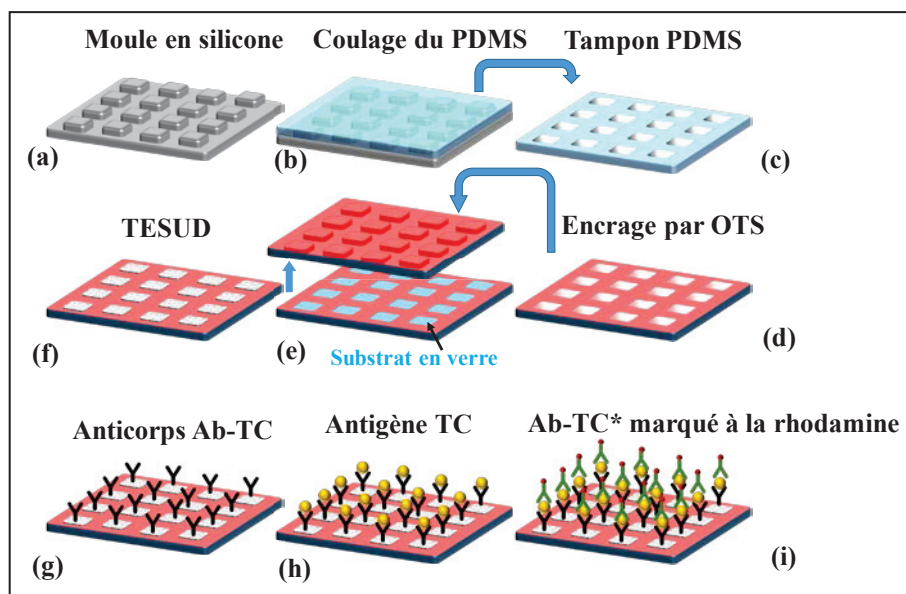


Figure II.19: Schéma illustrant l'aspect du micro-tamponnage pour le test de bio-reconnaissance.

Les images de fluorescence ont été faites avec un microscope (Zeiss AxioPlan 2 Imaging apparatus), équipé par des objectifs de 10×, 40×, 50× et 100× et d'une caméra monochrome. La Figure II.20 montre une image de fluorescence du test de bio-reconnaissance entre l'Ab-TC et la TC par μ CP sur un substrat en verre, montrant un tamponnage bien homogène et une haute résolution des carreaux fluorescents de la rhodamine de l'anticorps secondaire Ab-TC^{*R}. Ce résultat confirme la haute bio-reconnaissance entre l'anticorps Ab-TC et son antigène qui est la TC à une faible concentration et qui peut donc être appliquée avec succès dans le développement de l'immunocapteur.

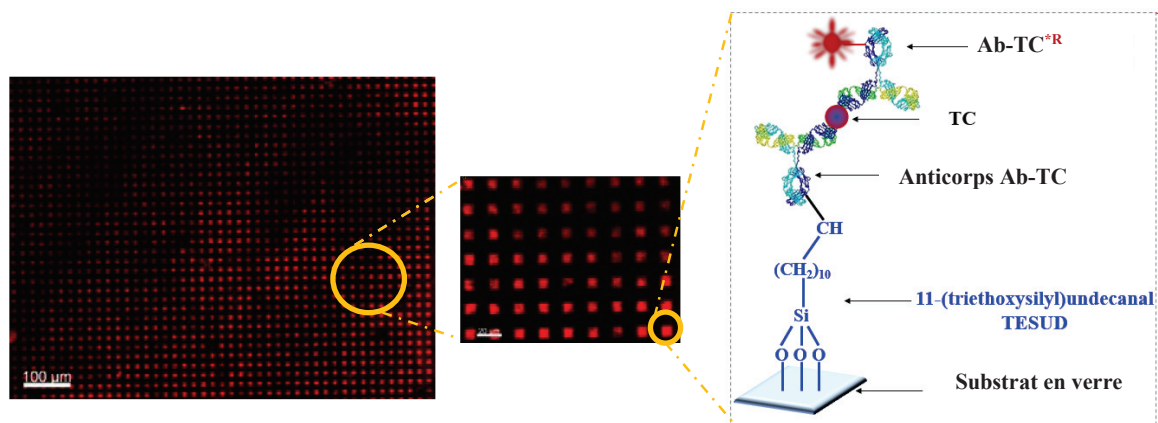


Figure II.20: Schéma illustrant l'image fluorescente du test de bio-reconnaissance (Ab-TC/TC) par μ CP sur un substrat en verre.

II.5.2. Optimisation de la concentration de la tétracycline et de son anticorps

La quantité de la TC immobilisée sur la surface des microélectrodes d'or a fait l'objet d'une optimisation. Celle-ci a été réalisée par leur bio-fonctionnalisation par trois concentrations de la TC : 50, 100 et 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La Figure II.21(A) montre les résultats de l'analyse par la SIE indiquant que les résistances de transfert de charges issues des diagrammes de Nyquist croient avec l'augmentation de la concentration de la TC de 50 à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, puis demeurent presque inchangeables entre 100 et 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour cette étude, la concentration optimale de la TC a été établie à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

En outre, afin d'atteindre une sensibilité élevée de la détection de la TC, l'optimisation de la concentration d'anticorps Ab-TC a été aussi étudiée. Le but de cette étape est de déterminer la concentration de cet anticorps réagissant complètement avec 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de la TC immobilisée sur la surface des microélectrodes. La Figure II.21(B) montre les diagrammes de Nyquist correspondant à l'interaction antigène-anticorps pour des concentrations d'anticorps Ab-TC allant de 1 à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Comme nous pouvons le constater, une saturation de détection a été atteinte vers la concentration de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cet anticorps, valeur qui sera utilisée pour tout le reste de la détection compétitive séquentielle de la TC.

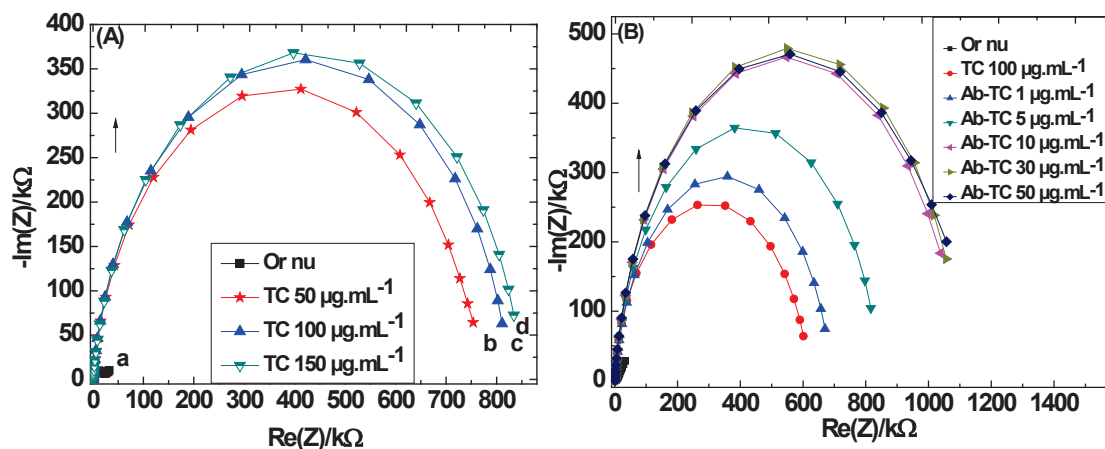


Figure II.21: Diagrammes de Nyquist de l'optimisation de la concentration de : (A) TC, (B) Ab-TC.

II.5.3. Détection compétitive séquentielle de la tétracycline

La détection de l'analyte TC par le biais de ce biocapteur a été réalisée par une approche compétitive afin d'améliorer le signal de détection de la TC ayant une faible masse molaire (444 Da) par rapport à son anticorps correspondant à Ab-TC (160 000 Da). De plus, cette approche a été favorisée dans le présent travail pour faire une préconcentration permettant de détecter seulement la TC et d'éliminer d'autres molécules non pertinentes. Cette étape a été réalisée par incubation de la surface des microélectrodes bifonctionnalisées, en utilisant les trois méthodes

décrites précédemment, dans un mélange de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de l'anticorps Ab-TC et de concentrations décroissantes de la solution étalon de la TC de 1000 à $0,1 \text{ pg.mL}^{-1}$ pendant 30 min à 4°C . La Figure **II.22(A-C)** montre les demi-cercles des diagrammes de Nyquist obtenus pour les trois fonctionnalisations adoptées dans ce travail. Nous pouvons noter que pour les trois approches, les demi-cercles des diagrammes de Nyquist augmentent en diminuant les concentrations de la TC. Comme attendu, la diminution de la concentration de cette dernière produit une augmentation de la résistance du transfert de charge due à la présence des anticorps libres réagissant avec les TC immobilisées sur la surface des microélectrodes.

Un excellent ajustement entre les spectres simulés et expérimentaux a été obtenu pour chaque concentration de la TC en utilisant le circuit équivalent de Randles montré dans l'encart de la Figure **II.22(D)**. Pour chaque concentration de TC, la valeur de $\Delta R/R_0$ a été calculée. Les données normalisées montrent trois équations linéaires : $y = -0,208 x + 0,960$, $y = -0,148 x + 0,578$ et $y = -0,109 x + 0,474$ avec des coefficients de déterminations de $0,962$, $0,986$ et $0,946$, pour les trois méthodes de fonctionnalisation 1, 2 et 3 respectivement. Comme nous pouvons remarquer sur cette figure, la sensibilité de détection a été fortement améliorée dans le cas de la modification de la surface d'or par les PPy/PPy-COOH/MNP (méthodes 3). Pour cette approche, les biocapteurs développés ont fourni une meilleure sensibilité de $0,208 \text{ mL.pg}^{-1}$ avec une limite de détection (LD) de $1,2 \text{ pg.mL}^{-1}$ [21]. Il est intéressant de noter que cette LD est 83000 fois inférieure à la limite maximale de résidus (LMR) de la TC dans le miel, fixée par la réglementation Européenne.

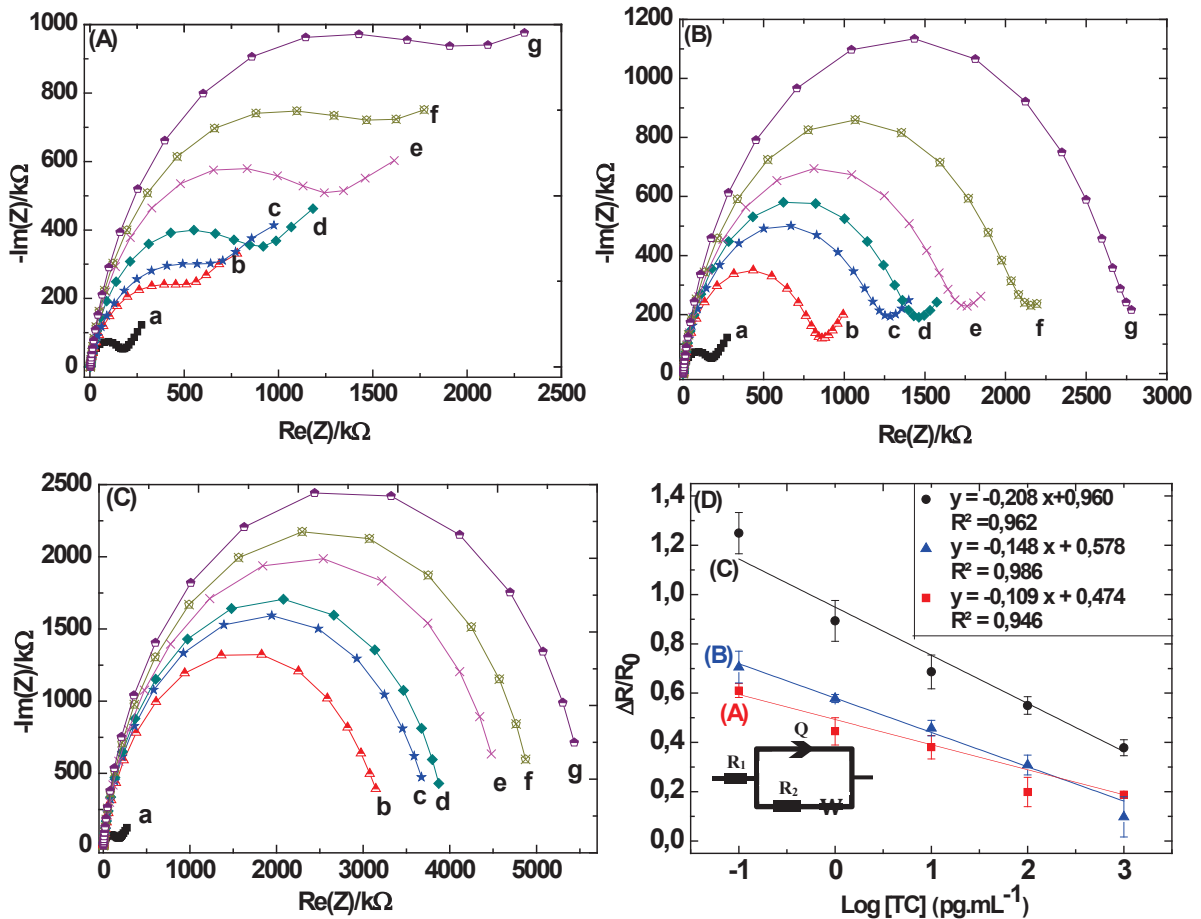


Figure II.22: Diagrammes de Nyquist de la détection compétitive de la TC sur les microélectrodes fonctionnalisées par: (A) méthode 1, (B) méthode 2, (C) méthode 3, avec (a) or nu, (b) après dépôt de $100 \mu g.mL^{-1}$ de la TC, (c-g) après détection compétitive séquentielle de la TC à 1000, 100, 10, 1 et $0,1 pg.mL^{-1}$, respectivement, (D) sensibilités des biocapteurs obtenues par la normalisation des données des diagrammes de Nyquist, en encart: circuit équivalent utilisé pour le montage SIE.

En outre, en se référant à la littérature existante, il s'est avéré que nous avons pu développer le premier immunocapteur dédié à la détection des résidus de la TC dans le miel. La comparaison entre la LD de la TC trouvée et celles obtenues dans la littérature est présentée dans le Tableau II.3 [22-29]. Ce dernier montre que notre biocapteur fournit une faible LD ($0,0012 ng.mL^{-1}$) dans une large gamme de concentrations, en comparaison avec les résultats trouvés par d'autres immunocapteurs [28,29]. Par ailleurs, des techniques récemment développés [23,26] présentent aussi des LD relativement faibles ($0,01$ et $0,006 ng.mL^{-1}$) mais elles restent supérieures à celle trouvée par notre immunocapteur.

Tableau II.3 : Comparaison de différentes méthodes de détection de la tétracycline.

Méthode	Gamme de linéarité (ng.mL ⁻¹)	LD (ng.mL ⁻¹)	Milieux réels	Référence
Chromatographie en phase liquide à haute performance	15-5000	5	Lait	[22]
Capteur photoélectrochimique	0,2-1000,0	0,01	Médicament	[23]
Spectroscopie térahertz	0-2×10 ⁷	0,45	Eau et lait	[24]
ELISA	0,26–2,00	15	Lait et miel	[25]
Dosage immunologique	0,05-100	0,006	Miel, lait et cacahuète	[26]
Capteurs à base de polymères à empreintes moléculaires	0,0001-10	0,1×10 ⁻⁶	Miel	[27]
Immunocapteur électrochimique à base de nanoparticules magnétiques de chitosane	0,08-1,00	0,03	Lait	[28]
Immunocapteur ampérométrique	0,0005 -500	0,86	Lait	[29]
Notre immunocapteur	0,0001-1	0,0012	Miel	[21]

II.5.4. Sélectivité de l'immunocapteur

La sélectivité de ce biocapteur a été étudiée en présence de divers antibiotiques de la même famille des cyclines pouvant avoir une réaction croisée avec l'anticorps Ab-TC. Cette étude a été réalisée en comparant les réponses de la détection de la TC avec trois molécules analogues, à savoir le chlortétracycline (CT), la doxycycline (DXy) et l'oxytétracycline (OXy). Des mesures par la SIE ont été réalisées en utilisant le processus expérimental avéré plus sensible et qui est basé sur la fonctionnalisation par les PPy/PPy-COOH/MNP/TC (méthode 3), avec une détection compétitive séquentielle dans la même gamme de concentrations de 1000 à 0,1 pg.mL⁻¹. Pour les trois interférents, nous avons obtenu des courbes d'étalonnage avec une pente plus faible par rapport à la TC, (Figure II.23). Nous pouvons ainsi conclure que cet immunocapteur présente une bonne sélectivité pour la TC.

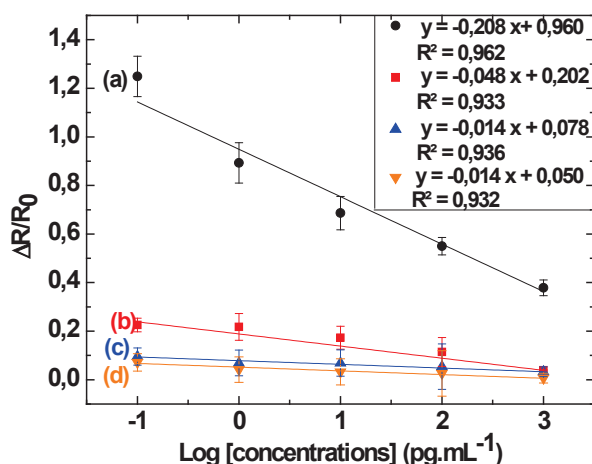


Figure II.23: Courbes d'étalonnage pour la détection de (a) TC, (b) DXy, (c) CT, (d) OXy.

II.5.5. Application dans le miel

II.5.5.1. Méthode de recouvrement

Le dosage de la TC dans le milieu réel a été effectuée dans un miel pur préparé suivant le procédé décrit dans le paragraphe II.4.6.1. Ces échantillons sont ensuite dilués 10 fois par le PBS (pH 7,4) et enrichis par des mélanges standards de la TC et de l'anticorps Ab-TC pour atteindre des concentrations finales dans la gamme dynamique précédemment décrite. Les résultats de ce test sont présentés dans le Tableau II.4, indiquant que la teneur en TC peut être déterminée avec succès par le biais de l'immunocapteur développé avec des bons taux de recouvrements variant de 80% à 98% et des RSD compris entre 1 et 6%.

Tableau II.4: Détermination de la TC dans les échantillons de miel enrichis.

Échantillon	C _{ajoutée} (pg.mL ⁻¹)	C _{trouvée} (pg.mL ⁻¹)	Recouvrement (%)	RSD (%)
1	1000,0	951,40	95	2
2	100,0	79,80	80	2
3	10,0	9,50	95	6
4	1,0	0,98	98	1

II.5.5.2. Méthode des ajouts dosés

Après avoir confirmé la possibilité d'exploitation du présent immunocapteur pour le dosage des résidus de la TC dans le miel, la méthode des ajouts dosés a été utilisée afin de déterminer la concentration de la TC dans un échantillon de miel à titre inconnu. La détection compétitive séquentielle de cet analyte dans ce miel a été réalisée par ajout d'un mélange de différentes solutions standards de la TC à des concentrations finales de 3, 5, 10, 15 pg.mL⁻¹, en

présence de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de l'anticorps Ab-TC. Selon la Figure II.24 (a), l'intersection de l'extrapolation de la droite obtenue avec l'axe des abscisses permet de déterminer la concentration de la TC dans l'échantillon de miel à titre inconnu qui est de $25,2 \text{ pg.mL}^{-1}$. Par ailleurs, le test négatif effectué en présence de l'anticorps non spécifique Ab-155 (Figure II.24 (b)) a révélé la non sensibilité de ce dernier vis-à-vis de la TC, en comparaison avec le résultat trouvé en présence de l'anticorps Ab-TC.

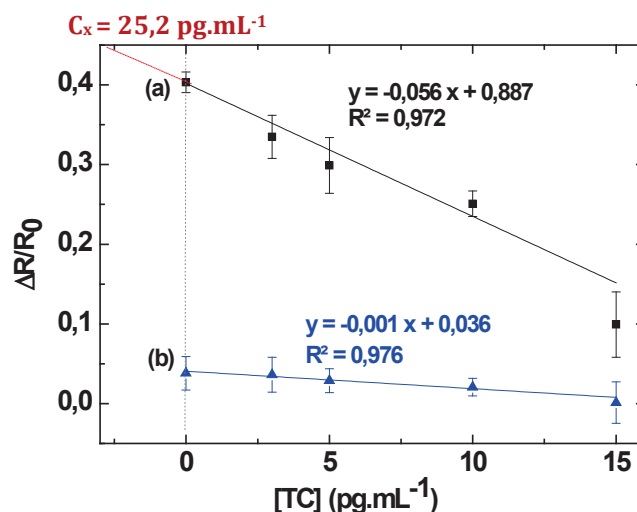


Figure II.24: Normalisation des données SIE montrant la variation linéaire de $\Delta R/R_0$ en fonction des concentrations de la TC dans le miel, par utilisation des anticorps : (a) Ab-TC, (b) Ab-155.

II.6. Récapitulatif

Dans ce chapitre, des structures dites Bio-MEMS basées sur des microélectrodes en or ont été utilisées dans le but de développer des immunocapteurs impédimétriques pour la détection des résidus de la SPy et de la TC dans le miel. La première partie de ce travail porte sur la fabrication d'un immunocapteur basé sur l'exploitation d'une nouvelle structure de nanoparticules magnétiques revêtues du copolymère poly(acide pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylique), choisies pour leur réseau d'immobilisation tridimensionnel ainsi que pour leur stabilité pendant de longues durées. Afin de vérifier la bonne fonctionnalisation des microélectrodes d'or par ces nanoparticules, une caractérisation par l'AFM a été réalisée, suivie par des mesures électrochimiques utilisant la voltammétrie cyclique et la spectroscopie d'impédance électrochimique. La quantification de la SPy a été réalisée par une immunorecognition compétitive en utilisant son analogue structurel synthétique qui est la SA2-BSA vis-à-vis de l'anticorps polyclonal spécifique Ab-155.

Dans des conditions optimisées, cet immunocapteur a fourni une sensibilité élevée de $0,067 \text{ L.ng}^{-1}$ et une limite de détection de $0,4 \text{ ng.L}^{-1}$, ainsi qu'une haute sélectivité pour la

SPy, en comparaison avec d'autres molécules interférentes, à savoir la SDz, STz et SMz. De plus, le biocapteur proposé offre une grande fiabilité pour la détection de faibles concentrations de la SPy dans des échantillons de miel.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons discuté le processus de développement d'un nouvel immunocapteur sensible et hautement sélectif basé sur des réseaux d'immobilisation à 2D et à 3D pour la détection des résidus de la TC dans le miel. Ce biocapteur a été développé, à l'instar du précédent, sur les microélectrodes d'or du système Bio-MEMS, fonctionnalisées d'une part par le sel de diazonium et d'autre part, par les nanoparticules magnétiques revêtues par le copolymère PPy/PPy-COOH. La TC a été quantifiée par une procédure de détection compétitive séquentielle entre l'analyte immobilisé sur la surface des microélectrodes et celui en solution avec l'anticorps Ab-TC. Une lithographie douce appelée impression par microcontact, suivie d'une caractérisation par microscopie fluorescente, a été ensuite appliquée afin de s'assurer du bon déroulement de la réaction immune sur la surface des microélectrodes. La sensibilité de ces systèmes a été vérifiée par des mesures de la SIE pour chaque fonctionnalisation. Une meilleure sensibilité a été trouvée pour la fonctionnalisation par les PPy/PPy-COOH/MNP, avec une limite de détection de $1,2 \text{ pg.mL}^{-1}$. La spécificité de cet immunocapteur a été testée en présence des molécules analogues à la TC telles que le chlortétracycline, la doxycycline et l'oxytétracycline. L'application dans le milieu réel qui est le miel a été validée à des taux de recouvrement variant entre 80% et 98% et à un écart-type compris entre 1% et 6% avec toutefois une bonne sensibilité de détection dans un échantillon de miel à titre inconnu par la méthode des ajouts dosés.

La simplicité et la miniaturisation de ces immunocapteurs ont ouvert la voie à des utilisations diverses, simples et peu coûteuses pour le contrôle, non seulement pour la détection des résidus de la SPy et de la TC, mais aussi pour la détection d'autres contaminants des produits alimentaires à l'échelle industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. Cheong, P. Hajeb, S. Jinap, I. Fitry, Sulfonamides determination in chicken meat products from Malaysia, *Int. Food Res. J.* 17 (2010) 885–892.
- [2] R. Galarini, F. Diana, S. Moretti, B. Puppini, G. Saluti, L. Persic, Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed, *Food Control.* 35 (2014) 300–310.
- [3] W. Jiang, Z. Wang, R.C. Beier, H. Jiang, Y. Wu, J. Shen, Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide residues in milk by a dual-Colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1995–1999.
- [4] Y. Zhang, X. Liu, X. Li, J. Zhang, Y. Cao, M. Su, Z. Shi, H. Sun, Rapid screening and quantification of multi-class multi-residue veterinary drugs in royal jelly by ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Food Control.* 60 (2016) 667–676.
- [5] A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.Á. Rodríguez-Delgado, Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 130–137.
- [6] M.D. Joshi, J.L. Anderson, Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry, *Rsc Adv.* 2 (2012) 5470–5484.
- [7] S.G. Dmitrienko, E.V. Kochuk, V.V. Apyari, V.V. Tolmacheva, Y.A. Zolotov, Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review, *Anal. Chim. Acta.* 850 (2014) 6–25.
- [8] E.T. Tenório-Neto, A. Baraket, D. Kabbaj, N. Zine, A. Errachid, H. Fessi, M.H. Kunita, A. Elaissari, Submicron magnetic core conducting polypyrrole polymer shell: Preparation and characterization, *Mater. Sci. Eng. C.* 61 (2016) 688–694.
- [9] F. Conzuelo, L. Stratmann, S. Grützke, J.M. Pingarrón, W. Schuhmann, Detection and quantification of sulfonamide antibiotic residues in milk using scanning electrochemical microscopy, *Electroanalysis.* 26 (2014) 481–487.
- [10] N.E.A.E. Hassani, A. Baraket, E.T.T. Neto, M. Lee, J.-P. Salvador, M. Marco, J. Bausells, N.E. Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine, Novel strategy for sulfapyridine detection using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS: Application to honey analysis, *Biosens. Bioelectron.* 93 (2017) 282–288.
- [11] W.-H. Tsai, H.-Y. Chuang, H.-H. Chen, Y.-W. Wu, S.-H. Cheng, T.-C. Huang, Application of sugaring-out extraction for the determination of sulfonamides in honey by high-

performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7812–7815.

[12] A. Iglesias, C. Nebot, J.M. Miranda, B.I. Vázquez, A. Cepeda, Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 3235–3249.

[13] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk, *Anal. Chim. Acta.* 737 (2012) 29–36.

[14] B. Liu, H.T. Lian, J.F. Yin, X.Y. Sun, Dopamine molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene–chitosan composite, *Electrochimica Acta.* 75 (2012) 108–114.

[15] A. Muriano, D.-G. Pinacho, V. Chabottaux, J.-M. Diserens, B. Granier, S. Stead, F.S. Baeza, M.I. Pividori, M.-P. Marco, A portable electrochemical magnetoimmunosensor for detection of sulfonamide antimicrobials in honey, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7885–7895.

[16] E. Valera, A. Muriano, I. Pividori, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, Development of a Coulombimetric immunosensor based on specific antibodies labeled with CdS nanoparticles for sulfonamide antibiotic residues analysis and its application to honey samples, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 211–217.

[17] S.M. Ghoreishi, M. Behpour, A. Khoobi, S. Masoum, Application of experimental design for quantification and voltammetric studies of sulfapyridine based on a nanostructure electrochemical sensor, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) 3156–3166.

[18] Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC.

[19] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 5883–5884.

[20] A. Kumar, G.M. Whitesides, Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching, *Appl. Phys. Lett.* 63 (1993) 2002–2004.

[21] N. El Alami El Hassani, A. Baraket, S. Boudjaoui, E.T.T. Neto, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine, Development and application of a novel

electrochemical immunosensor for tetracycline screening in honey using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS, *Biosens. Bioelectron.* 130 (2018) 330-337.

[22] I.D. Kargin, L.S. Sokolova, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun, HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk with post-column derivatization and fluorescence detection, *Inorg. Mater.* 52 (2016) 1365–1369.

[23] Q. Han, R. Wang, B. Xing, H. Chi, D. Wu, Q. Wei, Label-free photoelectrochemical aptasensor for tetracycline detection based on cerium doped CdS sensitized BiYWO₆, *Biosens. Bioelectron.* 106 (2018) 7–13.

[24] J. Qin, L. Xie, Y. Ying, Rapid analysis of tetracycline hydrochloride solution by attenuated total reflection terahertz time-domain spectroscopy, *Food Chem.* 224 (2017) 262–269.

[25] Y. Chen, D. Kong, L. Liu, S. Song, H. Kuang, C. Xu, Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody, *Food Anal. Methods.* 9 (2016) 905–914.

[26] X. Que, X. Chen, L. Fu, W. Lai, J. Zhuang, G. Chen, D. Tang, Platinum-catalyzed hydrogen evolution reaction for sensitive electrochemical immunoassay of tetracycline residues, *J. Electroanal. Chem.* 704 (2013) 111–117.

[27] M. Bougrini, A. Florea, C. Cristea, R. Sandulescu, F. Vocanson, A. Errachid, B. Bouchikhi, N. El Bari, N. Jaffrezic-Renault, Development of a novel sensitive molecularly imprinted polymer sensor based on electropolymerization of a microporous-metal-organic framework for tetracycline detection in honey. *Food Control.* 59 (2016) 424–429.

[28] X. Liu, S. Zheng, Y. Hu, Z. Li, F. Luo, Z. He, Electrochemical immunosensor based on the chitosan-magnetic nanoparticles for detection of tetracycline, *Food Anal. Methods.* 9 (2016) 2972–2978.

[29] F. Conzuelo, S. Campuzano, M. Gamella, D.G. Pinacho, A.J. Reviejo, M.P. Marco, J.M. Pingarrón, Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 100–105.

CHAPITRE III

**DÉVELOPPEMENT DES CAPTEURS
ÉLECTROCHIMIQUES À BASE DE POLYMÈRES À
EMPREINTES MOLÉCULAIRES POUR LA
DÉTECTION DE LA SULFAGUANIDINE, DE LA
DOXYCYCLINE ET DU CHLORAMPHÉNICOL
DANS LE MIEL**

III.1. Introduction

La détection des contaminants alimentaires à de faibles concentrations nécessite des étapes de préparation d'échantillons efficaces appuyées sur une série de méthodes d'analyse notamment les techniques chromatographiques telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse [1,2], la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [3–5] ou la fluorométrie couplée à des méthodes chromatographiques [6–8]. Par ailleurs, d'autres techniques réalisées ont également été utilisées pour détecter des traces de contaminants, parmi lesquels nous trouvons l'électrophorèse capillaire [9,10], la spectrophotométrie [11] et l'immunodosage enzymatique [12,13]. La plupart de ces méthodes sont coûteuses, nécessitant un long temps d'exécution et une grande consommation de réactifs, ce qui limite leurs utilisations dans les laboratoires d'analyse et de contrôle de la qualité des denrées alimentaires.

Dans nos précédents travaux, nous avons déjà mis au point de nouveaux immunocapteurs électrochimiques dédiés à la détection de la sulfapyridine et de la tétracycline dans le miel [14,15]. L'avantage de ces techniques immunochimiques réside dans la haute spécificité des anticorps, mais à un coût très élevé, d'où le recours à des méthodes capables d'imiter le rôle des anticorps afin de reconnaître sélectivement une molécule cible. L'une de ces approches consiste à utiliser les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) car ils présentent des avantages certains pour la technologie des capteurs, à savoir la simplicité, la stabilité à des pH et à des températures extrêmes, ainsi que la réutilisabilité de ces capteurs qui revient à un faible coût [16].

Le but de ce chapitre est de développer des systèmes à base de MIPs sensibles et sélectifs envers les résidus de certains antibiotiques notamment la sulfaguanidine (SG), la doxycycline (DXy) et le chloramphénicol (CAP) pour le contrôle de la qualité du miel.

III.2. Dispositif expérimental

Les différents travaux de ce chapitre ont été réalisés sur des dispositifs sérigraphiés en or (Au-SPE) ayant une électrode de travail en or de diamètre 2,56 mm, une électrode auxiliaire en or et une pseudo-référence en argent. Les Au-SPE ont été connectés à un potentiostat portable relié à un ordinateur par le logiciel PStace5.2 permettant ainsi de collecter et de stocker automatiquement les réponses des capteurs.

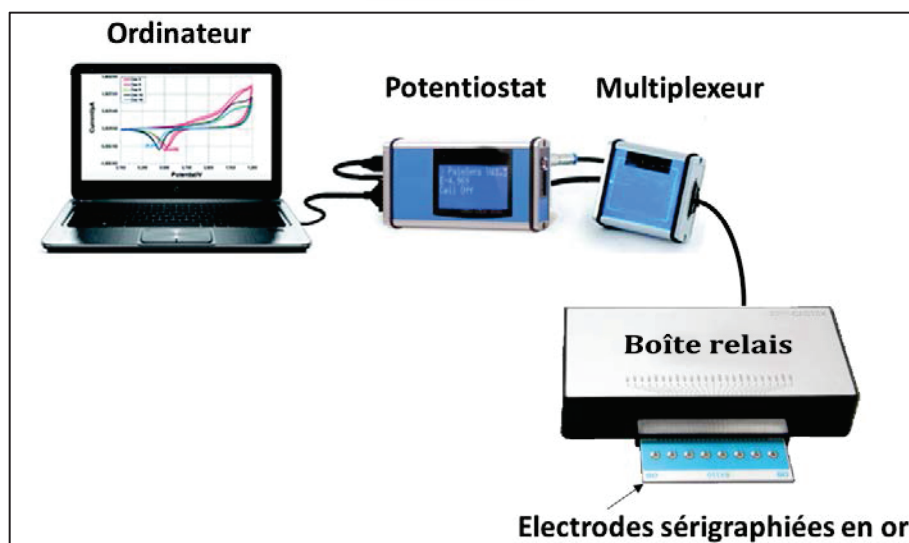


Figure III.1: Représentation schématique du dispositif expérimental.

III.3. Développement d'un capteur à base des polymères à empreintes moléculaires pour la détection de la sulfaguanidine dans le miel

La sulfaguanidine (SG) est un antibiotique de la famille des sulfonamides, utilisé pour traiter et prévenir les infections bactériennes en inhibant la conversion de l'acide para-aminobenzoïque (le substrat essentiel pour la croissance de certaines bactéries) en acide tétrahydrofolique [17]. Dans ce qui suit, nous présentons les étapes et les résultats du développement d'un capteur MIP dédié à la détection des résidus de cet antibiotique dans le miel.

III.3.1. Protocole expérimental

Avant de commencer la préparation du capteur MIP, la surface des Au-SPE a été nettoyée par trois fois un lavage à l'éthanol (99,8%), puis par un rinçage à l'eau distillée et par séchage sous un flux d'azote. Ensuite, le polymère à empreintes de la SG a été fabriqué par une polymérisation électrochimique. Un choix judicieux du monomère fonctionnel est crucial pour réussir cette étape dans le but de créer une grande affinité entre la molécule cible et le polymère. Ainsi, un mélange contenant de l'acrylamide (AAM) à 1 M qui est le monomère fonctionnel, du N,N'-méthylène bis-acrylamide (NNMBA) à 0,07 M utilisé comme un agent de réticulation et de la SG à 0,05 M qui est la molécule cible, a été effectué. Le tout a été préparé dans l'acétonitrile en présence d'un électrolyte à base du fluorure de tétra-n-butylammonium (TBAFB ; 0,1 M). Cette étape a été effectuée par la voltammétrie cyclique (VC) pendant treize cycles dans une plage de potentiels entre -0,2 et 0,3 V avec une vitesse de balayage de 20 mV.s⁻¹. La Figure III.2 montre les voltammogrammes cycliques obtenus pendant la polymérisation

de l'AAM, indiquant que le courant diminue progressivement à chaque cycle de balayage, en raison de la formation continue du composite polyacrylamide (PAM)/SG. Ce film formé, obstrue donc le transfert d'électrons de la sonde d'oxydoréduction $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ vers la surface des électrodes d'or et inversement.

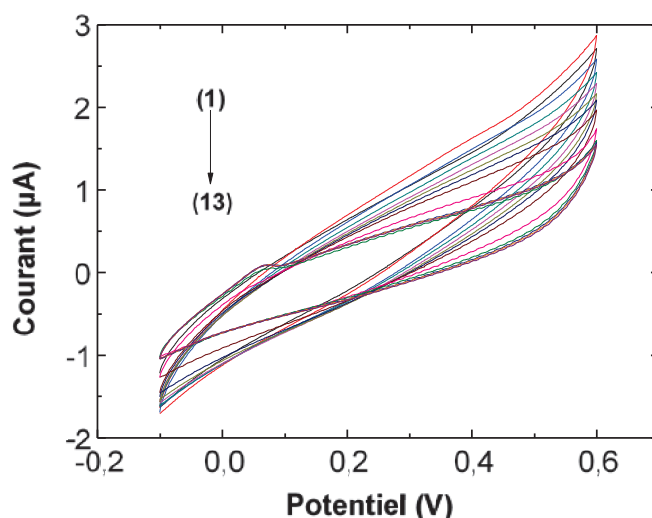


Figure III.2: Voltammogrammes cycliques du procédé d'électro-polymérisation du film de MIP.

Ensuite, les sites spécifiques de la SG ont été formés par extraction de celle-ci à l'aide d'un lavage du film dans l'acétonitrile contenant le TBAFB (0,1 M) en appliquant simultanément un potentiel constant de 0,4 V pendant 5 min. Ce type de lavage a été réalisé afin de faciliter la libération de la SG par un gonflement du film. De même, la sensibilité de ce système a été étudiée par un polymère sans empreintes moléculaires appelé (*Non-imprinted polymer* NIP) qui a été fabriqué d'une manière similaire à la préparation du MIP, mais en absence de la SG dans le mélange de polymérisation.

La Figure III.3(A) résume les étapes de la formation du composite PAM/SG sur une électrode d'or. Quant à la Figure III.3(B), elle illustre le mécanisme de formation du composite PAM/SG, montrant que la SG et l'AAM ont interagi avant la polymérisation par des liaisons hydrogènes entre les groupes méthyles de l'AAM et les groupes amines de la SG.

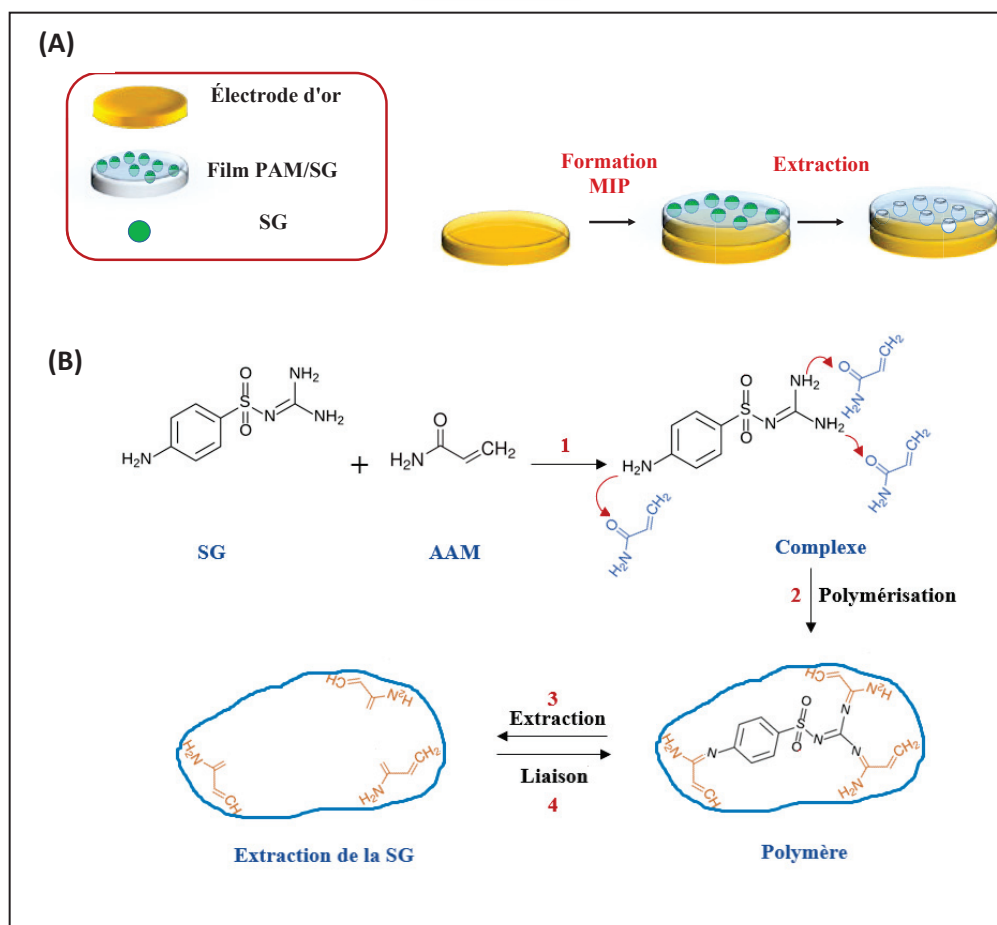


Figure III.3: (A) Étapes de préparation du capteur MIP, (B) schéma du processus chimique de la formation du composite PAM/SG.

III.3.1.1. Caractérisations morphologiques et chimiques

La caractérisation morphologique et chimique de la surface du capteur MIP à différentes étapes de fabrication a été examinée par deux techniques, à savoir : la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et la microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une analyse par spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX). Ces caractérisations ont été réalisées au sein de « *Institute of Non-ferrous and Rare Metals* » (IMNR) à Bucarest en Roumanie.

L'analyse par FT-IR a été réalisée à température ambiante par un spectrophotomètre FT-IR HATR de la marque ABB, MB3000, Canada. Les spectres ont été effectués en mode de transmission dans un intervalle de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ avec une résolution de 4 cm^{-1} . La Figure III.4 montre les spectres de l'analyse par FT-IR collectés au cours du processus de préparation du capteur impliquant les profils d'absorption relatifs à l'or nu (Figure IV.4(A)), à la couche PAM/SG (Figure III.4(B)) et au film du PAM après extraction de la SG (Figure III.4(C)).

D'après ces profils, la présence de la SG dans la matrice du polymère a été mise en évidence par des liaisons C=N manifestées à des nombres d'ondes vers 1620 cm^{-1} et 1651 cm^{-1} [18], par un cycle benzène substitué à un nombre d'ondes de 825 cm^{-1} et par des liaisons d'étirement symétriques du O=S=O à 1132 cm^{-1} [19]. Cependant, les liaisons -CNS de la molécule SG et les amines secondaires non attachées au film du polymère ont été apparues à 1520 cm^{-1} et 3362 cm^{-1} , respectivement [20]. Quant aux fonctions amides introduites à la fois par le monomère et par le réticulant, elles ont montré des liaisons d'absorption à 3294 cm^{-1} et à 968 cm^{-1} relatives aux vibrations d'étirement N-H et C-H, respectivement [19].

De même, l'extraction de la SG a impliqué l'absence de toutes les bandes d'absorption décrites précédemment à l'exception de celle du film du PAM. Par conséquent, cette caractérisation microscopique a été efficacement adaptée pour affirmer que la SG a été incorporée avec succès et complètement éliminée de la matrice du polymère, formant des cavités spécifiques à sa structure.

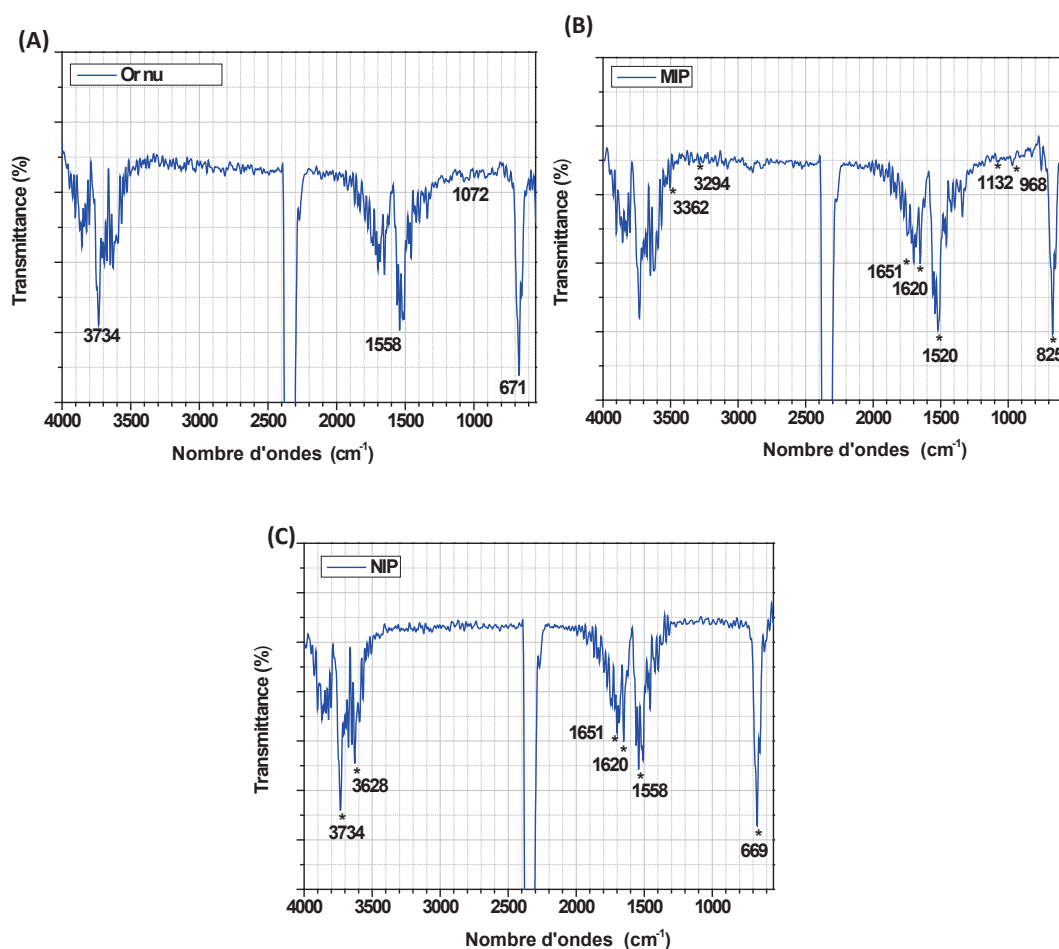


Figure III.4: Spectres de la spectroscopie FT-IR de l'électrode d'or (A) nue, (B) modifiée par le film PAM/SG (MIP), (C) après extraction de la SG (NIP).

Par ailleurs, la morphologie de la surface des électrodes durant les différentes modifications a été réalisée par la technique de la MEB (Figure III.5). Comme ce qui a été illustré dans cette figure, les électrodes d'or sont typiquement caractérisées par une surface rugueuse avec une structure microporeuse (Figure III.5 (A)). La modification de la surface des électrodes par la SG incorporée dans une matrice de PAM a été observée dans la Figure III.5 (B) montrant une homogénéité de dépôt à la surface de l'électrode, ce qui confirme la bonne immobilisation de la couche PAM/SG. L'extraction de la SG a été confirmée par la disparition de cet analyte avec la création de cavités plus au moins atypiques relatives aux capteurs MIP fabriqués par une approche non-covalente (Figure III.5 (C)). Cette constatation indique que la fabrication du capteur MIP a été réalisée avec succès.

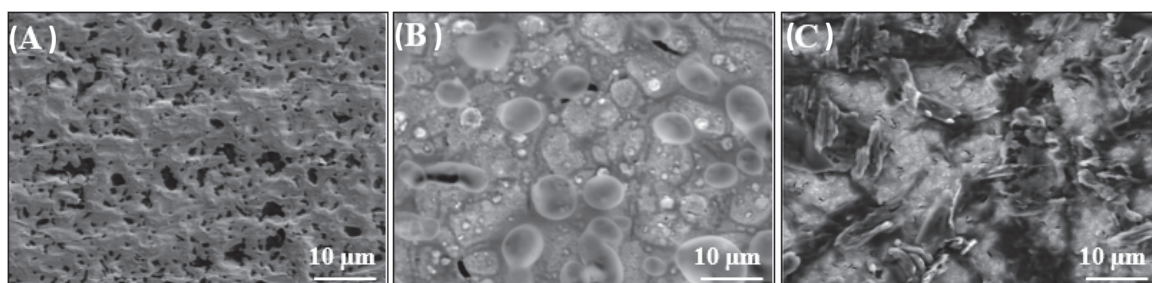


Figure III.5: Images MEB de l'électrode d'or (A) nue, (B) modifiée par le film PAM/SG, (C) après extraction de la SG.

En outre, la caractérisation chimique de la surface des électrodes a été réalisée par spectroscopie aux rayons X à dispersion d'énergie (EDX). La Figure III.6 représente les spectres EDX obtenus à partir des différentes modifications des électrodes, ainsi que celle de la surface de l'or nu (La Figure III.6(A)) présentant deux pics liés aux atomes Au et Al provenant du précurseur intermétallique or-aluminium (AuAl_2) utilisé pour fabriquer des surfaces d'or hautement poreuses. La formation du film PAM/SG est représentée dans la Figure III.6(B), montrant l'apparition des pics des atomes S, N, O et C relatifs à la SG et au PAM/SG, tandis que l'atome Cl est attribué aux traces du HCl utilisé pour solubiliser la SG. Après l'extraction de la matrice, nous avons obtenu le spectre EDX présenté dans la Figure III.6(C) dans laquelle nous remarquons une disparition des pics des atomes S et Cl, ce qui confirme l'extraction de la SG de la matrice du polymère.

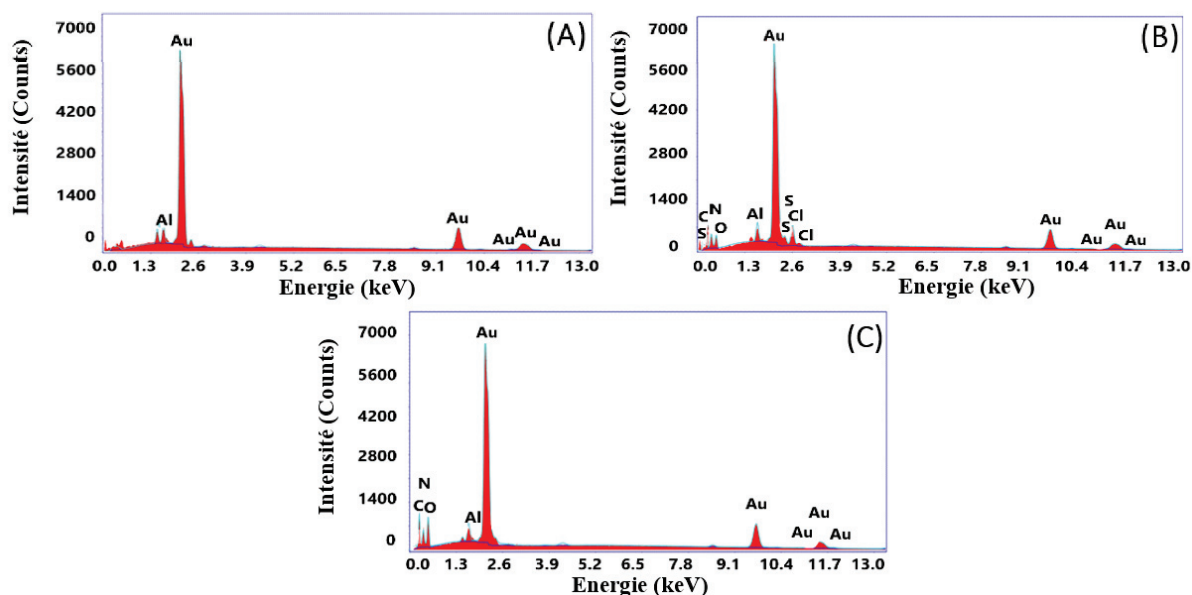


Figure III.6: Spectres EDX de l'électrode d'or : (A) nue, (B) modifiée par le film PAM/SG, (C) après extraction de la SG.

III.3.1.2. Caractérisations électrochimiques

Pour vérifier le processus de fabrication du capteur MIP, les différentes modifications de la surface des électrodes ont été suivies en utilisant une caractérisation électrochimique par la voltammétrie cyclique (VC) et par la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) à température ambiante. Ces mesures ont été effectuées dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) préparée dans le tampon PBS (pH 7,4). Les mesures par VC ont été établies dans une gamme de potentiels entre -0,4 et +0,6 V à une vitesse de balayage de $30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Cependant, les mesures par SIE ont été réalisées dans une gamme de fréquences entre 0,1 et 50 000 Hz avec un potentiel continu de 0,35 V/ref et avec un potentiel alternatif de 10 mV. La détection de la SG a été effectuée par la voltammétrie différentielle pulsée (VDP) entre -0,1 et +0,2 V avec une vitesse de balayage de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et un temps d'impulsion de 0,1 s.

Les réponses de la SIE sont présentées dans la Figure III.7 (A) sous forme de diagrammes de Nyquist. Comme nous pouvons le remarquer sur cette figure, les électrodes d'or non fonctionnalisées montrent un demi-cercle aplati comparé à celui des électrodes fonctionnalisées. Ceci montre qu'il y a une modification de la surface par le film PAM/SG qui obstrue le transfert d'électrons de la sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ vers la surface des électrodes et inversement. La Figure III.7 (B) représente le résultat de la caractérisation de la surface des électrodes par la VC après les différentes modifications effectuées. Les voltammogrammes obtenus ont montré une séparation élevée entre les pics de courant d'oxydation et de réduction

de l'électrode d'or nu et après ses différentes modifications, ce qui prouve l'augmentation de la résistance de transfert de charges comme précédemment trouvée par la SIE.

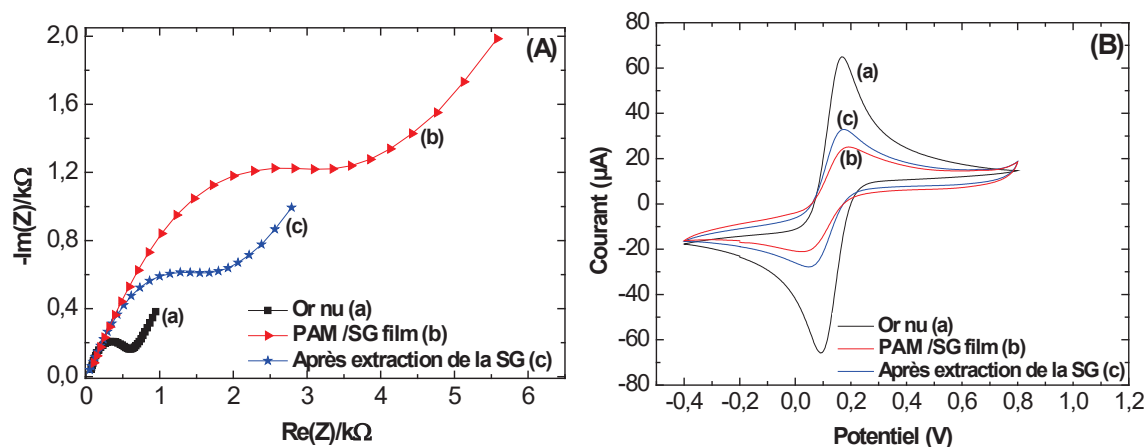


Figure III.7: (A) Diagrammes de Nyquist et (B) voltammogrammes cycliques relatifs aux différentes étapes de fabrication du capteur MIP.

III.3.2. Optimisation de la concentration du monomère et du temps d'extraction

Les performances du capteur MIP ont été optimisées dans ce travail via les paramètres qui ont une influence sur son fonctionnement telles que la concentration du monomère et le temps d'extraction de la SG. Il est à noter que quand un paramètre est modifié, les autres paramètres sont fixés à leurs valeurs optimales. La concentration de l'AAM a été optimisée dans un intervalle de concentration entre 0,1 et 1,0 M (Figure III.8). Le résultat obtenu indique que le pic de courant d'oxydation régénéré à partir des mesures par la VC diminue avec l'augmentation de la concentration du monomère jusqu'à la concentration 0,7 M, puis continue à diminuer légèrement de 0,7 à 1,0 M. Ce phénomène s'explique par la croissance du polymère sur la surface des électrodes. Par conséquent, une polymérisation optimale sera effectuée en adoptant la concentration 1 M du monomère AAM.

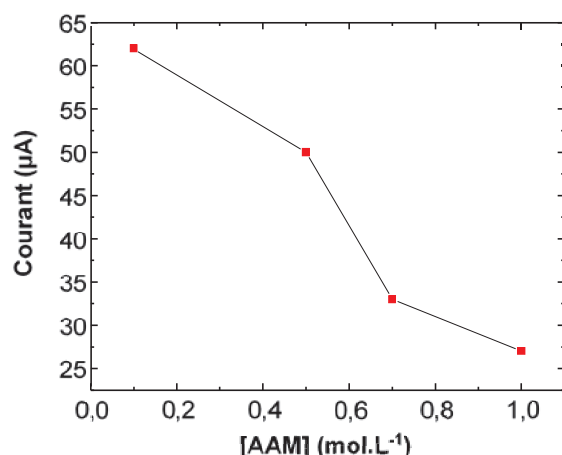


Figure III.8 : Effet de la concentration du monomère AAM sur la réponse du capteur MIP.

Quant au procédé d'extraction, la SG a été retirée de la matrice du polymère par un potentiel fixe pendant des durées comprises entre 1 et 5 min. La Figure III.9 illustre les résultats obtenus dans ce sens, montrant que les pics de courant des voltammogrammes cycliques augmentent proportionnellement avec le temps d'extraction de 1 à 5 min, puis ils se stabilisent. Le temps d'extraction optimal dans cette étude a été fixé donc à 5 min.

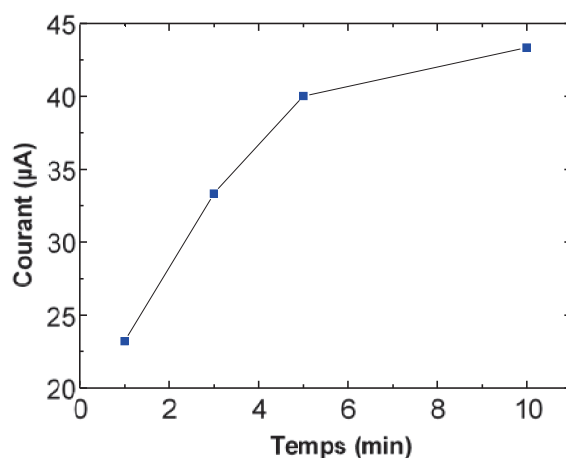


Figure III.9: Effet du temps d'extraction de la SG sur la réponse du capteur MIP.

III.3.3. Réponses électrochimiques des capteurs

La détection de la SG a été réalisée par le dépôt de ses solutions standards à différentes concentrations sur la surface des électrodes modifiées. En outre, des mesures par la VDP et la SIE ont été réalisées. Les voltammogrammes d'impulsions différentielles correspondant aux différentes concentrations de la SG ont été présentés dans la Figure III.10 (A). Nous pouvons remarquer dans cette figure que l'augmentation des concentrations de la SG induit une diminution des pics de courant liés au potentiel d'oxydation de l'électrolyte, ce qui explique le

remplissage des cavités par la molécule cible. Par ailleurs, la Figure III.10 (B) représente les résultats des mesures par VDP pendant la détection de la SG par le NIP. Comme nous pouvons le constater, l'intensité de courant du pic d'oxydation reste quasiment inchangée pour les différentes concentrations de la SG, ce qui confirme l'absence des cavités spécifiques capables de reconnaître la SG, d'où l'absence de la sensibilité du capteur à base du NIP. La corrélation entre les pics de courant et leurs concentrations correspondantes dans une gamme de 0,1 à 1000 pg.mL^{-1} est illustrée dans la Figure III.10 (C). Les courbes de calibration du MIP et du NIP, ont de bonnes linéarités avec des coefficients de détermination de 0,972 et 0,928, respectivement. En outre, la sensibilité élevée du capteur MIP d'une valeur $0,063 \text{ mL.pg}^{-1}$ a été observée par rapport à celle du NIP ($0,016 \text{ mL.pg}^{-1}$), révélant que la réponse électrochimique résultante ne dépend pas de l'interaction non spécifique entre le polymère et la SG.

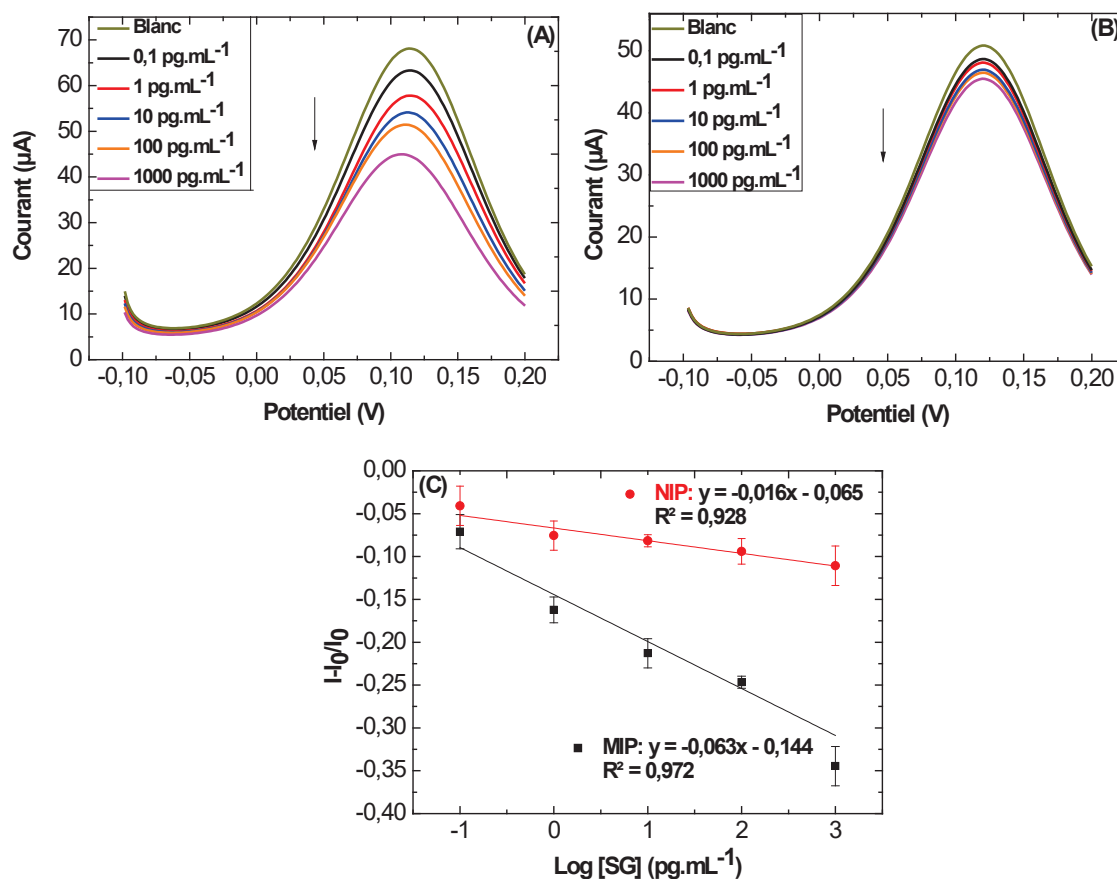


Figure III.10 : Voltammogrammes d'impulsions différentielles obtenus après détection de la SG à différentes concentrations sur (A) MIP, (B) NIP, (C) Courbes d'étalonnage correspondantes.

En plus, la méthode SIE a été réalisée pour étudier davantage les réponses de ce capteur, en particulier pour obtenir des informations subtiles sur les changements d'impédance au cours de la détection de l'analyte. La quantification de la SG à diverses concentrations est représentée dans la Figure **III.11 (A-B)**. Les demi-cercles des diagrammes de Nyquist correspondent à la résistance de transfert de charge (R_{ct}) après immersion des capteurs MIP et NIP dans les différentes concentrations de la SG. La Figure **III.11 (A)** montre l'augmentation substantielle des valeurs de la R_{ct} avec l'augmentation de la concentration en analyte, ce qui confirme le remplissage des cavités spécifiques par la molécule cible. En revanche, la Figure **III.11 (B)** montre les résultats du capteur NIP, présentant des valeurs de la R_{ct} presque inchangées, ce qui révèle l'interaction minimale et non spécifique existante entre le polymère et la SG. Les demi-cercles de la courbe de Nyquist ont été parfaitement ajustés par le logiciel PSTrace 5.2 en utilisant le circuit équivalent montré dans l'encart de la Figure **III.11 (C)**. Le rapport $\Delta R/R_0$ a été calculé pour chaque concentration de la SG. Les données normalisées obtenues par le capteur MIP et NIP ont montré une bonne linéarité avec des coefficients de détermination de 0,975 et 0,962, respectivement et des pentes significativement différentes, ce qui confirme la grande sensibilité du MIP.

Par conséquent, ce capteur a permis d'obtenir des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de 0,20 et 0,67 pg.mL^{-1} pour les mesures par VDP et de 0,17 et 0,57 pg.mL^{-1} pour les mesures par la SIE [21]. Il est intéressant de noter que ces valeurs obtenues restent très inférieures à la limite maximale de résidus (LMR) définie dans les législations suisse, britannique et belge qui est comprise entre 10 et 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [22].

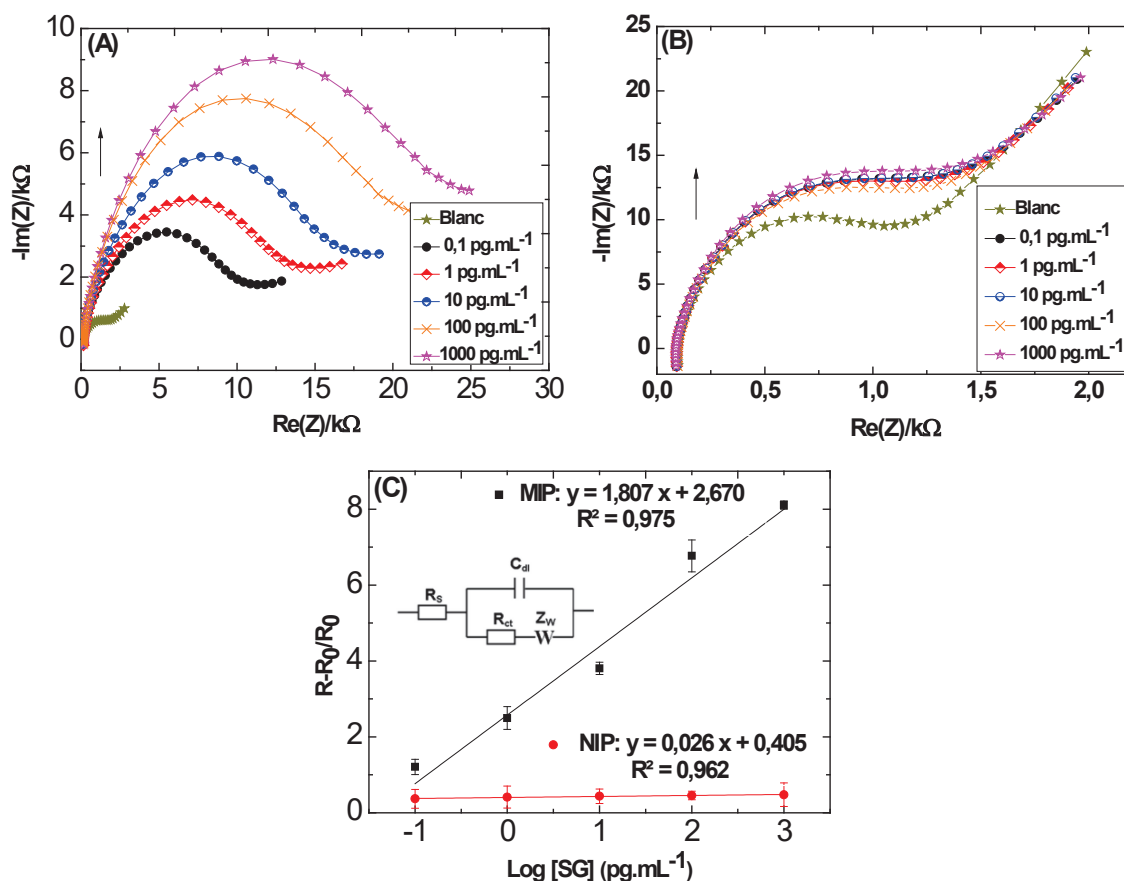


Figure III.11: Diagrammes de Nyquist obtenus après détection de la SG à différentes concentrations sur (A) MIP, (B) NIP, (C) sensibilité des capteurs par la normalisation des données.

Une comparaison entre la LD et la LQ du capteur MIP développé et les autres travaux publiés dans la littérature est présentée dans le Tableau III.1 [23–30]. Ce dernier montre que notre capteur MIP produit une réponse linéaire dans une large gamme de concentrations avec de très faibles limites de détection et de quantification. Ce résultat, prouve la grande sensibilité et la fiabilité de ce capteur à détecter de faibles concentrations en résidus de la SG, en comparaison avec les techniques analytiques de référence en l’occurrence les techniques chromatographiques [24–27], les techniques immuno-enzymatiques [26] et celles basées sur d’autres types de capteurs électrochimiques [29,30]. À cet effet, les résultats obtenus par ce capteur sont prometteurs dans le dosage des résidus de la SG dans le miel et donc pour le contrôle de la qualité de cette précieuse denrée alimentaire.

Tableau III.1 : Comparaison de différentes méthodes de détection de la sulfaguanidine.

Méthodes	Gamme de linéarité (ng.mL ⁻¹)	LD (ng.mL ⁻¹)	LQ (ng.mL ⁻¹)	Milieux réels	Référence
Électrophorèse capillaire	1,4-128,5	0,4	1,4	Eau	[23]
Chromatographie phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	15-150	15,0-20,0	-	Lait et poisson	[24]
Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse	2,0-150,0	2,0	10,0	Lait	[25]
Chromatographie liquide à haute performance avec une détection de fluorescence	1,0-100,0	0,2	0,7	Miel	[26]
ELISA	0,2–36,8	2,6	-	Lait	[27]
Électrophorèse sur micropuce	2000-1200	400,0	-	Plasma du lapin	[28]
Capteur à base de polymères à empreintes moléculaires	0,5-150,0	5,0	10,0	Eaux usées	[29]
Capteur électrochimique	2100-430000	2100	-	Sérum et urine	[30]
Notre capteur à base de MIP	0,0001- 1,0	0,0002 et 0,00017	0,00067 et 0,00057	Miel	[21]

III.3.4. Sélectivité du capteur

La sélectivité envers une molécule cible est un critère très important pour évaluer la performance de n'importe quel capteur. Elle dépend de différents facteurs tels que la taille de l'empreinte moléculaire et l'interaction entre la molécule cible et le polymère. Dans la présente étude, le capteur MIP développé a été testé pour la détection de trois molécules interférentes à la SG, dont les résidus sont largement présents dans le miel et la gelée royale, à savoir la sulfacetamide (SA), la sulfadiazine (SD) et la sulfaméthoxazole (SZ) avec des structures chimiques proches à celle de la SG (Figure III.12).

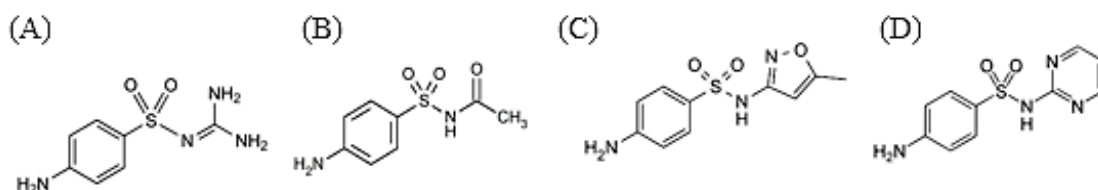


Figure III.12: Structures chimiques de la (A) SG, (B) SA, (C) SZ, (D) SD.

Les sensibilités de détection de ces molécules vis-à-vis de la SG sont illustrées dans la Figure III.13, où nous remarquons des droites de détection à de faibles pentes comparées à celle de la SG pour les mesures par SIE et VDP. De plus, il est clairement observé que les résultats obtenus par la SIE dans la Figure III.13 (A), montrent une sensibilité élevée pour la SG par rapport aux mesures de la VDP (Figure III.13 (B)). Par conséquent, le présent capteur basé sur les MIPs offre une excellente spécificité de reconnaissance de la SG.

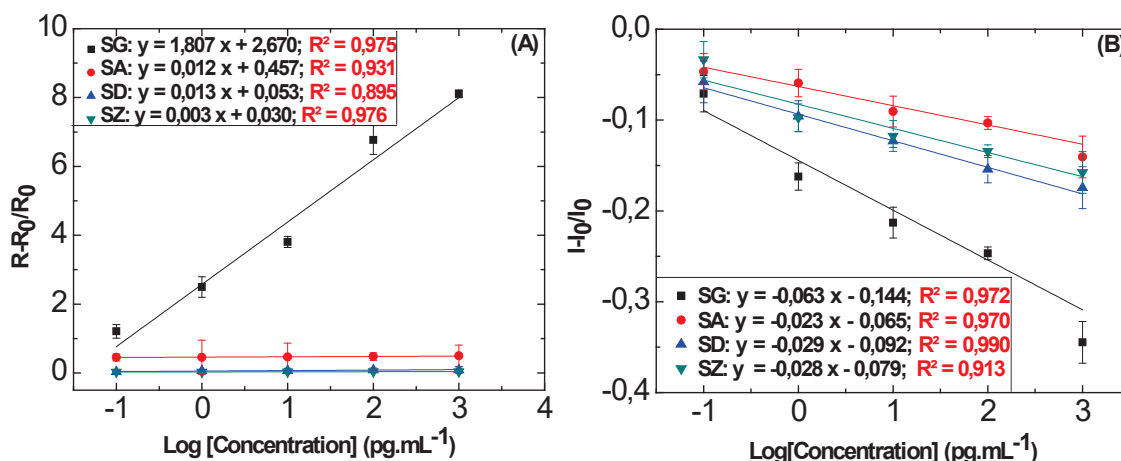


Figure III.13: Variations des courants et des résistances de transfert de charges de la SG, SA, SZ et SD par des mesures de (A) SIE, (B) VDP.

III.3.5. Répétabilité et stabilité du capteur

La répétabilité des résultats du capteur MIP a été étudiée en collectant le courant issu d'incubation de chaque concentration de la SG trois fois sur la même électrode. L'écart type relatif (RSD) de ces mesures varie entre 1,5% et 8,6%, montrant que ce capteur peut être réutilisé à plusieurs reprises. Tandis que la stabilité de ce système a été étudiée en surveillant, pendant sept jours, la réponse de la détection de la SG à une concentration de 10 pg.mL⁻¹. Les résultats obtenus ont montré que ce capteur peut conserver 97% d'une réponse stable durant cette période.

III.3.6. Application sur les échantillons de miel

Afin d'évaluer la fiabilité du capteur développé pour détecter la SG dans le miel, une méthode de recouvrement a été effectuée comme suit : une masse de 1 g de miel a été dissoute dans 1 mL du HCl (0,1 M) sous agitation magnétique. Ensuite, les échantillons de miel ont été dilués à 1:10 (v/v) dans le PBS (pH 7,4) et ils ont été filtrés à travers un filtre d'acétate de cellulose de diamètre 0,8 µm afin de réduire l'effet de matrice. Les échantillons préparés ont été mélangés avec des solutions standards de la SG pour d'atteindre les concentrations finales de 10 et 100 pg.mL⁻¹ suivis par des mesures de la VDP et de la SIE réalisées comme décrites précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III.2 indiquant des taux de recouvrements satisfaisants entre 83,9% et 99,7% avec une bonne répétabilité exprimée par un RSD compris entre 0,8% et 3,6% et entre 5,2% et 3,8% pour les mesures de la VDP et de la SIE, respectivement. Ces résultats ont permis de conclure que le capteur MIP développé est approprié pour détecter les résidus de la SG dans une matrice complexe telle que le miel.

Tableau III.2: Résultats du capteur MIP appliqué pour la détermination de la SG dans le miel.

Méthodes	Cajoutée (pg.mL ⁻¹)	Ctrouvée (pg.mL ⁻¹)	Recouvrement (%)	RSD (%)
VDP	10,0	9,4	94,0	3,6
	100,0	99,7	99,7	0,8
SIE	10,0	9,2	92,2	5,2
	100,0	83,9	83,9	3,8

III.4. Développement des capteurs à base des polymères à empreintes moléculaires pour la détection de la doxycycline et du chloramphénicol dans le miel

La doxycycline (DXy) et le chloramphénicol (CAP) sont des antibiotiques issus de la famille des cyclines et des phénicols, respectivement, utilisés comme médicaments vétérinaires pour traiter un grand nombre d'infections bactériennes et protozoaires ainsi que pour favoriser la croissance des animaux. Dans cette étude, nous décrirons le procédé de développement ainsi que les résultats obtenus par des capteurs MIPs pour la détection des résidus de la DXy et du CAP dans le miel.

III.4.1. Protocole expérimental

Les capteurs MIP élaborés dans cette étude ont été construits distinctement sur deux électrodes d'or (Au-SPE) que nous avons fonctionnalisées par un film du polyvinyle carboxylique (PVC-COOH). Ce dernier joue un rôle de médiateur entre la molécule cible et la matrice polymérique via les groupes carboxyliques. À cet effet, ces électrodes de travail ont été modifiées par une solution du PVC-COOH préparée dans le dioxane à une concentration de $8,4 \text{ mg.mL}^{-1}$. L'incubation s'est établie pendant 2 h à température ambiante, jusqu'à un séchage complet du film polymérique. Afin de fixer la DXy et le CAP sur la surface des électrodes, les groupes carboxyliques ont été activés pendant 2 h dans un mélange aqueux contenant 50 mM du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et 25 mM du N-hydroxysuccinimide (NHS). Ensuite, des solutions de la DXy et du CAP à des concentrations de 1 mg.mL^{-1} chacune, ont été déposées séparément sur la surface des électrodes activées pendant 3 h à une température de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Afin de limiter les réactions non spécifiques, les groupements carboxyliques non réagis avec les deux analytes ont été bloqués par une solution de l'éthanolamine (ETA) à une concentration de 1%. L'étape de polymérisation a été réalisée par incubation des électrodes préparées dans une solution contenant 1 M de l'AAM comme monomère fonctionnel et 0,07 M du NNMBA comme un agent de réticulation en présence de 0,06 M du persulfate d'ammonium (APS) et de 5% du tétraméthyléthylènediamine (TEMED) comme des précurseurs de la réaction. Le mélange a été préparé dans le PBS à un pH de 7,4. La réaction de polymérisation a été effectuée pendant une nuit à température ambiante. Après lavage avec de l'eau distillée, les empreintes de la DXy et du CAP ont été obtenues par une extraction de ces molécules par une solution du méthanol et d'acide acétique (7:3 (v/v)) pendant 10 min. Les capteurs MIPs formés ont été finalement prêts pour la reconnaissance de la DXy et du CAP à différentes concentrations.

III.4.2. Caractérisations électrochimiques

La caractérisation électrochimique des capteurs développés ci-dessus a été effectuée dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) par la VC scannée entre -0,4 et +0,6 V à une vitesse de balayage de $30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et par la VDP entre -0,1 et +0,2 V avec une vitesse de balayage de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. La Figure III.14 représente la relation existante entre les courants obtenus après caractérisation des différentes étapes de fabrication des capteurs. Dans l'encart de cette figure, nous pouvons observer que le dépôt du film PVC-COOH sur les électrodes modifie considérablement les pics de courants, ce qui prouve l'apport des groupements carboxyliques servant comme des points d'attache pour les molécules à détecter. Par ailleurs, la fixation de la DXy et du CAP provoque une diminution des pics de courants qui augmentent légèrement après la polymérisation de l'AAM, ce qui révèle le comportement conducteur des matrices DXy-polyacrylamide (DXy-PAM) et CAP-polyacrylamide (CAP-PAM).

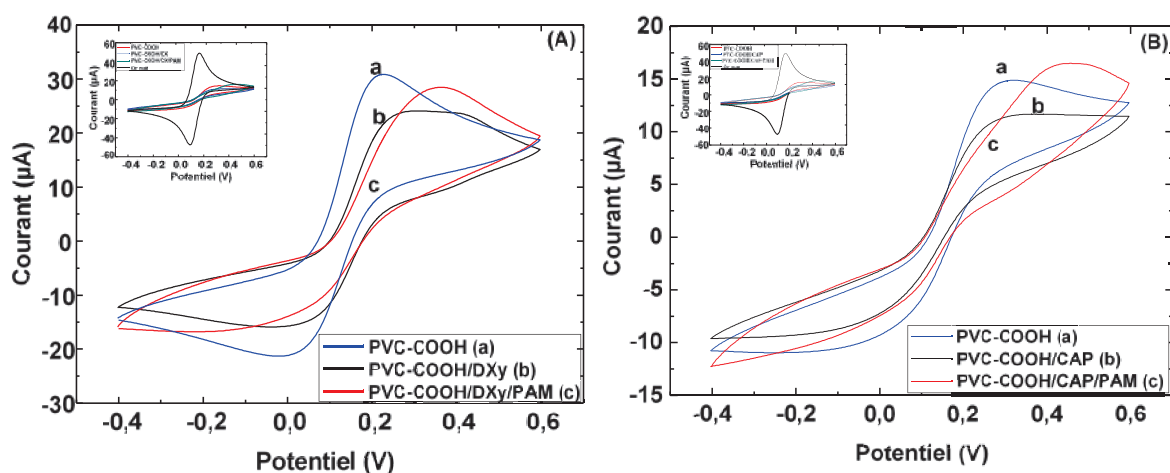


Figure III.14: Voltammogrammes cycliques des différentes modifications des électrodes en or par (A) DXy, (B) CAP, en encart : voltammogrammes cycliques comprenant celui de l'électrode d'or nu.

III.4.3. Détection de la doxycycline et du chloramphénicol

La détection de la DXy et du CAP par les capteurs MIP développés a été réalisée dans une gamme de solutions standards de concentrations entre $0,1$ et $1000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les voltammogrammes d'impulsion différentielle obtenus sont présentés dans la Figure III.15 (A, B). Comme nous pouvons observer sur cette figure, l'augmentation des concentrations des molécules cibles conduit à une diminution des pics de courant associés au potentiel d'oxydation du $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Ceci illustre le remplissage des cavités créées dans la matrice du polymère. Par ailleurs, la sensibilité de ces capteurs a été également étudiée en se basant sur les réponses fournies par les capteurs MIP et NIP. La Figure III.15 (C,D) représente les voltammogrammes

d'impulsions différentielles obtenus à cet égard, révélant la non-sensibilité des capteurs NIP, ce qui explique la non-formation des sites spécifiques capables de reconnaître la DXy et le CAP.

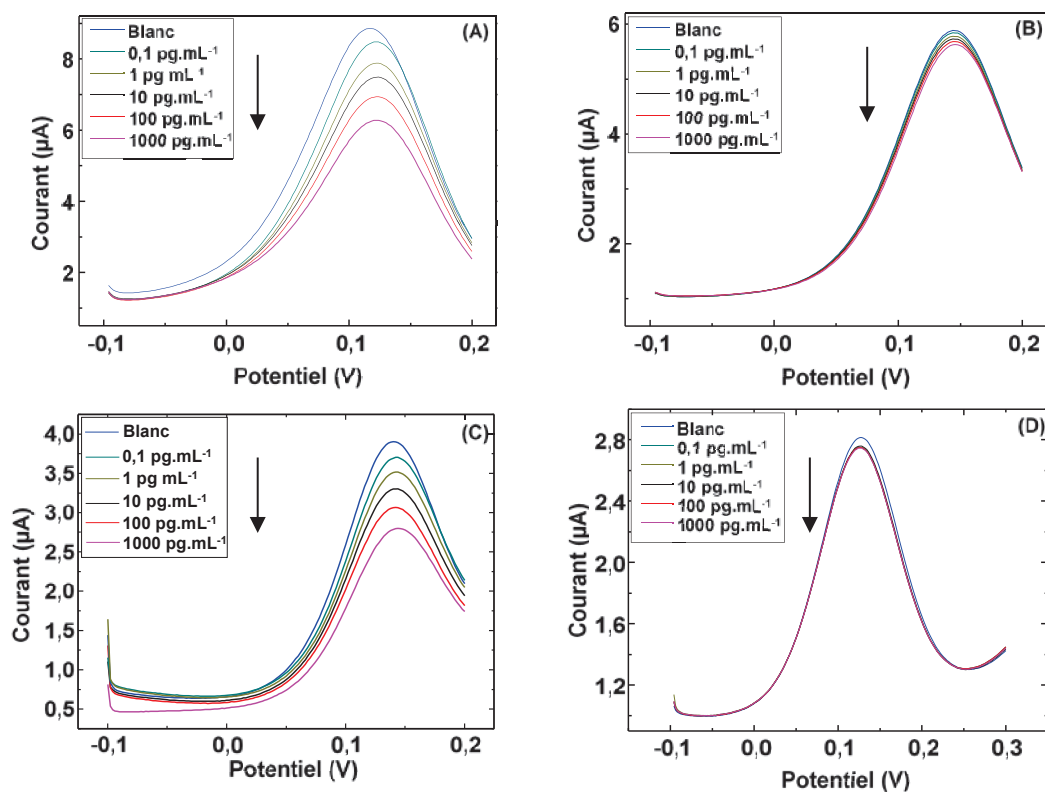


Figure III.15: Voltammogrammes d'impulsions différentielles obtenus après détection de la DXy et du CAP à différentes concentrations par (A,C) MIP, (B,D) NIP, respectivement.

La représentation des pics de courant en fonction du logarithme des concentrations est dans la Figure III.16. La haute sensibilité de ces capteurs MIPs a été exprimée par leurs droites de calibrations ayant des pentes élevées par rapport à celles des NIP, expliquant que le comportement électrochimique du processus de la détection ne dépend pas des réactions non spécifiques entre le polyacrylamide et les molécules cibles. Par conséquent, des limites de détection de 0,1 et 0,4 pg.mL^{-1} ont été atteintes pour la DXy et le CAP, respectivement [31].

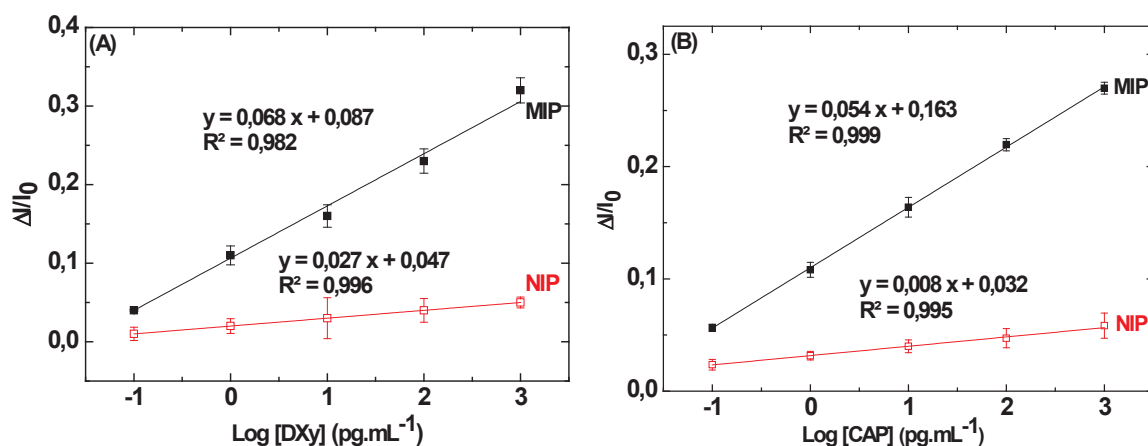


Figure III.16: Courbes de calibration des capteurs MIP et NIP de la (A) DXy, (B) CAP.

Par ailleurs, les limites de détection de la DXy et du CAP obtenues par les capteurs développés ont été comparé avec celles trouvés dans la littérature [32–39]. Le Tableau III.3 récapitule ces résultats, en indiquant que nos capteurs MIPs produisent des réponses linéaires dans une large gamme de concentrations avec de très faibles limites de détection (de l'ordre de $10^{-3} \text{ ng.mL}^{-1}$). Ce résultat, confirme la grande sensibilité de ces capteur vis-à-vis de la DXy et du CAP, en comparaison avec les techniques analytiques de référence notamment les techniques chromatographiques [32,36] et celles basées sur d'autres types de capteurs MIPs [33,39].

Tableau III.3 : Comparaison de différentes méthodes de détection de la doxycycline et du chloramphénicol.

	Méthode	Gamme de linéarité (ng.mL ⁻¹)	LD (ng.mL ⁻¹)	Milieux réels	Référence
Doxycycline	Chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance	10-7005	10	Sérum humain	[32]
	Capteur à base des polymères à empreintes moléculaires	0,08-2,60	0,05	Plasma du porc	[33]
	Capteur fluorescent optique	0,044-44,44	0,01	Lait	[34]
	Analyse par injection en flux continu	5000-250000	1500	Préparations pharmaceutiques	[35]
	Notre capteur MIP	0,0001-1	0,0001	Miel	[31]
Chloramphénicol	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse	0,025-0,15	0,5	Poisson et miel	[36]
	Immunocapteur piézoélectrique	0,5-100	0,2	Lait, œufs et miel	[37]
	Capteur à base d'aptamères	0,00096-0,0032	0,0032	Poisson	[38]
	Capteur à base des polymères à empreintes moléculaires	0,001-100	0,0007	Miel	[39]
	Notre capteur MIP	0,0001-1	0,0004	Miel	-

III.4.4. Sélectivité des capteurs

La sélectivité de ces capteurs a été réalisée en utilisant l'oxytétracycline (OXY) et le florphénicol (FAP) ayant des formules chimiques proches de celles de la DXy et du CAP, respectivement (Figure III.17).

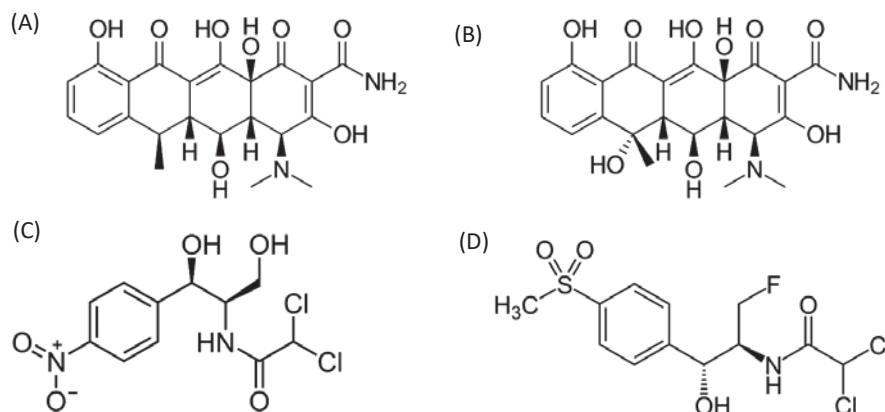


Figure III.17: Structures chimiques de (A) DXy, (B) OXY, (C) CAP, (D) FAP.

Des mesures par la VDP ont été appliquées pour la détection de ces deux molécules. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la Figure III.18 montrant que les pics de courant générés par ces interférents sont négligeables par rapport à ceux des molécules cibles. Ce phénomène révèle la sensibilité de réponse des capteurs MIP développés même en présence des composés interférents. Ceci indique que ces MIPs présentent de bonnes sélectivités pour la détection de la DXy et du CAP.

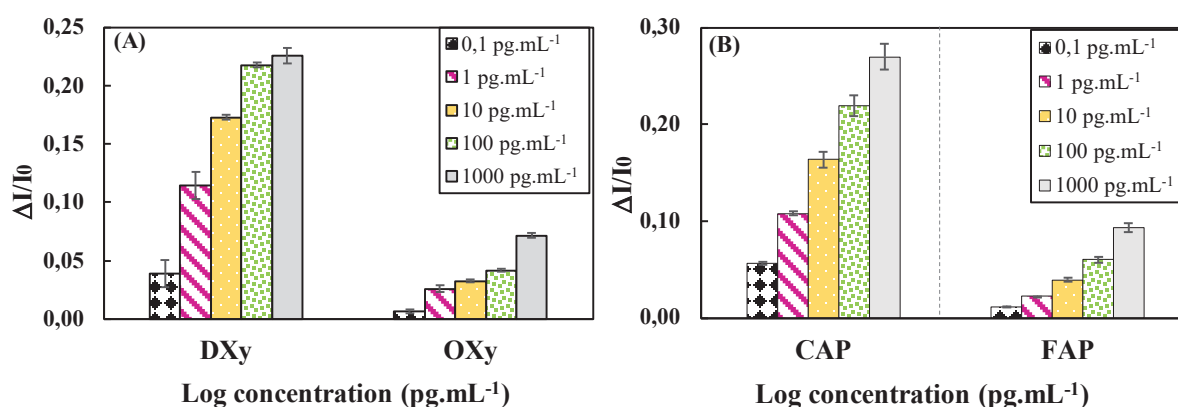


Figure III.18: Diagrammes de la sélectivité des capteurs MIPs de la (A) DXy, (B) CAP.

III.4.5. Application sur les échantillons de miel

Les deux capteurs développés ont été ensuite appliqués dans la détection des résidus de la DXy et du CAP par la méthode des ajouts standards dans un échantillon de miel certifié sans

résidus d'antibiotiques. La préparation des solutions de miel a été réalisée comme ce qui a été déjà décrit dans le paragraphe III.3.6, ensuite, nous avons procédé par un dopage avec des quantités connues de solutions étalons de la DXy et du CAP à des concentrations de 10 et de 100 pg.mL⁻¹. Des mesures de la VDP ont été effectuées comme décrites précédemment. Le Tableau III.4 récapitule les résultats obtenus montrant des taux de recouvrement situés entre 87% et 100,5%, avec des coefficients de variations relatifs (RSD) entre 5,5% et 6,1%. Par conséquent, nous avons conclu que les capteurs MIP développés sont adéquats pour la détermination des résidus de ces deux antibiotiques dans une matrice réelle telle que le miel.

Tableau III.4: Résultats du capteur MIP appliqué pour la détermination de la DXy et du CAP dans les échantillons de miel.

	C _{ajoutée} (pg.mL ⁻¹)	C _{trouvée} (pg.mL ⁻¹)	Recouvrement (%)	RSD (%)
DXy	10,0	8,7	87,0	12,2
	100,0	95,5	95,0	11,1
CAP	10,0	10,1	101,0	5,5
	100,0	98,8	98,8	6,1

III.5. Récapitulatif

Dans le présent chapitre, nous avons développé des capteurs à base des MIPs pour la détection des résidus de la SG, de la DXy et du CAP dans des échantillons de miel. En ce qui concerne le capteur de la SG, il a montré une grande sensibilité de reconnaissance de cette molécule à une limite de détection de 0,20 pg.mL⁻¹ avec une sélectivité élevée par rapport aux molécules interférentes. En plus, la détection de la SG dans les échantillons de miel a présenté des taux de recouvrement entre 83,9% et 99,7% avec un coefficient de variation de moins de 5,5%. En outre, la combinaison entre la SG et le polyacrylamide résulte d'une stabilité élevée du capteur. Quant à la deuxième application, elle a concerné le développement de deux capteurs à base de MIPs pour la détection des résidus de la DXy et du CAP dans le miel. Ces capteurs ont montré une capacité de détection élevée vis-à-vis des deux molécules cibles en comparaison avec les capteurs non imprimés avec une sélectivité remarquable par rapport aux molécules interférentes à savoir : l'OXy et le FAP. Les limites de détection atteintes par ces deux capteurs sont 0,1 et 0,4 pg.mL⁻¹ pour la DXy et pour le CAP, respectivement. Par ailleurs, des taux de recouvrement de 87,0% à 100,5% ont été trouvés lors de l'application de ces systèmes dans

l'analyse dans le miel. Par ailleurs, les capteurs développés dans ce chapitre ont montré une bonne sensibilité, sélectivité et précision, leur permettant d'être utilisés dans le contrôle de la qualité du miel. Par ailleurs, les capteurs développés dans ce chapitre ont montré des avantages qui se résument dans : la haute sélectivité, la précision, la reproductibilité ainsi que les faibles coûts de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A.K. Malik, C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 4018–4040.
- [2] J. O’Mahony, L. Clarke, M. Whelan, R. O’Kennedy, S.J. Lehotay, M. Danaher, The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food—challenges and applications, *J. Chromatogr. A.* 1292 (2013) 83–95.
- [3] L.M. Nollet, F. Toldrá, *Food analysis by HPLC*, CRC Press, 2012.
- [4] O. Golge, F. Hepsag, B. Kabak, Determination of aflatoxins in walnut sujuk and Turkish delight by HPLC-FLD method, *Food Control.* 59 (2016) 731–736.
- [5] M. Qi, C. Tu, Z. Li, W. Wang, J. Chen, A.-J. Wang, Determination of sulfonamide residues in honey and milk by HPLC coupled with novel graphene oxide/polypyrrole foam material-pipette tip solid phase extraction, *Food Anal. Methods.* (2018) 1–12.
- [6] J.F. Huertas-Pérez, N. Arroyo-Manzanares, L. Havlíková, L. Gámiz-Gracia, P. Solich, A.M. García-Campana, Method optimization and validation for the determination of eight sulfonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 261–266.
- [7] J.F. Huertas-Pérez, N. Arroyo-Manzanares, D. Hitzler, F.G. Castro-Guerrero, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campana, Simple determination of aflatoxins in rice by ultra-high performance liquid chromatography coupled to chemical post-column derivatization and fluorescence detection, *Food Chem.* 245 (2018) 189–195.
- [8] H.J. Kim, M.J. Lee, H.J. Kim, S.K. Cho, H.J. Park, M.H. Jeong, Analytical method development and monitoring of aflatoxin B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in animal feed using HPLC with fluorescence detector and photochemical reaction device, *Cogent Food Agric.* 3 (2017) 1419788.
- [9] Z. Li, Y. Li, M. Qi, S. Zhong, W. Wang, A.-J. Wang, J. Chen, Graphene-Fe₃O₄ as a magnetic solid-phase extraction sorbent coupled to capillary electrophoresis for the determination of sulfonamides in milk, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 3818–3826.
- [10] O. Adewusi, Application of capillary electrophoresis in quantification of toxins in food, (2017).
- [11] S.G. Dmitrienko, E.V. Kochuk, V.V. Tolmacheva, V.V. Apyari, Y.A. Zolotov, Determination of the total content of some sulfonamides in milk using solid-phase

- extraction coupled with off-line derivatization and spectrophotometric detection, *Food Chem.* 188 (2015) 51–56.
- [12] X. Zhang, M. Song, X. Yu, Z. Wang, Y. Ke, H. Jiang, J. Li, J. Shen, K. Wen, Development of a new broad-specific monoclonal antibody with uniform affinity for aflatoxins and magnetic beads-based enzymatic immunoassay, *Food Control.* 79 (2017) 309–316.
- [13] F. Zhang, B. Liu, S. Wang, Review of immunoassay methods for the detection of sulfonamides, *Curr. Org. Chem.* 21 (2017) 2662–2674.
- [14] N.E.A.E. Hassani, A. Baraket, E.T.T. Neto, M. Lee, J.-P. Salvador, M. Marco, J. Bausells, N.E. Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine, Novel strategy for sulfapyridine detection using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS: Application to honey analysis, *Biosens. Bioelectron.* 93 (2017) 282–288.
- [15] N. El Alami El Hassani, A. Baraket, S. Boudjaoui, E.T.T. Neto, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, N. Zine, Development and application of a novel electrochemical immunosensor for tetracycline screening in honey using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS, *Biosens. Bioelectron.* 130 (2018) 330–337.
- [16] L.I. Andersson, Molecular imprinting for drug bioanalysis: a review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 739 (2000) 163–173.
- [17] G. Font, A. Juan-García, Y. Picó, Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis–mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat, *J. Chromatogr. A.* 1159 (2007) 233–241.
- [18] S. Mondal, S.M. Mandal, T.K. Mondal, C. Sinha, Spectroscopic characterization, antimicrobial activity, DFT computation and docking studies of sulfonamide Schiff bases, *J. Mol. Struct.* 1127 (2017) 557–567.
- [19] A. Chandran, H. Tresa Varghese, C. Yohannan Panicker, G. Rajendran, FT-IR and computational study of sulphaguanidine, *Orient. J. Chem.* 27 (2011) 611.
- [20] S.S.A. Abidi, Y. Azim, S.N. Khan, A.U. Khan, Sulfaguanidine cocrystals: synthesis, structural characterization and their antibacterial and hemolytic analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149 (2018) 351–357.
- [21] N.E.A. El Hassani, E. Llobet, L.-M. Popescu, M. Ghita, B. Bouchikhi, N. El Bari, Development of a highly sensitive and selective molecularly imprinted electrochemical

- sensor for sulfaguanidine detection in honey samples, *J. Electroanal. Chem.* 823 (2018) 647–655.
- [22] Ž. Bargańska, J. Namieśnik, M. Ślebioda, Determination of antibiotic residues in honey, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1035–1041.
- [23] H. Ji, Y. Wu, Z. Duan, F. Yang, H. Yuan, D. Xiao, Sensitive determination of sulfonamides in environmental water by capillary electrophoresis coupled with both silvering detection window and in-capillary optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detector, *Electrophoresis*. 38 (2017) 452–459.
- [24] M.E. Dasenaki, A.A. Bletsou, G.A. Koulis, N.S. Thomaidis, Qualitative multiresidue screening method for 143 veterinary drugs and pharmaceuticals in milk and fish tissue using liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 4493–4508.
- [25] S. Moretti, G. Cruciani, S. Romanelli, R. Rossi, G. Saluti, R. Galarini, Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk, *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 792–804.
- [26] M. Sajid, N. Na, M. Safdar, X. Lu, L. Ma, L. He, J. Ouyang, Rapid trace level determination of sulfonamide residues in honey with online extraction using short C-18 column by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1314 (2013) 173–179.
- [27] M. Franek, I. Diblíková, I. Cernoch, M. Vass, K. Hruska, Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1559–1567.
- [28] B. Zhang, Z. Chen, Y. Yu, J. Yang, J. Pan, Determination of sulfonamides in pharmaceuticals and rabbit plasma by microchip electrophoresis with LED-IF detection, *Chromatographia*. 76 (2013) 821–829.
- [29] D.M. Pavlović, K. Nikšić, S. Livazović, I. Brnardić, A. Anžlovar, Preparation and application of sulfaguanidine-imprinted polymer on solid-phase extraction of pharmaceuticals from water, *Talanta*. 131 (2015) 99–107.
- [30] L. Fotouhi, M. Fatollahzadeh, M.M. Heravi, Electrochemical behavior and voltammetric determination of sulfaguanidine at a glassy carbon electrode modified with a multi-walled carbon nanotube, *Int J Electrochem Sci.* 7 (2012) 3919–3928.
- [31] N.E.A. El Hassani, S. Motia, B. Bouchikhi, N. El Bari, Synthesis of highly sensitive molecular imprinted sensor for selective determination of doxycycline in honey samples,

- World Acad. Sci. Eng. Technol. Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng. 11 (2017) 371–374.
- [32] R.R. Seelam, M. Terrin, H.E. Hassan, Validated UHPLC–MS/MS method for quantification of doxycycline in abdominal aortic aneurysm patients, *Bioanalysis*. 10 (2018) 527–539.
- [33] J. Ashley, X. Feng, Y. Sun, A multifunctional molecularly imprinted polymer-based biosensor for direct detection of doxycycline in food samples, *Talanta*. 182 (2018) 49–54.
- [34] J. Song, J. Li, Z. Guo, W. Liu, Q. Ma, F. Feng, C. Dong, A novel fluorescent sensor based on sulfur and nitrogen co-doped carbon dots with excellent stability for selective detection of doxycycline in raw milk, *RSC Adv.* 7 (2017) 12827–12834.
- [35] S. Palamy, W. Ruengsitagoon, A novel flow injection spectrophotometric method using plant extracts as green reagent for the determination of doxycycline, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 171 (2017) 200–206.
- [36] H. Kikuchi, T. Sakai, R. Teshima, S. Nemoto, H. Akiyama, Total determination of chloramphenicol residues in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 230 (2017) 589–593.
- [37] N.A. Karaseva, T.N. Ermolaeva, A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food, *Talanta*. 93 (2012) 44–48.
- [38] Y.-B. Miao, H.-X. Ren, N. Gan, Y. Cao, T. Li, Y. Chen, Fluorescent aptasensor for chloramphenicol detection using DIL-encapsulated liposome as nanotracer, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 454–459.
- [39] B.S. Ebarvia, I.E. Ubando, F.B. Sevilla III, Biomimetic piezoelectric quartz crystal sensor with chloramphenicol-imprinted polymer sensing layer, *Talanta*. 144 (2015) 1260–1265.

DEUXIÈME PARTIE :

**APPLICATION DE LA LANGUE ÉLECTRONIQUE
VOLTAMMÉTRIQUE DANS LES ANALYSES
AGROALIMENTAIRES ET BIOMÉDICALES**

CHAPITRE IV

**APPLICATION DE LA LANGUE ÉLECTRONIQUE
VOLTAMMÉTRIQUE POUR LA CARACTÉRISATION
ANALYTIQUE ET POUR LA CLASSIFICATION
GÉOGRAPHIQUE DES MIELS DE LA FRANCE ET DU
MAROC**

IV.1. Introduction

Depuis les dernières décennies, les consommateurs ont recours aux denrées alimentaires de grande qualité ayant des origines géographiques bien définies. Ce choix rentre en relation avec les caractéristiques et la réputation de ces denrées ce qui leur donne un caractère unique (un aspect particulier ou un arôme original). Ces produits disposent en effet d'une notoriété liée à la fois à un territoire de production, à un climat, à un type de sol, à des ressources naturelles, mais aussi à une tradition et à un savoir-faire perfectionné au fil du temps. À cet effet, la discrimination géographique des denrées alimentaires est considérée comme l'ensemble d'indications qui servent à identifier un produit comme étant originaire d'une région où une qualité, une réputation ou une autre caractéristique déterminée pouvant y être attribuée [1]. Ceci fait qu'une même denrée produite dans des régions différentes n'aurait certainement pas les mêmes caractéristiques [2]. Dans le cas du miel, l'origine géographique joue un rôle important dans le contrôle de sa qualité, nécessitant un suivi bien rigoureux. Selon les approches traditionnelles, l'origine géographique du miel a été discriminée sur la base de l'examen microscopique des pollens (analyse méliissopalynologique) car le pollen du miel reflète la végétation butinée par les abeilles [3]. Cependant, dans le cas de la proximité géographique des échantillons, la discrimination devient plus difficile [4], d'où l'utilisation des études analytiques alternatives. Plusieurs méthodes analytiques ont été trouvées dans la littérature pour la discrimination géographique des miels telles que la spectroscopie dans l'infrarouge moyen [5] et proche [6], la spectroscopie Raman [3], la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse [7], la chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance [8]. Toutes ces méthodes donnent de bonnes capacités de discrimination, de précision et de fiabilité, mais elles nécessitent des étapes de traitement de l'échantillon fastidieuses avec une instrumentation très coûteuse. Afin de surmonter ces limitations, un nouvel outil plus pratique et plus efficace appelé langue électronique a été introduit dans le but du contrôle de la qualité des aliments en l'occurrence le miel. Certains chercheurs y compris Madiha et al., appartenant à notre équipe de recherche ont déjà traité l'utilisation de la langue électronique dans l'analyse qualitative des miels. Ses analyses ont été basées particulièrement sur la discrimination de l'origine botanique du miel, permettant de distinguer différents échantillons monofloraux et/ou polyfloraux, ainsi que pour une classification en fonction de l'origine géographique couplée à une détection des fraudes [9,10]. Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus lors de l'application du système de la langue électronique voltammétrique (Langue-EV) pour l'analyse agroalimentaire. Cette étude concerne la collecte et l'interprétation des résultats ainsi que l'élaboration des modèles statistiques relatifs à la discrimination géographique et à la

caractérisation physico-chimique de quatorze échantillons de miel issus de la France et du Maroc. Les bases d'apprentissages obtenues ont été exploitées par les méthodes multivariées d'analyse de données à savoir : l'analyse en composantes principales (ACP), la classification ascendante hiérarchique (CAH), la régression à moindres carrés partiels (PLS) et les séparateurs à vastes marges (SVMs).

IV.2. Provenance et préparation des échantillons du miel

Afin de mener cette étude, 6 échantillons de miels monofloraux de 14 régions géographiques (84 échantillons au total) ont été collectés et fournis par les coopératives « Secrets d'Apiculteur » et « APIA » en France et au Maroc, respectivement. Ces mêmes échantillons ont été stockés dans l'obscurité à température ambiante ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) jusqu'à leur utilisation. La Figure IV.1 représente une carte de localisation des quatorze échantillons de miels analysés.

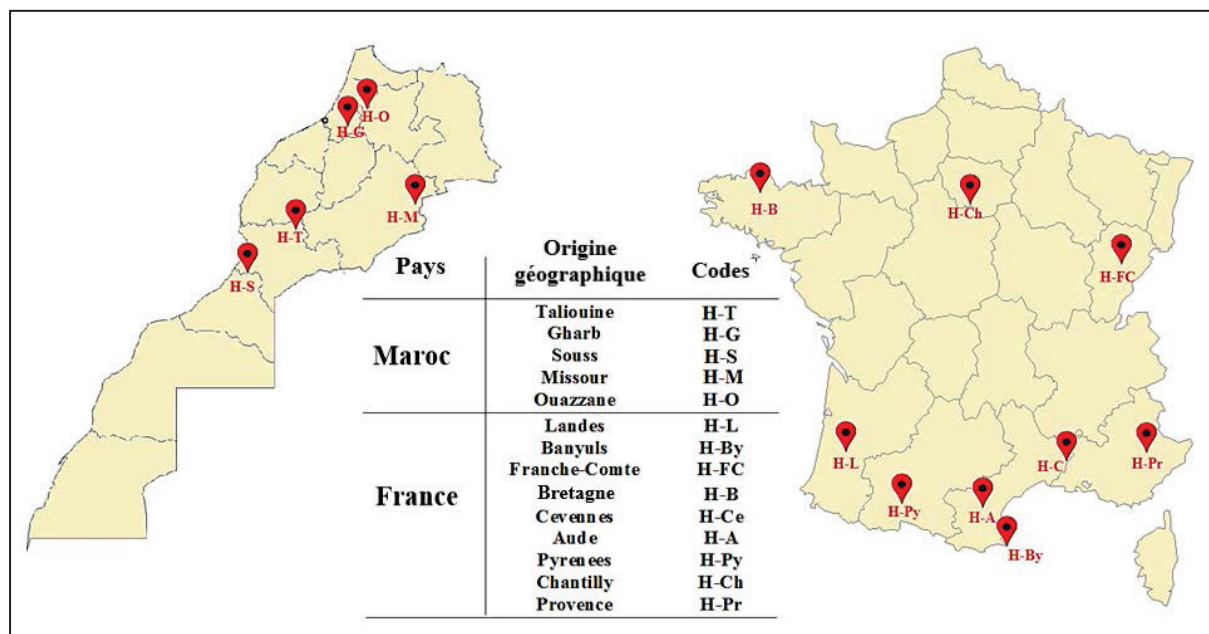


Figure IV.1 : Carte de localisation des quatorze échantillons de miel.

IV.3. Dispositif expérimental de la langue électronique voltammétrique

Le dispositif de la Langue-EV utilisé dans ce travail est constitué d'une cellule électrochimique contenant : une matrice d'électrodes de travail, une électrode auxiliaire et une électrode de référence. Le choix des matériaux d'électrodes de travail a porté sur le platine (Pt), l'or (Au), le carbone vitreux (GC), l'argent (Ag), le nickel (Ni), le palladium (Pd) et le cuivre (Cu), tous d'une pureté 99,9%. Par ailleurs, l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence

sont à base du platine (pureté 99,9%) et de l'argent-chlorure d'argent (Ag-AgCl), respectivement.

En effet, les mesures de la voltammétrie cyclique (VC) par le système de la Langue-EV ont été effectuées en plongeant cette matrice d'électrodes dans une solution contenant une masse de 6 g de miel dissoute dans 50 mL d'eau distillée. Les mesures de la VC ont été effectuées sur une fenêtre de potentiels entre -0,5 et +0,4 V avec une vitesse de balayage de 0,02 V.s⁻¹. Pour chaque série de mesure, les échantillons ont été analysés au cours de la même journée afin de réduire au minimum les effets des paramètres environnementaux.

IV.4. Discrimination du miel de différentes origines géographiques par la langue électronique voltammétrique

IV.4.1. Réponses des capteurs voltammétriques

La VC pilotée par un potentiostat portable a été utilisée dans ce travail afin d'étudier les propriétés redox des composés chimiques à l'interface des électrodes de la Langue-EV. La Figure IV.2 représente les voltammogrammes obtenus par l'immersion de l'électrode d'argent dans les différentes solutions de miel. Par ailleurs, différentes signatures de compositions peuvent en résulter de chaque type de capteur montrant un ensemble des pics anodiques et cathodiques.

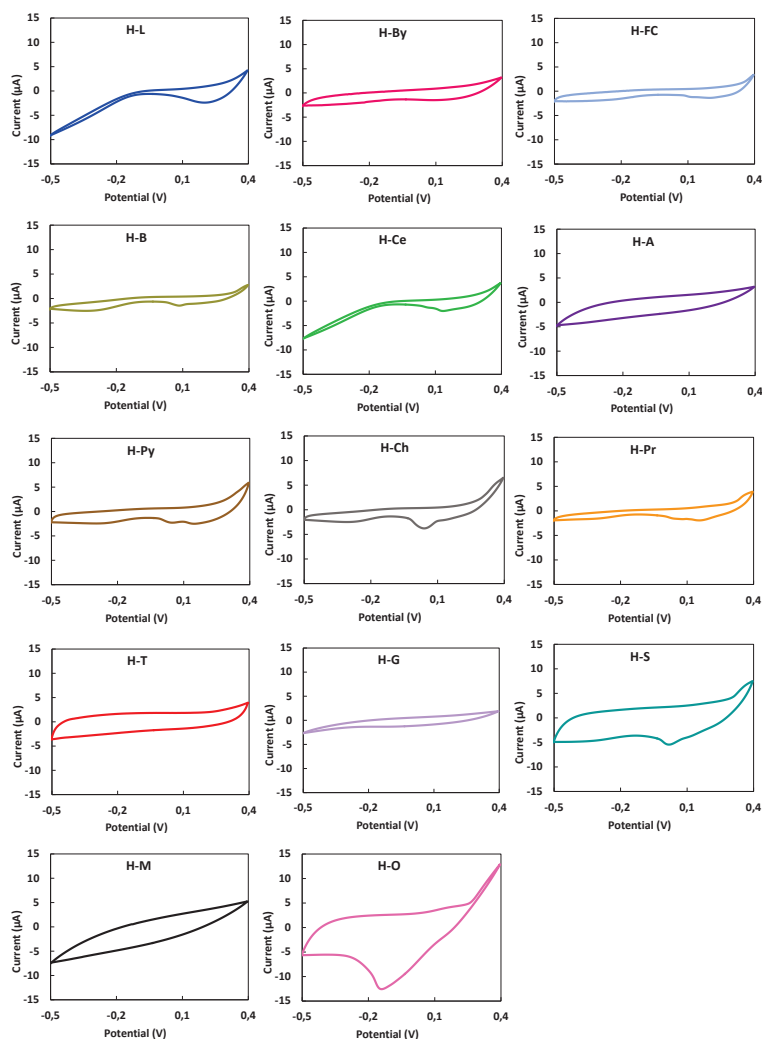


Figure IV.2 : Réponses voltammétriques de l'électrode d'argent immergée dans les quatorze solutions de miel d'origines géographiques différentes.

IV.4.2. Discrimination des miels par l'analyse en composantes principales

Les voltammogrammes obtenus ci-avant, ont fait l'objet d'une extraction de variables représentatives les plus pertinentes à savoir : la différence entre la valeur maximale et minimale du courant ($\Delta I = I_{\max} - I_{\min}$) ainsi que la pente maximale du courant dans la phase d'oxydation (Pt_{ox}) comme déjà expliqué dans le paragraphe 1.7.3.4.1. Afin de déterminer la capacité de la Langue-EV à distinguer entre les quatorze miels de différentes zones géographiques, l'ACP a été établie. Pour chaque miel, nous avons caractérisé 6 échantillons distincts, avec une matrice de données d'apprentissage obtenue de taille (84,14). La Figure IV.3 montre le diagramme de score des résultats obtenus par l'ACP sur les mesures effectuées par la Langue-EV. Dans cette figure les trois premières composantes principales expriment un taux de réussite de la discrimination de l'ordre de 77%. Le diagramme obtenu révèle aussi une séparation entre tous les échantillons de miel, qui est attribuée aux différences existantes dans leurs compositions

chimiques en fonction de leurs origines géographiques. Ce constat a été déjà prouvé dans notre précédent travail [9], où nous avons pu discriminer des échantillons de miel de la même origine florale mais issus de différentes zones géographiques. Par conséquent, nous concluons que la Langue-EV est capable de discriminer les différences de composition subtiles dans le miel de différentes provenances indépendamment de leurs origines florales.

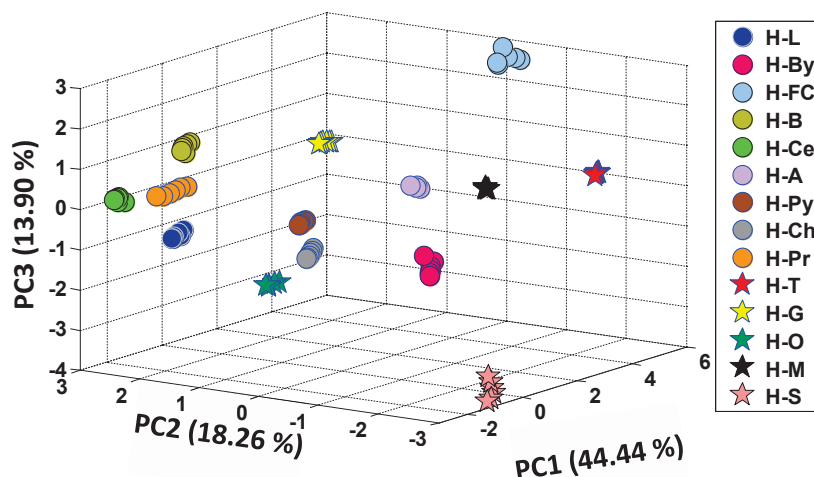


Figure IV.3 : Discrimination des miels de quatorze origines géographiques par l'ACP.

IV.4.3. Classification des miels par la méthode ascendante hiérarchique

Il existe de nombreuses techniques statistiques visant à partitionner une population en différentes classes ou sous-groupes. La méthode CAH s'est ajoutée à l'ACP afin de chercher les groupements d'individus au sein d'une même classe. Pour ceci, les similitudes entre les différents échantillons ont été obtenues par le calcul de la distance euclidienne. Les classes associées ont été définies par la méthode de Ward discutée dans le paragraphe I.7.3.4.3 (c). La Figure IV.4 représente le dendrogramme obtenu par la CAH illustrant la classification des quatorze échantillons de miel sous quatorze groupes distincts avec une nette séparation entre les miels de la France et ceux du Maroc vers la distance de liaison 35.

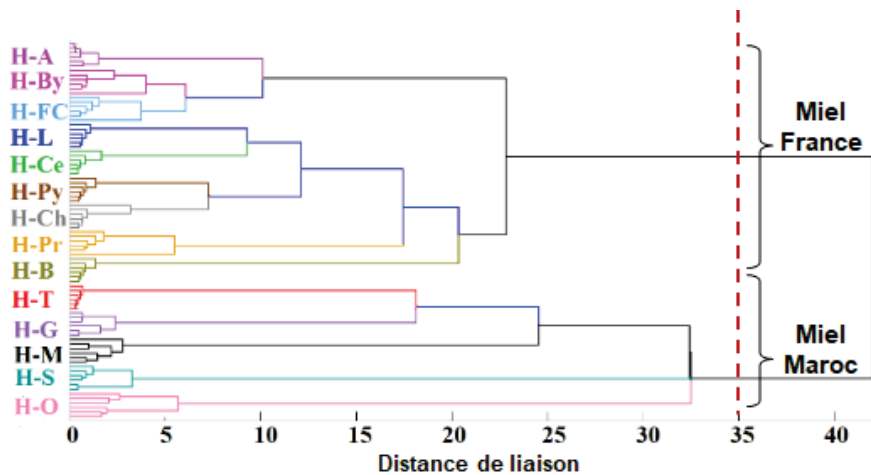


Figure IV.4 : Dendrogramme de la classification des quatorze miels de différentes origines géographiques par la CAH.

IV.4.4. Classification des miels par les séparateurs à vastes marges

La méthode des SVMs a été également appliquée afin de classer les différents échantillons de miel en utilisant la technique de validation croisée dite « Leave-One-Out ». Le Tableau IV.1 représente le résultat de la matrice de confusion obtenu indiquant les classes a priori et a posteriori, avec un score de réussite de 100% pour la classification des quatorze échantillons de miel. Par conséquent, l'approche développée basée sur la Langue-EV s'est avérée être très prometteuse pour classifier l'origine géographique du miel [2].

Tableau IV.1: Matrice de confusion des quatorze miels de différentes origines géographiques identifiés par les SVMs.

Affectation a priori	Classes des données a posteriori													
	H-L	H-By	H-FC	H-B	H-Ce	H-A	H-Py	H-Ch	H-Pr	H-T	H-G	H-S	H-M	H-O
H-L	6													
H-By		6												
H-FC			6											
H-B				6										
H-Ce					6									
H-A						6								
H-Py							6							
H-Ch								6						
H-Pr									6					
H-T										6				
H-G											6			
H-S												6		
H-M													6	
H-O														6

IV.5. Caractérisations physico-chimiques des miels

IV.5.1. Intensité de couleur

L'intensité de couleur des échantillons de miel a été décrite en 2005 par Beretta, et al. [11]. En partie, elle reflète la teneur en pigments ayant des propriétés antioxydantes telles que les (flavonoïdes, caroténoïdes, ...etc.) [12]. Pour en déterminer, les échantillons de miel ont été

dilués à 50% (m/v) dans de l'eau distillée, chauffée à 50 °C afin de dissoudre les cristaux de sucre, puis ils ont été filtrés à travers un filtre de 0,45 µm. L'absorbance a été déterminée à 450 nm et à 720 nm par la technique UV-Vis spectrophotométrie dont le principe a été décrit dans le paragraphe I.9.1. La différence entre les absorbances a été exprimée en mAU en appliquant l'équation suivante :

$$ABS_{450} = (Abs_{450} - Abs_{720}) \times 1000$$

Où :

Abs₄₅₀ : absorbance à 450 nm ;

Abs₇₂₀ : absorbance à 720 nm.

Les valeurs ABS₄₅₀ pour les différents échantillons sont présentées dans le Tableau IV.2. Ce résultat montre une variation de l'intensité de couleur entre 103 ±3 et 879 ±2 mAU correspondant aux deux miels H-M et H-S. Ceci explique leur couleur claire et sombre, respectivement, en relation avec leur teneur en flavonoïdes.

Tableau IV.2: Résultats de l'intensité de couleur des miels analysés.

Codes des échantillons	ABS ₄₅₀ (mAU)
H-L	362 ± 3
H-By	200 ± 3
H-FC	320 ± 4
H-B	522 ± 4
H-Ce	285 ± 3
H-A	316 ± 2
H-Py	753 ± 2
H-Ch	724 ± 6
H-Pr	592 ± 2
H-T	634 ± 2
H-G	169 ± 2
H-S	879 ± 2
H-M	103 ± 3
H-O	469 ± 0

IV.5.2. Teneur en sucres réducteurs et totaux

Les sucres réducteurs sont des sucres simples donneurs d'électrons dans une réaction d'oxydo-réduction, parmi lesquels nous trouvons : le glucose, le fructose et le maltose. L'analyse quantitative des sucres réducteurs dans le miel a été effectuée suivant le protocole décrit par Saxena et al. [13]. Cette analyse est basée sur l'utilisation de l'acide 3,5-

dinitrosalicylique (DNSA) qui est un indicateur de la présence des sucres réducteurs en Les échantillons de miel d'une concentration de $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ ont été dilués 100 fois avec de l'eau distillée. Ensuite, un volume de 1 mL de ces solutions a été mélangé avec 1 mL du DNSA, puis a été incubée dans un bain-marie d'eau bouillante pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, ces solutions ont été mélangées avec 7,5 mL de l'eau distillée avant d'effectuer la lecture des absorbances à une longueur d'onde de 540 nm. Une courbe d'étalonnage a été obtenue en utilisant les solutions standards du glucose. La détermination de la teneur en sucres totaux a été réalisée par l'inversion de saccharose en sucre réducteur et la mesure de sa concentration a été réalisée comme décrit précédemment. Les solutions de miel ($0,1 \text{ g.mL}^{-1}$) ont été diluées 33 fois avec de l'eau distillée et un volume de 1 mL a été mélangé avec le HCl afin d'atteindre une concentration finale de 2 N. Ensuite, le mélange a été incubé à une température de $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 8 min afin de compléter la réaction d'inversion du saccharose en sucre réducteur. Après refroidissement, la solution acide a été neutralisée par ajout de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et le volume total a été ajusté à 2 mL avec de l'eau distillée. Les mesures d'absorbance ont été effectuées en trois répétitions et la concentration de saccharose dans les échantillons de miel a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Saccharose (\%)} = (\text{sucres totaux-sucres réducteurs}) \times 0,95$$

Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau IV.3, dans lequel nous observons une variation des valeurs des sucres réducteurs et totaux de 34% à 67% et de 35% à 72%, respectivement. Quant à la teneur en saccharose elle est inférieure à 5% pour tous les échantillons de miel, ce qui reste inférieur à la limite maximale admise par le *Codex Alimentarius*, ce qui justifie une non-adultération par le sirop de saccharose [14]. Par conséquent, les résultats obtenus ont confirmé que les sucres réducteurs sont majoritaires dans les différents miels analysés.

Tableau IV.3: Résultats de la teneur en sucres réducteurs et en sucres totaux des miels analysés.

Code des échantillons	Sucres réducteurs (%)	Sucres totaux (%)	Saccharose (%)
H-L	56 ± 1	59,9 ± 0,4	4,0 ± 0,2
H-By	67 ± 2	71,5 ± 0,4	4,5 ± 0,4
H-FC	58 ± 1	61,8 ± 0,2	3,9 ± 0,2
H-B	44 ± 2	48,2 ± 0,7	4,6 ± 0,2
H-Ce	47 ± 2	47,2 ± 0,2	0,4 ± 0,7
H-A	34 ± 2	35,4 ± 0,3	1,4 ± 0,4
H-Py	34 ± 1	35,2 ± 0,5	1,1 ± 0,2
H-Ch	44 ± 1	44,3 ± 0,3	0,7 ± 0,3
H-Pr	40 ± 1	40,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1
H-T	37 ± 1	38,0 ± 0,8	1,6 ± 0,1
H-G	43 ± 1	43,5 ± 0,7	1,1 ± 0,1
H-S	49 ± 1	50,8 ± 0,3	2,6 ± 0,3
H-M	67 ± 1	69,0 ± 0,3	2,6 ± 0,4
H-O	57 ± 2	58,5 ± 0,6	1,9 ± 0,4

IV.5.3. pH et teneur en acides

Le miel est un aliment très acide, avec un pH moyen de 4,0 dû à la présence des acides qui déterminent sa stabilité, son goût, sa conservation et son origine. Par ailleurs, l'acidité totale du miel dépend de la présence des acides organiques qui découlent du nectar ou de miellat. L'origine de ces acides est relative des sécrétions salivaires de l'abeille et des processus enzymatiques et fermentatifs qui ont lieu dans la ruche, donnant deux formes d'acides : libres ou combinés sous forme de lactones. La teneur du miel en acides est un critère déterminant lié à la qualité de celui-ci car une acidité libre élevée est associée à une fermentation alcoolique des sucres par les levures et les champignons, au cours de laquelle le glucose et le fructose sont transformés en dioxyde de carbone et en alcool. En présence d'oxygène, les composés résultants sont hydrolysés en acide acétique contribuant alors au taux d'acidité libre dans le miel [15]. Tandis que, les miels ayant une teneur plus élevée en sels minéraux se caractérisent par un pH en moyenne plus élevé (de 4,2 à 5,5). Ces miels à pH élevé ont généralement un taux d'acidité libre pratiquement bas, ce qui implique une acidité lactonique plus élevée responsable aux arômes spécifiques du miel. Dans la présente étude, nous avons procédé par la détermination du pH des différents échantillons de miel dilués à 10% (m/v) dans de l'eau distillée. Les acidités

libres, totales et lactoniques ont été déterminées par la méthode titrimétrique suivante : une masse de 10 g de chaque échantillon de miel (masse m) a été dissoute dans 75 mL d'eau distillée. La solution obtenue a été titrée avec le NaOH (0,05 N) sous agitation magnétique jusqu'à atteindre le pH 8,3 (volume V). Immédiatement, un volume de 10 mL de NaOH (0,05 N) a été ajouté et titré avec le HCl (0,05 N) jusqu'à le retour au pH 8,3 (volume V'). Les résultats sont exprimés en milliéquivalents de NaOH requis pour neutraliser 1 kg de miel (meq.kg^{-1}) en appliquant les équations suivantes [16] :

$$\text{Acides libres} = \frac{V \times 50 \times 1000}{m}$$

$$\text{Acides lactoniques} = \frac{(10 - V') \times 50 \times 1000}{m}$$

$$\text{Acides totaux} = \text{Acides libres} + \text{Acides lactoniques}$$

Où :

- m : poids des échantillons de miel ;
- V : volume ajouté de NaOH ;
- V' : volume ajouté de HCl.

Les résultats de ce test sont illustrés dans le Tableau IV.4. Les valeurs de pH obtenues ont montré que tous les échantillons de miel analysés se sont avérés avoir un caractère acide, avec un pH compris entre 3,4 et 4,9. Par ailleurs, l'acidité libre de tous les échantillons se situe dans la fourchette autorisée par le *Codex Alimentarius* qui est de l'ordre de 50 meq.kg^{-1} de miel avec des valeurs comprises entre $4 \pm 2 \text{ meq.kg}^{-1}$ et $27 \pm 1 \text{ meq.kg}^{-1}$. En outre, la teneur en lactone varie de $10 \pm 2 \text{ meq.kg}^{-1}$ à $43 \pm 2 \text{ meq.kg}^{-1}$. Cette variation d'acidité entre les différents échantillons peut être attribuée à la variation de leurs constituants selon la saison de la récolte. Une comparaison entre l'acidité lactonique et l'acidité totale a révélé que par exemple, le miel de Taliouine (H-T), ayant une grande teneur en lactones, a également une acidité totale plus élevée. Cette observation confirme clairement l'idée que l'acidité lactonique est le principal contributeur dans l'acidité totale du miel.

Tableau IV.4 : Résultats de la teneur en acides des miels analysés.

Codes des échantillons	pH	Acidité libre (meq.kg ⁻¹)	Acidité lactonique (meq.kg ⁻¹)	Acidité totale (meq.kg ⁻¹)
H-L	4,4	11 ± 1	10 ± 2	41 ± 2
H-By	4,1	7 ± 1	15 ± 1	22 ± 2
H-FC	4,0	9 ± 1	21 ± 1	31 ± 1
H-B	3,8	18 ± 2	17 ± 1	36 ± 2
H-Ce	4,7	15 ± 1	16 ± 1	30 ± 1
H-A	3,8	27 ± 1	14 ± 1	21 ± 2
H-Py	4,7	12 ± 1	28 ± 2	40 ± 3
H-Ch	4,2	13 ± 1	20 ± 1	34 ± 2
H-Pr	4,8	10 ± 1	24 ± 3	34 ± 3
H-T	3,4	17 ± 1	43 ± 2	59 ± 3
H-G	3,8	4 ± 2	18 ± 2	22 ± 3
H-S	3,7	17 ± 1	33 ± 1	49 ± 1
H-M	4,9	5 ± 1	16 ± 0	21 ± 1
H-O	3,6	10 ± 1	39 ± 2	50 ± 3

IV.5.4. Teneur en phénols

Les recherches sur les bienfaits du miel ont démontré que ses principales propriétés reconnues comme thérapeutiques sont corrélées à son activité antioxydante, relative aux composés phénoliques. Ces composés sont capables d'interagir avec les radicaux libres afin de fournir aux cellules de notre organisme une protection contre le vieillissement, et contre les méfaits environnementaux. Dans ce travail, la teneur totale en composés phénoliques des quatorze échantillons de miel a été établie par la méthode décrite par Saxena, et al. [13]. À cet effet, un volume de 2,4 mL de chaque solution de miel à une concentration de 1,25 mg.mL⁻¹ a été mélangé avec 150 µL d'une solution du Folin-Ciocalteu (0,2 N). Les solutions préparées ont été soigneusement agitées et incubées pendant 2 min à température ambiante. Ensuite, ces solutions ont été mélangés avec 450 µL de carbonate de sodium (0,2 g.mL⁻¹) pendant 2 h à température ambiante et les absorbances ont été mesurées à 765 nm. Une courbe standard a été préparée en utilisant l'acide gallique (0-400 mg.L⁻¹). Les résultats obtenus ont été exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique (mg GAE)/100 g de miel (Tableau IV.5). La teneur en composés phénoliques des miels analysés, se situe entre 29 ±1 mg GAE/100 g et 70 ±1 mg GAE/100 g pour les échantillons H-T et H-L, respectivement, ce qui signifie leurs fortes activités antioxydantes.

Tableau IV.5: Résultats de la teneur en phénols des miels analysés.

Codes des échantillons	Phénols (mg GAE/100 g)
H-L	70 ± 1
H-By	48 ± 1
H-FC	41 ± 1
H-B	33 ± 1
H-Ce	52 ± 1
H-A	33 ± 1
H-Py	46 ± 1
H-Ch	48 ± 3
H-Pr	36 ± 1
H-T	29 ± 1
H-G	42 ± 2
H-S	39 ± 1
H-M	38 ± 1
H-O	47 ± 1

IV.5.5. Teneur en protéines

Les protéines de miel sont principalement sous la forme d'enzymes, qui ont été introduites par les abeilles ou dans certains cas elles peuvent être dérivées du nectar. La glucose oxydase et la catalase sont les protéines les plus importantes du miel, grâce à leur régulation de la production de peroxyde d'hydrogène qui est l'un des facteurs antibactériens dans le miel.

Les quatorze échantillons de miel exploités dans cette étude ont été analysés en termes de la teneur en protéines par le test de Lowry [17]. Une quantité de 0,1 g de miel a été dissoute dans 100 µL d'une solution de NaOH (2 N) et a été hydrolysée à 100 °C pendant 10 min. Les extraits protéiques ont été ajoutés ensuite à 1 mL du complexe réactionnel fraîchement préparé contenant : 20 mL de la solution du sodium carbonate (2% m/v) + 0,2 mL de la solution du tartrate double de sodium et de potassium (2% m/v) + 0,2 mL de la solution du sulfate de cuivre (1% m/v), le tout préparé dans l'eau distillée. Après incubation du mélange pendant 10 min à température ambiante, un volume de 100 µL du folin ciocalteu a été ajouté et les solutions ont été soigneusement mélangées. L'absorbance de la couleur bleue développée a été mesurée à 550 nm, où un maximum d'absorption des acides aminés tyrosine et tryptophane, est observé. La teneur en protéines des échantillons de miel a été déterminée en se basant sur la courbe de calibration standard de la BSA dans un intervalle de concentration de 0 à 2000 µg.mL⁻¹. La teneur en protéines de ces échantillons illustrée dans le Tableau IV.6, varie entre 516 ±33 et 2596 ±33 µg.g⁻¹ pour les miels H-O et H-G, respectivement, ce qui signifie leurs fortes activités antimicrobiennes.

Tableau IV.6: Résultats de la teneur en protéines des miels analysés.

Codes des échantillons	Protéines ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
H-L	1409 \pm 50
H-By	2209 \pm 83
H-FC	2436 \pm 33
H-B	1743 \pm 19
H-Ce	1463 \pm 50
H-A	2463 \pm 83
H-Py	1316 \pm 33
H-Ch	1276 \pm 33
H-Pr	1383 \pm 38
H-T	1609 \pm 19
H-G	2596 \pm 33
H-S	1223 \pm 38
H-M	1143 \pm 19
H-O	516 \pm 33

IV.5.6. Teneur en hydroxyméthylfurfurale

L'hydroxyméthylfurfurale (HMF) est un composé organique issu de la déshydratation de certains sucres. La mesure de la teneur en HMF a été faite afin d'évaluer la qualité du miel frais. Généralement, ce composé s'est formé au cours de la déshydratation des hexoses catalysée par un acide. Sa teneur augmente pendant le conditionnement thermique afin d'empêcher la cristallisation ou la fermentation du miel [18]. Selon le *Codex Alimentarius*, le miel ne doit pas dépasser un taux du HMF de $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, afin de garantir qu'il n'a pas été chauffé durant son traitement, ainsi qu'un taux de $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dans le cas des miels provenant de régions où règnent des températures ambiantes tropicales. La teneur en HMF des différents échantillons de miel a été établie en utilisant la méthode décrite par White [19]. Pour cela, un volume de 0,5 mL de la solution de Carrez I (1 g de ferrocyanure de potassium dans 100 mL d'eau) a été ajouté à 5 g de chaque échantillon de miel et ce volume a été complété à 25 mL avec de l'eau distillée. Ensuite, le mélange a été ajouté à 0,5 mL de la solution de Carrez II (30 g d'acétate de zinc dans 100 mL d'eau), puis complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Les solutions ont été filtrées par la suite, à travers un filtre à membrane de diamètre 0,45 μm . L'absorbance des solutions obtenues a été lue à 284 nm et 336 nm contre une solution de blanc traitée avec 0,2% de bisulfite de sodium comme un inhibiteur de la liaison carbonyle dans la structure du HMF. La teneur en HMF a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{HMF (mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ miel)} = (A_{284} - A_{336}) \times 149,7$$

Où:

- A_{284} : absorbance à 284 nm ;
- A_{336} : absorbance à 336 nm ;
- 149,7: un facteur correspondant au poids moléculaire du HMF et à la masse de l'échantillon.

La teneur en HMF des quatorze échantillons de miel se situe entre 0,1 et 12 mg.kg⁻¹ pour les échantillons H-Py et H-Ch, respectivement (Tableau IV.7), ce qui reste inférieur à la limite tolérée par le *Codex Alimentarius*. Ceci indique que les miels étudiés n'ont pas subi des traitements thermiques durant leur production.

Tableau IV.7: Résultats de la teneur en HMF des miels analysés.

Sample code	HMF (mg.kg ⁻¹)
H-L	7 ± 1
H-By	6 ± 1
H-FC	2 ± 1
H-B	1 ± 1
H-Ce	4 ± 1
H-A	3 ± 1
H-Py	1 ± 1
H-Ch	12 ± 1
H-Pr	4 ± 1
H-T	1 ± 1
H-G	3 ± 1
H-S	6 ± 1
H-M	6 ± 1
H-O	8 ± 1

IV.5.7. Modélisation par la méthode de la régression à moindres carrées

Afin de confirmer la relation entre les résultats voltammétriques obtenus par la langue électronique (données de la matrice ΔI pour les sept capteurs) et ceux des études physico-chimiques ci-avant, la méthode PLS a été appliquée. Le but de l'utilisation de cette technique est de construire ainsi que de valider des modèles statistiques pour prédire les concentrations des différents paramètres à partir des données voltammétriques. La régression par PLS a été réalisée à partir des données de deux matrices : la première notée X contenant les valeurs ΔI des voltammogrammes cycliques et la deuxième notée Y contenant les différentes valeurs des paramètres physico-chimiques. La Figure IV.5 représente les modèles de la corrélation linéaire ainsi obtenus.

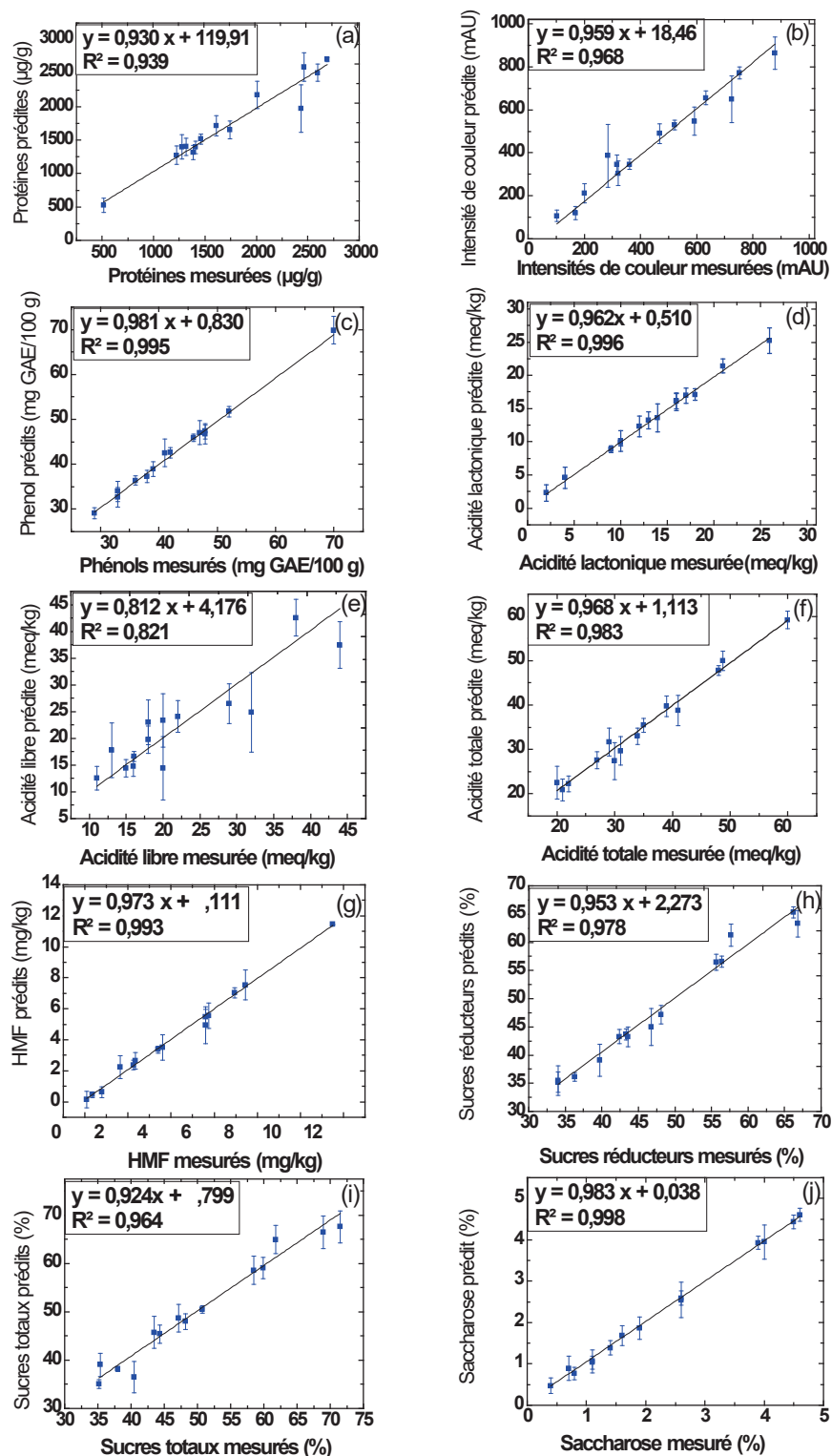


Figure IV.5 : Modèles PLS obtenus pour les paramètres physico-chimiques : (a) : protéine, (b) : intensité de couleur, (c) : phénol, (d) : acidité lactonique, (e) : acidité totale, (f) : acidité libre, (g) : HMF, (h) : sucres réducteurs, (i): sucres totaux et (j): saccharose.

Par ailleurs, le Tableau IV.8 récapitule la corrélation observée pour les paramètres analysés. Les meilleurs résultats étant pour la teneur en saccharose avec un coefficient de corrélation (r) de 0,999, puis l'acidité lactonique ($r=0,998$), les phénols ($r=0,997$), le taux du

HMF ($r=0,996$), l'acidité totale ($r=0,991$), les sucres réducteurs ($r=0,988$), l'intensité de couleur ($r=0,983$), les sucres totaux ($r=0,982$) et les protéines ($r=0,969$). La corrélation la plus faible a été observée pour la prédiction de l'acidité libre ($r=0,906$). En plus, l'erreur quadratique moyenne normalisée (NRMSE) caractérisant la précision de cette modélisation a été calculée pour chaque paramètre étudiée. Comme le montre le Tableau III.8, le système de la Langue-EV a pu prédire tous les paramètres analysés avec des valeurs de NRMSE comprises entre 0,015 et 0,184. La capacité de prédiction du modèle obtenu a également été évaluée avec le rapport de la performance à la déviation (RPD), qui est le rapport de l'erreur type dans la prédiction à l'écart-type des échantillons. Lorsque la valeur du RPD est supérieure à 2,5, le modèle a une bonne capacité de prédiction [20]. Les modèles résultants pour les paramètres étudiés ont montré des valeurs de RPD supérieures à ce seuil, à l'exception de l'acidité libre (RPD = 2,306), ce qui explique son instabilité dans le temps.

Tableau IV.8 : Performances des modèles PLS pour les paramètres mesurés.

Paramètres	r	NRMSE	RPD
Saccharose	0,999	0,015	2,797
Acidité lactonique	0,998	0,089	5,130
Phénols	0,997	0,031	7,658
HMF	0,996	0,125	6,070
Acidité totale	0,991	0,057	5,584
Sucres réducteurs	0,988	0,048	4,592
Intensité de couleur	0,983	0,103	4,949
Sucres totaux	0,982	0,063	3,637
Protéines	0,969	0,093	3,791
Acidité libre	0,906	0,184	2,306

La fiabilité de ces résultats a été prouvée par une littérature récente, dans laquelle une langue électronique potentiométrique a été appliquée pour la classification botanique et la caractérisation physico-chimique des échantillons de miel [21]. Ceci a été réalisé en prenant comme paramètres : la conductivité électrique, l'acidité totale et la teneur en sucres invertis et en sucres totaux. Une autre langue électronique avec une matrice de cinq électrodes (Ag, Ni, Co, Cu et Au) a été aussi utilisée pour différencier et prédire uniquement la capacité antioxydante totale des échantillons de miel [22]. Par ailleurs, les résultats de corrélations trouvés par la méthode PLS nous ont permis d'offrir une nouvelle méthode très prometteuse basée sur l'exploitation du système de la Langue-EV dans le contrôle de la qualité du miel en se basant sur l'étude des différents paramètres physico-chimiques.

IV.6. Récapitulatif

Au cours de ce travail, nous avons testé la capacité de la Langue-EV pour la discrimination et la caractérisation des miels de différentes origines géographiques. En effet, nous avons, tout d'abord, commencé par présenter les résultats obtenus de la classification des miels de différentes origines géographiques représentant quatorze régions de la France et du Maroc. Ceci a été réalisé à travers le résultat de l'ACP, qui a montré une discrimination des échantillons avec un taux de réussite de 77%. Ce résultat a été confirmé par la CAH et les SVMs avec un taux de réussite de 100%. Nous avons également démontré la fiabilité de ce dispositif à prédire les résultats des différents paramètres physico-chimiques d'après les réponses voltammétriques en utilisant la régression PLS. En guise de conclusion, les résultats de la présente étude ont montré que ce nouveau système basé sur la Langue-EV peut être appliqué avec succès, comme une alternative aux méthodes analytiques classiques, pour un contrôle rapide de la qualité du miel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Scheffer, Qu'est-ce qu'un produit alimentaire lié à une origine géographique ?, *Inf. Géographique*. 68 (2004) 276–280.
- [2] N. El Alami El Hassani, K. Tahri, E. Llobet, B. Bouchikhi, A. Errachid, N. Zine, N. El Bari, Emerging approach for analytical characterization and geographical classification of Moroccan and French honeys by means of a voltammetric electronic tongue, *Food Chemistry*. 243 (2018) 36–42.
- [3] F. Corvucci, L. Nobili, D. Melucci, F.-V. Grillenzoni, The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis, *Food Chem*. 169 (2015) 297–304.
- [4] S. Bogdanov, P. Martin, Honey authenticity, *Mitteilungen Aus Leb. Hyg.* 93 (2002) 232–254.
- [5] K. Ruoff, W. Luginbühl, R. Künzli, S. Bogdanov, J.O. Bosset, K. von der Ohe, W. von der Ohe, R. Amadò, Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6858–6866.
- [6] T. Woodcock, G. Downey, J.D. Kelly, C. O'Donnell, Geographical classification of honey samples by near-infrared spectroscopy: A feasibility study, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 9128–9134.
- [7] I.K. Karabagias, A. Badeka, S. Kontakos, S. Karabournioti, M.G. Kontominas, Characterization and classification of *Thymus capitatus* (L.) honey according to geographical origin based on volatile compounds, physicochemical parameters and chemometrics, *Food Res. Int.* 55 (2014) 363–372.
- [8] Z. Jandrić, R.D. Frew, L.N. Fernandez-Cedi, A. Cannavan, An investigative study on discrimination of honey of various floral and geographical origins using UPLC-QToF MS and multivariate data analysis, *Food Control*. 72 (2017) 189–197.
- [9] M. Bougrini, K. Tahri, T. Saidi, N.E.A. El Hassani, B. Bouchikhi, N. El Bari, Classification of honey according to geographical and botanical origins and detection of its adulteration using voltammetric electronic tongue, *Food Anal. Methods*. 9 (2016) 2161–2173.
- [10] K. Tiwari, B. Tudu, R. Bandyopadhyay, A. Chatterjee, Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue, *J. Food Eng.* 117 (2013) 205–210.
- [11] G. Beretta, P. Granata, M. Ferrero, M. Orioli, R.M. Facino, Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics, *Anal. Chim. Acta*. 533 (2005) 185–191.

- [12] H.A. Alzahrani, R. Alsabehi, L. Boukraâ, F. Abdellah, Y. Bellik, B.A. Bakhotmah, Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins, *Molecules*. 17 (2012) 10540–10549.
- [13] S. Saxena, S. Gautam, A. Sharma, Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys, *Food Chem.* 118 (2010) 391–397.
- [14] C. Alimentarius, Revised codex standard for honey, *Codex Stan.* 12 (2001) 1982.
- [15] S. Bogdanov, P. Martin, C. Lullmann, Harmonised methods of the international honey commission, *Swiss Bee Res. Cent. FAM Liebefeld.* (2002).
- [16] AOAC (2002). Official methods of analysis. Gaithersburg, Maryland, USA: Association of Analytical Communities 1st revision.
- [17] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [18] E. Tosi, M. Ciappini, E. Re, H. Lucero, Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content, *Food Chem.* 77 (2002) 71–74.
- [19] J.W. White Jr, The composition of honey, *Bee World.* 38 (1957) 57–66.
- [20] A.M. Mouazen, N. Al-Walaan, Glucose adulteration in Saudi honey with visible and near infrared spectroscopy, *Int. J. Food Prop.* 17 (2014) 2263–2274.
- [21] N. Major, K. Marković, M. Krpan, G. Šarić, M. Hruškar, N. Vahčić, Rapid honey characterization and botanical classification by an electronic tongue, *Talanta.* 85 (2011) 569–574.
- [22] M. Juan-Borrás, J. Soto, L. Gil-Sánchez, A. Pascual-Maté, I. Escriche, Antioxidant activity and physico-chemical parameters for the differentiation of honey using a potentiometric electronic tongue, *J. Sci. Food Agric.* 97 (2017) 2215–2222.

CHAPITRE V

**VERS UNE APPLICATION DE LA LANGUE
ÉLECTRONIQUE VOLTAMMETRIQUE POUR LE
DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS DES VOIES
URINAIRES**

V.1. Introduction

L'infection des voies urinaires (IVU) est la maladie urologique la plus courante, causée par les bactéries des voies urinaires, telles que l'urètre, la vessie ou les reins. Cette maladie provoque chaque année chez des millions de femmes des symptômes de mictions douloureuses, ainsi que dans des cas plus graves, elle peut entraîner une infertilité [1]. Bien que les hommes soient également à risque, les IVU restent plus fréquentes chez les femmes que les hommes. Cette maladie survient le plus souvent entre 16 et 35 ans et présente un risque élevé de récurrence [2]. Par conséquent, les signes et les symptômes relatifs à la maladie sont suffisants pour réaliser un diagnostic en se basant sur un examen cyto bactériologique de l'urine (ECBU) [3]. Ce test est un examen de biologie médicale qui étudie l'urine d'un patient en fonction de la détermination des globules rouges, les leucocytes estérases, la micro-hématurie, la présence ou l'absence de germes, ainsi que la présence des éventuels cristaux. Un inconvénient majeur de ce test est le délai de culture nécessitant environ 48 h entre la collecte des échantillons et l'identification des agents pathogènes avec le besoin d'un environnement d'analyse stérile. Le test ECBU est souvent réalisé en parallèle avec des analyses par des bandelettes urinaires qui changent leurs couleurs une fois immergées dans des échantillons d'urine. Ceci dans le but de déterminer la présence ou l'absence d'acétone, d'albumine, du glucose et du nitrite en parallèle du pH urinaire. Malgré la sensibilité de ce test, ses performances peuvent être réduites par de nombreuses conditions, telles que la protéinurie, la glycosurie ou la mauvaise conservation des échantillons.

À cet effet, des approches de diagnostics rapides et fiables sont très utiles avec un intérêt accru pour les techniques des analyses sensorielles. Ceci est réalisé en développant les capteurs électrochimiques [4–7] et immuno-enzymatiques [8] ainsi que le nez électronique [9–11] et certaines techniques de détection basées sur la langue électronique voltammétrique (Langue-EV) [12].

Dans ce chapitre, nous avons cherché à évaluer la fiabilité du système de la Langue-EV pour détecter les infections urinaires. Avec cette stratégie de détection, nous pourrions discriminer en quelques minutes les urines saines et infectées, en se basant sur un ECBU comme un test de référence.

V.2. Collecte et pré-analyse des échantillons d'urine

Cette étude a été menée sur 12 femmes âgées de 6 à 64 ans sans comorbidités au moment du diagnostic. La collecte des échantillons a été menée dans le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Mohammed V situé à Meknès. Après un nettoyage minutieux et une désinfection locale

avec une solution antiseptique, les urines du matin (20 mL) ont été recueillies dans des flacons stériles. Ces échantillons ont été analysés sans aucun prétraitement dans les 4 h suivant leur prélèvement afin d'éviter toute altération ou développement bactérien. Par la suite, le pH, le taux de protéines, du nitrite, de l'acétone et du glucose ont été déterminés via des bandelettes urinaires avant d'effectuer les cultures microbiologiques.

V.3. Examen cyto bactériologique de l'urine

V.3.1. Étapes de réalisation

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) est une analyse d'urines prescrite dans le cadre d'un diagnostic ou du suivi d'une infection du tractus urinaire, celui-ci étant normalement stérile. Ce test permet de confirmer l'infection urinaire et d'identifier l'agent responsable. L'ECBU débute par un examen macroscopique de l'échantillon d'urine qui permet de noter :

- l'aspect limpide, trouble ou avec des hématies ;
- la couleur (jaune pâle ou jaune foncé) qui renseigne sur la concentration en eau de l'urine, sachant toutefois que certains médicaments peuvent la teinter.

1- **L'examen cytologique** correspond à la numération des différentes cellules présentes dans les urines :

- la présence de leucocytes (leucocytes estérases) est un élément décisif de l'infection urinaire et du processus inflammatoire (leucocyturie) ;
- la présence des érythrocytes (hémoglobine) ;
- la présence d'hématies, qui doivent être en faible quantité, leur nombre important traduit une possible infection, mais ne constitue pas un élément décisif du diagnostic (hématurie) ;
- la présence de cristaux d'acide urique en cas d'insuffisance rénale aiguë (hyperuricémie) et des cristaux de cystine (cystinurie) ;
- des cellules épithéliales d'origine vaginale qui signent une contamination rendant le prélèvement non interprétable.

2- **L'examen bactériologique** comprend l'examen microscopique avec coloration de Gram, ainsi qu'une culture microbiologique consistant à l'identification et le dénombrement des germes, exprimés en unités formant colonies (UFC).mL⁻¹. La présence d'une éventuelle bactériurie (souvent *Escherichia coli*) en quantités supérieures ou égales à 10⁴ UFC.mL⁻¹ confirme une IVU.

- 3- L'**antibiogramme** permet d'analyser la sensibilité des éventuelles bactéries aux différents antibiotiques afin de prescrire le traitement adapté.

V.3.2. Résultats de l'ECBU

Les données de l'ECBU obtenues après l'examen cytologique et la culture microbiologique pendant 24 h sur un milieu gélosé enrichi en cystine et lactose pauvre en ions (CLED) sont rassemblées dans le Tableau V.1. Cet examen s'est avéré positif pour 6 patientes (P619, P4100, P4360, P4508, P5327, P4811) ayant des infections urinaires causées par la présence de la bactérie *Escherichia coli* et négatif pour le reste des individus. Le pH de ces échantillons d'urine est relativement plus élevé chez les patientes atteintes des IVU (pH = 7,4) que chez les individus sains (pH = 6,5). Cela s'explique par l'alcalinité des urines infectées, favorisant la croissance bactérienne. Cependant, les échantillons des deux individus P4100 et P5327, ayant des IVU confirmées par l'ECBU ont présenté une leucocyturie et une nitriturie négatives, dû à leurs jeunes âges (6 et 10 ans), ayant de petites vessies à vidange vésicale restreinte, donc dans ce cas l'urine n'a pas trop séjournée dans la vessie [13]. Par conséquent, ces tests négatifs n'excluent pas la présence d'une IVU. En outre, une leucocyturie positive a été observée pour l'individu P4511, avec une culture négative. Ce taux élevé de leucocytes dans l'urine peut apparaître en raison des changements hormonaux soudains dans le corps de cette femme enceinte, ou pendant une éventuelle prise d'antibiotiques avant la collecte de l'échantillon.

Par ailleurs, le taux élevé des érythrocytes dans l'urine a été évalué comme un marqueur d'une hématurie causée par une infection grave. Le taux d'érythrocytes dans les urines étudiée ne dépasse pas 10^3 , ce qui correspond aux résultats normaux. Une exception a été montrée pour l'individu P4731 avec une hématurie en dehors des menstruations, indiquant la présence des quantités anormales de globules rouges. Cela peut être dû à la présence d'infections, de traumatismes, de calculs rénaux, d'une grossesse ou d'une tumeur de la vessie. En outre, la protéinurie exprimée par la teneur en albumine est normalement retenue au niveau de la barrière glomérulaire. Elle est souvent présente dans l'urine à des niveaux infimes (inférieurs à $0,20 \text{ g.L}^{-1}$), mais sa présence élevée dans les urines indique l'existence d'une lésion dans les glomérules rénaux. Dans la présente étude, tous les individus ont des taux d'albumine normaux, à l'exception des individus P4511 et P4731 en raison de leur grossesse ce et non à une IVU, ce qui explique leurs résultats d'ECBU négatifs.

Tableau V.1 : Résultats de l'ECBU de la population étudiée.

Code d'échantillon	pH	Age	Nitrite	Leucocytes .mL ⁻¹	Érythrocytes .mL ⁻¹	Albumine	Culture
619	7,4	38	0	350000	< 10 ³	Trace	Positive
4100	6,3	6	0	< 10 ⁴	< 10 ³	0	Positive
4360	5,0	36	0	2000000	< 10 ³	0	Positive
4508	6,3	64	+	250000	< 10 ³	0	Positive
5327	6,0	10	0	< 10 ⁴	< 10 ³	0	Positive
4811	6,5	30	+	150000	< 10 ³	0	Positive
3147	6,0	46	0	< 10 ⁴	< 10 ³	0	Négative
4114	5,5	43	0	< 10 ⁴	< 10 ³	0	Négative
4511	6,5	33	0	200000	< 10 ³	++	Négative
4648	6,5	60	0	< 10 ⁴	< 10 ³	Trace	Négative
4731	5,5	30	0	Hématurie		++	Négative
4744	6,2	30	0	< 10 ⁴	< 10 ³	0	Négative

V.4. Analyses par la Langue-EV

La discrimination des échantillons d'urine a été réalisée par le système de la Langue-EV, déjà décrit dans notre précédent travail (Chapitre IV). Les mesures par la voltammétrie cyclique (VC) ont été effectuées par six électrodes de travail constituées d'or (Au), d'argent (Ag), de cuivre (Cu), de carbone vitreux (GC), de palladium (Pd) et de platine (Pt), avec une électrode de référence en Ag/AgCl (saturée en solution KCl (1 M)) et une électrode de Pt utilisée comme électrode auxiliaire. Les mesures par la VC ont été effectuées dans une marge de potentiel entre -0,4 et 0,8 V avec une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹. Treize mesures différentes ont été effectuées avec chaque échantillon d'urine. La Figure V.1 montre les voltammogrammes de l'électrode d'argent de certains individus ayant des résultats de l'ECBU positifs et négatifs.

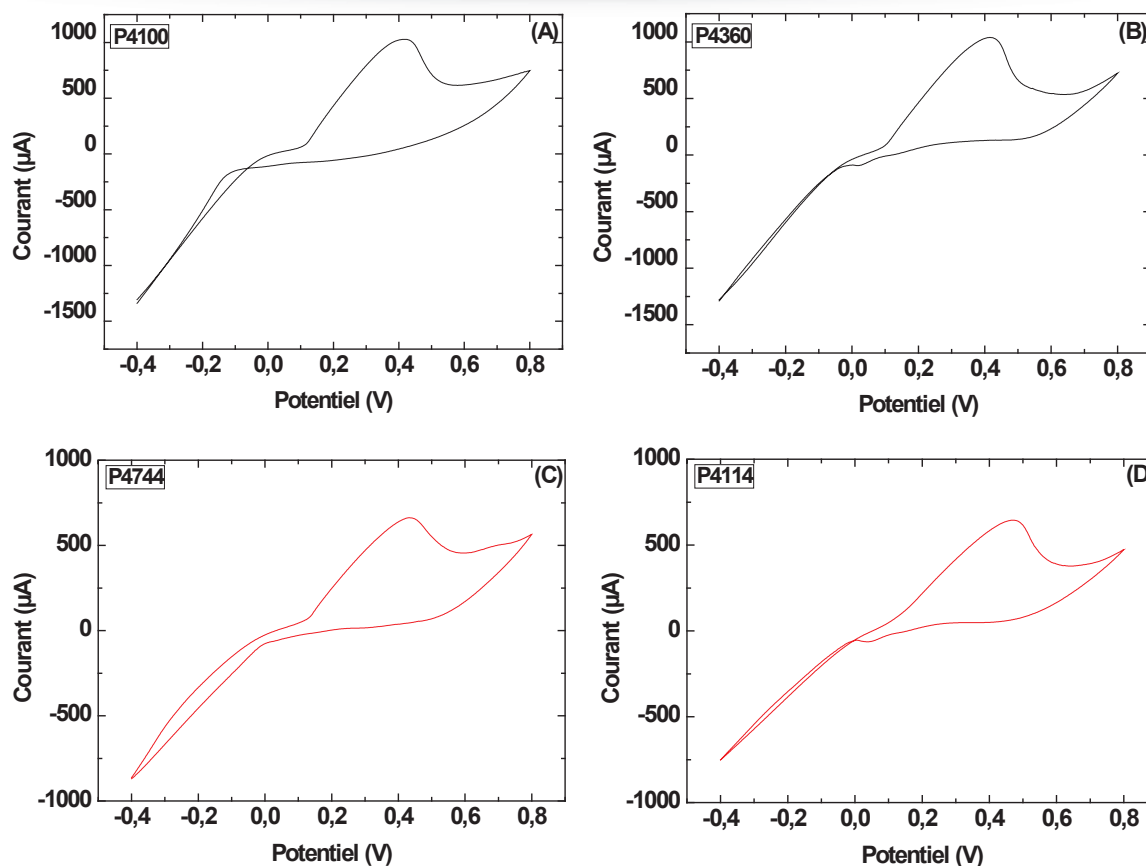


Figure V.1 Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'argent relatifs aux individus (A,B) P4100 et P4360 ayant un résultat d'ECBU positif, (C,D) P4744 et P4114 ayant un résultat d'ECBU négatif.

Une intensité de courant élevée a été obtenue d'après les réponses des voltammogrammes de l'électrode d'argent avec un comportement assez similaire pour les autres électrodes. Pour bien visualiser cette variation, des représentations radiales de données normalisées ont été réalisées (Figure V.2). Pour construire ces représentations radiales, les valeurs de la variation des pics de courant (ΔI) des six capteurs de la Langue-EV ont été divisées par la valeur ΔI correspondante au capteur ayant la réponse maximale. Comme nous pouvons le constater, ces diagrammes révèlent une variation de courant entre les échantillons d'urine des individus sains et autres ayant des IVU, ce qui s'explique par la variation de la composition de ces urines. Ainsi, ces représentations ont pu anticiper les résultats d'une discrimination par des analyses multivariées de données, en l'occurrence l'AFD et les SVMs.

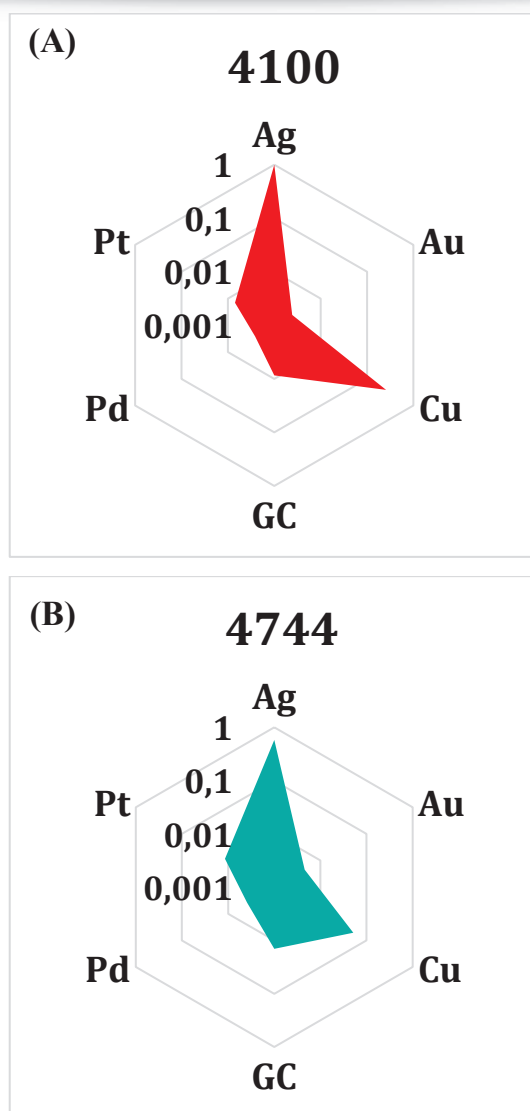


Figure V.2 : Représentations radiales des échantillons d'urine de deux individus (A) sans IVU, (B) avec IVU.

V.5. Traitement statistique des données

Les données collectées par le système de la Langue-EV ont été analysées par un logiciel de traitement statistique en fonction des programmes concernés. En premier lieu, la variation de courant comme étant la différence entre les valeurs cathodique et anodique du courant (ΔI), a été extraite des voltammogrammes cycliques comme variable de chaque capteur. Ensuite, une sélection des électrodes les plus discriminantes a été effectuée afin de déterminer ceux conduisant le plus à une séparation nette entre les deux populations étudiées.

Le graphique montrant cette sélection sur un espace à deux dimensions est représenté sur la Figure V.3. Les points de données proches de zéro indiquent une faible contribution de l'électrode, donc ce sont des électrodes non-discriminantes. Selon cette distribution, seules

quatre électrodes, à savoir Ag, Au, Cu et GC, contribuent de manière significative à la discrimination des échantillons d'urine relatifs aux IVU. Alors qu'avec les électrodes Pd et Pt la discrimination des échantillons d'urine étudiés n'a été observée. Par conséquent, les données de ces électrodes ont été retirées avant d'appliquer les méthodes multivariées d'analyse de données.

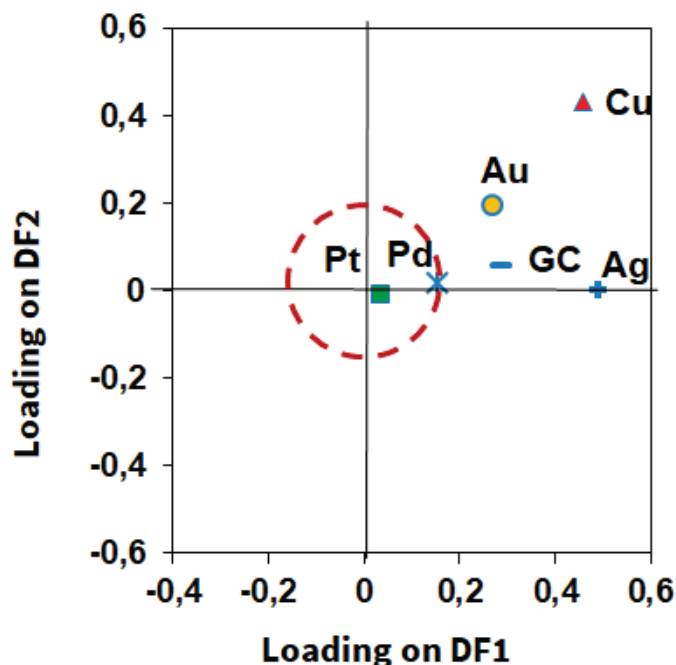


Figure V.3 : Diagramme de sélection des électrodes discriminantes en utilisant la base de données de la variable ΔI .

V.5.1. Discrimination par l'analyse factorielle discriminante

Afin d'examiner la capacité de la Langue-EV à regrouper les échantillons d'urine, l'AFD a été réalisée. Cette méthode statistique a été adoptée en raison de sa grande capacité de discriminer les populations étudiées même avec un faible nombre d'échantillonnage avec la possibilité d'identifier un échantillon inconnu.

La Figure V.4 (A) montre une séparation bien définie entre les urines des individus en bonne santé par rapport aux patientes ayant des IVU. Alors que la Figure V.4 (B) montre une amélioration de cette discrimination après la sélection des électrodes les plus discriminantes, en éliminant tout chevauchement entre les deux classes étudiées. Le résultat obtenu indique donc que les bactéries responsables des IVU ont une influence sur les signaux voltammétriques, permettant par conséquent de distinguer les deux groupes d'urine étudiés. Ce résultat détermine la fiabilité du dispositif de la Langue-EV à discriminer les urines des individus ayant une IVU des autres qui ne l'ont pas. En plus, ce dispositif a permis de classer directement les échantillons des individus P4100 et P5327 avec ceux qui ont des IVU malgré leur leucocyturie et leur nitriturie confirmées par les bandelettes urinaires. En outre, l'échantillon de l'individu 4511

avec une leucocyturie élevée et un résultat d'ECBU négatif a été classé avec les échantillons des individus sains.

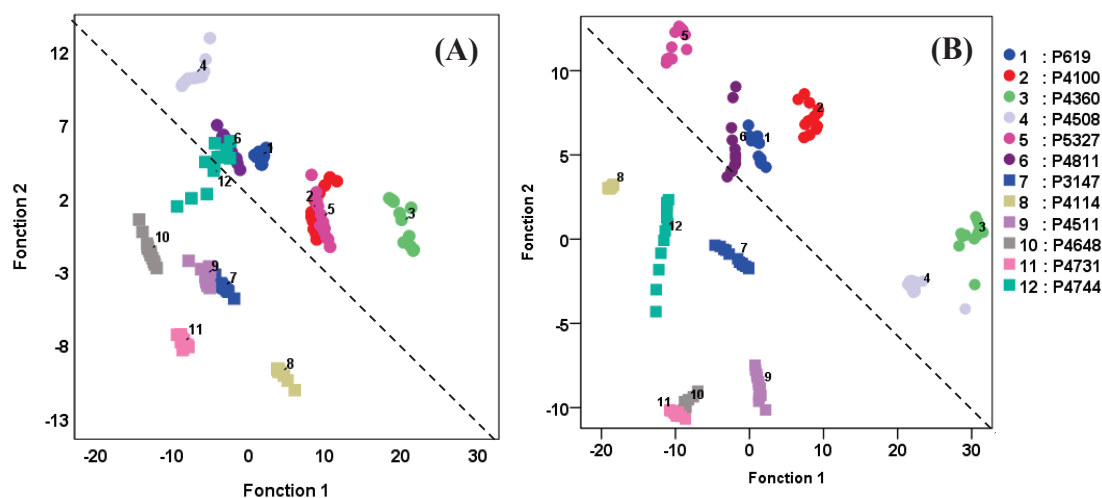


Figure V.4 : Diagrammes de l'analyse par l'AFD des douze échantillons d'urine, (A) avant, (B) après sélection des électrodes les plus discriminantes.

V.5.2. Classification par les séparateurs à vastes marges

Les séparateurs à vastes marges (SVMs), qui constituent une méthode de classification supervisée, ont été utilisés pour développer le modèle de classifieur et pour affecter les échantillons en tant que groupes définis a priori pour le modèle des SVMs.

En raison du faible nombre d'échantillons disponibles, une procédure de validation croisée a été réalisée pour estimer le taux de réussite réel de discrimination. Le Tableau V.2 présente la matrice de confusion incluant les informations sur les classes réelles et prédites réalisées par la méthode des SVMs. Comme nous pouvons l'observer dans ce tableau, les échantillons d'urine étudiés ont été correctement identifiés en fonction de la présence ou de l'absence des IVU avec deux erreurs de reclassement signalées : une mesure appartenant à P4811 a été classée par erreur comme appartenant à P4744 et une autre mesure appartenant à P4731 a été classée avec l'échantillon P4648. Par ailleurs, un taux de réussite de 98,61% a été démontré par les SVMs pour la discrimination des urines étudiées.

Tableau V.2 : Matrice de confusion des douze échantillons d'urine identifiées par les SVMs.

Affectation a priori	Classes de données à posteriori											
	P619	P4100	P4360	P4508	P5327	P4811	P3147	P4114	P4511	P4648	P4731	P4744
P619	12											
P4100		12										
P4360			12									
P4508				12								
P5327					12							
P4811						11						1
P3147							12					
P4114								12				
P4511									12			
P4648										12		
P4731											1	11
P4744												12

V.6. Récapitulatif

Dans cette étude, nous avons présenté la capacité de la Langue-EV basée sur quatre électrodes de travail à distinguer les échantillons d'urines des patientes atteintes d'infections urinaires de ceux de femmes saines. Des tests de l'ECBU ont été réalisés, en tant que techniques de référence afin de valider la présence ou l'absence de cette maladie. L'AFD nous a permis de visualiser nettement les différences existantes entre les deux classes des urines étudiées avec un score de discrimination de 100%. De plus, les SVMs basés sur l'approche « un-contre-un » ont montré un taux de discrimination réussi à 98,61%. Les résultats actuels ont démontré la capacité de cette Langue-EV en tant que système de diagnostic rapide, non invasif, portable et peu coûteux, à la détermination clinique des infections urinaires, avec une bonne fiabilité de pronostic de la maladie en comparaison avec les résultats donnés par les bandelettes urinaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Griebling, Tomas L., Urinary tract infection in women, in: Urol. Dis. Am., 2007: pp. 587–619.
- [2] J. Car, Urinary tract infections in women: diagnosis and management in primary care, BMJ. 332 (2006) 94–97.
- [3] S. Berthélémy, L'examen cyto bactériologique des urines, Actual. Pharm. 55 (2016) 57–59.
- [4] J.C. Liao, M. Mastali, V. Gau, M.A. Suchard, A.K. Møller, D.A. Bruckner, J.T. Babbitt, Y. Li, J. Gornbein, E.M. Landaw, E.R.B. McCabe, B.M. Churchill, D.A. Haake, Use of electrochemical DNA biosensors for rapid molecular identification of uropathogens in clinical urine specimens, J. Clin. Microbiol. 44 (2006) 561–570.
- [5] Y. Pan, G.A. Sonn, M.L.Y. Sin, K.E. Mach, M.-C. Shih, V. Gau, P.K. Wong, J.C. Liao, Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 649–654.
- [6] K.E. Mach, C.B. Du, H. Phull, D.A. Haake, M.-C. Shih, E.J. Baron, J.C. Liao, Multiplex pathogen identification for polymicrobial urinary tract infections using biosensor technology: a prospective clinical study, J. Urol. 182 (2009) 2735–2741.
- [7] S. Cho, T.S. Park, T.G. Nahapetian, J.-Y. Yoon, Smartphone-based, sensitive μ PAD detection of urinary tract infection and gonorrhea, Biosens. Bioelectron. 74 (2015) 601–611.
- [8] C.-M. Shih, C.-L. Chang, M.-Y. Hsu, J.-Y. Lin, C.-M. Kuan, H.-K. Wang, C.-T. Huang, M.-C. Chung, K.-C. Huang, C.-E. Hsu, C.-Y. Wang, Y.-C. Shen, C.-M. Cheng, Paper-based ELISA to rapidly detect *Escherichia coli*, Talanta. 145 (2015) 2–5.
- [9] V.S. Kodogiannis, J.N. Lygouras, A. Tarczynski, H.S. Chowdrey, Artificial odor discrimination system using electronic nose and neural networks for the identification of urinary tract infection, IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed. 12 (2008) 707–713.
- [10] M. Bernabei, G. Pennazza, M. Santonico, C. Corsi, C. Roscioni, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, A preliminary study on the possibility to diagnose urinary tract cancers by an electronic nose, Sens. Actuators B Chem. 131 (2008) 1–4.
- [11] L. Capelli, G. Taverna, A. Bellini, L. Eusebio, N. Buffi, M. Lazzeri, G. Guazzoni, G. Bozzini, M. Seveso, A. Mandressi, L. Tidu, F. Grizzi, P. Sardella, G. Latorre, R. Hurler, G. Lughezzani, P. Casale, S. Meregali, S. Sironi, Application and uses of electronic noses for clinical diagnosis on urine samples: A Review, Sensors. 16 (2016) 1708.
- [12] D. Lelli, C. Pedone, P. Alemanno, A. Bertini, C.D. Gioia, S. Fazzina, G. Pennazza, M. Santonico, S. Grasso, A. Zompanti, S. Angeletti, R.A. Incalzi, Voltammetric analysis for

fast and inexpensive diagnosis of urinary tract infection: a diagnostic study, *J. Transl. Med.* 16 (2018) 17.

- [13] G.G. Sagbo, F. Sogbo, H.F. Lalya, J. Agossou, Y. Tohodjèdé, F. Alihonou, G. Bognon, D. Ahinonhossou, A. Dissou, B. Ayivi, Contribution of the urine dipstick to urinary tract infection diagnosis among children in two hospitals in Cotonou-Benin, *Open J. Pediatr.* 07 (2017) 272.

Conclusion générale

Les objectifs de ce travail de recherche sont de développer et d'exploiter pratiquement des immunocapteurs, des capteurs et des multi-capteurs électrochimiques dans la sécurité alimentaire et l'analyse biomédicale.

Dans un premier temps, nous avons présenté un état de l'art qui nous a permis de contextualiser notre problématique vis-à-vis des recherches actuelles et de souligner les différents types de capteurs et biocapteurs utilisés qui ont servi à la réalisation de nos travaux de recherche. Ensuite, nous avons subdivisé ce mémoire en deux parties. Dans la première, nous avons commencé par le développement des immunocapteurs électrochimiques pour la détection des résidus de la sulfapyridine et la tétracycline dans le miel à des limites de détection de 0,4 et 1,2 pg.mL^{-1} , respectivement. L'originalité de cette élaboration réside dans le type de matériaux, les techniques de fonctionnalisations basées sur des réseaux d'immobilisation à deux et à trois dimensions (2D, 3D), ainsi que les méthodes de détection qui ont été soigneusement sélectionnées.

En outre, des capteurs biomimétiques ont été développés au cours de cette thèse, concernant le développement des systèmes sensibles et sélectifs à base des polymères à empreintes moléculaires, ayant la capacité de détecter les résidus de certains antibiotiques notamment la sulfaguanidine, la doxycycline et le chloramphénicol dans le miel. Les capteurs biomimétiques développés ont montré de faibles limites de détection de l'ordre de : 0,17 ; 0,10 ; 0,40 pg.mL^{-1} pour la sulfaguanidine, la doxycycline et le chloramphénicol, respectivement. Ce résultat nous a permis de conclure sur les avantages d'utilisation des capteurs à base des polymères à empreintes moléculaires en raison de leurs faibles coûts de développement, leurs grandes stabilités, ainsi que leurs bonnes affinités pour de petites molécules organiques.

La deuxième partie de ces travaux de recherche a été consacrée à l'évaluation de la capacité d'une langue électronique voltammétrique (Langue-EV) pour la discrimination et la caractérisation des échantillons de miels de différentes origines géographiques du Maroc et de la France. En effet, nous avons, tout d'abord, commencé par présenter les résultats obtenus de la classification de ces miels issus de quatorze régions par des méthodes de reconnaissance de formes qui ont démontré une parfaite discrimination entre les différents échantillons étudiés. Nous avons également démontré la fiabilité de ce dispositif à prédire les résultats des paramètres physico-chimiques d'après les réponses de la Langue-EV en utilisant la méthode de la régression à moindres carrées. Comme la Langue-EV a fait ses preuves dans le contrôle de la qualité du miel, nous l'avons exploitée dans une analyse biomédicale. Cette étude a consisté à distinguer les échantillons d'urines des patientes atteintes d'infections urinaires de ceux de femmes saines en utilisant le même dispositif de la Langue-EV combiné aux méthodes de

reconnaissance de formes. Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de ce dispositif à discriminer les échantillons d'urines selon la présence ou l'absence d'infections urinaires.

En guise de conclusion, nous avons démontré à travers les nombreuses applications effectuées au cours de ce travail de thèse, que les systèmes à base de capteurs et biocapteurs électrochimiques constituent des alternatives très intéressantes par rapport aux différentes techniques classiques en termes de rapidité, portabilité, coût réduit et facilité d'utilisation.

Par ailleurs, de nombreuses perspectives sont envisageables pour la poursuite de ces travaux de recherche. Concernent le volet agroalimentaire, nous envisageons le développement de biocapteurs et de capteurs à base des polymères à empreintes moléculaires pour la détection d'autres contaminants alimentaires tels que les aflatoxines et les pesticides. Nous pouvons également élargir le champ d'application de nos travaux de recherche sur le volet biomédical. Ceci concerne l'application de la Langue-EV, comme une méthode rapide et non invasive pour la détection des infections urinaires avec un échantillonnage élevé. En outre, nos perspectives concernent aussi le développement des biocapteurs pour le dosage des marqueurs tumoraux dans les fluides biologiques dans le but de diagnostiquer certains types de cancer.