



HAL
open science

Nanobiocapteurs pour la détection de micropolluants

Maroua Hamami

► **To cite this version:**

Maroua Hamami. Nanobiocapteurs pour la détection de micropolluants. Chimie analytique. Université Paris-Saclay; Université de Tunis El Manar, 2021. Français. NNT : 2021UPASF021 . tel-03908944

HAL Id: tel-03908944

<https://theses.hal.science/tel-03908944>

Submitted on 21 Dec 2022

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.

Nanobiocapteurs pour la détection de micropolluants

Nanobiosensors for micropollutant detection

**Thèse de doctorat de l'université de Tunis El Manar et de
l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 571, sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de chimie moléculaire et
des matériaux d'Orsay, 91405, Orsay, France.
Référént : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 20/04/2021, par**

Maroua HAMAMI

Composition du Jury

Mohamed Lotfi EFRIT Professeur, Université Tunis El Manar	Président
Abdelhamid ERRACHID Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur & Examineur
Ali OTHMANE Professeur, Université de Monastir	Rapporteur & Examineur
Rachel MEALLET-RENAULT Professeur, Université Paris Saclay	Examinatrice

Direction de la thèse

Noureddine RAOUAFI Professeur, Université Tunis El Manar	Directeur de thèse
Hafsa KORRI-YOUSOUFI Directrice de recherche, Université Paris Saclay	Co-directrice de thèse

Nanobiocapteurs pour la détection de micropolluants

Nanobiosensors for micropollutant detection

**Thèse de doctorat de l'université de Tunis El Manar et de
l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 571, sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de chimie moléculaire et
des matériaux d'Orsay, 91405, Orsay, France.
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 20/04/2021, par**

Maroua HAMAMI

Composition du Jury

Mohamed Lotfi EFRIT Professeur, Université Tunis El Manar	Président
Abdelhamid ERRACHID Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur & Examineur
Ali OTHMANE Professeur, Université de Monastir	Rapporteur & Examineur
Rachel MEALLET-RENAULT Professeur, Université Paris Saclay	Examinatrice

Direction de la thèse

Noureddine RAOUAFI Professeur, Université Tunis El Manar	Directeur de thèse
Hafsa KORRI-YOUSOUFI Directrice de recherche, Université Paris Saclay	Co-directrice de thèse

Anne-Chantal Gouget-Laemmel Directrice de recherche, Ecole Polytechnique	Invitée
---	---------

À LA MÉMOIRE DE MON PÈRE
À MA MÈRE
À MES FRÈRES
À TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

Ce travail de doctorat a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle au sein du Laboratoire de Chimie Analytique et Electrochimie (LCAE) à la Faculté des Sciences de Tunis de l'Université de Tunis El Manar (Tunisie) et du Laboratoire de Chimie Bioorganique et Bioinorganique (LCBB) à L'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) de l'Université Paris Saclay (France).

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens à adresser tout d'abord mes sincères remerciements à mon directeur de thèse : M. Nouredine RAOUAFI, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis et ma directrice de thèse : Mme Hafsa KORRI-YOUSSOUFI, Directrice de recherche au CNRS, pour m'avoir accueillie dans leurs équipes de recherche au sein desquelles j'ai enrichi ma formation et bénéficié de leurs expertises scientifiques de haut niveau. Je les remercie également pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour les nombreux moyens qu'ils ont mis à ma disposition et pour les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ces années. J'ai été très sensible à leur générosité et à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension. Qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance.

Je remercie très vivement, toutes les personnes qui ont accepté de participer au jury de cette thèse :

M. Mohamed Lotfi EFRIT, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, m'a fait l'honneur en acceptant de juger ce travail et de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

M. Abdelhamid ERRACHID EL SALHI, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, et M. Ali OTHMANE, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir, pour avoir bien voulu s'intéresser à l'évaluation de cette thèse. Je suis très honorée par leur participation au jury en tant que rapporteurs.

Mme Rachel MEALLET-RENAULT, Professeur à l'université Paris Saclay, pour l'intérêt qu'elle a manifesté à l'égard de ce travail en acceptant d'en être l'examinatrice.

Mes vifs et sincères remerciements vont également à Mme Anne-Chantal GOUGET-LAEMMEL, Directrice de recherche au CNRS, pour ses précieux conseils scientifiques qui m'ont permis d'avancer sur mon projet de thèse en tant que membre de mon comité de suivi, ainsi que pour ses qualités humaines.

J'exprime toute ma reconnaissance à M. Khaled BOUJLEL, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis et ancien directeur du laboratoire LCAE, qui a su nous inspirer non seulement en tant que scientifique mais aussi par ses qualités humaines.

Je tiens à remercier M. Azzedine BENDOUNAN, Scientifique à Synchrotron Soleil, de m'avoir accueillie au sein de la ligne TEMPO pour la réalisation des analyses XPS haute résolution.

Je voudrais aussi remercier tout le personnel de l'ICMMO, en particulier M. François BRISSET qui a été très patient et disponible pour passer tous mes échantillons au MEB et Mr Jean Pierre BALTAZE qui a été là pour m'aider avec la RMN.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du LCBB ; M. Jean-Pierre MAHY, M. Remy RICOUX, Mme Hélène DORIZON, M. Laurent SALMON, M. Wadih GHATTAS, Mme Stéphanie PETHE, M. Frédéric AVENIER et M. Raphael LABRUERE, pour leur accueil chaleureux et leurs conseils avisés durant les séminaires de laboratoire.

Un grand merci à Mme Stéphanie LATIMIER et Mme Corinne RUELLO pour leur bonne humeur, leur aide précieuse et leurs qualités humaines.

Je remercie tous les membres et ex-membres du LCAE et LCBB pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignés durant ces années de dur labeur. Une pensée particulière pour Syrine, Charles, Guillermo, Xavier, Nada, Hang, Anne Gaelle, Maguy, Meriem, Awatef, Mohamed, Sondes et Riham avec qui j'ai partagé que de bons moments.

Je voudrais aussi remercier mes chers ami(e)s ; Dalel, Moneim Alma, *Princesse, Abdou*, Nabil, *Dali*, Amira et Yasmine, pour leur soutien moral, leur présence et leur encouragement durant les périodes difficiles ainsi que pour les merveilleux moments partagés ensemble. Mes remerciements vont aussi à mes ami(e)s que j'ai rencontré

durant mon séjour en France ; Meryem, Anna, *Kala*, *Hissema*, *Yoyo*, Nawel qui ont fait en sorte que cette expérience soit extrêmement agréable.

Je remercie très profondément avec beaucoup d'émotions ma chère maman pour ses tendres encouragements et ses sacrifices sans oublier mes chers frères pour leur soutien inconditionnel et leur amour. Je prie le bon Dieu de veiller sur eux.

Pour finir, je dédie ce travail à la mémoire de mon père adoré qui est parti trop tôt et à qui je dois tant. Aucune dédicace ne pourrait exprimer ma reconnaissance et mes profonds sentiments envers lui

A tous ceux que j'ai omis de citer, **Merci**

Table des matières

Table des matières	i
Liste des abréviations et terminologie	vii
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etat de l'art	
1. Introduction	5
2. Généralité sur les biocapteurs	5
2.1. Définition d'un biocapteur	5
2.2. Critère d'évaluation	6
2.3. Nature des biorécepteurs	7
2.3.1. Biorécepteurs d'hybridation	7
2.3.1.1. Définition de l'ADN	7
2.3.1.2. Extraction et amplification de l'ADN	8
2.3.2. Biorécepteurs d'affinité	9
2.3.2.1. Les aptamères	10
2.3.2.2. Structures secondaires des aptamères	10
2.3.2.3. Sélection des aptamères	11
2.3.2.4. Propriétés des aptamères	12
2.3.3. Biorécepteurs catalytiques	13
2.3.3.1. Les ADNzymes	13
2.3.3.2. Structure et Mécanisme de clivage	15
2.3.3.3. Propriétés des ADNzymes	16
2.4. Les transducteurs	17
2.4.1. Les transducteurs ampérométriques	17
2.4.2. Les transducteurs potentiométriques	17

2.4.3.	Les transducteurs conductimétriques	18
2.4.4.	Les transducteurs impédimétriques	18
2.5.	Les méthodes d’immobilisation des sondes redox	18
2.5.1.	Immobilisation par adsorption	19
2.5.2.	Immobilisation par intercalation	20
2.5.3.	Immobilisation covalente	20
3.	Nanomatériaux	21
3.1.	Les semi-conducteurs 2D	22
3.1.1.	Structure cristalline	23
3.1.2.	Méthodes de préparation	24
3.1.2.1.	Exfoliation.....	24
3.1.2.2.	Dépôt chimique en phase vapeur (CVD).....	25
3.1.2.3.	La méthode hydrothermale	26
3.1.3.	Les propriétés	27
3.1.3.1.	Structure de bande.....	27
3.1.3.2.	Propriétés optiques.....	28
3.1.3.3.	Propriétés électroniques	28
3.1.3.4.	Propriétés chimiques	29
3.1.4.	Application	29
3.2.	Les polymères conducteurs	31
3.2.1.	Les voies de synthèse du polypyrrole	33
3.2.1.1.	Synthèse chimique	33
3.2.1.2.	Synthèse par voie électrochimique	34
3.2.1.3.	Les propriétés électriques du polypyrrole.....	35
3.2.2.	Application	36
3.3.	Les nanohybrides	39
3.3.1.	Les méthodes de préparation des nanohybrides	40
3.3.1.1.	Méthode classique.....	40

3.3.1.2.	Microémulsion	40
3.3.1.3.	Modification de surface	40
3.3.2.	Caractéristiques des nanomatériaux hybrides à base de semi-conducteurs et de polymères π -conjugués.....	40
3.3.3.	Application	41
4.	La pollution de l'eau.....	42
4.1.	Les polluants aqueux	42
4.1.1.	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	42
4.1.2.	Les nitrates et autres composés azotés	43
4.1.3.	Les pesticides ou produits phytosanitaires	44
4.1.4.	Les métaux lourds	44
4.2.	Normes de qualité environnementale	45
4.3.	Mesure de référence.....	46
5.	Biocapteur pour la détection des polluants.....	47
6.	Conclusion.....	52
	Références bibliographiques chapitre 1.....	53

Chapitre 2: Biocapteur à base de MoS₂/PPy pour la détection de l'ampicilline

1.	Introduction	70
2.	Biocapteur à base du composite MoS ₂ /PPy pour la détection de l'ampicilline	72
2.1.	La sonde redox naphthoquinone.....	72
2.1.1.	Synthèse du dérivé naphthoquinone.....	73
2.2.	Préparation de nanofeuilles MoS ₂ et caractérisation	73
2.2.1.	Préparation des nanofeuilles MoS ₂	73
2.2.2.	Caractérisation des nanofeuilles MoS ₂ par spectroscopie Raman et EDX	74
2.3.	Elaboration du biocapteur.....	74
2.3.1.	1ère étape : Dépôt des nanomatériaux.....	74
2.3.1.1.	Electrodéposition des nanofeuilles MoS ₂	74

2.3.1.2.	Electropolymérisation pulsée du film PPy.....	75
2.3.2.	Fonctionnalisation de la surface par des groupes amines (2ème étape).....	76
2.3.3.	Greffage de NQ et de l'aptamère (3ème étape et 4ème étape).....	77
2.4.	Caractérisation du biocapteur	78
2.4.1.	Etudes structurale et morphologique de la surface	78
2.4.1.1.	Analyses par MEB, EDX et AFM	78
2.4.1.2.	Par spectroscopie infrarouge.....	80
2.4.1.3.	Analyse par spectroscopie des photoélectrons X (XPS).....	81
2.4.2.	Caractérisation électrochimique.....	82
2.4.2.1.	Fonctionnalisation de l'électrode par le système MoS ₂ , PPy et MoS ₂ /PPy .	82
2.4.2.2.	Fonctionnalisation de l'électrode par EDA et la NQ	85
2.4.2.3.	Biofonctionnalisation par l'aptamère.....	88
2.5.	Performances analytiques des biocapteurs	89
2.5.1.	Biodétection de l'AMP.....	89
2.5.1.1.	Mise en évidence de l'interaction Aptamère-cible	89
2.5.1.2.	Détection ampérométrique de l'ampicilline.....	89
2.5.2.	Sélectivité	92
2.5.3.	Application : Détection de l'ampicilline dans des échantillons réels.....	93
2.5.4.	Comparaison avec la littérature.....	95
3.	Conclusion.....	95
	Références bibliographiques chapitre 2	97

Chapitre 3 : Biocapteur à base de MoS₂/ PPy et ADNzyme pour la détection de Pb (II)

1.	Introduction	101
2.	Biocapteur à base de composite MoS ₂ /PPy pour la détection le Pb ²⁺	102
2.1.	Synthèse de la sonde redox intercalante.....	102
2.1.1.	Acridine	102

2.1.2.	Ferrocène	103
2.1.3.	Intercalant acridine-ferrocène	103
2.2.	Elaboration du biocapteur	104
2.2.1.	Contrôle et vérification de la méthode proposée	105
2.2.2.	Optimisation du temps de la formation de la biocouche	106
2.3.	Caractérisation de la biopuce	107
2.3.1.	Etude structurale par FT-IR	107
2.3.2.	Caractérisation électrochimique	108
2.3.3.	Étude cinétique	110
2.4.	Réponse électrochimique du biocapteur	111
2.4.1.	Biodétection de Pb^{2+}	111
2.4.2.	Comparaison avec la littérature	112
2.4.3.	Etude de la sélectivité	113
2.5.	Détection du Pb^{2+} dans les eaux usées	114
2.6.	Intégration dans des puces microfluidiques	115
3.	Conclusion	117
	Références bibliographiques chapitre 3	118

Chapitre 4 : Biocapteur bimodal à base du composite MoS_2/PPy pour la détection simultanée du Pb^{2+} et de l'AMP

1.	Introduction	121
2.	Biocapteur bimodal à base du composite MoS_2/PPy pour la détection simultanée du Pb^{2+} et de l'AMP	124
2.1.	Elaboration du biocapteur	124
2.2.	Caractérisation électrochimique	125
2.3.	Réponse électrochimique du biocapteur	126
2.3.1.	1 ^{ère} expérience	126
2.3.2.	2 ^{ème} expérience	127
3.	Conclusion	129

Références bibliographiques chapitre 4	131
Conclusion générale	132
Partie expérimentale	135

Liste des abréviations et terminologie

Acr	Acridine
Acr-Fc	Dérivé Acridine-ferrocène
ADN	Acides nucléiques ou acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à Force Atomique
AMP	Ampicilline
AMX	Amoxicilline
APT	Aptamère
ARN	Acide ribonucléique
Au	Or métallique
CD ₃ OD	Méthanol deutéré
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
Cu ²⁺	Ion cuivrique
CuBr ₂	Bromure de cuivre (II)
CVD	Dépôt chimique en phase vapeur
DBO	Demande biochimique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DMSO-d ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DPASV	Voltammétrie à redissolution anodique par polarographie à impulsion différentielle
DPV	Voltammétrie différentielle pulsée

Dz	ADNzyme
EDA	Ethylène diamine
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDX	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
Ep	Potentiel du pic d'oxydation ou de réduction
ETM	Eléments traces métalliques
Fc	Ferrocène
Fe ²⁺	Ion ferreux
FeCl ₃	Chlorure de fer
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GC-MS	Chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse
Gly	Glycine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hg ²⁺	Ion mercurique
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
Ip	Intensité du courant du pic
ISFET	Transistors à effet de champ sensibles aux ions
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
Kd	Constante de dissociation
LEVO	Lévofloxacine
LoD	Limite de détection
MB	Bleu de méthylène

MEB	Microscopie électronique à balayage
MeOH abs	Méthanol absolu
Mg ²⁺	Ion magnésium (II)
Mn ²⁺	Ion manganèse (II)
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NQ	Dérivé de naphthoquinone : (3,3'-(1,4-dihydro-1,4-dioxo-2,3 naphthylenedithio)di-propionic acid
OD	Oxygène dissous
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pb ²⁺	Ion plomb (II)
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEN	Pénicilline
POP	Polluants Organiques Persistants
PPy	Polypyrrole
RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
RSD	Ecart type relatif
SAM	Monocouche auto assemblée
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SIE	Spectroscopie d'impédance électrochimique
SPCE	Electrode imprimée de carbone
SWV	Voltammétrie à vagues carrées
T _m	Température de fusion

TMDs	Les dichalcogénures de métaux de transition
TMS	Tétraméthylsilane
US EPA	Agence environnementale américaine
ν	Vitesse de balayage
VC	Voltammétrie cyclique
XPS	Spectroscopie des photoélectrons X
Zn^{2+}	Ion zinc (II)
ΔE_p	Différence entre les potentiels de pics anodiques et cathodiques
$\% \Delta I / I_0$	Variation moyenne du courant

Introduction générale

Le concept de la convergence a surgi sur le devant de la scène des discours de politique scientifique depuis une vingtaine d'années. L'idée qui se cache derrière cette révolution scientifique renvoie au fait que plusieurs grands domaines de la science sont en train de se rapprocher, de s'hybrider voire de fusionner les uns dans les autres lorsque la matière est manipulée à l'échelle nanométrique. Les *nanobiocapteurs* s'inscrivent dans le cadre de cette thématique de convergence, ce qui a conduit à la mise au point de structures hybrides à base de nanomatériaux, d'oligomères et de biomacromolécules. En effet, le concept de nanomatériaux hybrides *organiques-inorganiques* fait l'objet d'un intérêt croissant de scientifiques venant de plusieurs disciplines différentes. Cette symbiose, entre deux mondes de la chimie trop longtemps considérés comme antagonistes, peut aussi amener des propriétés complètement uniques et nouvelles ce qui a orienté la recherche vers l'élaboration des nanocomposites de plus en plus sophistiqués et ayant des structures originales.

Depuis une vingtaine d'année, les biocapteurs à ADN ont démontré une grande richesse pour détecter les brins d'ADN en vue de reconnaître un ADN provenant de bactéries, de virus, d'organismes génétiquement modifiés, les mutations de l'ADN responsables de maladies ou les relations génétiques. Plus récemment, le développement grandissant d'une librairie d'oligonucléotides artificiels (aptamère et ADNzyme), capables de reconnaître spécifiquement de nombreux types d'espèces (bactéries, protéines, petites molécules organiques, métaux lourds etc.), a permis la conception d'un nouveau genre de systèmes de détection hautement sélectifs aux cibles. Ces plateformes ont été exploitées pour développer une vaste gamme de nouveaux biocapteurs dédiés à l'analyse et à la détection de cibles à l'état de traces et d'ultra traces dans plusieurs secteurs (**Figure**).

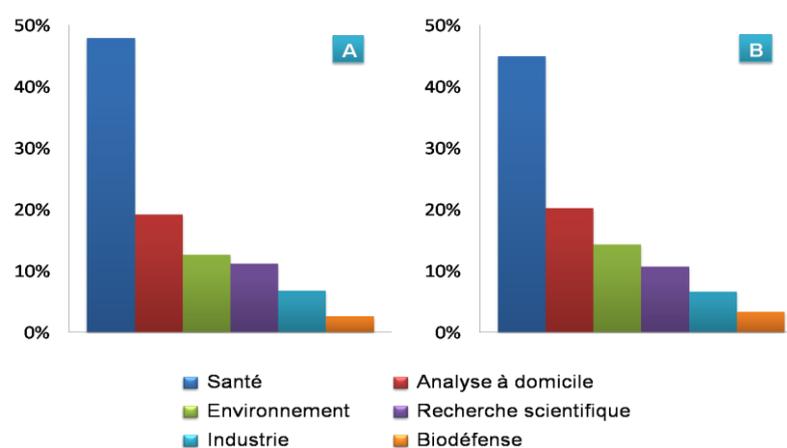


Figure. Marché mondial des biocapteurs : pourcentage de revenu par secteur pour 2009 (A) et 2016 (B)¹

¹<https://www.frost.com/>

La qualité et la gestion de nos ressources en eau sont fortement mises en danger par le gaspillage, la pollution ou bien encore l'inégalité face à l'accès à l'eau. Nous constatons aujourd'hui une dégradation de la qualité des eaux, aussi bien souterraines que marines. A la dégradation physiques (barrages, détournement de rivières, captage...) s'ajoute une dégradation chimique due au déversement de produits chimiques tels que les nitrates, les pesticides, les hydrocarbures ou bien encore les médicaments. Il existe alors un réel besoin en technologies innovantes permettant de contrôler en continu et in situ la qualité des eaux souterraines et marines

C'est dans ce cadre, et en combinant l'ensemble de ces trois domaines : la nanotechnologie, l'électrochimie et la biologie, que s'inscrivent les travaux de cette thèse. Ils se sont focalisés sur la mise au point des méthodes pour le développement des électrodes à base de nanocomposites pour détecter les polluants dans les déversoirs d'orage et les rivières. Ils permettront de pallier le manque crucial de données sur la contamination des cours d'eau et aura donc un intérêt indéniable pour la santé publique et la sécurité environnementale.

Ainsi, ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres.

Le premier chapitre a pour but d'introduire le contexte général de notre travail de thèse. Dans un premier temps, nous présenterons les bases théoriques fondamentales se rapportant aux biocapteurs. Dans un second temps, un rappel bibliographique sur les nanomatériaux et les nanoparticules utilisées dans ce travail pour le développement de biocapteurs sera donné. Nous passerons en revue quelques approches mentionnées dans la littérature s'apparentant au travail visé dans cette thèse.

Le deuxième chapitre est consacré à la mise au point d'un biocapteur électrochimique pouvant servir à la détermination rapide, sensible et spécifique de l'ampicilline (AMP), un antibiotique à large spectre, très utilisé dans l'élevage. Nous avons porté un intérêt particulier pour développer des aptacapteurs à base de nanofeuilles de MoS₂, film PPy et le nanohybride MoS₂/PPy en utilisant des aptamères comme sonde de reconnaissance. L'objectif de ce chapitre est double, il permet d'une part, de montrer l'intérêt d'utiliser des matériaux hybrides associant un matériau inorganique 2D de type chalcogénure avec des polymères conducteurs comme le polypyrrole et d'autre part, d'obtenir un système de détection ampérométrique sur des électrodes imprimées. Il inclut une partie descriptive de la méthode de préparation du biocapteur, suivie par des caractérisations morphologiques, spectroscopiques et électrochimiques de différentes surfaces modifiées par ces nanomatériaux. Le but est d'étudier

l'effet de l'hétérojonction type n-p de l'hybride MoS₂/PPy sur les performances analytiques du biocapteur en comparant à celles des biocapteurs à base de nanofeuilles MoS₂ et film PPy non combinées. Le dispositif analytique permet la détection directe de l'AMP avec une très grande sélectivité. Il sera par la suite exploité pour la détection de l'analyte cible dans des échantillons réels d'eau de rivière artificiellement contaminés.

Le troisième chapitre vise à concevoir un biocapteur basé sur les ADNzymes dépendants de Pb²⁺ pour la détection du plomb (II) à l'état de trace. Notre stratégie repose sur l'utilisation de l'ADNzyme qui peut s'hydrolyser en présence de l'ion plomb et de l'acridine-Ferrocene comme marqueur redox qui permet de suivre la réaction d'hydrolyse. Ce composé présente l'avantage de combiner les propriétés redox du ferrocene et les propriétés d'intercalation de l'acridine dans le double brin d'ADN pour former un intercalant à ADN aux propriétés redox. Il sera synthétisé au cours de la thèse et intercalé entre les bases de l'ADN pour fournir un signal redox stable. Le Biocapteur est formé sur une surface modifiée avec le nanomatériau MoS₂/PPy, par la suite, le système analytique est étudié pour la détection du plomb sur une large gamme de concentrations. La détection est suivie par la variation du signal de l'intercalant qui diminue après hydrolyse avec le plomb et lavage de la surface. La sélectivité est étudiée avec différents composants qui peuvent être présents dans les rivières. Des tests de détection dans les eaux de rivière seront également effectués. Dans le but de développer un dispositif analytique microfluidique et pour obtenir une détection avec un signal positif des essais préliminaires ont été réalisés avec un dispositif électrochimique intégré dans un dispositif microfluidique.

Dans le dernier chapitre, un nouveau biocapteur issu de la combinaison des deux types de biocapteurs développés précédemment où l'ADNzyme et de l'aptamère ont été intégrés dans un même système analytique. Cette association est réalisée avec des connecteurs oligonucléotidiques qui permettent d'aboutir à un système de détection associant deux sondes biologiques aptamère et DNAzyme appelé *aptazyme* et deux sondes redox le ferrocène et la naphtoquinone qui opèrent à des potentiels redox différents. Ce système est développé en vue de réaliser une détection simultanée de deux analytes. Nous avons montré cette preuve de concept avec la détection de l'AMP et du Pb²⁺. Le choix des sondes redox utilisés au cours de cette thèse est basé sur leurs potentiels redox qui devaient être distincts afin d'éviter tout chevauchement des signaux et assurer le suivi de chaque analyte présent dans la solution d'une manière à pouvoir l'associer à un signal redox bien déterminé. Cette stratégie nous a permis

de mettre au point un système biologique ayant la capacité d'effectuer des fonctions logiques sous l'action de différentes entrées (AMP et Pb^{2+}) et avec comme sortie la variation du signal redox des deux sondes : la naphthoquinone et le ferrocène.

Pour conclure, nous dresserons dans un premier temps un certain nombre de constats associés à ces résultats pour présenter les points forts de ce travail puis nous proposerons quelques perspectives pour combler les points faibles et améliorer les performances des outils développés au cours de cette étude.

Chapitre 1 – Etat de l’art

1. Introduction

Aujourd'hui, les biocapteurs forment un axe de recherche multidisciplinaire où la biologie, la chimie, la physique, l'électronique et la technologie sont mises à contribution pour atteindre l'objectif ultime de confection d'outils d'analyse de petites tailles, sélectifs et sensibles. Grâce aux nanotechnologies, cet horizon indépassable n'a plus rien de chimérique. De ce fait, les nanomatériaux permettent d'améliorer les performances analytiques et la rentabilité des biocapteurs.

Dans ce chapitre, tout en analysant la littérature, nous présenterons le principe de fonctionnement et quelques applications récentes des biocapteurs. Dans un premier temps, les bases théoriques fondamentales se rapportant aux biocapteurs (biorécepteurs et transducteurs) seront présentées. Dans un second temps, un rappel bibliographique sur les nanomatériaux et les nanoparticules utilisées dans ce travail pour le développement de biocapteurs sera donné. Nous passerons en revue quelques approches mentionnées dans la littérature s'apparentant au travail visé dans cette thèse.

2. Généralité sur les biocapteurs

2.1. Définition d'un biocapteur

Un *biocapteur* est un outil analytique associant un site de reconnaissance spécifique sous forme d'un composant biochimique, tels qu'une enzyme, une protéine, un anticorps, un brin d'acide désoxyribonucléique (ADN), d'acide ribonucléique (ARN) ou des micro-organismes, à un transducteur qui transforme la reconnaissance moléculaire en un signal analytiquement mesurable (**Figure 1.1**). Par ailleurs, l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée, l'IUPAC,[1] a défini un biocapteur comme étant un système analytique de détection des composés chimiques, qui utilise des réactions biochimiques spécifiques médiées par des enzymes isolées,[2] des cellules (micro-organismes),[3] des immuno-systèmes[4] ou des tissus[5] comme outils de reconnaissance pour assurer la détection.

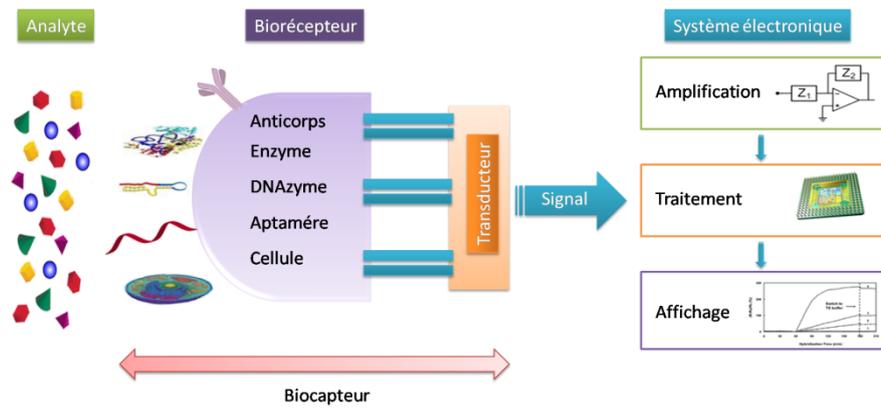


Figure 1.1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

2.2. Critère d'évaluation

Critère d'évaluation l'acronyme ASSURED est un terme anglais qui regroupe les lettres correspondant aux différents critères qui font qu'un biocapteur peut être considéré comme excellent.

A : Affordable ; si le coût de production du biocapteur est minimal et le prix de vente est inférieur à \$1/unité. Ainsi des biocapteurs à base de papiers dont le coût est inférieur à 0,01\$ ont été développés.

S : Sensitive ; si le capteur est sensible et peut atteindre des concentrations extrêmement faibles de l'analyte visé.

S : Specific ; la spécificité est un paramètre primordial. Il est important que le biocapteur ne détecte que l'analyte visé dans un milieu complexe tels que les liquides physiologiques. Ceci est généralement assuré par l'utilisation de biomolécules comme sites récepteurs.

U : User-friendly ; l'utilisation du biocapteur est facile et ne nécessite pas une connaissance des phénomènes physicochimiques mis en jeu.

R : Robust and rapid ; la rapidité de réponse permet de garantir un résultat immédiat par la mise en contact avec l'échantillon à analyser.

E : Equipment-free ; l'utilisation du biocapteur ne nécessite pas d'équipements lourds et coûteux ou le recours à une personne qualifiée pour le manipuler.

D : Deliverable to end-users ; la délivrance aux utilisateurs finaux fait que les biocapteurs seront utilisables en suivant une simple notice d'utilisation.

2.3. Nature des biorécepteurs

Considérés comme la partie responsable à la biodétection, les biorécepteurs constituent le premier maillon du biocapteur. La qualité du biorécepteur conditionne l'efficacité du dispositif en termes de sélectivité, sensibilité, répétabilité et reproductibilité. La couche bioréceptrice doit répondre à certains critères : une bonne conservation de l'immunoréactivité, une quantité importante de molécules immobilisées avec un faible taux de dénaturation et une bonne stabilité vis-à-vis des variations de pH, de force ionique.

En présence des substrats tels que les antigènes, les fragments d'ADN ou les molécules bioactives, le biorécepteur, sous sa forme enzymatique, cellulaire, ou protéique, suite à son interaction avec l'analyte, provoque un changement des propriétés physiques, chimiques ou optiques au niveau du transducteur. Généralement, on peut classer les biorécepteurs selon leurs modes de fonctionnement.

2.3.1. Biorécepteurs d'hybridation

Les fragments monobrins d'ADN ou d'ARN peuvent être utilisés comme des sondes hautement spécifiques pouvant s'hybrider avec les séquences complémentaires. Elles peuvent reconnaître un ADN exogène (externe n'appartenant au pool ADN spécifique à un organisme donné), pour déceler une mutation dans une séquence ADN d'un gène donné responsable d'une maladie génétique ou pour les tests d'affiliation biologique. Actuellement, un fort intérêt est porté à la détection de courtes séquences d'ARN (appelées microARN), présentes dans le plasma sanguin ou à l'intérieur même des cellules, par des brins sondes d'ADN complémentaire greffés sur les électrodes, en vue de suivre les processus biologiques du vivant et servir dans la détection de maladies graves notamment le cancer.

2.3.1.1. Définition de l'ADN

Les acides nucléiques – acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN) – sont des macromolécules synthétisées au sein des cellules vivantes. Ils sont formés par des unités de bases, ou monomères, de type nucléotides [6]. Supports de l'information génétique, ces molécules interagissent entre elles et, à travers plusieurs étapes, conduisent à la formation de protéines, lesquelles sont associées à des fonctions spécifiques dans les cellules. Les nucléotides sont composés d'un groupe phosphate, un sucre (le 2-désoxyribose dans le cas de l'ADN ou le ribose dans le cas de l'ARN) et d'une base azotée. Au nombre de cinq, ce sont les bases azotées qui déterminent la nature du nucléotide. La séquence d'un brin d'ADN ou d'ARN peut donc se résumer à la succession des bases azotées qui la compose. Dans le cas de l'ADN, on retrouve l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Pour l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). Les nucléotides sont

reliés entre eux par des liaisons covalentes entre le sucre et le groupe phosphate, appelées liaisons 5'-3'phosphodiester.

Le squelette phosphodiester et les bases azotées forment ainsi un brin. Chaque brin d'ADN s'écrit conventionnellement à partir de l'extrémité 5', associée à un groupement phosphate vers l'extrémité 3' et associée à une fonction alcool. Cette succession de nucléotides correspond à une structure primaire simple brin, les deux brins complémentaires étant antiparallèles, ce qui signifie que pour un brin observé dans le sens 3' vers 5', le complémentaire est orienté de 5' vers 3'. La structure ainsi obtenue est alors dite double brin hélicoïdal. Cette orientation antiparallèle est nécessaire pour que les brins s'emboîtent dans l'espace à trois dimensions.

Ils sont maintenus solidaires grâce à la formation de paires de bases : en établissant des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène) l'adénine se lie exclusivement avec la thymine, tandis que la cytosine se lie avec la guanine (**Figure 1.2**).

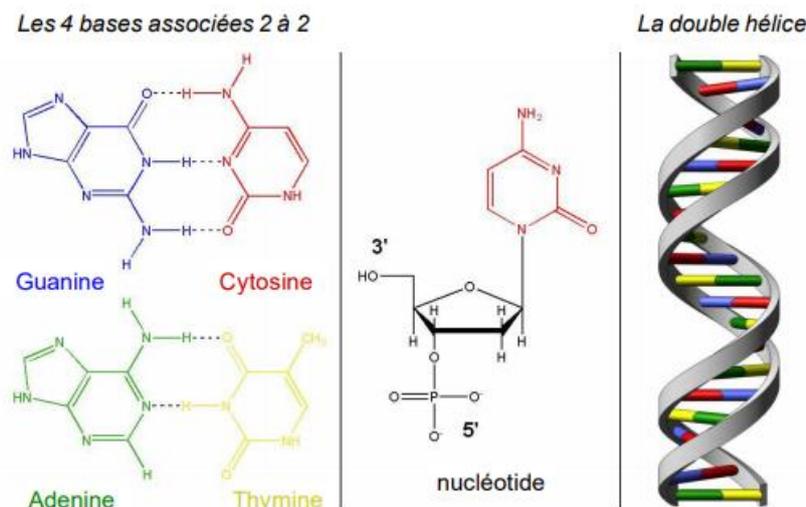


Figure 1.2. Structure de l'ADN, d'après Maillard et al.[2] A gauche : les bases puriques (guanine et adénine) associées aux bases pyrimidiques (respectivement cytosine et thymine) via des liaisons hydrogène représentées en pointillés. Au centre : exemple de nucléotide composé d'un groupement phosphate, d'un sucre désoxyribose et d'une base (ici la cytosine en rouge). A droite : Structure classique double brin en double hélice de l'ADN.

2.3.1.2. *Extraction et amplification de l'ADN*

L'ADN peut être extrait facilement en éclatant les cellules. Il est possible d'effectuer l'amplification d'une séquence d'ADN d'un gène souhaitée en s'appuyant sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) [7]. Plusieurs protocoles ont été développés pour l'extraction des séquences spécifiques d'ADN. La première étape de ces procédures consiste à détruire les membranes cellulaires et nucléaires pour libérer l'ADN. Pour cela deux voies sont possibles, la première consiste à lyser les cellules en utilisant des billes magnétiques de

tailles similaires à celles des cellules. Une simple centrifugation du mélange bille/cellule permet d'exploser les membranes cellulaires et de libérer l'ADN génomique. La deuxième voie repose sur l'utilisation de tampon chimique composée de détergents et des enzymes de digestion comme la protéinase K qui est capable de digérer des cellules et d'extraire les acides nucléiques (ADN ou ARN).

La PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir le détecter et l'étudier. Ce processus consiste à introduire l'ADN génomique dans une solution tampon contenant deux amorces oligonucléotides et une forte concentration des désoxynucléosides triphosphates et d'une enzyme appelée ADN polymérase thermostable (**Figure 1.3**). Il y a lieu de signaler que les extrémités des amorces pointent l'une vers l'autre et sont complémentaires des extrémités des séquences du brin d'ADN génomique qu'on souhaite amplifier. L'ADN polymérase thermostable est une enzyme de synthèse de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ADN, elle est isolée à partir de *Thermus aquaticus* ou de l'*E. Coli* [8].

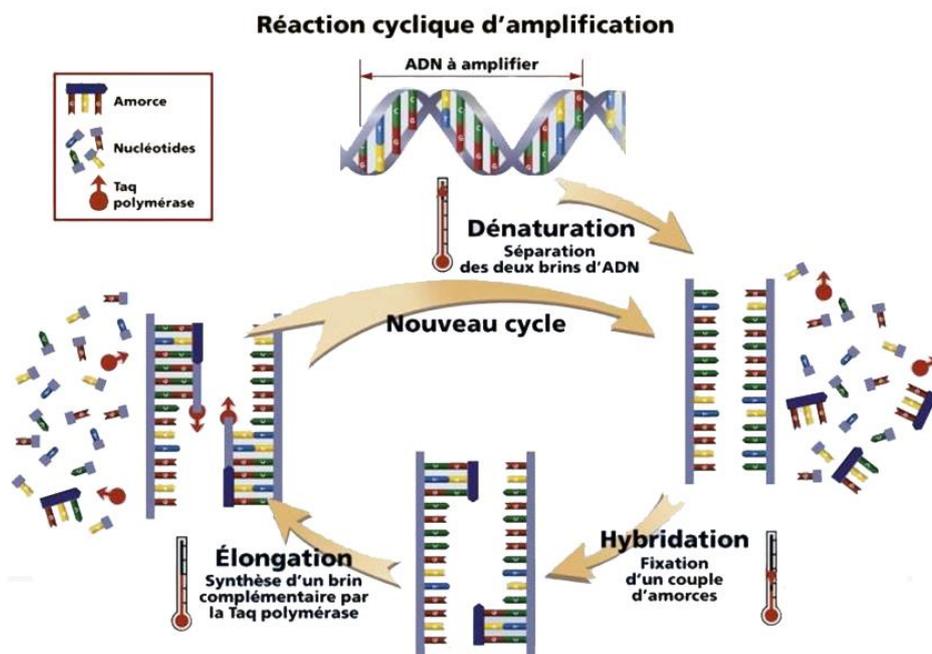


Figure 1.3. Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.3.2. Biorécepteurs d'affinité

Les biorécepteurs d'affinité sont des macromolécules biologiques connues pour leur pouvoir de reconnaissance hautement spécifique, avec des constantes de formation pouvant atteindre $10^9 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$. On y distingue les anticorps, appelés aussi les immunoglobulines, les

aptamères et les foldamères qui se caractérisent par leur sélectivité, affinité et la facilité de production. Le récepteur et son analyte se reconnaissent à travers une complémentarité de forme en 3D via des interactions non covalentes (Van der Waals et électrostatiques).

2.3.2.1. *Les aptamères*

Ces cinquante dernières années ont vu la naissance et le recours massif aux anticorps comme éléments de reconnaissance spécifiques pour la capture des macromolécules cibles (antigènes). Par conséquent, ils sont actuellement à la base de la plupart des diagnostics médicaux effectués dans les laboratoires d'analyse. Cependant, du fait de leur production *in vivo* par culture cellulaire ou chez des animaux, ces derniers possèdent un certain nombre de limitations surtout pour la détection des petites molécules organiques. Grâce aux progrès technologiques, la sélection artificielle *in vitro* de séquences d'ADN ou d'ARN monobrin a permis d'identifier aisément des brins ayant une forte affinité aussi bien aux petites qu'aux grandes (bio)molécules appelées aptamères qui permettent de surmonter les limitations présentées par les anticorps. Ils sont considérés comme une nouvelle classe de macromolécules rivalisant avec les anticorps pour de multiples applications.

2.3.2.2. *Structures secondaires des aptamères*

D'un point de vue structural (**Figure 1.4**), les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques composés tout comme l'ADN ou l'ARN d'adénine, guanine, cytosine et de thymine ou d'uracile dans le cas d'un ARN. Ils sont formés par un seul brin composé de 20 à 150 nucléotides [9].

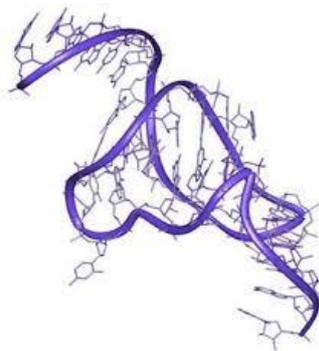


Figure 1.4. Représentation d'un aptamère formé par un nombre réduit de nucléobases.

Ces oligonucléotides sont capables de se replier sur eux-mêmes en respectant les règles d'appariement des bases composant les duplex d'ADN dans le but de former des structures secondaires 2D et 3D stables. Dans la littérature, on distingue différents motifs composants les aptamères :

- Les motifs en épingle à cheveux, appelés aussi tige–boucle,[10] ces derniers correspondent à une double hélice d'ADN avec la présence à l'extrémité d'une boucle de quelques nucléotides non appariés variant généralement entre 4 et 8 (**Figure 1.5.A**).
- Dit pseudo–nœud,[11] ce second motif est la structure qui résulte de l'appariement de nucléotides de la boucle avec d'autres nucléotides présents dans une autre région du brin, généralement située en dehors de la tige. Cette structure présente ainsi deux hélices (**Figure 1.5.B**).
- La troisième et la dernière structure dite G–quadruplex [12] est le résultat de l'empilement de plusieurs G–quartets, appelé aussi tétrades de guanines, correspondant à l'association de 4 guanines dans un même plan cyclique. (**Figure 1.5.C**)

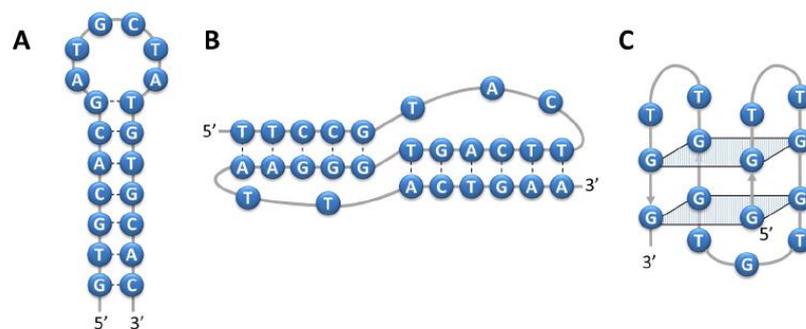


Figure 1.5. Représentation schématique des principaux motifs composant les aptamères : (A) motif tige–boucle, (B) motif pseudo–nœud et (C) motif G–quadruplex [13].

2.3.2.3. Sélection des aptamères

L'identification et la sélection de molécules d'aptamères fait appel à un procédé d'évolution moléculaire dirigée ou SELEX (pour Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Développée simultanément par deux équipes en 1990 [14,15] le principe de cette technique repose sur l'extraction de ligands potentiels à partir d'une banque d'oligonucléotides composée initialement de séquences générées aléatoirement. La coexistence, dans une même entité moléculaire, de la structure et de la séquence permet alors, par alternance d'étapes de sélection (basées sur la structure) et d'amplification (basées sur la séquence), d'isoler le composé possédant les propriétés recherchées (**Figure 1.6**). Ainsi, il s'agit d'une méthode combinatoire faisant intervenir trois étapes principales : la synthèse de banques de séquences suffisamment riches, le criblage de candidats potentiels et enfin, l'identification et purification des séquences retenues. La première étape, cruciale, nécessite la constitution de banques d'oligonucléotides présentant une diversité moléculaire

suffisante. Sachant que les séquences sont constituées d'une région aléatoire de n nucléotides (en général de 20 à 100), la diversité de la banque dépendra de la taille de cette région. La limite expérimentale de la richesse de la banque est généralement de l'ordre de 10^{13} à 10^{15} séquences différentes [16]. Cette population est ensuite soumise à une étape de criblage via une sélection basée sur l'existence d'une activité catalytique, ou le plus souvent, l'affinité pour une cible choisie. La sélection s'opère par séparation physique et peut faire intervenir diverses méthodes telles que la chromatographie, la rétention sur filtre ou encore l'électrophorèse. Les séquences sélectionnées sont alors amplifiées par PCR grâce à des amorces qui s'hybrident aux régions fixes. Une banque enrichie en candidats potentiels est donc obtenue, à partir de laquelle un nouveau cycle de sélection/amplification peut être effectué. Le taux d'enrichissement dépend des conditions de sélection, qui jouent un rôle déterminant pour l'évolution de la population. Cette succession d'étapes de sélection et d'amplification est répétée 10 à 15 cycles, permettant ainsi l'enrichissement progressif de la population en séquences présentant les meilleures qualités pour la fonction recherchée.

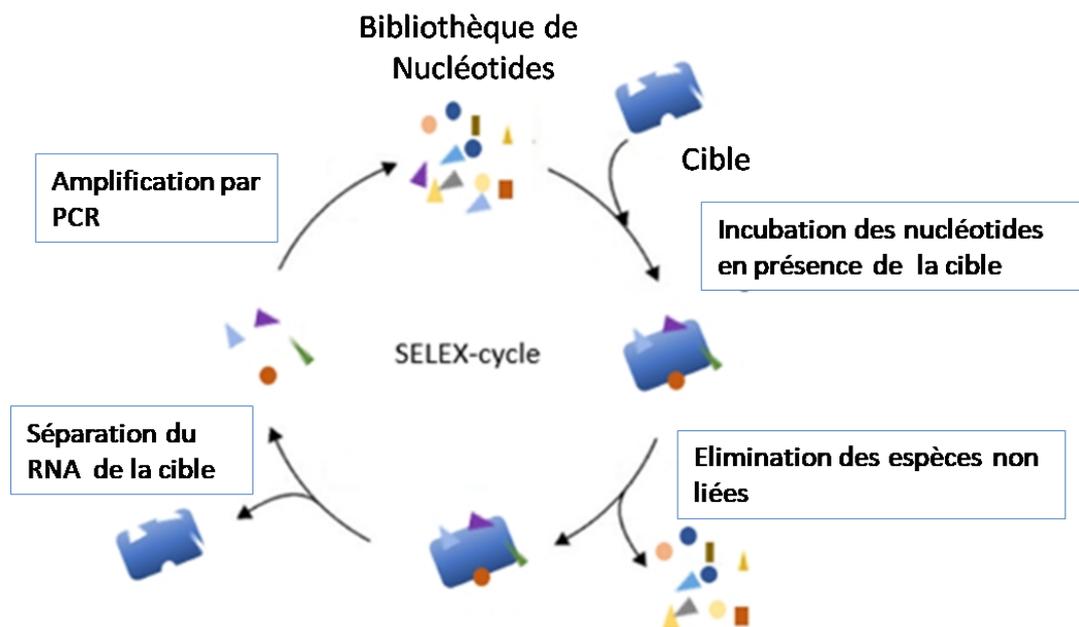


Figure 1.6. Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé d'une étape d'incubation entre la cible et la banque d'oligonucléotides, une étape de sélection des séquences ayant présenté une affinité pour la cible et une étape d'amplification des séquences sélectionnées.

2.3.2.4. Propriétés des aptamères

Depuis leur découverte en 1990, les aptamères ont connu un développement important vue qu'ils ont la particularité de se lier spécifiquement à des molécules cibles avec une forte

affinité et une forte spécificité, pouvant égaler celle des anticorps. Les espèces cibles peuvent être des ions métalliques, des toxines, des acides aminés ou des peptides, des macromolécules comme des protéines, des polluants,[17] ou des microorganismes pathogènes [18]. Cette large bibliothèque des espèces cibles offre aux aptamères une place de choix dans la conception de biocapteurs hautement sélectifs. En effet, ces molécules de petites tailles sont produites par synthèse chimique avec une grande stabilité. Leur modification chimique est facile, permettant ainsi l'ajout d'un marquage soit par une sonde fluorescente, ou par des nanoparticules, sans altérer leur affinité [19]. De plus, ils peuvent subir plusieurs cycles de dénaturation et régénération, sans que cela n'affecte leurs propriétés. Un autre avantage est leur coût de production réduit par rapport aux anticorps ce qui permettra la production en masse de biocapteurs à prix compétitif.

2.3.3. Biorécepteurs catalytiques

Ils sont souvent choisis pour la confection des biocapteurs pour leurs capacités de reconnaissance et leurs fortes activités à faibles concentrations [20]. Les enzymes (protéines structurées de façon à posséder un site ou plusieurs sites actifs) sont les biorécepteurs les plus répandus car la détection par réaction catalytique en chaîne est amplifiée de manière sélective [21]. La détection envisagée par ces biorécepteurs repose sur la reconnaissance de l'analyte ou sur la détection d'un produit issu de l'activité enzymatique. Par exemple la détection du glucose peut être le résultat d'une réaction catalytique qui engendre un transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode qui détecte ce transfert [22].

2.3.3.1. Les ADNzymes

La majorité des réactions catalytiques biologiques reposent sur la présence d'enzymes, on a découvert au début des années 1980 que l'ARN est également capable de remplir de telles fonctions. Ce bouleversement dans le domaine de la biochimie est initié par les travaux pionniers de l'équipe du Dr. T. Cech qui, en cherchant à purifier l'enzyme responsable de l'excision des introns d'un gène ribosomique ARNr chez *Tetrahymena Thermophila*, proposa après plusieurs échecs l'hypothèse selon laquelle l'intron se clivait seul. Il la reporta dans un article paru en 1982 dans *Cell* où il introduit pour la première fois le terme « ribozyme », né de la contraction des termes « ribonucleic acids » et « enzyme », et qui définit donc la capacité d'un ARN à réaliser une réaction chimique de type enzymatique [23, 24].

Depuis, de nombreux ribozymes ont été découverts parmi lesquels la RNase P impliquée dans la maturation des ARNt,[25] les riborégulateurs (ou riboswitches) présents sur certains

ARNm qui ont une capacité autolytique,[26, 27] ou encore le site actif ARNr du ribosome qui catalyse la réaction de synthèse peptidique [28]. Ce domaine de recherche sera couronné par l'obtention du prix Nobel de Chimie de 1989 pour les deux initiateurs T. Cech et S. Altman (**Figure 1.7**)[23, 29].

The Nobel Prize in Chemistry 1989



Sidney Altman
Prize share: 1/2



Thomas R. Cech
Prize share: 1/2

Figure 1.7. Les Lauréats du prix Nobel de chimie de 1989 pour leur découverte de l'activité catalytique de l'ARN

Les chimistes ayant toujours à cœur de comprendre et de mimer la nature, les premiers ribozymes artificiels sont publiés en 1990 par D. Robertson et G. Joyce dans Nature et permettent le clivage de séquences d'ARN simple brin [30]. Depuis lors, de nombreux autres systèmes ont été développés et permettent de catalyser de multiples réactions chimiques dont la ligation d'ARN, des réactions de Diels-Alder, la formation de liaisons peptidiques, des réactions d'aminoacylation [31].

D'une manière intéressante, aucun ADN catalytique naturel n'a à ce jour été découvert alors que dès 1994, G. Joyce en association avec R. Breaker démontrent que la technologie développée pour la sélection in vitro des séquences d'ARN catalytique est adaptable à l'ADN et leur permet d'isoler un petit fragment d'ADN capable de catalyser le clivage d'une séquence d'ARN en présence de Pb^{2+} [32]. Par analogie aux ribozymes, ces activités catalytiques faisant intervenir l'ADN sont nommées déoxyribozyme, plus connues sous le terme de ADNzyme [33]. Aujourd'hui, le domaine des ADNzymes est vaste et permet de réaliser un nombre important de réactions chimiques parmi lesquelles nous citerons le clivage et la ligation d'ARN ou d'ADN, le clivage de dimères de thymines, les réactions de Diels-Alder simples et énantiosélectives,[34] ou encore les réactions de Michael ou de

Friedel-Crafts en séries énantiosélectives avec des excès énantiomériques pouvant atteindre 99% [31, 33].

2.3.3.2. Structure et Mécanisme de clivage

Les ADNzymes sont des séquences d'ADN simple brin (single strand (ss)) qui se replient en structures tertiaires complexes. Ils sont composés d'une boucle catalytique et d'une partie de reconnaissance hybridée au substrat portant une seule base ribonucléotide servant de site de clivage (**Figure 1.8**)

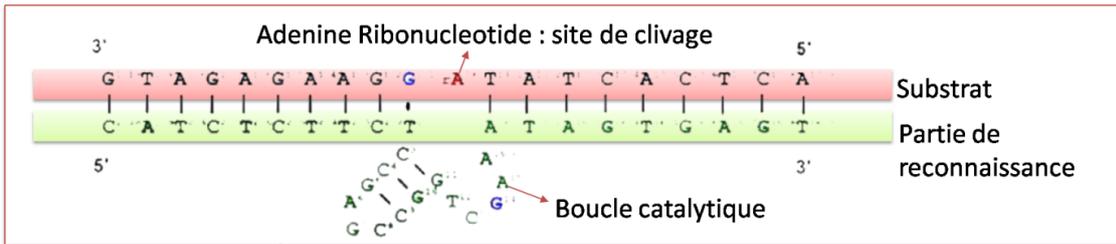


Figure 1.8. Représentation d'un ADNzyme

Ces derniers sont capables de catalyser un certain nombre de réactions, y compris le clivage du squelette phosphodiester au niveau d'un site ribonucléotidique ou désoxyribonucléotidique [35]. Il a été démontré que les cations jouent un rôle critique dans le processus catalytique et sont constitutivement nécessaires à l'activité catalytique de la plupart des ADNzymes. (**Figure 1.9**)

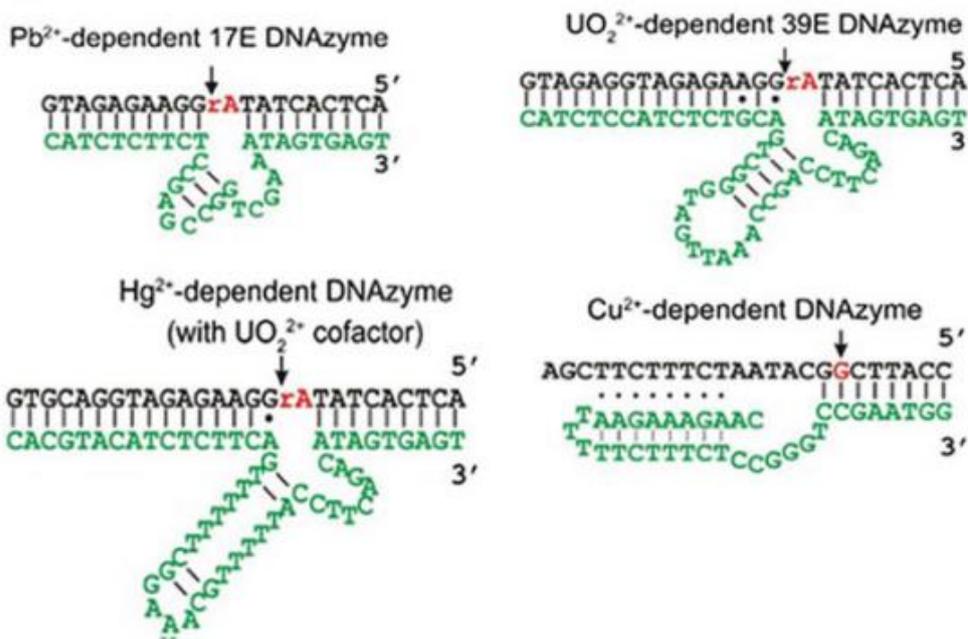


Figure 1.9. Représentation de quelques exemples d'ADNzyme ribonucléases [35]

Le mécanisme de clivage a été décrit par Liu et al. qui ont montré qu'en présence du Pb^{2+} l'ADNzyme qui appartient à la classe des ribonucléases, catalyse le clivage d'une liaison ribonucléotide phosphodiester par une réaction de trans-estérification en formant 2 sous-produits : une terminaison phosphate cyclique 2'3'-terminale et 5'-hydroxyl terminale. (Figure 1.10)[36].

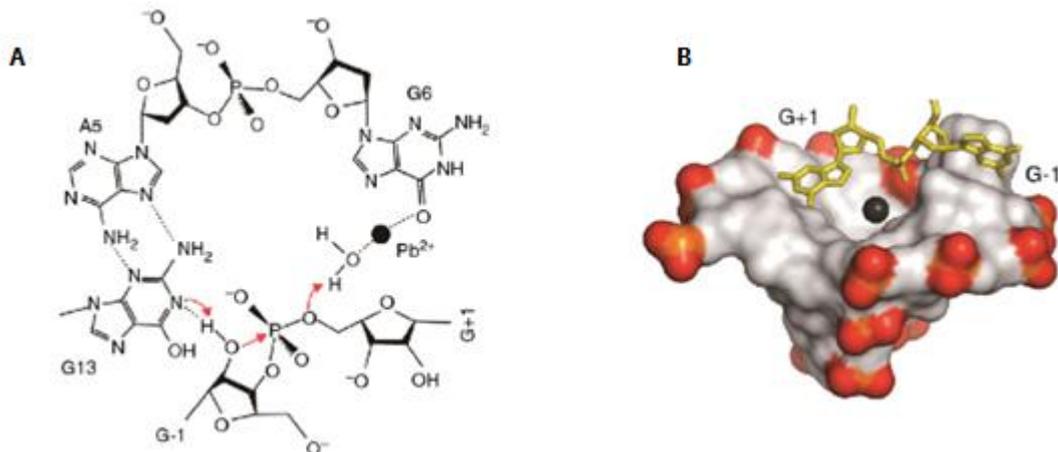


Figure 1.10. (A) Mécanisme proposé pour le clivage du substrat RNA par l'ADNzyme 8–17 (B) Représentation de surface montrant la boucle catalytique. Le Pb^{2+} est représenté comme une sphère noire. Les résidus G – 1 et G + 1 sont représentés sous forme de modèles de bâtons en jaune. Les atomes de phosphore et les atomes d'oxygène des groupes phosphate du squelette du ADNzyme sont colorés en orange et rouge, respectivement [36].

2.3.3.3. Propriétés des ADNzymes

Les avantages des ADNzymes face aux ribozymes et aux protéines sont multiples. Tout d'abord du point de vue de leur stabilité à l'hydrolyse et à l'augmentation de température, l'ADN s'avère en moyenne 1000 fois plus stable que les protéines et près de 100000 fois plus stable que l'ARN. De plus, l'ADN se synthétise aisément au sein d'un laboratoire de manière automatisée ou peut être synthétisé à façon par différents fournisseurs d'oligonucléotides et dont le coût final est beaucoup plus faible que celui des protéines. Un autre atout est la possibilité de modifier facilement les séquences nucléotidiques par l'ajout de sondes fluorescentes par exemple, ou encore de les fixer sur un support solide. Le dernier avantage relevé ici est la facilité de modulation du nombre et de la nature des bases permettant d'obtenir virtuellement un nombre illimité de séquences permettant d'accéder à celle offrant la réponse désirée pour l'application souhaitée [37]. De nombreuses applications dans le domaine de la biologie et de la santé s'avèrent également

particulièrement prometteuses, notamment pour le ciblage et le clivage d'ARNm en thérapie antitumorale [38, 39].

2.4. Les transducteurs

Le transducteur représente l'élément physique du biocapteur responsable de la traduction de la modification biochimique, issue de l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur, en un signal analytique exploitable. Suivant le type de modification biochimique, on choisira le type de transducteur approprié pour exploiter au mieux l'effet créé par le biorécepteur en présence de l'espèce cible. On peut distinguer plusieurs types de transducteurs on peut citer à titre d'exemple : les transducteurs optiques,[40] électrochimiques,[41] acoustiques,[42] piézoélectriques,[43] ... Dans ce qui suit, on va se limiter seulement aux transducteurs électrochimiques.

Les biocapteurs électrochimiques sont classés en plusieurs catégories selon leurs modes de transduction, qui peut être ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique ou impédimétrique [44].

2.4.1. Les transducteurs ampérométriques

Cette catégorie représente une des méthodes de transduction électrochimique des plus utilisées en bioanalyse et ceci à cause de sa sensibilité remarquable, sa rapidité de réponse et son faible coût de mise en œuvre [45]. En effet, la détection ampérométrique est basée sur la mesure, à potentiel fixe, de la variation du courant entre l'électrode de travail et la contre-électrode [46]. L'intensité du courant est proportionnelle à la concentration des espèces électroactives oxydées ou réduites à la surface de l'électrode de travail. Après immobilisation du biorécepteur à la surface de l'électrode de travail, son interaction avec l'analyte peut provoquer une réaction redox modifiant l'accumulation des charges au niveau de cette électrode par rapport à la contre électrode.

2.4.2. Les transducteurs potentiométriques

La méthode potentiométrique repose sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de référence, dont le potentiel est constant, et l'électrode de travail. La valeur du potentiel de l'électrode de travail permet de déterminer directement la concentration de l'analyte à doser à partir de l'expression du potentiel redox, par l'équation de Nernst, qui dans les cas simples peut s'écrire sous la forme :

$$E = E_{ox/red}^0 + nFRT \times \ln\left(\frac{a_{ox}}{a_{red}}\right) \quad (\text{Eq. 1})$$

L'un des exemples bien connus de systèmes à transduction potentiométrique sont les électrodes solides de pH qui ont été les premiers transistors à effet de champ sensibles aux ions (ISFET) commercialisés. De plus, les ISFETs ont été à la base de capteurs pour détecter les métaux lourds,[47] des immunocapteurs [48] et des biocapteurs génétiques [49].

2.4.3. Les transducteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie [50]. Le principe de ce mode de détection repose sur la mesure de la variation de la conductivité d'une solution induite par la production ou la consommation d'espèces chargées lors d'une réaction. Ce type de biocapteur est adapté pour les biorécepteurs enzymatiques qui produisent des entités chargées durant la phase de détection. Le paramètre à mesurer est la conductance électrique Σ .

$$\Sigma = \sigma \times S \times l \quad (\text{Eq. 2})$$

Dans cette relation, S est la surface des plaques métalliques, l est la longueur séparant les deux plaques qui constituent la cellule de conductimétrie et σ est la conductivité électrique de la solution.

2.4.4. Les transducteurs impédimétriques

La spectroscopie d'impédance électrochimique sert essentiellement à étudier les propriétés électriques interfaciales des matériaux solides ou liquides en contact avec un transducteur électrochimique [51]. Elle permet de suivre le processus de transfert de charge et de la matière à l'interface électrode/électrolyte. La mesure de l'impédance s'effectue dans une cellule équipée d'une électrode de référence, d'une électrode auxiliaire et d'une électrode indicatrice sur laquelle est déposée le biocapteur [52]. En effet, un potentiel imposé avec une perturbation sinusoïdale de faible amplitude $U(\omega)$, entre l'électrode de référence et l'électrode indicatrice, permet de mesurer un courant, de la même forme $I(\omega)$, générée entre l'électrode indicatrice et l'électrode auxiliaire. Le rapport de la tension appliquée par l'intensité du courant mesuré définit l'impédance du système électrochimique $Z(\omega)$.

$$Z(\omega) = U(\omega)/I(\omega) \quad (\text{Eq. 3})$$

2.5. Les méthodes d'immobilisation des sondes redox

L'immobilisation de la sonde redox est une étape clé dans la réalisation d'un biocapteur. La procédure la plus simple est celle qui met en jeu des interactions électrostatiques établies entre la surface activée et la sonde tandis que l'établissement des nouvelles liaisons covalentes est une approche plus complexe qui nécessite une bonne maîtrise de la chimie organique, par ailleurs cette dernière reste la plus fiable à condition que la formation de liaisons covalentes ne doit pas réduire son accessibilité.

2.5.1. Immobilisation par adsorption

La méthode présentée ici est aussi la plus simple à mettre en œuvre. En effet l'adsorption moléculaire est une caractéristique intrinsèque à certains composés, minéraux ou organiques, leur permettant de se fixer à une surface ou un édifice tridimensionnel. L'adsorption repose sur les interactions faibles de types Van der Waals, liaisons hydrogènes ou encore des interactions ioniques.

Une variante de l'immobilisation par adsorption consiste à réaliser une monocouche auto assemblée (SAM) à la surface d'une électrode. Les SAMs sont formées par adsorption spontanée de molécules, de type surfactant, à partir d'une solution ou d'une phase gazeuse sur un substrat pour lequel elles présentent une affinité particulière. Ces molécules sont constituées d'une fonction d'accroche, d'un bras espaceur et de la sonde (**Figure 1.11**). La fonction d'accroche présente une affinité pour la surface du matériau et initie l'autoassemblage. Les faibles interactions entre les différents bras espaceurs permettent ensuite la formation de l'assemblage et la stabilisation de la structure. Les avantages de cette méthode sont multiples, cette dernière permet de limiter grandement les phénomènes de désorption et donc d'augmenter la durée de vie du système [54–55].

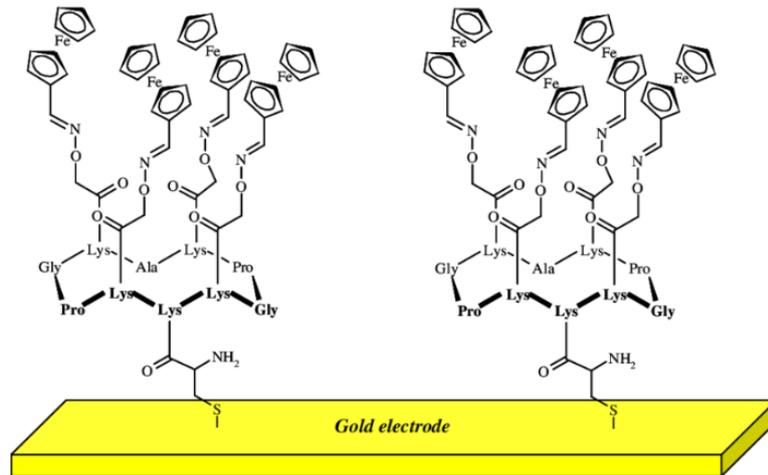


Figure 1.11. Préparation d'une monocouche auto-assemblée de peptides fonctionnalisés par du ferrocène sur la surface d'une électrode d'or [56].

2.5.2. Immobilisation par intercalation

L'intercalation est définie comme une insertion réversible de groupements chimiques dans l'espace interfoliaire des matériaux lamellaires [57]. Le pouvoir d'intercalation de ces derniers dépend de la force d'interaction entre les espèces intercalées et les sites d'intercalation. Ces sites peuvent être des sites cristallographiques ou bien des groupes chargés positivement ou négativement ou bien des groupements ayant des propriétés basique ou acide ou polaire. Cette stratégie a été adoptée par Gao et al. [58] qui ont décrit une procédure de fonctionnalisation en intercalant le ruthénium tris(1,10-phenanthroline) ($\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$) comme sonde entre les bases de l'ADNzyme pour détecter le plomb.

L'intercalation alors mise en jeu est de l'empilement π - π stacking dû à des recouvrements positifs entre les orbitales moléculaires frontières de type π des paires de bases et du ligand intercalant [59]. De plus les cycles aromatiques des ligands intercalants sont compatibles avec le caractère hydrophobe du centre de la double hélice. (**Figure 1.12**)

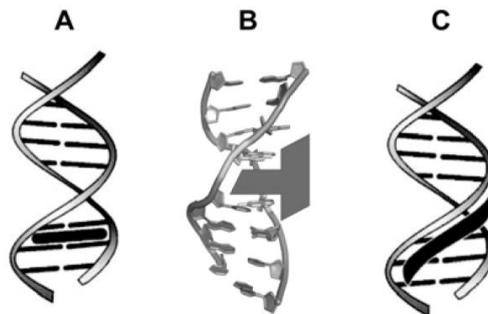


Figure 1.12. Représentation générique d'intercalation entre les bases de l'ADN [60]

2.5.3. Immobilisation covalente

Dans la littérature, on trouve plusieurs méthodes décrivant l'utilisation de certains acides aminés, présents à la surface des protéines, pouvant former une liaison covalente avec une surface activée [61-62]. Une des méthodes de ligation les plus populaires fait intervenir la réactivité du groupe amine, sur des fonctions N-hydroxysuccinimide d'esters activés donnant lieu à la formation d'un amide (**Figure 1.13**) [63]. Les lysines peuvent également réagir avec des aldéhydes pour former un amide.

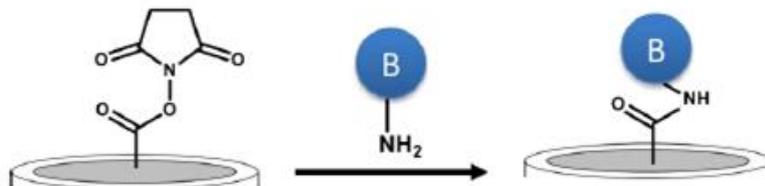


Figure 1.13. Principe simplifié d'immobilisation covalente sur la surface d'une électrode via la formation d'une liaison peptidique suite à la réaction d'un ester activé N-hydroxysuccinimide et d'un groupe amine de la biomolécule

La fonction thiol (–SH) du récepteur peut également s'additionner sur les groupes maléimide, via une réaction click, se trouvant sur la surface de l'électrode (**Figure 1.14**) [64].

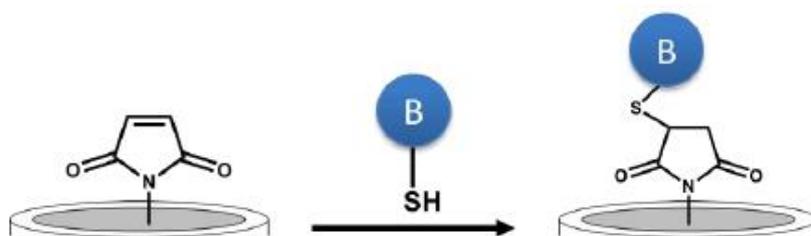


Figure 1.14. Principe simplifié d'immobilisation covalente à la surface d'une électrode d'une biomolécule par la réaction d'un résidu cystéine avec le maléimide pour former un thioéther.

Les sondes portant des groupes fonctionnels (–SH, –OH ou –NH₂) peuvent également réagir avec les surfaces d'électrodes fonctionnalisées avec des sels de diazonium pour se substituer au N₂⁺ et former ainsi des liaisons covalentes fortes (**Figure 1.15**) [65].

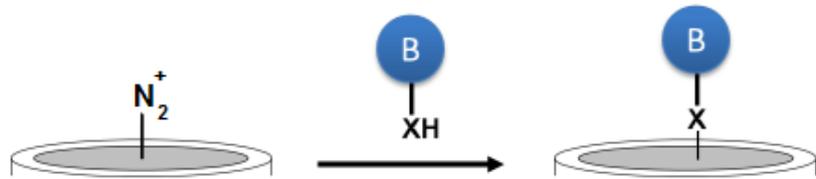


Figure 1.15. Principe simplifiée d'immobilisation covalente sur la surface d'une électrode suite à la réaction d'un résidu nucléophile sur l'entité biologique avec le sel de diazonium.

3. Nanomatériaux

La nanotechnologie peut être définie comme la capacité de tirer le maximum d'avantages des progrès de la science dans le monde du *nano* pour aboutir à de nouvelles applications. Elle est basée sur les propriétés intrinsèques d'objets de taille nanométrique (entre 1 et 100 nm) [66] et sur la possibilité de les utiliser de façon à améliorer leurs propriétés en les rendant plus spécifiques et plus puissants. De ce fait, la *nanoscience* peut être définie comme étant l'étude des principes fondamentaux des objets et des molécules à l'échelle nanométrique. Nous présentons ci-dessous dans la **Figure 1.16**, l'échelle métrique de quelques matériaux et quelques macro-organismes biologiques.

Nous allons citer dans ce qui suit quelques classes de nanomatériaux auxquels nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse.

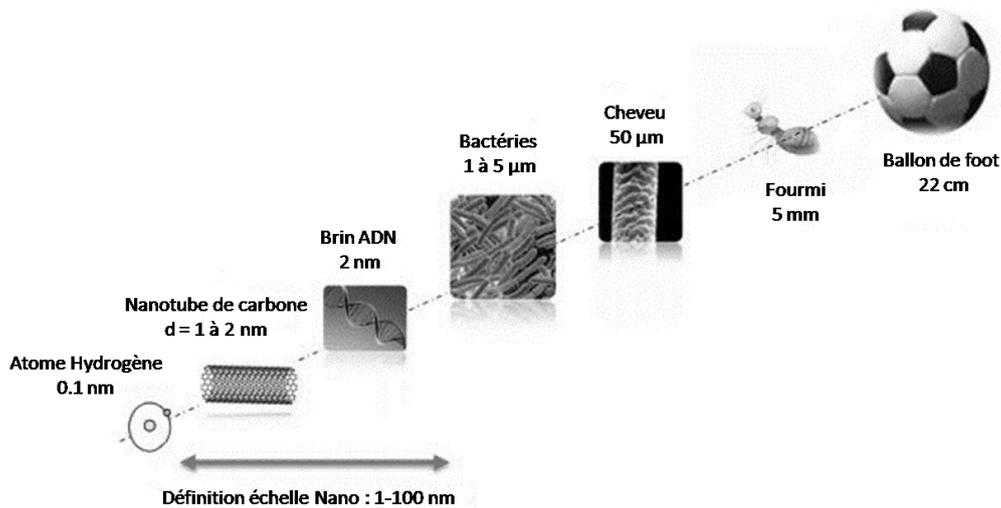


Figure 1.16. Echelle comparant le nanomètre à des structures de l'ordre du micromètre (un cheveu), du millimètre (une fourmi) et du centimètre (un ballon de foot).

3.1. Les semi-conducteurs 2D

En 2004, l'équipe d'A. Geim à l'Université de Manchester a mis en évidence les propriétés exceptionnelles du graphène [67]. Cette découverte majeure a montré que la dimensionnalité d'un matériau pouvait influencer largement sur ses propriétés. Cela a décuplé l'intérêt des chercheurs pour les cristaux bidimensionnels (2D). Il existe de nombreux matériaux qui peuvent être isolés sous la forme 2D (**Tableau 1.1**) ; leurs propriétés sont aussi très diverses. Parmi ces cristaux 2D, la famille des TMDs (les dichalcogénures de métaux de transition) est beaucoup étudiée depuis quelques années car les matériaux associés présentent un potentiel considérable pour diverses applications en électronique notamment [68].

Tableau 1.1 : répertoriant les matériaux pouvant cristalliser sous la forme 2D. En bleu, les cristaux 2D qui sont stables à l'air et à température ambiante ; en vert, ceux qui sont probablement stables à l'air ; en rose, ceux qui ne sont pas stables à l'air mais qui le sont probablement sous atmosphère inerte ; et en gris, les composés qui ont été exfoliés sous la forme d'une monocouche mais pour lesquels il y a peu d'informations supplémentaires [69].

Famille du Graphène	Graphène	Nitride de bore hexagonal	Hétérodiamant (BCN)	Fluorographène	Oxyde de Graphène
Les chalcogénures 2D	MoS ₂ WS ₂ MoSe ₂ WSe ₂	Dichalcogénures semiconducteurs : MoTe ₂ , WTe ₂ , ZrS ₂ , ZrSe ₂ ...		Dichalcogénures métalliques : NbSe ₂ , NbS ₂ , TaS ₂ , TiS ₂ , NiSe ₂ ...	
				Semiconducteur en couche : GaSe, GaTe, InSe, Bi ₂ Se ₃ ...	
Les Oxydes 2D	Micas, BSCCO	MoO ₃ WO ₃	Types pérovskite : LaNb ₂ O ₇ (CaSr) ₂ Nb ₃ O ₁₀ Bi ₄ Ti ₃ O ₁₂ Ca ₂ Ta ₂ TiO ₁₀	Les Hydroxydes : Ni(OH) ₂ , Eu(OH) ₂ ...	Autres
	Couche d'oxydes de Cu	TiO ₂ MnO ₂ V ₂ O ₅ TaO ₃ RuO ₂			

Les TMDs constituent une famille de matériaux de formule générale MX₂, où M représente un métal de transition du groupe 4 à 10 (dans la classification périodique des éléments) et X un chalcogène (**Figure 1.17**). Les TMDs présentent différentes propriétés physiques, allant du supraconducteur au semi-conducteur. Parmi ces TMDs, cette thèse s'intéresse en

particulier au MoS_2 . C'est un semi-conducteur dont le potentiel a suscité l'attention des chercheurs dans plusieurs domaines d'application durant ces dernières années [70].

Tableau périodique des éléments sur lequel sont mis en évidence les éléments intervenant dans la composition de composés 2D de la famille des TMDs. Le tableau est coloré pour indiquer les éléments concernés. Les métaux de transition qui cristallisent sous forme 2D avec les trois chalcogènes sont entièrement colorés. Les métaux de transition partiellement colorés ne forment des cristaux 2D qu'avec certains des chalcogènes.

MX ₂ M = Transition metal X = Chalcogen																	
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La-Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac-Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Ff	Uup	Lv	Uus	Uuo

Figure 1.17. Tableau périodique des éléments sur lequel sont mis en évidence les éléments intervenant dans la composition de composés 2D de la famille des TMDs. Il en existe environ 40. Les métaux de transition qui cristallisent sous forme 2D avec les trois chalcogènes sont entièrement colorés. Les métaux de transition partiellement colorés ne forment des cristaux 2D qu'avec certains des chalcogènes. [71]

3.1.1. Structure cristalline

Le disulfure de molybdène, composé chimique de formule MoS_2 , est un cristal connu depuis le début du XX^{ème} siècle [72]. C'est un composé lamellaire dont la structure rappelle celle du graphite. Il est constitué de feuillets bidimensionnels, empilés selon l'axe c (**Figure 1.18**). Chaque feuillet est composé d'un plan de cations métalliques (M) pris entre deux plans d'anions (X). Ces anions X sont en coordination trigonale prismatique par rapport aux atomes de métal. Les liaisons M-X à l'intérieur des feuillets sont fortes, de nature covalente et les liaisons entre feuillets sont beaucoup plus faibles (de type Van Der Waals). La bande séparant les deux feuillets d'anion (X= S) est nommée gap de Van Der Waals et son épaisseur est de 0,308 nm. Ce type d'interaction entre feuillets explique que le MoS_2 peut être clivé et que l'on peut isoler une monocouche de ce matériau. L'isolation d'une monocouche de MoS_2 a été entreprise pour la première fois en 1986 [73] Une monocouche de MoS_2 a une épaisseur de 0,65 nm. L'empilement des couches donne lieu à trois polytypes : les polytypes 1T et 3R sont métastables alors que le polytype 2H, le plus commun à l'état naturel, est stable.

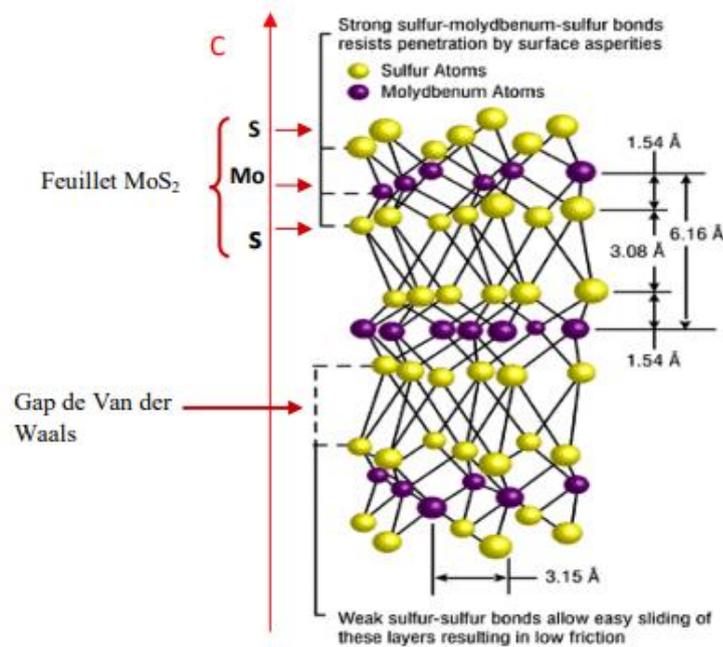


Figure 1.18. Représentation de la structure de MoS₂ (Projection selon [110] de la structure cristalline du polytype 2H du MoS₂) [74]

3.1.2. Méthodes de préparation

3.1.2.1. Exfoliation

L'exfoliation mécanique par la méthode de report multiple à l'aide de ruban adhésif, développée dans le contexte du graphène, [67] est actuellement la méthode la plus fiable et la plus utilisée pour la réalisation de prototypes [75-76] car elle permet l'isolation de monocouches idéales à partir d'un monocristal dont la structure et la composition sont parfaitement connus. Ce procédé n'étant pas viable industriellement, des méthodes d'exfoliation chimiquement assistées ont été envisagées. La première consiste à utiliser la capacité des métaux alcalins à intercaler le disulfure de molybdène [77] pour provoquer la séparation de ses feuillets. Techniquement, des cristaux de MoS₂ sont traités par une solution de n-butyllithium pendant 48h, puis les feuillets intercalés sont mis en suspension dans de l'hexane et hydrolysés sous agitation ultrasonique. L'hydrogène libéré lors de la réaction d'hydrolyse provoque alors la séparation des feuillets composant les cristaux de MoS₂, permettant l'obtention de monocouches en suspension [78-73].

La technique d'exfoliation par intercalation n'est pas sans conséquences puisque l'insertion des atomes de lithium entre les feuillets de MoS₂ provoque une déformation de leur structure

conduisant à l'obtention de la phase 1T. Cette transition est toutefois réversible, et un traitement thermique à 300°C permet une relaxation rapide vers la phase hexagonale [79].

3.1.2.2. Dépôt chimique en phase vapeur (CVD)

Le dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition) consiste de manière générale à envoyer un flux gazeux contenant un ou plusieurs précurseurs chimiques vers un substrat afin de former un dépôt solide. Dans le cas d'un flux gazeux à haute température envoyé vers un substrat plus froid afin de provoquer un dépôt par condensation, on parle de CVD à mur froid. Si la température du substrat est supérieure à la température du flux, de manière à activer une réaction chimique entre les précurseurs ou à initier leur décomposition thermique pour former un dépôt solide, on parle alors de CVD thermique (ou à murs chauds). Dans ce dernier cas, la réaction ou la décomposition des précurseurs peut être assistée par plasma ou activation photochimique.

Pour répondre au récent objectif de synthétiser des monocouches de MoS₂, des procédés de CVD thermique à haute température (550-800°C) ont été développés. Une tentative de CVD à partir du soufre élémentaire et de l'anhydride molybdique (MoO₃) à 750°C, a permis d'obtenir des nanocristaux de MoS₂ de seulement quelques feuillets d'épaisseur sur des plaques de quartz [80].

Il a rapidement été mis en évidence que l'utilisation de ce même procédé sur des substrats épitaxiés favorisait la croissance de monocouches dans le plan du substrat et l'obtention de domaines cristallins beaucoup plus larges [81].

Cette méthode a par la suite été appliquée à de nombreux substrats présentant un accord de maille avec les plans basaux du MoS₂, tels que le saphir,[82] le mica (de type fluorophlogopite),[83] le graphène [84] ou encore les nitrures h-BN [85] et h-GaN [86].

Le problème majeur de cette méthode réside toutefois dans la volatilité très faible et non reproductible des précurseurs utilisés. Le soufre élémentaire possède une tension de vapeur quasi-inexistante à température ambiante ($< 10^{-6}$ Torr) et il doit être chauffé au moins à 100°C pour générer une vapeur appréciable (10^{-2} Torr) [87]. L'anhydride molybdique s'évapore quant à lui sous forme de clusters de différentes tailles [88] et sa volatilité est fortement liée à son mode de préparation [89].

3.1.2.3. La méthode hydrothermale

La synthèse hydrothermale est définie comme méthode dérivée de la synthèse solvothermale qui contrairement à cette dernière requiert la mise en œuvre de phase aqueuse à la place de

solvants organiques, à une pression supérieure à 1 atm et une température supérieure à la température ambiante.

Le principe de base de cette voie de préparation est la nucléation homogène de petits cristaux qui vont croître lorsqu'ils sont soumis à de fortes températures et pressions.

Pendant la nucléation et le processus de croissance, l'eau est à la fois un agent catalytique et occasionnellement un composant de la phase de l'état solide. Sous conditions extrêmes à l'intérieur du réacteur (autoclave), l'eau atteint souvent un état supercritique favorisant ainsi l'augmentation de la force de dissolution, la diffusion et le transport de masse du liquide en réduisant sa viscosité. De plus, la possibilité de réglage de la pression à l'intérieur du réacteur permet l'ajustement de la densité du produit final. Zhang et al. [90] ont synthétisé des nanofeuilles de MoS₂ en une seule étape en utilisant de l'heptamolybdate d'hexaammonium tétrahydrate (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O et la thiourée comme précurseurs. L'épaisseur des produits finaux obtenus était de ~ 4 nm et la taille latérale des couches était dans la gamme de 200 à 400 nm. L'influence de la température et la durée de la réaction sur la formation des nanofeuilles MoS₂ a été discutée. Un mécanisme de croissance possible a été proposé (**Figure 1.19**) pour expliquer la formation de nanofeuilles MoS₂ en se basant sur les observations du processus d'évolution de la morphologie en fonction du temps.

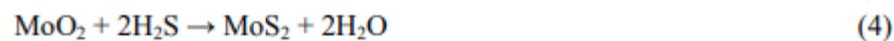
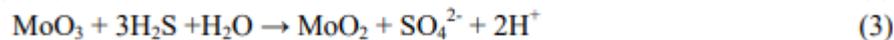
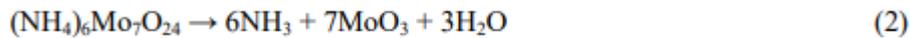
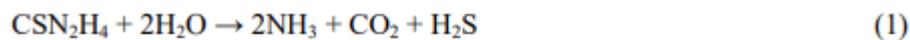


Figure 1.19. Equations de formations des nanofeuilles de MoS₂

En comparant avec les autres méthodes, la synthèse hydrothermale offre une meilleure alternative pour la production de nanostructures à bas coût suivant la démarche d'éco-conception ou « green chemistry ». Les matériaux obtenus par la synthèse hydrothermale sont généralement de bonne qualité cristalline avec une grande variété de formes et de tailles [91-92].

3.1.3. Les propriétés

3.1.3.1. Structure de bande

En mars 2010, des chercheurs de l'université de Berkeley décrivaient pour la première fois le changement de propriétés du MoS₂ lorsqu'il est isolé à l'état d'un feuillet unique [93]. Le disulfure de molybdène est un semiconducteur possédant un gap indirect de 1,2 eV depuis le

point Γ et un gap direct de 1,7 eV au point K, une monocouche de MoS₂ isolée ne présente plus qu'un gap direct de 1,9 eV au point K (**Figure 1.20**). La bande interdite directe se situe au point K. En ce qui concerne la bande interdite indirecte, le haut de la bande valence se situe au point Γ alors que le bas de la bande de conduction se situe à mi-chemin entre le point Γ et le point K. En effet, quand le nombre de couches de MoS₂ diminue, l'énergie du bas de la bande de conduction augmente à cause du confinement quantique, ce qui provoque la transition bande interdite indirecte/directe.

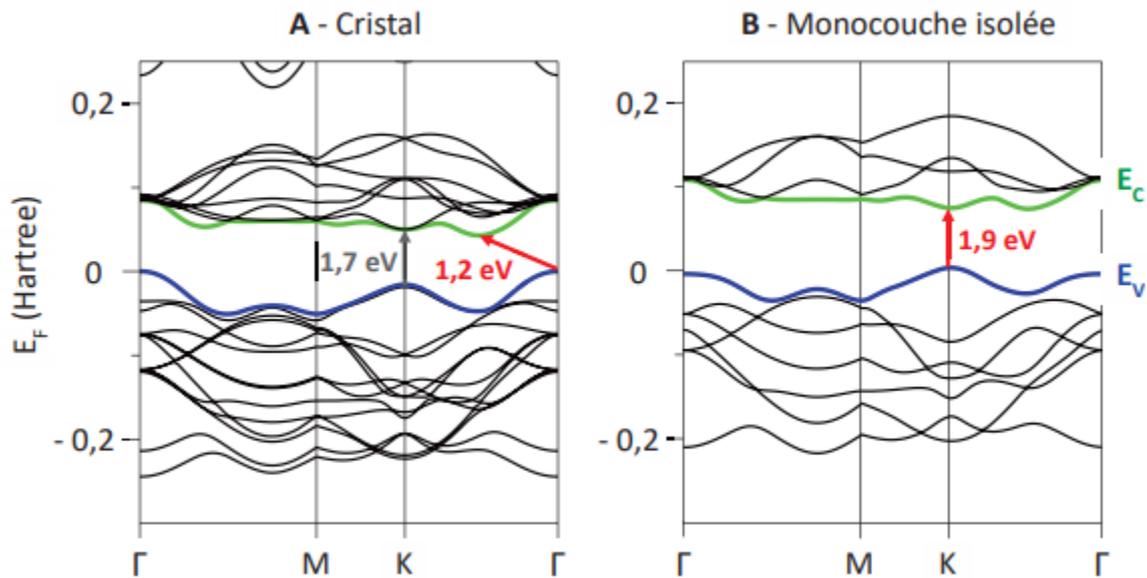


Figure 1.20. (A) Structure de bande calculée par DFT pour un cristal de MoS₂ ; (B) Structure de bande calculée par DFT pour une monocouche de MoS₂ isolée (les bandes bleues et vertes indiquent respectivement les niveaux supérieurs de la bande de valence et les niveaux inférieurs de la bande de conduction, et les flèches rouges le gap optique de plus faible énergie).[94]

3.1.3.2. Propriétés optiques

Les propriétés optiques de fines couches de MoS₂ exfoliées ont été mises en évidence expérimentalement par les équipes de F. Wang (Université de Californie à Berkeley) et T. Heinz (Université de Columbia) en 2010 [93-95]. Les deux études montrent que ces propriétés optiques dépendent très fortement du nombre de couches du feuillet de MoS₂. En particulier, ils montrent que la photoluminescence d'une monocouche de MoS₂ est bien plus importante que pour des feuillets plus épais ; le rendement quantique de photoluminescence décroît de 3 ordres de grandeur quand on passe d'une monocouche à une double couche [95]. Ces résultats sont en accord avec la structure de bande du MoS₂ qui passe d'une bande interdite indirecte à une bande interdite directe lorsque l'on passe d'une double couche à une monocouche. Ce changement de comportement est principalement lié à la suppression des

interactions entre les atomes de soufres d'un feuillet à l'autre, permettant de réduire suffisamment le maximum de la bande de valence au point Γ (présentant une contribution importante des orbitales 3pz du soufre) pour que l'énergie de la transition indirecte devienne supérieure à celle de la transition directe [94-96].

3.1.3.3. Propriétés électroniques

À l'état naturel, la molybdénite est majoritairement un semiconducteur de type P, avec des conductivités dans le plan allant de 1 à 500 S/m et une mobilité moyenne des porteurs de charges de 240 cm²/V/s (déterminée par effet Hall) [97]. La conductivité de la molybdénite mesurée selon un axe perpendiculaire à ses plans de base étant environ 2000 fois inférieure à celle mesurée dans le plan des feuillets,[98] la grande variabilité des valeurs de conductivité peut s'expliquer par la présence de dislocations dont la quantité varie d'un cristal à un autre [99]. Par ailleurs, la nature des porteurs de charge (électrons ou trous) semble considérablement dépendre de l'origine de la molybdénite ou de son mode de préparation : des cristaux de disulfure de molybdène obtenus en laboratoire par transport chimique en présence de brome sont des semiconducteurs de type-n,[100] alors que ceux dopés au niobium sont de type-p [101]. La conduction de type-p dans la molybdénite naturelle pourrait donc provenir de ses impuretés métalliques (Cu, Fe, Mg, Ca, ...), mais aucune corrélation n'a toutefois été établie entre la composition des cristaux et le type de conduction qu'ils présentent. Plus récemment, des études ont pu mettre en évidence que la conduction de type-n dans le sulfure de molybdène synthétique était probablement liée à des lacunes en soufre, agissant comme donneurs d'électrons [102].

3.1.3.4. Propriétés chimiques

La molybdénite est très robuste d'un point de vue chimique. Elle est insensible aux acides halogénés à température ambiante, quelle que soit leur concentration, et ne peut être attaquée que par des acides oxydants (acide nitrique, persulfurique, ...) pour former l'acide molybdique (H₂MoO₄), dont la faible solubilité dans l'eau (1,5 g/L à 20°C) conduit à la précipitation de MoO₃. Elle est également insensible à l'action de bases diluées mais s'oxyde lentement en molybdates en milieu oxygéné et fortement alcalin (pH > 10) [103]. De manière générale, la réactivité de la molybdénite est liée à sa structure. La saturation de la sphère de coordination du molybdène et la formation d'une couche compacte d'atomes de soufre de part et d'autre de chaque feuillet rendent les plans de base particulièrement hydrophobes et chimiquement inertes. En revanche, les bordures des feuillets présentent des sites coordinativement insaturés et sont donc beaucoup plus réactifs. (**Figure 1.21**).

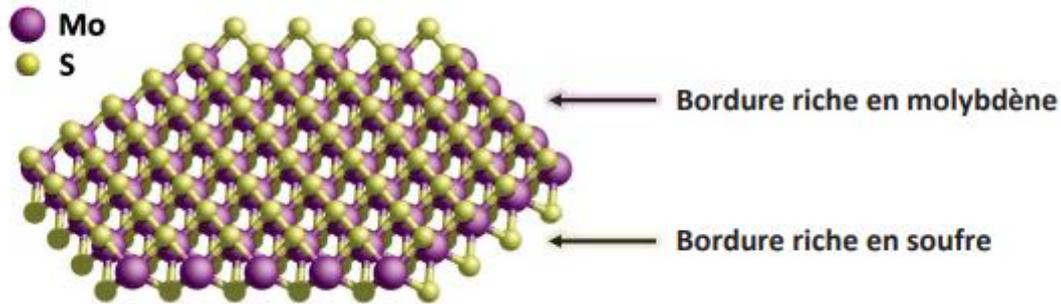


Figure 1.21. Représentation d'un feuillet de MoS₂ dans un nano-cristal hexagonal.[104]

3.1.4. Application

En raison de leur solidité et de leur flexibilité (résistance à la rupture jusqu'à des pressions de 16 GPa),[105] les monocouches de MoS₂ sont particulièrement adaptées pour l'électronique flexible et la réalisation de dispositifs optoélectroniques transparents. La première preuve de concept, réalisée en 2011 par des chercheurs de l'école polytechnique de Lausanne, a été la conception d'un transistor à effet de champ possédant une mobilité d'environ 200 cm²/V/s et un ratio ON/OFF de 108 à température ambiante [75]. La mobilité des porteurs de charge, qui est considérablement réduite lorsque le MoS₂ est isolé à l'état de monocouches (0,1 – 10 cm²/V/s) en raison des interactions environnementales (interaction avec le substrat ou les contacts, présence de molécules adsorbées...), a pu être restaurée grâce à l'utilisation de HfO₂ comme isolant de grille. Quelques mois plus tard, Z. Yin et al reportaient la fabrication d'un phototransistor à base de MoS₂ permettant la production et l'extinction d'un photocourant de 7,5 mA/W avec un temps de réponse de seulement 50 ms [76]. Depuis, la réalisation de ces dispositifs a largement progressé (allant jusqu'à la fabrication de circuits logiques), notamment grâce à une meilleure compréhension de l'influence de la prise de contacts, des diélectriques utilisés ou encore de l'environnement chimique sur la qualité du transport de charge [106-107].

Comme tous les matériaux de basse dimensionnalité, le MoS₂ présente un ratio surface / volume très élevé. De ce fait, il est très sensible à son environnement. Cela se manifeste par des transferts de charges entre les molécules de l'environnement et le MoS₂. Par conséquent, il peut être intéressant d'utiliser ce matériau dans les capteurs et biocapteurs pour la détection de certaines molécules.

Sha et al. [108] ont mis au point un capteur électrochimique flexible et simple pour la détection de l'acide urique, à base de MoS₂ déposé sur une lame d'aluminium par la voie de

synthèse hydrothermale (**Figure 1.22**). Le capteur développé présente une limite de détection de $1,169 \mu\text{M}$, un temps de réponse $< 3 \text{ s}$, une excellente reproductibilité, une sélectivité envers l'acide par rapport au glucose, à l'acide ascorbique et à l'urée avec une sensibilité de $98,3 \pm 1 \text{ nA}/\mu\text{M}$ ($R^2 = 0,999$) dans une large gamme dynamique de $10\text{--}400 \mu\text{M}$. Les hautes performances du capteur peuvent être attribuées à la grande surface spécifique de MoS_2 ayant un plus grand nombre de sites. Le capteur proposé a également été évalué avec succès pour la détection de l'analyte cible dans un échantillon réel et les résultats obtenus correspondent à ceux obtenus à partir des tests biochimiques conventionnels effectués en laboratoire clinique.

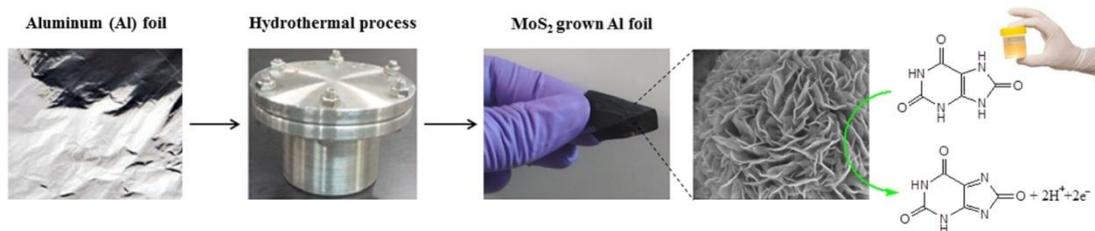


Figure 1.21. Les différentes étapes du processus d'élaboration du biocapteur

Majda et al. [109] ont proposé un transistor à effet de champ modifié par une couche de MoS_2 , comme biocapteur pour la détection d'un biomarqueur du cancer du sein le miRNA-155. Les monobrins d'ADN sonde du miRNA-155 ont été immobilisés par adsorption physique sur le plan basal du MoS_2 . En présence des brins complémentaires cibles miRNA-155 ces derniers vont s'hybrider pour former un double brin qui va se désorber du canal MoS_2 en induisant une modification du potentiel à la surface du matériau agissant comme témoin de l'hybridation (**Figure 1.23**). Ce biocapteur a permis la détection précise du miARN-155 cible à une très faible concentration. L'application du biocapteur a été évaluée avec succès dans le sérum humain et dans des échantillons d'une lignée cellulaire.

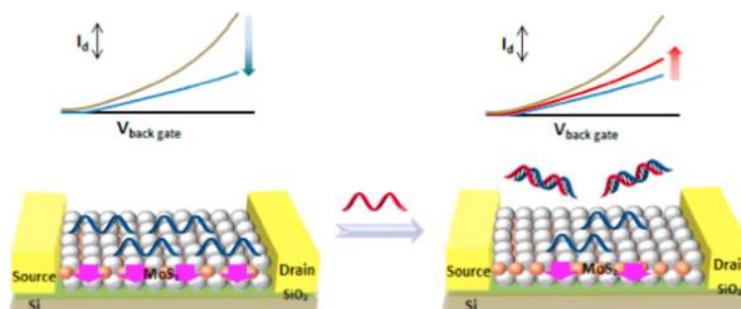


Figure 1.23. Principe de détection du miRNA-155 par le transistor à effet de champ développé

Kong et al. [110] ont mis à profit la capacité d'extinction de fluorescence des nanofeuilles de MoS₂ qui est supérieure à celle du graphène, en développant un biocapteur aptamérique pour la détection de PSA par fluorescence (**Figure 1.24**). En présence de l'analyte cible, l'aptamère marquée par un fluorophore, forme avec ce dernier un complexe qui résulte à sa désorption de la surface des nanofeuilles de MoS₂ ce qui résulte en la restauration de la fluorescence pour donner un signal positif. Cette approche présente l'avantage d'une conception simple et d'une détection rapide du PSA. Le biocapteur montre une sensibilité et une sélectivité élevées avec une limite de détection de 0,2 ng/mL. Le dispositif analytique a également été testé dans des échantillons de sérum humain avec succès.

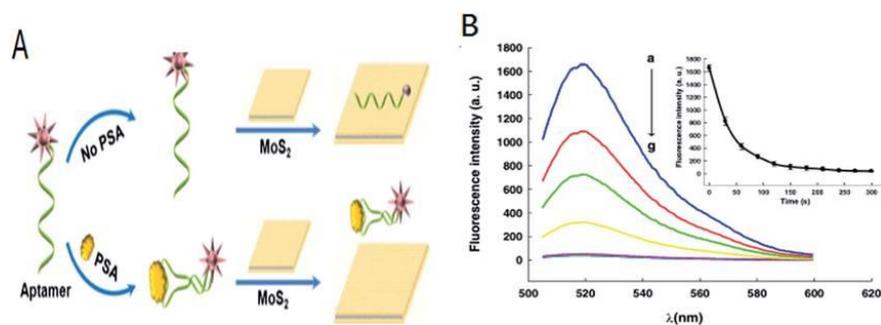


Figure 1.24. Schéma du principe de préparation et de détection de l'aptacapteur

3.2. Les polymères conducteurs

Le développement des polymères conjugués a commencé au début des années 1970 avec la mise en évidence d'une conductivité de type métallique ($\sim 10^3$ S/cm) pour le polynitrure de soufre $[(-S=N-)_x]$. Cette propriété remarquable suscita en effet l'intérêt de la communauté scientifique, qui proposa rapidement d'autres composés pouvant présenter des propriétés analogues. C'est ainsi qu'en 1977, les professeurs Mac Diarmid, Heeger et Shirakawa [111-112] découvrent qu'il est possible de moduler la conductivité électrique du polyacétylène moyennant l'introduction contrôlée de molécules donneuses ou accepteuses d'électrons (c'est le phénomène de dopage) faisant alors passer le polymère de l'état d'isolant à celui de conducteur. Depuis lors, l'imagination des chercheurs a permis la création de nombreux polymères conjugués stables présentant des conductivités électriques élevées. Les travaux de ces trois pionniers ont d'ailleurs été récompensés par un prix Nobel en 2000.

Il existe 3 principaux types de matériaux conducteurs [113]. Le premier entre dans la classe des polymères conducteurs composites ou encore appelés polymères conducteurs extrinsèques. Ils sont composés d'une matrice constituée d'un polymère isolant dans laquelle est dispersée une poudre conductrice constituée soit de particules métalliques [114,115,116] soit de polymères conducteurs intrinsèques [117-118] soit de carbone,

[119,120,121,122] afin d'augmenter la conductivité électrique. Ce type de composite trouve des applications dans les encres conductrices pour circuits imprimés, les protections anticorrosion, l'emballage ou encore les supports antistatiques... Le second groupe est constitué par les polymères dits conducteurs ioniques. Dans ces polymères organiques, par ailleurs isolants électroniques, les charges sont transportées par des ions. Les oxydes de polyéthylène, dans lesquels est dissout un sel de lithium, et utilisés comme électrolyte solide pour la première fois par Michel Armand dès les années 80 pour les applications batterie Li-polymère et Li-ion, en sont un exemple [123,124,125]. La dernière classe de polymères conducteurs, qui sera davantage développée dans ce travail, fait référence aux polymères conducteurs électroniques intrinsèques. Ils sont composés de chaînes carbonées le long desquelles il y a alternance de simples et de doubles liaisons. Cette conjugaison permet l'établissement d'un réseau π délocalisé, responsable de la conductivité électrique. La conductivité étant de type polaronique, la mobilité des porteurs majoritaires (électrons ou trous suivant le type de conductivité n ou p) est généralement faible, inférieure à $1\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Les principales classes de polymères conducteurs organiques sont les polyacétylènes, les polypyrroles, les polythiophènes, les polyanilines, les poly(para-phénylènes) et les poly(para-phénylène-vinylènes) illustrés dans la **Figure 1.25**.

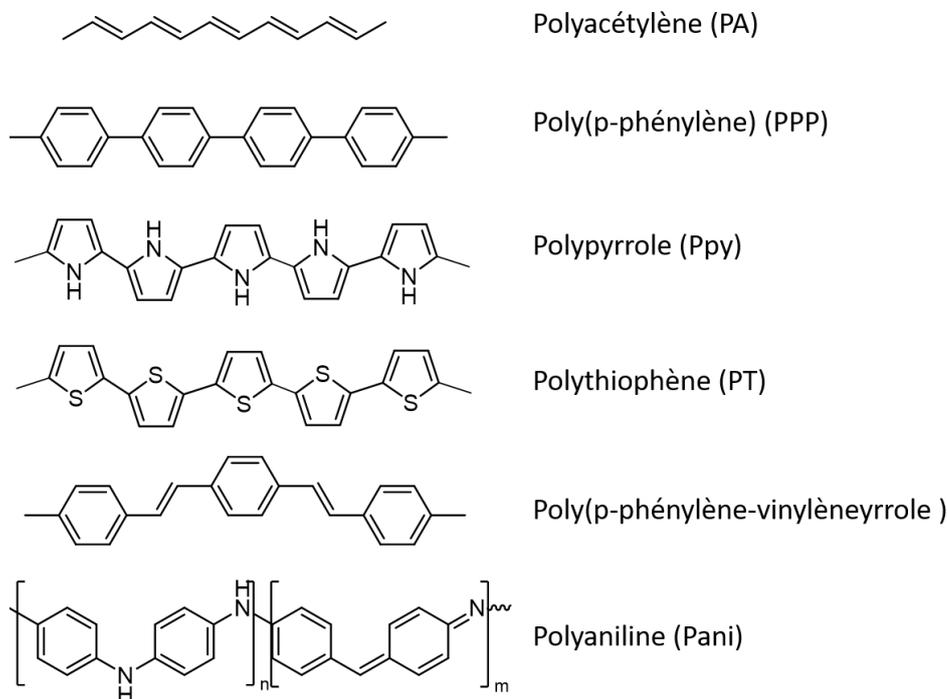


Figure 1.25. Structures des polymères intrinsèques les plus utilisés

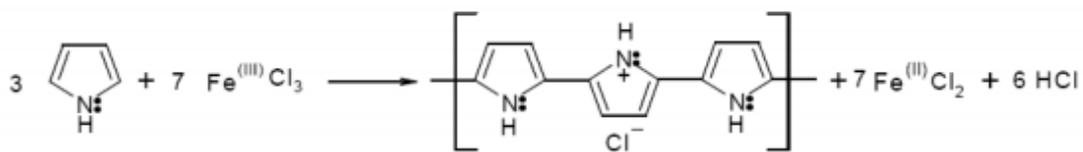
3.2.1. Les voies de synthèse du polypyrrole

3.2.1.1. Synthèse chimique

La synthèse chimique permet d'obtenir du polymère sous la forme d'une poudre noire. Cette méthode de synthèse à haut rendement est préférable pour des applications industrielles, étant donné qu'elle est simple et facile à mettre en œuvre avec une réaction presque totale.

Le polypyrrole a été polymérisé pour la première fois en 1916 [126] par oxydation du pyrrole par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le produit obtenu appelé « pyrrole noir » était sous forme de poudre amorphe.

En générale la préparation du polypyrrole fait intervenir une oxydation du monomère pour initier la polymérisation. De ce fait divers oxydants ont été utilisés tels que : le peroxyde d'hydrogène dans l'acide acétique, l'ozone, la benzoquinones, $FeCl_3$, $CuBr_2$...



La synthèse chimique ne permet pas de contrôler les propriétés physico-chimiques qui en résultent ainsi que les réactions secondaires. Ces dernières cassent la conjugaison électronique par la formation d'enchaînements α - β ou β - β réduisant considérablement la conductivité, contrairement à la polymérisation électrochimique [127].

3.2.1.2. Synthèse par voie électrochimique

La synthèse électrochimique permet de greffer directement un polymère conducteur à la surface de l'électrode. Cela a mené à des applications électrochimiques intéressantes. Le polypyrrole est toujours obtenu à l'état dopé car son potentiel d'oxydation est inférieur à celui du monomère pyrrolique. Le dopant, qui assure la neutralité électrique, est un anion qui provient de l'électrolyte support. L'épaisseur du film peut être aussi contrôlée facilement par la charge électrique appliquée pendant l'électropolymérisation. Finalement ce processus est rapide simple et propre (l'absence de catalyseurs, la possibilité d'utiliser dans l'eau comme solvant, ...). Cette méthode de synthèse électrochimique permet donc d'obtenir un film polymère conducteur avec une bonne conductivité.

Des recherches ont été menées sur le mécanisme de synthèse électrochimique du pyrrole, il en résulte trois étapes principales : [128-129]

- L'étape d'initiation est constituée par l'oxydation d'un monomère pyrrolique conduisant à la formation d'un radical cation. (**Figure 1.26 Eq.1**)

- L'étape de propagation consiste en l'attaque électrophile de ce radical cation sur un motif pyrrolique non oxydé. Cette attaque est suivie d'une aromatisation du dimère ainsi obtenu comme c'est le cas pour de nombreux radicaux cations analogues. (**Figure 1.26 Eq.2**)
- La polycondensation se poursuit de la même manière (**Figure 126 Eqs. 3 et 4**) tandis que simultanément la chaîne pyrrolique est oxydée puisque le potentiel d'oxydation du polymère formé est inférieur à celui du monomère.
- L'étape de terminaison est constituée par le couplage radicalaire de différentes chaînes oxydées ou par l'attaque radicalaire d'une impureté présente dans le milieu réactionnel.

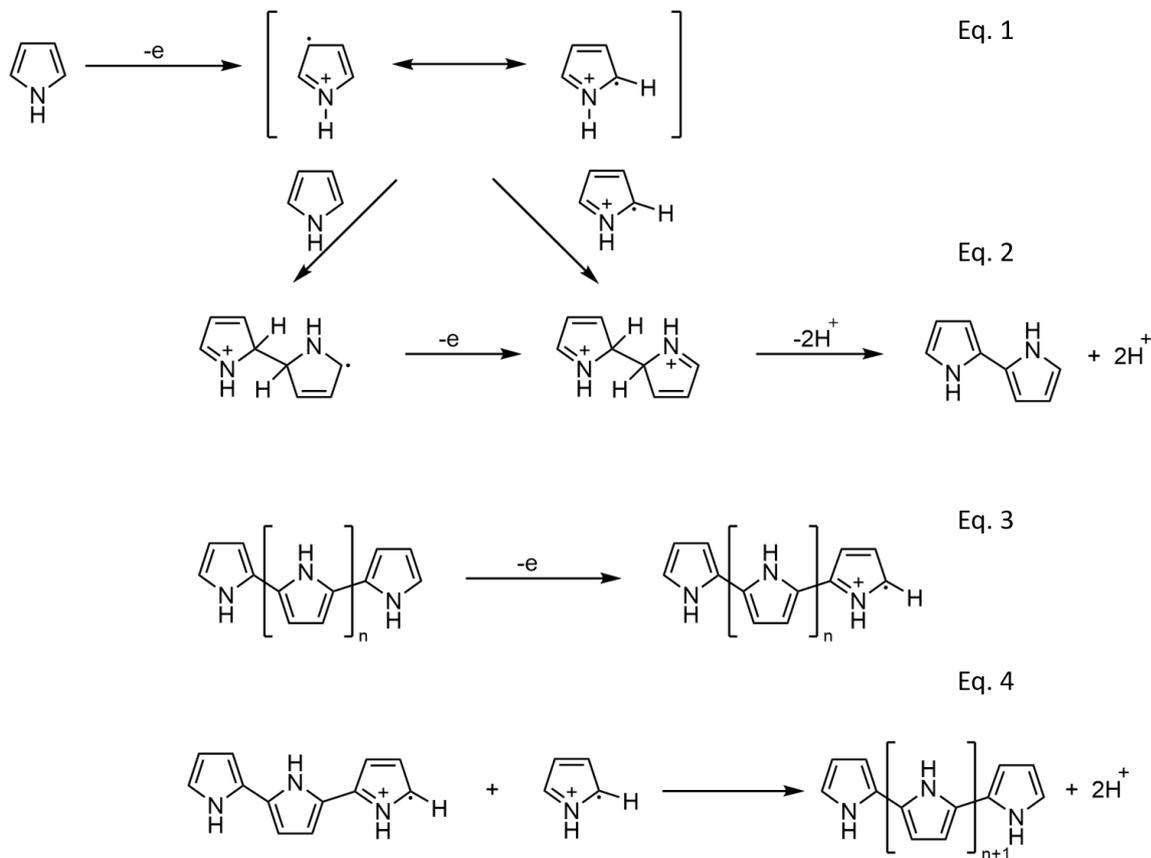


Figure 1.26. Différentes étapes de polymérisation du polypyrrole [129]

3.2.1.3. Les propriétés électriques du polypyrrole

Le polypyrrole est doté d'une haute conductivité électrique qui peut être expliquée par la présence d'un grand nombre d'électrons π conjugués permettant une délocalisation des électrons et donc à la mobilité de porteurs de charges. Ceux-ci, de type polaron et/ou bipolaron (**Figure 1.27**) sont présents en nombre beaucoup plus important que dans le cas des semi-conducteurs ; ils portent des charges positives compensées par des anions, appelés

dopants (ou contre ions), insérés dans le polymère [130]. La valeur du taux de dopage varie en fonction de la nature de l'agent oxydant, des concentrations en réactifs et de la nature du solvant.

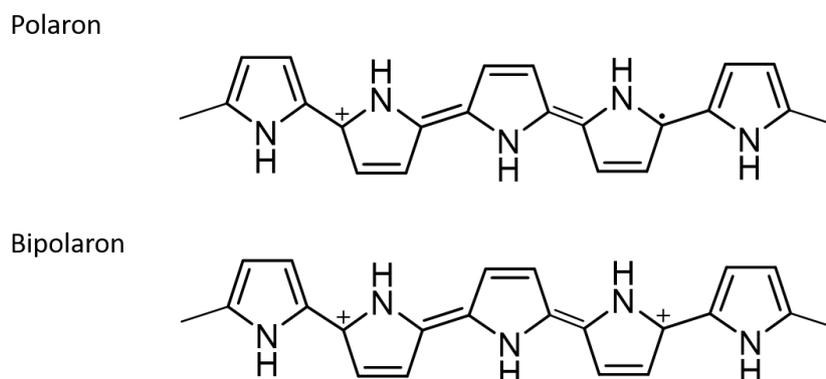


Figure 1.27. Polaron et bipolaron dans le polypyrrole

Ce dernier peut être aussi caractérisé par son caractère hydrophile et sa grande stabilité dans l'eau [131] et sa biocompatibilité. Son faible potentiel d'oxydation permet de faire croître un film polymère à partir de solutions aqueuses qui sont compatibles avec la plupart des éléments biologiques [132,133].

3.2.2. Application

Le polypyrrole est connu en tant que matériau biocompatible, est utilisé dans certaines applications biomédicales et semble être très prometteur dans le domaine des biotechnologies avancées. Dans cette voie, les plus prometteurs sont des nanocomposites appropriés pour les biocapteurs de glucose, qui pourraient potentiellement être implantés directement dans le corps humain. L'impact de différentes concentrations de nanoparticules polypyrrole sur des fibroblastes embryonnaires primaires de souris (MEF), la lignée cellulaire d'hépatome de souris (MH-22A) et sur la lignée cellulaire de lymphocytes T Jurkat humaine a été étudié [134].

En effet ce polymère conducteur a été aussi fortement exploité durant ces dernières années dans la conception de capteurs bioanalytiques [135] du fait notamment de ses différentes propriétés telles que son activité redox [136], sa capacité d'échanger des ions et de discriminer entre les ions [137] ses propriétés d'absorption des gaz, des protéines, d'ADN, son activité catalytique [138-139], de protection contre la corrosion [140]. On va citer dans ce qui suit quelques capteurs et biocapteurs récemment développés à base de polypyrrole.

Haddaoui et al. [141] ont décrit une nouvelle méthode électrochimique de la détection d'ADN en utilisant des nanoparticules de Fe_3O_4 enrobées de polypyrrole fonctionnalisées avec des dendrimères (**Figure 1.28**). L'hybridation de l'ADN sonde et sa séquence complémentaire induit une forte baisse du courant de la naphthoquinone permettant la détection jusqu'à 4 fM d'ADN cible. En outre, ils ont construit deux biopuces à ADN basées sur le même concept pour détecter le gène *rpoB* dans les souches sauvages et mutantes de la tuberculose. Les deux gènes diffèrent par un seul polymorphisme dans le codon 531 qui confère une résistance à la rifampicine, un antibiotique largement utilisé pour traiter la tuberculose. Chacune de ces biopuces ne reconnaît que sa cible spécifique. Les biopuces ont été aussi exploitées avec succès pour détecter avec une très grande spécificité l'ADN génomique amplifiée par PCR et non amplifiée.

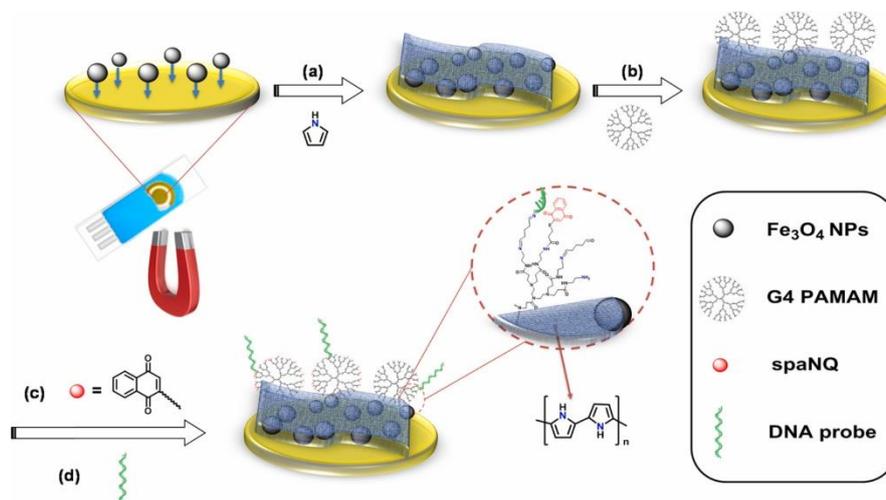


Figure 1.28. Illustration schématique des différentes étapes de conception du biocapteur à base de PPy/ Fe_3O_4 pour la détection de la tuberculose

Un biocapteur sensible à base de nanofils de polyéthylène glycol (PEG) et polypyrrole (PPy) (**Figure 1.29**) a été développé par Wang et al. [142] pour la détection de microARN. Les nanofils de PEG / PPy sont dotés d'une excellente conductivité électrique due aux nanofils de polymère conducteur PPy avec les propriétés « anti-fouling » du PEG. Le biocapteur proposé assure la détection de mARN cible dans un domaine de linéarité compris entre 0,10 pM et 1,0 nM et également l'identification des mésappariements de mARN. De plus, ce dispositif analytique peut détecter la cible avec une très grande sélective et sensibilité, démontrant d'excellentes performances de résistance aux protéines, même dans des échantillons de sérum humain complexes. Le biocapteur basé sur des nanofils PEG / PPy peut être étendu à la conception de tout type de biocapteur à base d'ADN.

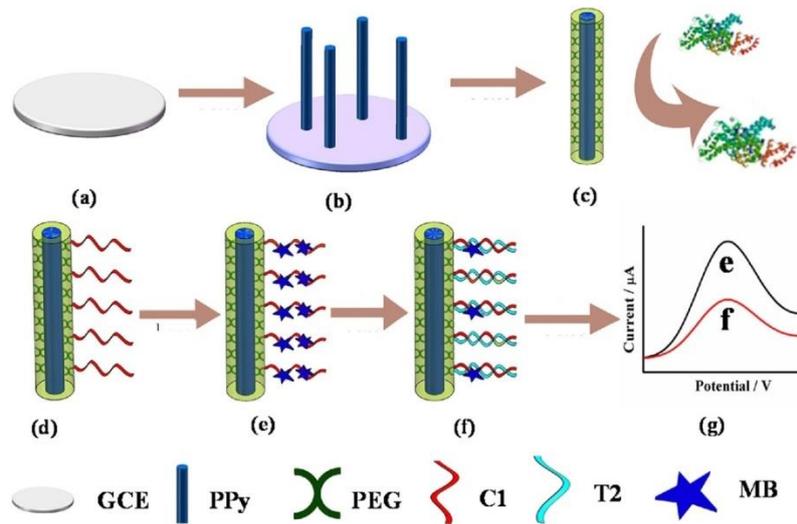


Figure 1.29. Préparation du biocapteur à base de nanofils de PEG/PPy et principe de la détection de microARN du cancer

Récemment Xu et al. [143] ont développé un capteur à base des nanoparticules de polypyrrole modifiés par une couche de polydopamine pour la détection du Pb^{2+} par l'adsorption de ce dernier à la surface (**Figure 1.30**). La voltammétrie différentielle pulsée a été utilisée pour le suivie de la concentration du cation. L'électrode présente de bonnes performances analytiques avec une large gamme dynamique de 0.1 à $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et une faible limite de détection de $0.055 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. L'ion Pb^{2+} a été détecté à un potentiel aux alentours de -0.5V avec une grande sélectivité même en présence de Hg^{2+} et Cu^{2+} . Le test de stabilité en fonction du temps a montré que ce capteur conserve sa reproductibilité pendant une durée d'un mois. Ce dernier a été appliqué pour la quantification du Pb (II) dans des échantillons d'eaux usées.

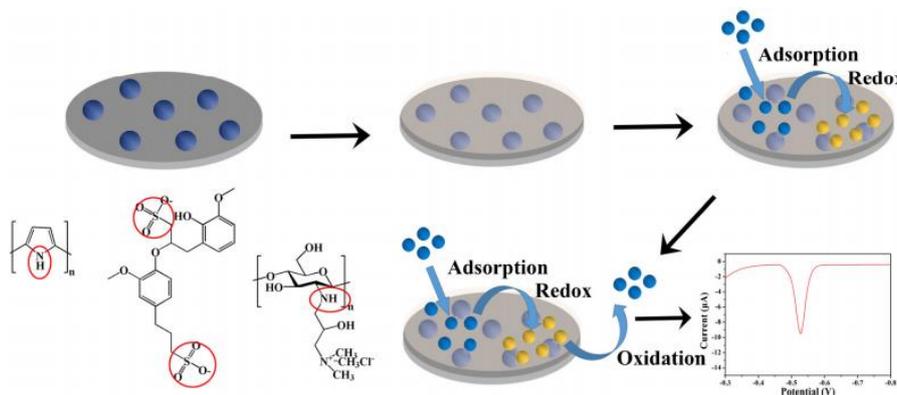


Figure 1.30 Développement du capteur électrochimique et base de nanoparticules de PPY modifiés par la polydopamine pour la détection du Pb (II)

3.3. Les nanohybrides

Les nanohybrides forment une classe de matériaux constitués d'une partie inorganique et d'une partie organique et dont la connexion entre les constituants se fait à l'échelle nanométrique. Sanchez [144] distingue deux types d'hybrides en fonction du mode d'arrangement entre les constituants :

- Les hybrides de classe I sont des matériaux dans lesquels les interactions organique/inorganique sont faibles (de type Van der Waals, ou électrostatiques)
- Les hybrides de classe II sont des matériaux dans lesquels les interactions organique/inorganique sont fortes (de type : covalentes, ou iono-covalentes).

De nouvelles propriétés, dues aux diverses interactions possibles entre les constituants, peuvent également apparaître et on pourrait alors parler d'effet de synergie [145]. Plusieurs structures peuvent être envisagées selon la stratégie de conception ; une dispersion de nanoparticules dans une matrice ou l'intercalation de molécules entre les feuillets d'un matériau lamellaire ou l'encapsulation de nanoparticules dans une couche donnant lieu à une structure cœur-écorce (**Figure 1.31**).

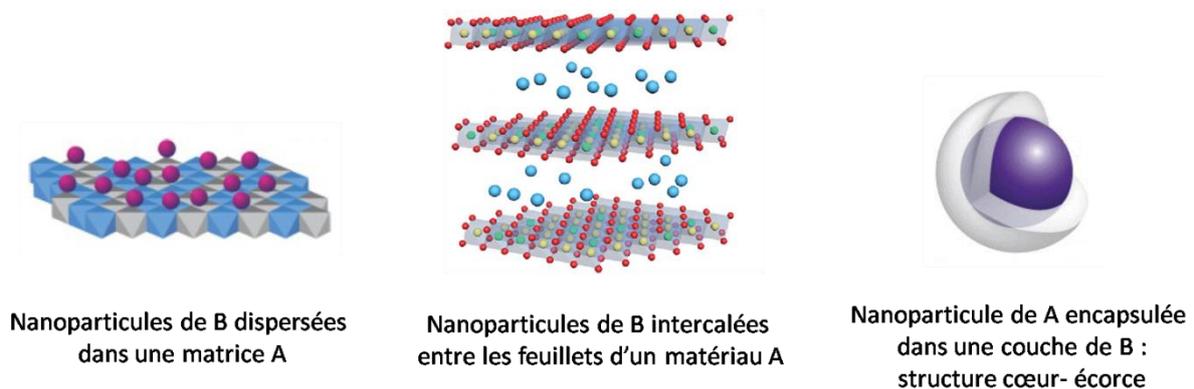


Figure 1.31. Différentes structures pouvant être qualifiées de nanohybrides

La majeure partie des études réalisées sur les nanohybrides porte sur des polymères conventionnels [146]. Les polymères sont, par exemple, solubilisés ou fondus et mélangés par la suite aux matériaux inorganiques ce qui permet d'établir une interaction entre les deux constituants [147]. Une matrice est généralement obtenue par cette voie de synthèse. La polymérisation de monomères dans une solution contenant des nanoparticules dispersées peut permettre, quant à elle, d'obtenir la structure cœur-écorce [148]. Il est important de noter aussi que différentes structures des nanohybrides peuvent également être préparés par voie électrochimique [149].

3.3.1. Les méthodes de préparation des nanohybrides

3.3.1.1. *Méthode classique*

La méthode classique de synthèse des nanohybrides cœur-écorce de type particule inorganique-polymère conducteur consiste à polymériser le monomère en présence d'un sol de nanoparticules inorganiques en utilisant un agent oxydant soluble. Les travaux ont tout d'abord porté sur le maintien de la stabilité colloïdale lors de la synthèse afin d'éviter l'agglomération du matériau, ce qui est fondamental pour l'obtention de la structure désirée.

3.3.1.2. *Microémulsion*

La technique dite de 'microémulsion' conduit également à des nanohybrides de structure cœur-écorce. Ainsi, des nanoparticules d'or enrobées de polypyrrole ont été obtenues dans les cavités d'un copolymère à bloc. Du pyrrole a été introduit dans les cavités du polystyrène-block-poly(2-vinylpyridine) dans du toluène et la polymérisation initiée par ajout de HAuCl_4 [150].

3.3.1.3. *Modification de surface*

Même si la méthode de synthèse classique décrite ci-dessus est facile à mettre en œuvre, elle mène cependant souvent à des composites dans lesquels la quantité de polymère en surface est faible [151]. Afin d'améliorer l'adhésion du polymère à la surface, le groupe de Perruchot [152] a eu recours à une autre stratégie. Ce dernier a utilisé la chimie des alkoxy-silanes pour fonctionnaliser la surface des particules de SiO_2 [153]. Dans le même contexte de la modification de surface, le groupe de Tang a montré que dans le cas de matériau à base de MoS_2 , le molybdène est fortement coordonné avec les atomes d'azote du pyrrole ce qui facilite la propagation contrôlée du polymère conducteur à la surface des feuillets du matériau 2D [154].

3.3.2. Caractéristiques des nanomatériaux hybrides à base de semi-conducteurs et de polymères π -conjugués

Les chercheurs ont toujours été intéressés par la possibilité de combiner deux matériaux ayant des propriétés différentes, voire complémentaires, pour aboutir à un seul nouveau matériau unissant ces propriétés ou possédant de nouvelles en raison d'effets de synergie. De ce point de vue, la combinaison des nanomatériaux organiques et inorganiques, plus précisément des polymères π -conjugués et des nanofeuillets de semi-conducteurs, semble très intéressante. Les propriétés électroniques de ces deux composants sont complémentaires et peuvent être modulées aisément, notamment en termes de matériau et de taille ainsi que concernant la nature chimique des molécules organiques (oligo- ou polymères). On peut

alors s'attendre à un grand nombre de combinaisons avec des propriétés intéressantes. De plus, il est possible de transformer le polymère conjugué de sa forme réduite peu conductrice à une forme dopée conductrice, ce qui permet de préparer des jonctions conducteur/semi-conducteur au sein du même matériau hybride. Les recherches fondamentales sur ces types de matériaux n'en sont qu'à leur début. Finalement, le facteur déterminant pour le choix de combiner des polymères conjugués avec des semi-conducteurs, a été que les polymères conjugués dopé sont de type p, tandis que les dichalcogénures de métaux de transition ont été conçus pour être de type n. Une combinaison des deux conduit alors à une jonction n-p, qui peut être parfaitement ajustée grâce aux constituants dont les niveaux énergétiques peuvent être aisément modulés. Le transfert électronique entre le polymère et le matériau inorganique est facilité par l'interface importante entre les deux, en raison du rapport surface/volume élevé des nanofeuillets, et que la phase polymère améliore les propriétés mécaniques de l'hybride par rapport aux matériaux uniquement constitués par des semi-conducteurs inorganiques. Les jonctions n-p sont notamment utilisées dans les dispositifs optoélectroniques, tels que les diodes électroluminescentes ou les cellules photovoltaïques.

3.3.3. Application

Ces nanohybrides trouvent diverses applications, par exemple dans le domaine biomédical avec le polypyrrole, car ce dernier présente une forte affinité avec des molécules biologiques telles que l'ADN. Ces dernières années, de nombreux groupes de recherche se sont également intéressés aux propriétés photovoltaïques [155]. Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés au nanohybride MoS₂ / polypyrrole. Malgré les nombreux défis qui restent à surmonter pour développer une compréhension fondamentale de ce nanocomposite, ce dernier a déjà été intégré dans plusieurs domaines d'applications que nous allons citer dans ce qui suit.

L'équipe de Tang a décrit une méthode de polymérisation in situ des films ultraminces de polypyrrole à la surface des monocouches de MoS₂ [154]. Ce film hybride uniforme et ultrafin possède une grande surface spécifique, ce qui favorise le stockage efficace des charges, le rendant ainsi applicable en tant qu'électrode de supercondensateur.

La conductivité électrique améliorée du MoS₂ fonctionnalisé avec des polymères conducteurs tels que le polypyrrole peut être utilisé comme un électrocatalyseur très actif dans la réaction de dégagement d'hydrogène [156]. En effet un film composite Molybdène sulfure / poly (pyrrole-alkylammonium) a montré une activité catalytique élevée et un

transfert d'électrons rapide ce qui en fait un candidat prometteur en tant que matériau de cathode dans la réaction de dégagement d'hydrogène [157].

Les électrodes négatives de batteries lithium ion sont au centre du domaine de stockage d'énergie électrique. Dans ce travail Xie al. ont développé une stratégie en deux étapes pour synthétiser les microsphères MoS₂/polypyrrole. Cette architecture cœur-écorce est composée des microsphères de MoS₂ enveloppées de manière homogène par un revêtement conducteur en polypyrrole. Les résultats obtenus lors des essais préliminaires montrent que les microsphères MoS₂/PPY obtenues présentent des performances électrochimiques grandement améliorées pour le stockage du lithium comparées aux performances des microsphères de MoS₂ non modifiées. L'électrode formée par le nanohybride affiche une capacité spécifique élevée de 1012mAh.g⁻¹ après 200 cycles à 200mA.g⁻¹ et des performances à haut débit (600mAh.g⁻¹ à 4000mA.g⁻¹). Les performances électrochimiques supérieures sont attribuées à la combinaison avantageuse d'une structure de microsphères hiérarchique et d'un revêtement du polymère conducteur [158].

4. La pollution de l'eau

La qualité et la gestion de nos ressources en eau sont fortement mises en danger par le gaspillage, la pollution ou bien encore l'inégalité face à l'accès à l'eau. Nous constatons aujourd'hui une dégradation de la qualité des eaux, aussi bien souterraines que marines. A la dégradation physiques (barrages, détournement de rivières, captage...) s'ajoute une dégradation chimique due au déversement de produits chimiques tels que les nitrates, les pesticides, les hydrocarbures ou bien encore les médicaments. Aux niveaux mondial, européen et national, des mesures sont mises en place afin de réagir à cette situation environnementale, ainsi, la potabilité de l'eau et la qualité de ses ressources requièrent de plus en plus de moyen de surveillance, de traitements et une législation accrue. Il existe aujourd'hui un réel besoin en technologies innovantes permettant de contrôler en continu et in situ la qualité des eaux souterraines et marines.

4.1. Les polluants aqueux

4.1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP constituent une famille de composés organiques résultant de la fusion d'au moins deux cycles aromatiques (**Figure 1.32**). A ce titre ils peuvent faire partie de la matière organique dissoute. Le nombre de HAP identifiés à ce jour est de l'ordre de 130. Environ 16

composés sont généralement considérés pour les études environnementales [159]. Ces molécules sont assez stables chimiquement et leur biodégradation est généralement lente. C'est pourquoi ils appartiennent à la classe des Polluants Organiques Persistants ou POP [160]. La toxicité aigüe n'est pas le problème majeur posé par les HAP car les concentrations à atteindre sont très élevées et rarement rencontrées dans l'environnement. Cependant, leur toxicité chronique, suite à l'exposition à de faibles doses sur une longue période, est beaucoup plus problématique [161]. Les risques les plus importants liés aux HAP sont leur effet mutagène et cancérigène. En effet, certains d'entre eux ont été classés comme cancérogènes probables ou possibles chez l'humain par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), l'US EPA, et l'Union européenne.

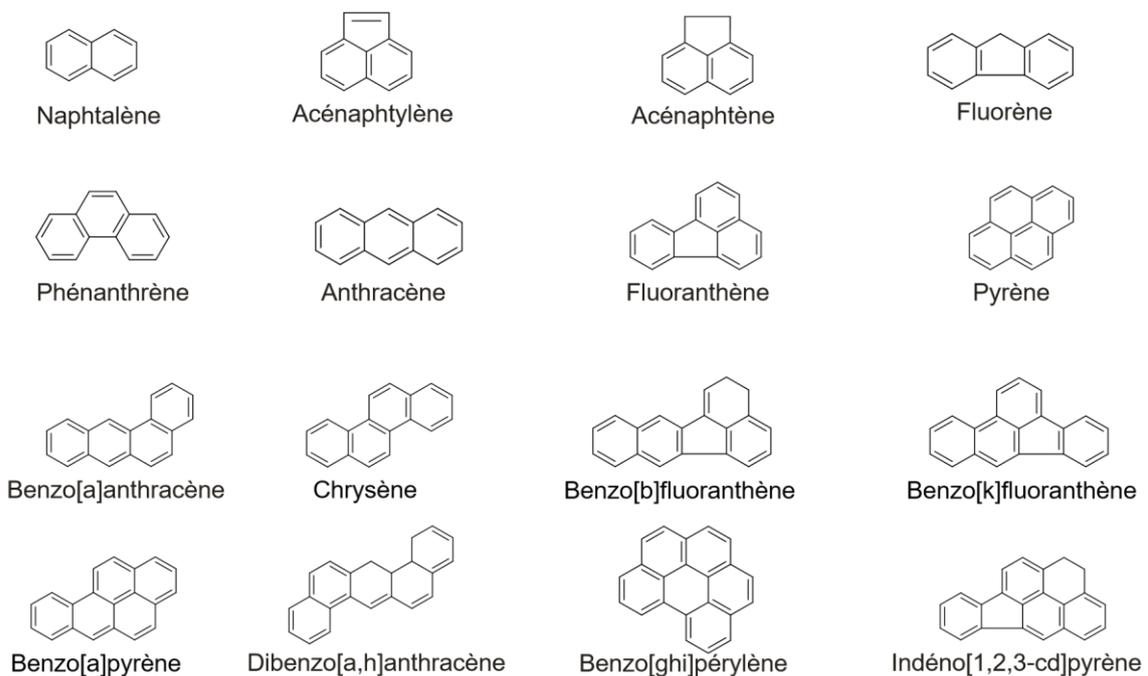


Figure 1.32. Formules semi-développées des 16 HAP prioritaires selon l'agence environnementale américaine (US EPA).

4.1.2. Les nitrates et autres composés azotés

Toutes les formes d'azote (azote organique, ammoniacque, nitrites...) peuvent être à l'origine des nitrates par le processus d'oxydation biologique. A la fin des années 1950, l'utilisation de ces composés a fortement augmenté notamment dans le milieu agricole. Leurs utilisations constituent aujourd'hui la principale source de pollution des eaux souterraines. Leur présence provient à 66 % de l'agriculture, le reste est issu des collectivités locales (22 %) et des rejets industriels (12 %). L'épandage massif d'engrais azotés (4 millions de tonnes chaque année en France), c'est-à-dire une forte différence entre les apports en nitrates sous

forme d'engrais et ce que les plantes vont réellement consommer, représente l'essentiel de la pollution. Les nitrates, fortement solubles et en excès sur le sol, sont principalement entraînés en profondeur par les pluies hivernales.

Les nitrates ne sont pas nocifs en soit pour la santé ; cependant, ils peuvent se transformer en nitrites dans le corps humain qui oxydent alors l'hémoglobine du sang. Elle ne peut alors plus fixer l'oxygène, ce qui perturbe la respiration cellulaire. Même à faible concentration, les nitrites peuvent également engendrer à long terme des cancers chez les adultes lorsqu'ils sont associés à certains pesticides avec lesquels ils forment des composés cancérigènes [162]

4.1.3. Les pesticides ou produits phytosanitaires

Le terme « pesticide » désigne les substances ou produits destinés à lutter contre les organismes jugés nuisibles, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries [163]. On peut distinguer plusieurs classes de pesticides selon leur mode d'action : les herbicides (amides, urées, triazines...), les insecticides non chlorés (organophosphorés, carbamates...) et chlorés (azoles...) ou bien encore les fongicides. Les herbicides sont particulièrement dangereux pour l'environnement, en effet ils sont très persistants et génèrent des produits de dégradations stables. L'origine de ces polluants est bien sûr agricole, mais ils sont également utilisés pour le désherbage des réseaux routiers et ferrés ainsi que pour l'entretien des espaces verts et jardins. Très solubles, ils migrent facilement dans les eaux souterraines. Le danger de ce type de polluant est lié à la grande diversité des produits phytosanitaires ; chaque année, entre 800 et 1 000 nouveaux produits sont mis sur le marché, ce qui ne fait qu'augmenter la grande diversité des molécules. En 2011, les 15 pesticides les plus quantifiés sont en majorité des herbicides et leurs dérivés [164], on peut citer l'AMPA, le diuron ou encore l'atrazine. Malgré leurs interdictions, respectivement en 2003 et 2008, l'atrazine et le diuron sont encore fortement présents, ce qui montre une forte persistance et une lente dégradation de ces polluants. Les effets à long terme des pesticides ou de leurs produits de dégradation sont mal connus, certains d'entre eux, comme l'atrazine, sont cancérigènes et d'autres auraient des effets néfastes sur la fertilité masculine.

4.1.4. Les métaux lourds

La pollution générée les métaux lourds est principalement due aux activités minières, à la sidérurgie, à l'industrie des peintures ou bien encore à l'usage de piles et batteries. La toxicité de ces métaux peut être très importante, c'est le cas du cadmium, du chrome, du mercure et du plomb. Les éléments traces métalliques (ETM), tels que le cuivre et le zinc, sont également source de pollution. Ils sont, dans ce cas, déversés par l'activité agricole,

plus particulièrement par l'alimentation animale. Les métaux lourds sont biopersistants, perturbent les écosystèmes, détériorent les sols, les eaux de surface, les forêts et les cultures et s'accumulent dans la chaîne alimentaire. Ils ne sont pas éliminés par l'organisme. En s'y accumulant, ils peuvent être la cause de maladies graves. Ingérées en grande quantité, lors d'une pollution accidentelle, ces mêmes substances sont rapidement toxiques. Certains sont même cancérigènes pour l'homme [165]. La grande diversité des substances chimiques déversées dans le milieu marin conduit à de graves conséquences toutes aussi variées. La protection du milieu marin nécessite donc surveillance et réglementation.

4.2. Normes de qualité environnementale

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) : adoptée le 23 octobre 2000 par le Parlement Européen, la directive 2000/60/CE fixe une politique communautaire dans le domaine de l'eau au niveau européen. Elle engage chaque état membre dans un objectif de protection et de reconquête de la qualité de l'eau et des milieux aquatiques. Elle met ainsi en place un programme de surveillance et fixe les objectifs à adopter pour atteindre les bons états, adaptés à chaque masse d'eau. Les objectifs sont fixés pour un cycle de gestion de six ans : 2009–2015, 2015–2021... Les masses d'eau servent de base pour définir le « bon état » : on distingue le bon état écologique, le bon état chimique et le bon état quantitatif (dans le cas des nappes d'eau souterraine). Le bon état chimique s'applique à toutes les masses d'eau.

Pour chacune des substances prioritaires de la DCE, une norme de qualité environnementale (NQE) a été déterminée (2000/60/CE), elle se définit comme « la concentration en un polluant dans l'eau, dans les sédiments ou le biote (l'ensemble des organismes vivants dans un habitat) qui ne doit pas être dépassée afin de protéger la santé humaine et l'environnement ». Les seuils sont fixés en prenant compte des différents effets des polluants : les effets écotoxicologiques directs (eau, sédiments), les effets écotoxicologiques indirects (bio-accumulation dans le biote) et les effets sur la santé humaine. Les NQE sont déterminées en suivant une méthodologie élaborée au niveau européen (Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards). Elles sont définies en prenant en compte les normes de qualité (NQ) des différents compartiments tels que le milieu aquatique, les sédiments, le biota, la santé humaine et l'eau destinée à l'eau potable. Les émissions et les pertes doivent être supprimées dans un délai de 20 ans. Une masse d'eau est qualifiée de « mauvais état chimique » si elle ne respecte pas les normes fixées par la DCE pour ces substances (Voir **Tableau 1.2**).

Tableau 1.2 . Normes de qualité environnementale des substances prioritaires et autres polluants fixées par la DCE (en ppb)

Substances	NQE Eau		Substances	NQE Eau	
	Douce	Marine		Douce	Marine
Alachlore	0,3	0,3	Ni et ses composés	4	8,6
Anthracène	0,1	0,1	Nonylphénol	0,3	0,3
Atrazine	0,6	0,6	Octylphénols	0,1	0,01
Benzène	10	8	Pentachlorobenzène	7.10^{-3}	7.10^{-4}
Diphényléthers	-	-	Pentachlorophénol	0,4	0,4
Cd et ses composés	0,2	0,2	Benzo(a)pyrène (HAP)	$1,7.10^{-4}$	$1,7.10^{-4}$
Tétrachlorure de carbone	12	12	Simazine	1	1
Chloroalcanes	0,4	0,4	Tétrachloroéthylène	10	10
Chlorfenvinphos	0,1	0,1	Trichloroéthylène	10	10
Chlorpyrifos	3.10^{-2}	3.10^{-2}	Composés du tributylétain	2.10^{-4}	2.10^{-4}
Pesticides cyclodiènes	1.10^{-2}	5.10^{-3}	Trichlorobenzène	0,4	0,4
DDT total	$2,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	Trichlorométhane	2,5	2,5
1,2-dichloroéthane	10	10	Trifluraline	3.10^{-2}	3.10^{-3}
Dichlorométhane	20	20	Dicofol	$1,3.10^{-4}$	$3,2.10^{-5}$
Di(2-ethylhexyle)- phtalate	1,3	1,3	Acide perfluoroocta-ne-sulfonique et ses dérivés	$6,5.10^{-4}$	$1,3.10^{-4}$
Diuron	0,2	0,2	Quinoxylène	0,15	0,015
Endosulfan	5.10^{-3}	5.10^{-4}	Dioxyne et ses composés	-	-
Fluoranthène	$6,3.10^{-3}$	$6,3.10^{-3}$	Aclonifène	0,12	0,012
Hexachlorobenzène	-	-	Bifénox	$1,2.10^{-2}$	$1,2.10^{-3}$
Hexachlorobutadiène	-	-	Cybutryne	$2,5.10^{-3}$	$2,5.10^{-3}$
Hexachlorocyclohexane	2.10^{-2}	2.10^{-3}	Cyperméthrine	8.10^{-5}	8.10^{-6}
Isoproturon	0,3	0,3	Dichlorvos	6.10^{-4}	6.10^{-5}
Pb et ses composés	1,2	1,3	Héxabromocyclo-dodécane	$1,6.10^{-3}$	8.10^{-4}
Hg et ses composés	-	-	Heptachlore	2.10^{-7}	1.10^{-8}
Naphtalène	2	2	Terbutryne	$6,5.10^{-2}$	$6,5.10^{-3}$

4.3. Mesure de référence

Depuis une vingtaine d'années, l'augmentation du nombre de textes et de réglementations relatifs aux questions environnementales impose une législation de plus en plus stricte. Les

analyses physico-chimiques des milieux aquatiques, dans le cadre de la DCE, doivent ainsi être réalisées par des laboratoires agréés (arrêté du 27 octobre 2011) et les méthodes d'analyses employées doivent répondre à la réglementation internationale de référence. On peut citer plusieurs techniques d'analyses utilisées par ces laboratoires : l'extraction (entraînement à la vapeur, extraction liquide/liquide, extraction sur phase solide), la chromatographie en phase gazeuse (détection par ionisation de flamme, détection par capture d'électron, détection par spectrométrie de masse), la séparation par chromatographie liquide ou encore la détection par UV ou fluorescence et enfin l'une des techniques analytiques les plus utilisées en laboratoire est la chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse GC-MS (« Gas Chromatography – Mass Spectrometry »).

Les techniques utilisées pour contrôler et surveiller la qualité des eaux souterraines et marines sont donc essentiellement des techniques de laboratoire présentant de nombreux avantages tels que la sensibilité ou encore la fiabilité de la mesure. Cependant, elles restent longues, chères et peu adaptées à un contrôle fréquent voir permanent de la qualité des eaux. De plus, l'analyse en laboratoire, donne des résultats sur des prélèvements, qui ne sont pas forcément représentatifs de la qualité de l'eau en continu. De nouveaux outils de mesure cherchent donc à émerger, en proposant des temps de réponses, des coûts, des facilités et des fréquences de mesure plus attractifs. Leurs objectifs sont donc de répondre à l'évolution de la réglementation ainsi qu'à l'apparition de nouvelles substances sur le marché, et par conséquent dans le milieu aquatique.

5. Biocapteur pour la détection des polluants

Contrairement aux techniques de laboratoire, les biocapteurs permettent la réalisation des mesures sur site. Cette stratégie présente de nombreux avantages : une mesure au plus près du terrain, une limitation des artefacts liés aux prélèvements et à la manipulation des échantillons et une meilleure compréhension du milieu grâce à la multiplication des mesures. Ce sont à la fois des outils d'alerte permettant de gérer la surveillance des masses d'eau, et des outils d'orientation donnant accès à une meilleure connaissance du milieu. La qualité de l'eau, notamment concernant les faibles concentrations de polluants, peut représenter un verrou à l'utilisation de la mesure sur site. En effet, les outils utilisés ne sont pas toujours suffisamment sensibles pour permettre la détection des polluants. L'efficacité d'un biocapteur sera évaluée en fonction de sa sensibilité et de sa sélectivité vis-à-vis des polluants chimiques. Il en existe plusieurs types de qui se différencient par leur méthode de

détection. Dans ce qui suit nous allons présenter seulement quelques travaux consacrés à la détection électrochimique des polluants aqueux en utilisant les biocapteurs.

Abbaspour et al. [166] ont proposé un aptacapteur électrochimique pour la détection de *Staphylococcus aureus* dans des échantillons aqueux. Le principe du biocapteur repose sur la fixation d'un premier aptamère modifié par des particules magnétiques sur la bactérie qui sera piégée en sandwich par un deuxième aptamère modifié par les nanoparticules d'argent. La détection de la bactérie consiste à récupérer les nanoparticules d'argent dissous dans une solution acide puis mesurer le signal de ces derniers par la voltammétrie à redissolution anodique par polarographie à impulsion différentielle (DPASV) ce qui va permettre indirectement de quantifier la *S. aureus* dans les échantillons contaminés. (**Figure 1.33**).

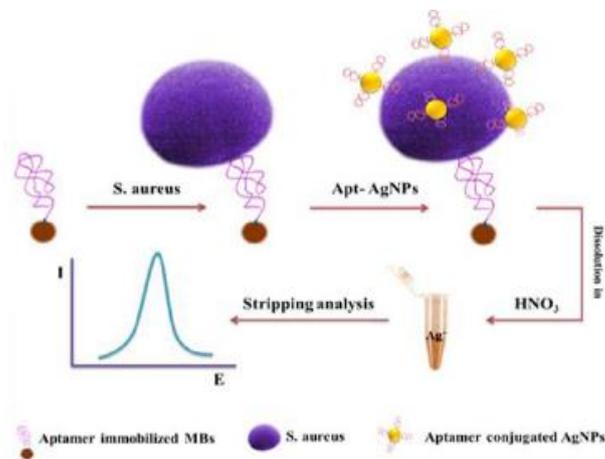


Figure 1.33. Les étapes de conception du biocapteur aptamérique pour la détection de *Staphylococcus aureus*

Dans le même contexte, Wang et al. [167] ont développé un biocapteur pour la détection de deux métaux lourds Hg^{2+} et Pb^{2+} . La plateforme a été préparée en immobilisant une ADNzyme et un ADN, qui possèdent une affinité vis-à-vis du Pb^{2+} et Hg^{2+} respectivement, par interaction électrostatique avec le graphène oxyde réduit et fonctionnalisé par des groupes amines après son traitement par plasma N_2 (**Figure 1.34**). La détection des deux ions de métaux lourds est assurée, avant et après leur interaction avec l'ADN, par spectroscopie d'impédance électrochimique à un potentiel de 0,2 V (vs Ag / AgCl). Le biocapteur développé est doté d'une linéarité dans le domaine de concentrations comprise entre 0.01 et 100 nM avec une limite de détection de l'ordre 7.8 pour Pb^{2+} et 5.4 pM pour

Hg^{2+} . De plus, le système a été appliqué avec succès pour détecter les deux ions avec une très grande sélectivité.

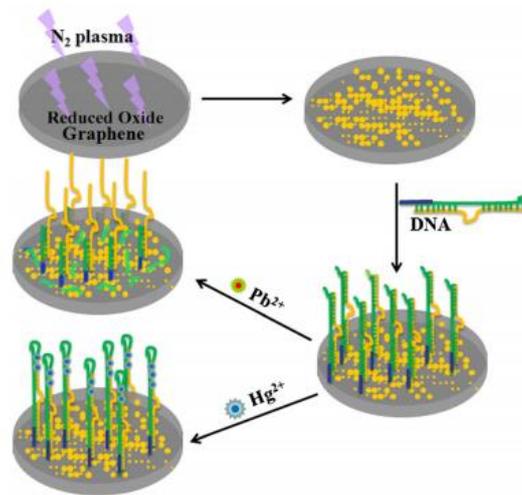


Figure 1.34. illustration schématique du développement du biocapteur et principe de la détection de Pb(II) et Hg(II)

Lim et al. ont élaboré un biocapteur pour la détection de la Ciprofloxacine, un antibiotique qui appartient à la famille des fluoroquinolones [168]. Ce dernier se base sur l'interaction électrostatique entre la molécule cible et un ADN double brins qui a été immobilisé à la surface d'une électrode modifiée par le graphène. (**Figure 1.35**) En effet l'interaction de la Ciprofloxacine qui est chargée positivement avec l'ADN qui est chargé négativement va induire l'augmentation du signal d'oxydation de la guanine à un potentiel +1.0V enregistrée par la voltampérométrie à onde carrée. Ce système permet de quantifier de la cible avec une linéarité de réponse comprise entre 0.1 et 100 μ M et une limite de détection de 0.1 μ M.

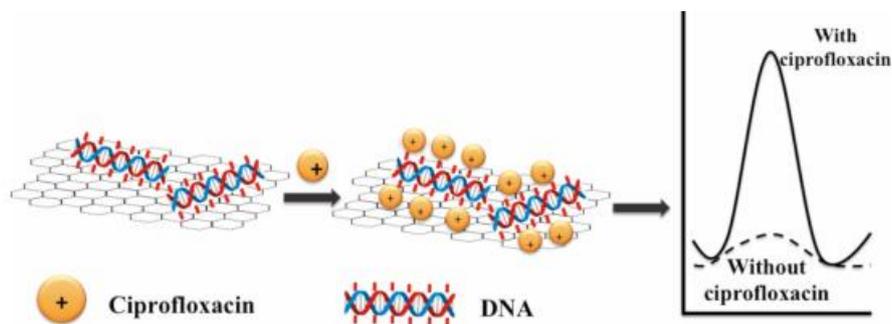


Figure 1.35. Conception du biocapteur à base de graphène pour la détection de la Ciprofloxacine

Dans des études récentes, plusieurs biocapteurs à base de piles à combustible microbiennes (MFC) ont été introduits pour les tests de qualité de l'eau. Ils sont largement utilisés non

seulement pour vérifier l'oxygène dissous (OD), la demande biochimique en oxygène DBO et la demande chimique en oxygène (DCO), mais également pour identifier et analyser différents polluants organiques dans les échantillons d'eau [169]. Ces électro-biocapteurs sont principalement composés d'une chambre cathodique et d'une chambre anodique (contenant des bactéries anaérobies), qui sont séparées par une membrane d'échange de protons. (Figure 1.36).

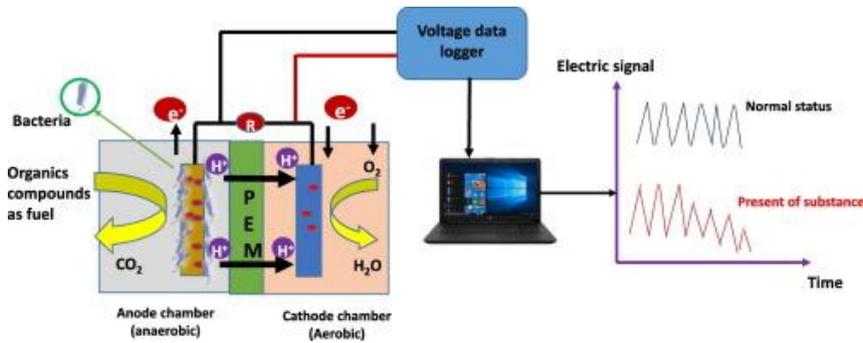


Figure 1.36. Présentation schématique d'une pile à combustible microbiennes [170]

Dans un autre travail, Caetano et al. ont décrit pour la première fois l'utilisation d'un biocapteur électrochimique intégré à un simple dispositif microfluidique pour la détection du phénol [171]. Les électrodes ont été modifiées avec des nanotubes de carbone / nanoparticules d'or sur lesquelles a été fixé la tyrosinase. Le transport de la solution est assuré sans aucune force externe ou pompe d'injection en mettant à profit le phénomène de la capillarité et de la force de gravité (Figure 1.37). Le système a été évalué pour la détection du phénol présentant une limite de détection et une limite de quantification de 2,94 nmol L⁻¹ et 8,92 nmol L⁻¹ respectivement. La plateforme proposée a été appliquée à la détection du phénol dans l'eau potable en obtenant des taux de recouvrement entre 90% et 110%.

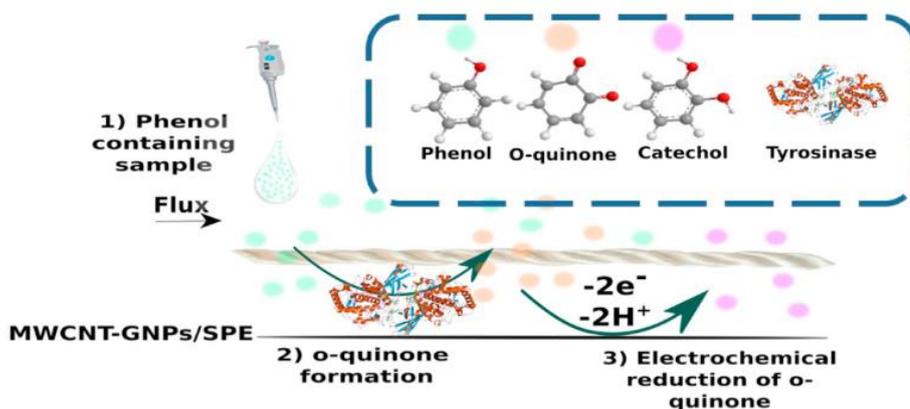


Figure 1.37. Schéma du principe du dispositif microfluidique pour la détection du phéno

Un système intégré sur puce pour la détection de l'urée a été développé par Morales-Cruz et al. [172] La quantité de l'urée a été indirectement suivie par l'oxydation électrochimique de l'ammoniac libérée suite à la réaction au niveau de la surface de la membrane du micro-organisme *P. vulgaris*. Après la biofonctionnalisation de l'électrode de travail de platine par *P. vulgaris* (**Figure 1.38**) une incubation dans différentes concentrations d'urée dans l'urine synthétique a permis d'établir la courbe de calibration avec un domaine de linéarité de 0,05 M jusqu'à 0,1 M et d'atteindre une limite de détection de 0.027 M. Les résultats obtenus montrent que le dispositif développé au cours de ce travail peut être utilisé pour la détection et la surveillance de l'urée *in vivo* ou dans les eaux usées.

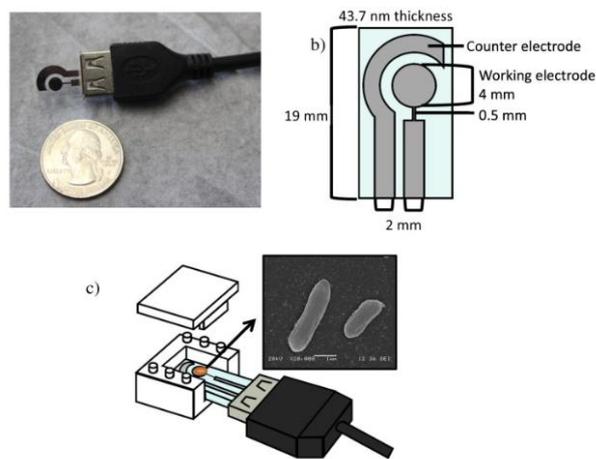


Figure 1.38. Principe de préparation d'un système intégré sur puce pour la détection de l'urée

L'équipe de recherche d'Arduini [173] a mis au point un biocapteur enzymatique à base de papier origami en trois dimensions pour la détection de plusieurs classes de pesticides en combinant différents biocapteurs d'inhibition enzymatique (**Figure 1.39**). Ce dispositif a été développé en intégrant deux électrodes sérigraphiées différentes à base de papier de bureau et plusieurs tampons à base de papier filtre pour charger les enzymes et les substrats enzymatiques. La plateforme sur papier a été utilisée pour détecter le paraoxon, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et l'atrazine en exploitant la capacité de ces différents types de pesticides (c.-à-d. Insecticides organophosphorés, herbicides phénoxyacides et herbicide triazine) à inhiber la butyrylcholinestérase, la phosphatase alcaline et la tyrosinase, respectivement. Le degré d'inhibition corrélé à la quantité de pesticides a été évalué en suivant par chronoampérométrie l'activité enzymatique en absence et en présence de pesticides. Le dispositif à base de papier a été appliqué pour la détection du paraoxon, de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et de l'atrazine au niveau de ppb. Le dispositif de papier

origami en trois dimensions proposées permet une détection rapide, rentable et précise des pesticides dans des échantillons prélevés de l'eau de rivière

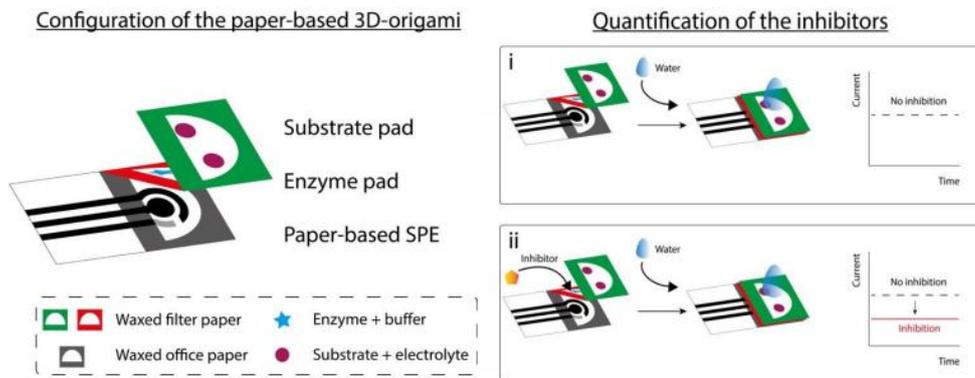


Figure 1.39. Schéma du principe de préparation du biocapteur enzymatique à base de papier origami en trois dimensions pour la détection des pesticides

6. Conclusion

Cette revue de la bibliographie montre les travaux dédiés à la préparation et au développement des biocapteurs à base de nanomatériaux pour l'analyse de divers analytes cibles. Dans un premier temps, nous avons décrit les principaux types de biocapteurs et leurs modes de fonctionnement. Nous avons par la suite consacré une partie de ce chapitre pour introduire les différents nanomatériaux utilisés au cours de ce travail en passant en revue les données bibliographiques concernant leurs méthodes de préparation, leurs propriétés, ainsi que les applications dans lesquelles ils interviennent. Pour finir, nous avons montré des exemples de la littérature dans la conception des biocapteurs, employant différentes stratégies pour la détection de polluants de l'eau.

Références bibliographiques du Chapitre 1

- [1] B. Nagel, H. Dellweg, L. Gierasch, Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992), (1992). <https://doi.org/10.1351/pac199264010143>.
- [2] M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne, Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*. 18 (2003) 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00209-9).
- [3] J.J. Pancrazio, J.P. Whelan, D.A. Borkholder, W. Ma, D.A. Stenger, Development and application of cell-based biosensors, *Ann Biomed Eng*. 27 (1999) 697–711. <https://doi.org/10.1114/1.225>.
- [4] P. Binder, Immunocapteurs et biocapteurs non enzymatiques: principes et applications possibles en analyse, *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 5 (1990) 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(05\)80165-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(05)80165-6).
- [5] R. Rizzuto, P. Pinton, M. Brini, A. Chiesa, L. Filippin, T. Pozzan, Mitochondria as biosensors of calcium microdomains, *Cell Calcium*. 26 (1999) 193–200. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0076>.
- [6] A.S. Baer, *Genes IV*. By Benjamin Lewin. New York: Oxford University Press. 1990
- [7] K.S. Lundberg, D.D. Shoemaker, M.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge, E.J. Mathur, High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene*. 108 (1991) 1–6. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90480-y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90480-y).
- [8] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*. 239 (1988) 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>.
- [9] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Homogeneous assays using aptamers, *Analyst*. 136 (2010) 257–274. <https://doi.org/10.1039/C0AN00281J>.
- [10] P. Fan, A.K. Suri, R. Fiala, D. Live, D.J. Patel, Molecular Recognition in the FMN – RNA Aptamer Complex, *Journal of Molecular Biology*. 258 (1996) 480–500. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0263>.
- [11] J.R. Lorsch, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin, *Biochemistry*. 33 (1994) 973–982. <https://doi.org/10.1021/bi00170a016>.

- [12] M. Girardot, P. Gareil, A. Varenne, Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE, *ELECTROPHORESIS*. 31 (2010) 546–555. <https://doi.org/10.1002/elps.200900387>.
- [13] F. Radom, P.M. Jurek, M.P. Mazurek, J. Otlewski, F. Jeleń, Aptamers: Molecules of great potential, *Biotechnology Advances*. 31 (2013) 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.007>.
- [14] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*. 346 (1990) 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- [15] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*. 249 (1990) 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
- [16] J.-J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, S. Moreau, Les aptamères : du concept à l'outil, *Médecine Nucléaire*. 31 (2007) 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2007.07.009>.
- [17] A. Hayat, J.L. Marty, Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants, *Front Chem*. 2 (2014). <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00041>.
- [18] E. Torres-Chavolla, E.C. Alocilja, Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*. 24 (2009) 3175–3182. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.11.010>.
- [19] S. A, B. Lj, L.-B. Bd, Optical detection systems using immobilized aptamers., *Biosens Bioelectron*. 26 (2011) 3725–3736. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.02.031>.
- [20] J. Davis, D. Huw Vaughan, M.F. Cardosi, Elements of biosensor construction, *Enzyme and Microbial Technology*. 17 (1995) 1030–1035. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00013-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00013-5).
- [21] Z. Rosenzweig, R. Kopelman, Analytical Properties and Sensor Size Effects of a Micrometer-Sized Optical Fiber Glucose Biosensor, *Anal. Chem*. 68 (1996) 1408–1413. <https://doi.org/10.1021/ac950864g>.
- [22] G.A. Rechnitz, M.Y. Ho, Biosensors based on cell and tissue material, *Journal of Biotechnology*. 15 (1990) 201–217. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90027-9).
- [23] T.R. Cech, Self-splicing and Enzymatic Activity of an Intervening Sequence RNA from Tetrahymena (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition in English*. 29 (1990) 759–768. <https://doi.org/10.1002/anie.199007591>.

- [24] K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, T.R. Cech, Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*, *Cell*. 31 (1982) 147–157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90414-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90414-7).
- [25] A. Mondragón, Structural Studies of RNase P, *Annual Review of Biophysics*. 42 (2013) 537–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130406>.
- [26] R.R. Breaker, Riboswitches and the RNA world, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4 (2012). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>.
- [27] A.D. Garst, A.L. Edwards, R.T. Batey, Riboswitches: structures and mechanisms, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3 (2011). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003533>.
- [28] P.B. Moore, T.A. Steitz, The roles of RNA in the synthesis of protein, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3 (2011) a003780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003780>.
- [29] S. Altman, Enzymatic Cleavage of RNA by RNA (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition in English*. 29 (1990) 749–758. <https://doi.org/10.1002/anie.199007491>.
- [30] D.L. Robertson, G.F. Joyce, Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature*. 344 (1990) 467–468. <https://doi.org/10.1038/344467a0>.
- [31] S.K. Silverman, Nucleic Acid Enzymes (Ribozymes and Deoxyribozymes): In Vitro Selection and Application, in: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, American Cancer Society, 2008: pp. 1–17. <https://doi.org/10.1002/9780470048672.wecb406>.
- [32] R.R. Breaker, G.F. Joyce, A DNA enzyme that cleaves RNA, *Chem Biol*. 1 (1994) 223–229. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/1074-5521(94)90014-0).
- [33] S.K. Silverman, DNA as a Versatile Chemical Component for Catalysis, Encoding, and Stereocontrol, *Angewandte Chemie International Edition*. 49 (2010) 7180–7201. <https://doi.org/10.1002/anie.200906345>.
- [34] C. Wang, G. Jia, J. Zhou, Y. Li, Y. Liu, S. Lu, C. Li, Enantioselective Diels–Alder Reactions with G-Quadruplex DNA-Based Catalysts, *Angewandte Chemie International Edition*. 51 (2012) 9352–9355. <https://doi.org/10.1002/anie.201204850>.
- [35] D. Mazumdar, T. Lan, Y. Lu, “Dipstick” Colorimetric Detection of Metal Ions Based on Immobilization of DNAzyme and Gold Nanoparticles onto a Lateral Flow Device, in: A. Rasooly, B. Prickril (Eds.), *Biosensors and Biodetection*, Springer New York, New York, NY, 2017: pp. 389–406. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6848-0_24.

- [36] H. Liu, X. Yu, Y. Chen, J. Zhang, B. Wu, L. Zheng, P. Haruehanroengra, R. Wang, S. Li, J. Lin, J. Li, J. Sheng, Z. Huang, J. Ma, J. Gan, Crystal structure of an RNA-cleaving DNAzyme, *Nature Communications*. 8 (2017) 2006. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02203-x>.
- [37] D.-M. Kong, Factors influencing the performance of G-quadruplex DNAzyme-based sensors, *Methods*. 64 (2013) 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.013>.
- [38] C.W.S. Chan, L.M. Khachigian, DNAzymes and their therapeutic possibilities, *Internal Medicine Journal*. 39 (2009) 249–251. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2009.01799.x>.
- [39] C.R. Dass, P.F.M. Choong, L.M. Khachigian, DNAzyme technology and cancer therapy: cleave and let die, *Mol Cancer Ther*. 7 (2008) 243–251. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0510>.
- [40] X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Analytica Chimica Acta*. 620 (2008) 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>.
- [41] A. Mars, C. Parolo, N. Raouafi, K. Boujlel, A. Merkoçi, Gold nanoparticles decorated with a ferrocene derivative as a potential shift-based transducing system of interest for sensitive immunosensing, *J. Mater. Chem. B*. 1 (2013) 2951–2955. <https://doi.org/10.1039/C3TB20503G>.
- [42] P. Leonard, S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, R. O’Kennedy, Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme and Microbial Technology*. 32 (2003) 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00232-6).
- [43] C. Yao, Y. Qi, Y. Zhao, Y. Xiang, Q. Chen, W. Fu, Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE, *Biosensors and Bioelectronics*. 24 (2009) 2499–2503. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.12.036>.
- [44] M. Mehrvar, M. Abdi, Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors, *Anal Sci*. 20 (2004) 1113–1126. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.1113>.
- [45] W. Schuhmann, Electron-transfer pathways in amperometric biosensors. Ferrocene-modified enzymes entrapped in conducting-polymer layers, *Biosensors and Bioelectronics*. 10 (1995) 181–193. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)96805-9](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96805-9).

- [46] Z.B. Zhang, S.J. Yuan, X.L. Zhu, K.G. Neoh, E.T. Kang, Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared via successive surface-initiated atom-transfer radical polymerization, *Biosensors and Bioelectronics*. 25 (2010) 1102–1108. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.09.023>.
- [47] N. Jaffrezic-Renault, A. Senillou, C. Martelet, K. Wan, J.M. Chovelon, ISFET microsensors for the detection of pollutants in liquid media, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 59 (1999) 154–164. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00213-0).
- [48] Z.E. Selvanayagam, P. Neuzil, P. Gopalakrishnakone, U. Sridhar, M. Singh, L.C. Ho, An ISFET-based immunosensor for the detection of beta-Bungarotoxin, *Biosens Bioelectron*. 17 (2002) 821–826. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00075-1).
- [49] P. Estrela, A.G. Stewart, F. Yan, P. Migliorato, Field effect detection of biomolecular interactions, *Electrochimica Acta*. 50 (2005) 4995–5000. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.02.075>.
- [50] P.J. Pearce, A.J. Bard, Polymer films on electrodes: Part III. Digital simulation model for cyclic voltammetry of electroactive polymer film and electrochemistry of poly(vinylferrocene) on platinum, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 114 (1980) 89–115. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80438-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80438-4).
- [51] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2001, John Wiley & Sons
- [52] B. Tremillon, *Electrochimie analytique et réactions en solution*. 1993, Masson
- [53] G. Zuo, X. Li, Z. Zhang, T. Yang, Y. Wang, Z. Cheng, S. Feng, Dual-SAM functionalization on integrated cantilevers for specific trace-explosive sensing and non-specific adsorption suppression, (2007). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/25/255501>.
- [54] Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir--Blodgett to Self-Assembly*; Academic Press, 2013.
- [55] H. Lee, S.M. Dellatore, W.M. Miller, P.B. Messersmith, Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings, *Science*. 318 (2007) 426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>.
- [56] O. Renaudet, J. Garcia, D. Boturyn, N. Spinelli, E. Defrancq, P. Labbe, P. Dumy, Molecular engineering of biomolecules for nanobio-sciences, *IJNT*. 7 (2010) 738. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2010.031742>.
- [57] D. W. Bruce and D. O'Hare, *Inorganic Materials*. John Wiley & Sons, 1997.

- [58] A. Gao, C.-X. Tang, X.-W. He, X.-B. Yin, Electrochemiluminescent lead biosensor based on GR-5 lead-dependent DNAzyme for Ru(phen)₃(2+) intercalation and lead recognition, *Analyst*. 138 (2013) 263–268. <https://doi.org/10.1039/c2an36398d>.
- [59] S. Li, V.R. Cooper, T. Thonhauser, B.I. Lundqvist, D.C. Langreth, Stacking Interactions and DNA Intercalation, *J. Phys. Chem. B*. 113 (2009) 11166–11172. <https://doi.org/10.1021/jp905765c>.
- [60] B.A.D. Neto, A.A.M. Lapis, Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends, *Molecules*. 14 (2009) 1725–1746. <https://doi.org/10.3390/molecules14051725>.
- [61] L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, Selective covalent protein immobilization: strategies and applications, *Chem Rev.* 109 (2009) 4025–4053. <https://doi.org/10.1021/cr8004668>.
- [62] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S.A. Soper, D.A. Spivak, Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications, *Anal Bioanal Chem.* 390 (2008) 1009–1021. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1587-2>.
- [63] D. Kim, A.E. Herr, Protein immobilization techniques for microfluidic assays, *Biomicrofluidics*. 7 (2013) 41501. <https://doi.org/10.1063/1.4816934>.
- [64] B.T. Houseman, E.S. Gawalt, M. Mrksich, Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips †, *Langmuir*. 19 (2003) 1522–1531. <https://doi.org/10.1021/la0262304>.
- [65] G. Istamboulié, N. Paniel, L. Zara, L.R. Granados, L. Barthelmebs, T. Noguer, Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk, *Talanta*. 146 (2016) 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.012>.
- [66] J. Schummer, Multidisciplinarity, interdisciplinarity, and patterns of research collaboration in nanoscience and nanotechnology, *Scientometrics*. 59 (2004) 425–465. <https://doi.org/10.1023/B:SCIE.0000018542.71314.38>.
- [67] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science*. 306 (2004) 666–669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>.
- [68] K.S. Novoselov, D. Jiang, F. Schedin, T.J. Booth, V.V. Khotkevich, S.V. Morozov, A.K. Geim, Two-dimensional atomic crystals, *PNAS*. 102 (2005) 10451–10453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502848102>.

- [69] A.K. Geim, I.V. Grigorieva, Van der Waals heterostructures, *Nature*. 499 (2013) 419–425. <https://doi.org/10.1038/nature12385>.
- [70] S.Z. Butler, S.M. Hollen, L. Cao, Y. Cui, J.A. Gupta, H.R. Gutiérrez, T.F. Heinz, S.S. Hong, J. Huang, A.F. Ismach, E. Johnston-Halperin, M. Kuno, V.V. Plashnitsa, R.D. Robinson, R.S. Ruoff, S. Salahuddin, J. Shan, L. Shi, M.G. Spencer, M. Terrones, W. Windl, J.E. Goldberger, Progress, Challenges, and Opportunities in Two-Dimensional Materials Beyond Graphene, *ACS Nano*. 7 (2013) 2898–2926. <https://doi.org/10.1021/nn400280c>.
- [71] M. Chhowalla, H.S. Shin, G. Eda, L.-J. Li, K.P. Loh, H. Zhang, The chemistry of two-dimensional layered transition metal dichalcogenide nanosheets, *Nature Chemistry*. 5 (2013) 263–275. <https://doi.org/10.1038/nchem.1589>.
- [72] R.G. Dickinson, L. Pauling, THE CRYSTAL STRUCTURE OF MOLYBDENITE, *J. Am. Chem. Soc.* 45 (1923) 1466–1471. <https://doi.org/10.1021/ja01659a020>.
- [73] P. Joensen, R.F. Frindt, S.R. Morrison, Single-layer MoS₂, *Materials Research Bulletin*. 21 (1986) 457–461. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(86\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0025-5408(86)90011-5).
- [74] R.W.G. Wyckoff, *Crystal Structures - Volume 1.*, Interscience Publishers, New York, 1963.
- [75] B. Radisavljevic, A. Radenovic, J. Brivio, V. Giacometti, A. Kis, Single-layer MoS₂ transistors, *Nat Nanotechnol.* 6 (2011) 147–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.279>.
- [76] Z. Yin, H. Li, H. Li, L. Jiang, Y. Shi, Y. Sun, G. Lu, Q. Zhang, X. Chen, H. Zhang, Single-Layer MoS₂ Phototransistors, *ACS Nano*. 6 (2012) 74–80. <https://doi.org/10.1021/nn2024557>.
- [77] W. Rüdorff, Einlagerungsverbindungen mit Alkali- und Erdalkalimetallen, *Angewandte Chemie*. 71 (1959) 487–491. <https://doi.org/10.1002/ange.19590711504>.
- [78] M.B. Dines, Lithium intercalation via n-Butyllithium of the layered transition metal dichalcogenides, *Materials Research Bulletin*. 10 (1975) 287–291. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(75\)90115-4](https://doi.org/10.1016/0025-5408(75)90115-4).
- [79] G. Eda, H. Yamaguchi, D. Voiry, T. Fujita, M. Chen, M. Chhowalla, Photoluminescence from Chemically Exfoliated MoS₂, *Nano Lett.* 11 (2011) 5111–5116. <https://doi.org/10.1021/nl201874w>.
- [80] S. Balendhran, J.Z. Ou, M. Bhaskaran, S. Sriram, S. Ippolito, Z. Vasic, E. Kats, S. Bhargava, S. Zhuiykov, K. Kalantar-zadeh, Atomically thin layers of MoS₂ via a two step

- thermal evaporation–exfoliation method, *Nanoscale*. 4 (2012) 461–466. <https://doi.org/10.1039/C1NR10803D>.
- [81] Y.-H. Lee, X.-Q. Zhang, W. Zhang, M.-T. Chang, C.-T. Lin, K.-D. Chang, Y.-C. Yu, J.T.-W. Wang, C.-S. Chang, L.-J. Li, T.-W. Lin, Synthesis of Large-Area MoS₂ Atomic Layers with Chemical Vapor Deposition, *Advanced Materials*. 24 (2012) 2320–2325. <https://doi.org/10.1002/adma.201104798>.
- [82] D. Dumcenco, D. Ovchinnikov, K. Marinov, P. Lazić, M. Gibertini, N. Marzari, O. Lopez Sanchez, Y.-C. Kung, D. Krasnozhan, M.-W. Chen, S. Bertolazzi, P. Gillet, A. Fontcuberta i Morral, A. Radenovic, A. Kis, Large-Area Epitaxial Monolayer MoS₂, *ACS Nano*. 9 (2015) 4611–4620. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01281>.
- [83] Q. Ji, Y. Zhang, T. Gao, Y. Zhang, D. Ma, M. Liu, Y. Chen, X. Qiao, P.-H. Tan, M. Kan, J. Feng, Q. Sun, Z. Liu, Epitaxial monolayer MoS₂ on mica with novel photoluminescence, *Nano Lett.* 13 (2013) 3870–3877. <https://doi.org/10.1021/nl401938t>.
- [84] Y. Shi, W. Zhou, A.-Y. Lu, W. Fang, Y.-H. Lee, A.L. Hsu, S.M. Kim, K.K. Kim, H.Y. Yang, L.-J. Li, J.-C. Idrobo, J. Kong, van der Waals epitaxy of MoS₂ layers using graphene as growth templates, *Nano Lett.* 12 (2012) 2784–2791. <https://doi.org/10.1021/nl204562j>.
- [85] S. Wang, X. Wang, J.H. Warner, All Chemical Vapor Deposition Growth of MoS₂:h-BN Vertical van der Waals Heterostructures, *ACS Nano*. 9 (2015) 5246–5254. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00655>.
- [86] D. Ruzmetov, K. Zhang, G. Stan, B. Kalanyan, G.R. Bhimanapati, S.M. Eichfeld, R.A. Burke, P.B. Shah, T.P. O'Regan, F.J. Crowne, A.G. Birdwell, J.A. Robinson, A.V. Davydov, T.G. Ivanov, Vertical 2D/3D Semiconductor Heterostructures Based on Epitaxial Molybdenum Disulfide and Gallium Nitride, *ACS Nano*. 10 (2016) 3580–3588. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08008>.
- [87] B. Meyer, Elemental sulfur, *Chem. Rev.* 76 (1976) 367–388. <https://doi.org/10.1021/cr60301a003>.
- [88] J. Berkowitz, M.G. Inghram, W.A. Chupka, Polymeric Gaseous Species in the Sublimation of Molybdenum Trioxide, *J. Chem. Phys.* 26 (1957) 842–846. <https://doi.org/10.1063/1.1743417>.
- [89] T. Dupuis, Le problème de la volatilité de l'anhydride molybdique, *Microchim Acta* 1950, 35, 449-465.

- [90] X.H. Zhang, , C. Wang, , M.Q. Xue, B.C. Lin, X. Ye, W.N. Lei, Hydrothermal synthesis and characterization of ultrathin MoS₂ nanosheets , Chalcogenide Letters. 13 (2016) 27–34.
- [91] Y. Zhang, W. Zeng, Y. Li, The hydrothermal synthesis of 3D hierarchical porous MoS₂ microspheres assembled by nanosheets with excellent gas sensing properties, Journal of Alloys and Compounds. 749 (2018) 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.03.307>.
- [92] R.M. Clark, B.J. Carey, T. Daeneke, P. Atkin, M. Bhaskaran, K. Latham, I.S. Cole, K. Kalantar-zadeh, Two-step synthesis of luminescent MoS₂–ZnS hybrid quantum dots, Nanoscale. 7 (2015) 16763–16772. <https://doi.org/10.1039/C5NR04790K>.
- [93] A. Splendiani, L. Sun, Y. Zhang, T. Li, J. Kim, C.-Y. Chim, G. Galli, F. Wang, Emerging photoluminescence in monolayer MoS₂, Nano Lett. 10 (2010) 1271–1275. <https://doi.org/10.1021/nl903868w>.
- [94] A. Kuc, N. Zibouche, T. Heine, Influence of quantum confinement on the electronic structure of the transition metal sulfide TS₂, Phys. Rev. B. 83 (2011) 245213. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.83.245213>.
- [95] K.F. Mak, C. Lee, J. Hone, J. Shan, T.F. Heinz, Atomically Thin MoS₂: A New Direct-Gap Semiconductor, Phys. Rev. Lett. 105 (2010) 136805. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.136805>.
- [96] E. Cappelluti, R. Roldán, J.A. Silva-Guillén, P. Ordejón, F. Guinea, Tight-binding model and direct-gap/indirect-gap transition in single-layer and multilayer MoS₂, Phys. Rev. B. 88 (2013) 075409. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.88.075409>.
- [97] R. Mansfield, S.A. Salam, Electrical Properties of Molybdenite, Proc. Phys. Soc. B. 66 (1953) 377–385. <https://doi.org/10.1088/0370-1301/66/5/305>.
- [98] H. Tributsch, J.C. Bennett, Electrochemistry and photochemistry of MoS₂ layer crystals. I, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. 81 (1977) 97–111. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80363-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80363-X).
- [99] Y. Kamiya, K. Ando, M. Nonoyama, R. Uyeda, Dislocation Networks and Moiré Patterns of Molybdenite, Journal of the Physical Society of Japan. 15 (1960) 2025–2035. <https://doi.org/10.1143/JPSJ.15.2025>.
- [100] R. Fivaz, E. Mooser, Mobility of Charge Carriers in Semiconducting Layer Structures, Phys. Rev. 163 (1967) 743–755. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.163.743>.

- [101] R.S. Title, M.W. Shafer, Band Structure of the Layered Transition-Metal Dichalcogenides: An Experimental Study by Electron Paramagnetic Resonance on Nb-Doped Mo₂S₃, Phys. Rev. Lett. 28 (1972) 808–810. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.28.808>.
- [102] H. Qiu, T. Xu, Z. Wang, W. Ren, H. Nan, Z. Ni, Q. Chen, S. Yuan, F. Miao, F. Song, G. Long, Y. Shi, L. Sun, J. Wang, X. Wang, Hopping transport through defect-induced localized states in molybdenum disulphide, Nature Communications. 4 (2013) 2642. <https://doi.org/10.1038/ncomms3642>.
- [103] A.A. Opalovskii, V.E. Fedorov, MOLYBDENUM CHALCOGENIDES, Russ. Chem. Rev. 35 (1966) 186–204. <https://doi.org/10.1070/RC1966v035n03ABEH001439>.
- [104] S.J. Tauster, T.A. Pecoraro, R.R. Chianelli, Structure and properties of molybdenum sulfide: Correlation of O₂ chemisorption with hydrodesulfurization activity, Journal of Catalysis. 63 (1980) 515–519. [https://doi.org/10.1016/0021-9517\(80\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0021-9517(80)90109-8).
- [105] S. Bertolazzi, J. Brivio, A. Kis, Stretching and Breaking of Ultrathin MoS₂, ACS Nano. 5 (2011) 9703–9709. <https://doi.org/10.1021/nn203879f>.
- [106] D. Jariwala, V.K. Sangwan, L.J. Lauhon, T.J. Marks, M.C. Hersam, Emerging Device Applications for Semiconducting Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides, ACS Nano. 8 (2014) 1102–1120. <https://doi.org/10.1021/nn500064s>.
- [107] X. Tong, E. Ashalley, F. Lin, H. Li, Z.M. Wang, Advances in MoS₂-Based Field Effect Transistors (FETs), Nano-Micro Lett. 7 (2015) 203–218. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0034-8>.
- [108] R. Sha, N. Vishnu, S. Badhulika, MoS₂ based ultra-low-cost, flexible, non-enzymatic and non-invasive electrochemical sensor for highly selective detection of Uric acid in human urine samples, Sensors and Actuators B: Chemical. 279 (2019) 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.106>.
- [109] S.M. Majid, A. Salimi, F. Ghasemi, An ultrasensitive detection of miRNA-155 in breast cancer via direct hybridization assay using two-dimensional molybdenum disulfide field-effect transistor biosensor, Biosens Bioelectron. 105 (2018) 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.009>.
- [110] K. Rm, D. L, W. Z, Y. J, Q. F, A novel aptamer-functionalized MoS₂ nanosheet fluorescent biosensor for sensitive detection of prostate specific antigen., Anal Bioanal Chem. 407 (2014) 369–377. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8267-9>.

- [111] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang, A.J. Heeger, Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1977) 578–580. <https://doi.org/10.1039/C39770000578>.
- [112] C.K. Chiang, C.R. Fincher, Y.W. Park, A.J. Heeger, H. Shirakawa, E.J. Louis, S.C. Gau, A.G. MacDiarmid, Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene, Phys. Rev. Lett. 39 (1977) 1098–1101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.39.1098>.
- [113] Wise, D.L.; Wnek, G.E.; Trantolo, D.J.; Cooper, T.M.; Gresser, J.D.; Marcel Dekker, NY., 1997, 167.
- [114] G. Pinto, A.-K. Maaroufi, Conducting polymer composites of zinc-filled urea-formaldehyde, Journal of Applied Polymer Science. 96 (2005) 2011–2015. <https://doi.org/10.1002/app.21580>.
- [115] G. Pinto, M.B. Maidana, Conducting polymer composites of zinc-filled nylon 6, Journal of Applied Polymer Science. 82 (2001) 1449–1454. <https://doi.org/10.1002/app.1983>.
- [116] V.I. Roldughin, V.V. Vysotskii, Percolation properties of metal-filled polymer films, structure and mechanisms of conductivity, Progress in Organic Coatings. 39 (2000) 81–100. [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(00\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(00)00140-5).
- [117] Y.-T. Kim, W.-S. Kim, H.-W. Rhee, M.-K. Song, Iron Corrosion Protection by Ultra-thin Conductive Films Based on Polypyrrole/Poly(methyl methacrylate) Composite, Molecular Crystals and Liquid Crystals. 445 (2006) 193/[483]-200/[490]. <https://doi.org/10.1080/15421400500367116>.
- [118] A.P. Lima Pacheco, E.S. Araujo, W.M. de Azevedo, Polyaniline/poly acid acrylic thin film composites: a new gamma radiation detector, Materials Characterization. 50 (2003) 245–248. [https://doi.org/10.1016/S1044-5803\(03\)00090-1](https://doi.org/10.1016/S1044-5803(03)00090-1).
- [119] J.C. Grunlan, Y. Ma, M.A. Grunlan, W.W. Gerberich, L.F. Francis, Monodisperse latex with variable glass transition temperature and particle size for use as matrix starting material for conductive polymer composites, Polymer. 42 (2001) 6913–6921. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00158-6).
- [120] J.C. Grunlan, W.W. Gerberich, L.F. Francis, Electrical and mechanical behavior of carbon black-filled poly(vinyl acetate) latex-based composites, Polym. Eng. Sci. 41 (2001) 1947–1962. <https://doi.org/10.1002/pen.10891>.

- [121] G. Wu, C. Zhang, T. Miura, S. Asai, M. Sumita, Electrical characteristics of fluorinated carbon black-filled poly(vinylidene fluoride) composites, *Journal of Applied Polymer Science*. 80 (2001) 1063–1070. <https://doi.org/10.1002/app.1191>.
- [122] A. Damasceni, L. Dei, F. Guasti, Thermal Behaviour of Silver-Filled Epoxy Adhesives. Technological implications in microelectronics, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 66 (2001) 223–232. <https://doi.org/10.1023/A:1012404218926>.
- [123] B. Scrosati, Conducting polymers: advanced materials for new design, rechargeable lithium batteries, *Polymer International*. 47 (1998) 50–55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199809\)47:1<50::AID-PI4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0126(199809)47:1<50::AID-PI4>3.0.CO;2-8).
- [124] T. Osaka, M. Datta, *Energy Storage Systems in Electronics*, CRC Press, 2000.
- [125] M. Kurian, M.E. Galvin, P.E. Trapa, D.R. Sadoway, A.M. Mayes, Single-ion conducting polymer–silicate nanocomposite electrolytes for lithium battery applications, *Electrochimica Acta*. 50 (2005) 2125–2134. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.09.020>.
- [126] P A. Angeli, *Gazz. Chim. Ital.* 46, 1916, p 279.
- [127] G. Street, T. Clarke, R. Geiss, V. Lee, A. Nazzal, P. Pfluger, J. Scott, CHARACTERIZATION OF POLYPYRROLE, *Journal de Physique Colloques*. 44 (1983) C3-599-C3-606. <https://doi.org/10.1051/jphyscol:19833120>.
- [128] Y.-J. Qiu, J.R. Reynolds, Electrochemically initiated chain polymerization of pyrrole in aqueous media, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 30 (1992) 1315–1325. <https://doi.org/10.1002/pola.1992.080300709>.
- [129] E.M. Genies, G. Bidan, A.F. Diaz, Spectroelectrochemical study of polypyrrole films, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 149 (1983) 101–113. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(83\)80561-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(83)80561-0).
- [130] C. Seidel, *Handbook of Conducting Polymers*. Volumes 1 and 2. Hg. von Terje A. Skotheim. ISBN 0-8247-7395-0 und 0-8247-7454-X. New York/Basel: Marcel Dekker Inc. 1986. XVIII + XVII, 1417 S., gcb. \$ 150.00, *Acta Polymerica*. 38 (1987) 101–101. <https://doi.org/10.1002/actp.1987.010380126>.
- [131] V. Khomenko, E. Frackowiak, F. Béguin, Determination of the specific capacitance of conducting polymer/nanotubes composite electrodes using different cell configurations, *Electrochimica Acta*. 50 (2005) 2499–2506. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.10.078>.

- [132] D.D. Ateh, P. Vadgama, H.A. Navsaria, Culture of human keratinocytes on polypyrrole-based conducting polymers, *Tissue Eng.* 12 (2006) 645–655. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.645>.
- [133] X. Jiang, Y. Marois, A. Traoré, D. Tessier, L.H. Dao, R. Guidoin, Z. Zhang, Tissue reaction to polypyrrole-coated polyester fabrics: an in vivo study in rats, *Tissue Eng.* 8 (2002) 635–647. <https://doi.org/10.1089/107632702760240553>.
- [134] A. Vaitkuvienė, V. Kasetė, J. Voronovic, G. Ramanauskaitė, G. Biziulevičienė, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius, Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization, *J Hazard Mater.* 250–251 (2013) 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.038>.
- [135] A. Bouchet, C. Chaix, C.A. Marquette, L.J. Blum, B. Mandrand, Cylinder-shaped conducting polypyrrole for labelless electrochemical multidetection of DNA, *Biosens Bioelectron.* 23 (2007) 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.06.018>.
- [136] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, Conducting polymers for electrochemical DNA sensing, *Biomaterials.* 30 (2009) 2132–2148. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.065>.
- [137] U. Johanson, M. Marandi, T. Tamm, J. Tamm, Comparative study of the behavior of anions in polypyrrole films, *Electrochimica Acta.* 50 (2005) 1523–1528. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.10.016>.
- [138] A. Azioune, F. Siroti, J. Tanguy, M. Jouini, M.M. Chehimi, B. Miksa, S. Slomkowski, Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films, *Electrochimica Acta.* 50 (2005) 1661–1667. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.10.014>.
- [139] X. Zhang, R. Bai, Y.W. Tong, Selective adsorption behaviors of proteins on polypyrrole-based adsorbents, *Separation and Purification Technology.* 52 (2006) 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.04.001>.
- [140] L. Zhang, S. Liu, H. Han, Y. Zhou, S. Hu, C. He, Q. Yan, Studies on the formation process and anti-corrosion performance of polypyrrole film deposited on the surface of Q235 steel by an electrochemical method, *Surface and Coatings Technology.* 341 (2018) 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.12.034>.
- [141] M. Haddaoui, C. Sola, N. Raouafi, H. Korri-Yousoufi, E-DNA detection of rpoB gene resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in real samples using Fe₃O₄/polypyrrole

- nanocomposite, *Biosens Bioelectron.* 128 (2019) 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.045>.
- [142] J. Wang, N. Hui, Electrochemical functionalization of polypyrrole nanowires for the development of ultrasensitive biosensors for detecting microRNA, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 281 (2019) 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.131>.
- [143] T. Xu, H. Dai, Y. Jin, Electrochemical sensing of lead(II) by differential pulse voltammetry using conductive polypyrrole nanoparticles, *Microchim Acta.* 187 (2019) 23. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4027-z>.
- [144] C. Sanchez, F. Ribot, L. Rozes, B. Alonso, Design of Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites Synthesized Via Sol-Gel Chemistry, *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 354 (2000) 143–158. <https://doi.org/10.1080/10587250008023609>.
- [145] X. Wang, W. Xing, X. Feng, L. Song, Y. Hu, MoS₂ /Polymer Nanocomposites: Preparation, Properties, and Applications, *Polymer Reviews.* 57 (2017) 440–466. <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1309662>.
- [146] Special Issue on Nanostructured Materials. *Chem. Mater.* 1996, 8 (8), 1569.
- [147] H.-L. Tsai, J.L. Schindler, C.R. Kannewurf, M.G. Kanatzidis, Plastic Superconducting Polymer–NbSe₂ Nanocomposites, *Chem. Mater.* 9 (1997) 875–878. <https://doi.org/10.1021/cm960516a>.
- [148] J. Jang, J. Ha, B. Lim, Synthesis and characterization of monodisperse silica–polyaniline core–shell nanoparticles, *Chem. Commun.* (2006) 1622. <https://doi.org/10.1039/b600167j>.
- [149] C. Zhu, S. Guo, Y. Fang, L. Han, E. Wang, S. Dong, One-step electrochemical approach to the synthesis of Graphene/MnO₂ nanowall hybrids, *Nano Res.* 4 (2011) 648–657. <https://doi.org/10.1007/s12274-011-0120-2>.
- [150] T. Selvan, J.P. Spatz, H.-A. Klok, M. Möller, Gold–Polypyrrole Core–Shell Particles in Diblock Copolymer Micelles, *Advanced Materials.* 10 (1998) 132–134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199801\)10:2<132::AID-ADMA132>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199801)10:2<132::AID-ADMA132>3.0.CO;2-Y).
- [151] C. Perruchot, M.M. Chehimi, M. Delamar, S.F. Lascelles, S.P. Armes, A Physicochemical Study of Polypyrrole–Silica Nanocomposites by Inverse Gas Chromatography, *Journal of Colloid and Interface Science.* 193 (1997) 190–199. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5049>.

- [152] C. Perruchot, M.M. Chehimi, D. Mordenti, M. Bri,, M. Delamar, The role of a silane coupling agent in the synthesis of hybrid polypyrrole–silica gel conducting particles, *J. Mater. Chem.* 8 (1998) 2185–2193. <https://doi.org/10.1039/a803019g>.
- [153] Faverolle, F.; Le Bars, O.; Attias, A. J.; Bloch, B. *Organic Coatings*; Lacaze, P. C., Ed.; Woodbury: New York, 1996; p. 267.
- [154] H. Tang, J. Wang, H. Yin, H. Zhao, D. Wang, Z. Tang, Growth of Polypyrrole Ultrathin Films on MoS₂ Monolayers as High-Performance Supercapacitor Electrodes, *Advanced Materials*. 27 (2015) 1117–1123. <https://doi.org/10.1002/adma.201404622>.
- [155] S. Roux, G.J. de A.A. Soler-Illia, S. Demoustier-Champagne, P. Audebert, C. Sanchez, Titania/Polypyrrole Hybrid Nanocomposites Built from In-Situ Generated Organically Functionalized Nanoanatase Building Blocks, *Advanced Materials*. 15 (2003) 217–221. <https://doi.org/10.1002/adma.200390049>.
- [156] T. Wang, J. Zhuo, K. Du, B. Chen, Z. Zhu, Y. Shao, M. Li, Electrochemically Fabricated Polypyrrole and MoS_x Copolymer Films as a Highly Active Hydrogen Evolution Electrocatalyst, *Advanced Materials*. 26 (2014) 3761–3766. <https://doi.org/10.1002/adma.201400265>.
- [157] Y. Lattach, A. Deronzier, J.-C. Moutet, Electrocatalytic Hydrogen Evolution from Molybdenum Sulfide–Polymer Composite Films on Carbon Electrodes, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 15866–15875. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03188>.
- [158] D. Xie, M. Zhang, F. Cheng, H. Fan, S. Xie, P. Liu, J. Tu, Hierarchical MoS₂@Polypyrrole core-shell microspheres with enhanced electrochemical performances for lithium storage, *Electrochimica Acta*. 269 (2018) 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.03.068>.
- [159] Brignon, J. M., 2006. HAP. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. INERIS.
- [160] K.C. Jones, J.A. Stratford, K.S. Waterhouse, N.B. Vogt, Organic contaminants in Welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.* 23 (1989) 540–550. <https://doi.org/10.1021/es00063a005>.
- [161] M. Bonnard, S. Devin, C. Leyval, J.-L. Morel, P. Vasseur, The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil, *Ecotoxicol Environ Saf.* 73 (2010) 955–960. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.02.023>.
- [162] V.M. Wagh, D.B. Panaskar, S.V. Mukate, M.L. Aamalawar, U.L. Sahu, Nitrate associated health risks from groundwater of Kadava River Basin Nashik, Maharashtra,

- India, Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 26 (2020) 654–672. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1528861>.
- [163] Dubois A., Contamination des cours d'eau par les pesticides en 2011. 2013, Commissariat général au développement durable.
- [164] B. Lemièrre, J.J. Seguin, C. Le Guern, D. Guyonnet, P. Baranger, D. Darmendrail, P. Conil, Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes, 2001.
- [165] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B.B. Mathew, K.N. Beeregowda, Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals, *Interdiscip Toxicol.* 7 (2014) 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- [166] A. Abbaspour, F. Norouz-Sarvestani, A. Noori, N. Soltani, Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus, *Biosens Bioelectron.* 68 (2015) 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.040>.
- [167] M. Wang, S. Zhang, Z. Ye, D. Peng, L. He, F. Yan, Y. Yang, H. Zhang, Z. Zhang, A gold electrode modified with amino-modified reduced graphene oxide, ion specific DNA and DNzyme for dual electrochemical determination of Pb(II) and Hg(II), *Microchim Acta.* 182 (2015) 2251–2258. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1569-6>.
- [168] S.A. Lim, M.U. Ahmed, A Simple DNA-based Electrochemical Biosensor for Highly Sensitive Detection of Ciprofloxacin Using Disposable Graphene, *Analytical Sciences.* 32 (2016) 687–693. <https://doi.org/10.2116/analsci.32.687>.
- [169] F. Ejeian, P. Etedali, H.-A. Mansouri-Tehrani, A. Soozanipour, Z.-X. Low, M. Asadnia, A. Taheri-Kafrani, A. Razmjou, Biosensors for wastewater monitoring: a review, *Biosensors and Bioelectronics.* 118 (2018) 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.019>.
- [170] M.H. Do, H.H. Ngo, W. Guo, S.W. Chang, D.D. Nguyen, Y. Liu, S. Varjani, M. Kumar, Microbial fuel cell-based biosensor for online monitoring wastewater quality: A critical review, *Sci Total Environ.* 712 (2020) 135612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135612>.
- [171] F.R. Caetano, E.A. Carneiro, D. Agustini, L.C.S. Figueiredo-Filho, C.E. Banks, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, Combination of electrochemical biosensor and textile threads: A microfluidic device for phenol determination in tap water, *Biosens Bioelectron.* 99 (2018) 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.070>.

- [172] M. Morales-Cruz, N.E. Solis-Marcano, C. Binder, C. Priest, C.R. Cabrera, Electrochemical *Proteus vulgaris* whole cell urea sensor in synthetic urine, *Current Research in Biotechnology*. 1 (2019) 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2019.07.002>.
- [173] F. Arduini, S. Cinti, V. Caratelli, L. Amendola, G. Palleschi, D. Moscone, Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection, *Biosens Bioelectron*. 126 (2019) 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.014>.

**Chapitre 2 – Biocapteur à base
du composite MoS₂/PPy pour la
détection de l'ampicilline**

1. Introduction

Suite à l'amélioration des soins médicaux, à l'allongement de l'espérance de vie et à l'industrialisation progressive de l'agriculture, la quantité de médicaments consommés a augmenté. La France est considérée comme le 4^{ème} consommateur mondial de médicaments. Plus de 3000 médicaments à usage humain et 300 médicaments vétérinaires sont actuellement disponibles sur le marché français. Parmi ces médicaments utilisés on trouve les antibiotiques qui sont des substances (naturelles ou synthétiques) ayant la capacité de détruire les cellules bactériennes ou d'inhiber leur multiplication. Ils sont largement utilisés pour la prévention et le traitement de maladies provoquées par des micro-organismes dans la médecine humaine et vétérinaire. Ces derniers ont été détournés de leur fonction principale et utilisés comme facteur de croissance dans l'élevage. Cette pratique est devenue très répandue dans l'élevage industriel depuis près de 60 ans, grâce à leurs effets bénéfiques sur l'augmentation de la production de la volaille et des porcs.

Inévitablement, l'usage intensif des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire finit par avoir des conséquences néfastes pour l'environnement qui se traduit par l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques et leurs transferts entre espèces bactériennes. De plus, de nombreux effets secondaires de cette pollution ont été causés sur le corps humain, y compris des réactions allergiques et des convulsions [1].

Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à la détection de l'ampicilline qui est classé comme un antibiotique à large spectre et donc couramment utilisé en médecine humaine et vétérinaire entraînant ainsi des résidus dans l'environnement [2]. L'ampicilline (AMP), un antibiotique qui appartient à la famille des β -lactame, a été largement utilisé pour traiter certaines infections bactériennes telles que la pneumonie, la bronchite et les infections des voies urinaires [3]. Plusieurs études [4] ont rapporté la présence de plusieurs bactéries résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'eaux usées traitées, et l'antibiotique le plus courant auquel elles étaient résistantes était l'ampicilline (83,3%). Par conséquent, l'Union européenne a fixé une limite tolérée pour la présence d'AMP à 4 ppb [5].

Afin d'identifier et de quantifier cette substance, plusieurs méthodes analytiques basées sur des techniques complexes ont été utilisées. Parmi ces techniques, on cite la chromatographie en phase liquide à haute performance,[6] la spectrométrie de masse,[7] et la spectroscopie

Raman exaltée de surface (SERS) [8]. Malgré la sensibilité et la spécificité de ces méthodes, il existe également quelques inconvénients ; la plupart sont des procédés multi-étapes qui nécessitent un équipement coûteux et ne peuvent pas être utilisés sur site. Par conséquent, il est urgent de développer une technologie simple, peu coûteuse et rapide, capable d'analyser des cibles en temps réel dans une matrice complexe. Dans le cadre de ce travail, nous avons mis au point un biocapteur électrochimique pouvant servir à la détermination rapide, sensible et spécifique de l'AMP. Nous avons porté un intérêt particulier pour développer des aptacapteurs à base de nanofeuilles de MoS₂, film PPy et l'hybride MoS₂/PPy dont les propriétés ont été passées en revue dans le chapitre réservé à l'état de l'art.

L'approche développée pour la conception des biocapteurs repose sur la méthode couche par couche (layer by layer) pour la modification des électrodes imprimées de carbone (**Schéma 2.1**). Le MoS₂ est préparé préalablement par synthèse hydrothermale et le polypyrrole est polymérisé par voie électrochimique pour aboutir à des nanoparticules conductrices. Nous avons étudié l'effet de l'association de ces deux matériaux MoS₂/PPy par différentes méthodes physico-chimiques, ainsi que les propriétés électrochimiques des différentes surfaces. Une chimie fine est développée pour construire les biocapteurs en se basant intégralement sur une immobilisation robuste de la sonde redox et de l'aptamère par le biais de liaisons covalentes. Les performances analytiques des biocapteurs sont analysées et comparées à celles des biocapteurs à base de nanofeuilles MoS₂ et du film de nanoparticules de PPy. Une étude sur les performances analytiques des différents biocapteurs en termes de sensibilité, sélectivité et stabilité pour la détection directe de l'AMP a été réalisée. Le biocapteur le plus performant est par la suite appliqué pour la détection de l'analyte cible dans des échantillons d'eau de rivière contaminées artificiellement pour démontrer la possibilité de son utilisation dans l'évaluation des effluents.

2. Biocapteur à base du composite MoS₂/PPy pour la détection de l'ampicilline

2.1. La sonde redox naphthoquinone

Le phénomène de reconnaissance moléculaire est lié à la modification mesurable d'une ou de plusieurs propriétés physicochimiques du récepteur. Si la réponse est proportionnelle à la concentration de l'espèce cible, il sera alors possible d'en réaliser le dosage [9]. Pour cette raison, nous avons choisi d'utiliser un dérivé organique comme médiateur redox. Parmi les espèces organiques, les quinones représentent une classe de molécules redox particulièrement utilisée dans les processus de transfert électronique. En particulier, la 1,4-Naphtoquinone, une

p-quinone dont la structure est intéressante ; elle est composée du noyau benzoquinone, responsable de son activité redox et un noyau aromatique qui lui confère la possibilité d'établir des interactions de type « π stacking » avec les nanomatériaux. Cette dernière se réduit aisément en hydroquinone à des potentiels modérés en échangeant deux électrons et deux protons (selon le pH du milieu) [10]. Ses propriétés redox ainsi que sa structure en font donc un excellent candidat pour la médiation et pour son incorporation au sein des biocapteurs. Pour cette raison, nous avons choisi d'utiliser un dérivé formé d'une naphthoquinone porteuse de deux groupes fonctionnels acides carboxyliques. En effet, ce dérivé étant bifonctionnel, permettra non seulement d'introduire un centre électroactif dans la plateforme mais aussi d'avoir une surface fonctionnalisée qui assurera par la suite l'immobilisation covalente de l'aptamère. Le dérivé redox symbolisé par NQ dans ce qui suit a été synthétisé selon le protocole décrit dans la littérature [11].

2.1.1. Synthèse du dérivé naphthoquinone

La synthèse du dérivé naphthoquinone bifonctionnelle (NQ) a été réalisée par une addition de Michael. Le protocole expérimental ainsi que la caractérisation par RMN sont détaillés dans la partie expérimentale. D'un point de vue mécanistique, la naphthoquinone α,β -insaturée, activée en présence de quelques gouttes d'acide acétique, subit une addition nucléophile de l'acide mercaptopropanoïque au niveau de la position 4 pour aboutir au produit NQ'. Ce dernier, étant sous la forme réduite, n'est pas réactif pour une addition supplémentaire jusqu'à ce qu'il soit reconverti en la forme oxydée (**Schéma 2.1**) en réagissant avec un second équivalent de naphthoquinone. Contrairement à la première réaction, la deuxième addition présente une cinétique chimique significativement plus lente suite à l'encombrement stérique imposé par le premier substituant.

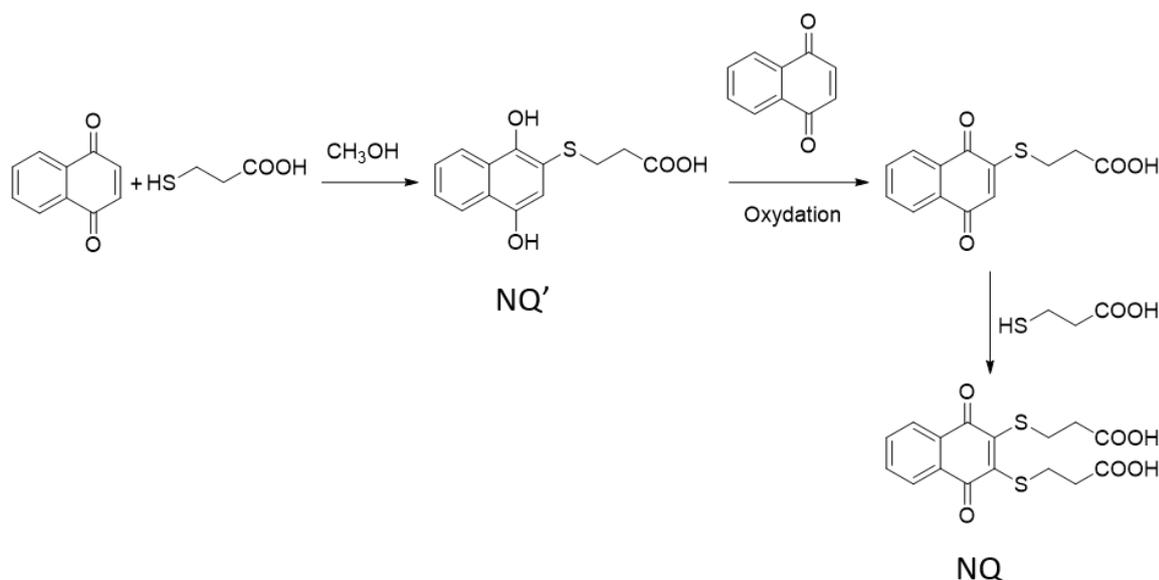


Schéma 2.1. Voie de synthèse de la naphthoquinone disubstituée

2.2. Préparation de nanofeuilles MoS₂ et caractérisation

2.2.1. Préparation des nanofeuilles MoS₂

Pour cette étude, nous avons eu recours à la méthode hydrothermale qui est une approche facile permettant l'obtention des nanofeuilles de MoS₂ en grande quantité et de haute qualité cristalline. Pour ce faire nous avons utilisé l'heptamolybdate d'hexaammonium tétrahydrate (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O et la thiourée comme précurseurs (voir Partie Expérimentale). L'épaisseur des nanofeuilles de MoS₂ obtenues avec cette méthode est de ~ 4 nm et la taille latérale des couches est dans la gamme de 200 à 400 nm [12]. Un mécanisme de croissance a été proposé (voir chapitre I : méthode hydrothermale).

Nous avons effectué une étape supplémentaire d'exfoliation assistée par ultrason afin d'obtenir des nanofeuilles de MoS₂ de l'ordre de quelques feuillets [13] que nous avons caractérisés par spectroscopie Raman et EDX.

2.2.2. Caractérisation des nanofeuilles MoS₂ par spectroscopie Raman et EDX

Le MoS₂ présente deux pics caractéristiques en spectroscopie Raman : un pic caractérisant la vibration des atomes de soufre hors du plan (A_{1g}) et un pic caractérisant la vibration des atomes de molybdène et de soufre dans le plan (E_{2g}^1). La position relative de ces deux pics permet de déterminer le nombre de couches de MoS₂ du domaine mesuré [14]. Le spectre (**Figure 2.1.A**) montre deux pics à 405.6 cm⁻¹ et 382.5 cm⁻¹. Ceci a permis de déterminer le nombre de couches des domaines de MoS₂ à 3 couches [15]. En outre, l'analyse élémentaire de la surface par EDX a confirmé la présence du molybdène et du soufre à la surface de l'électrode (**Figure 2.1.B**).

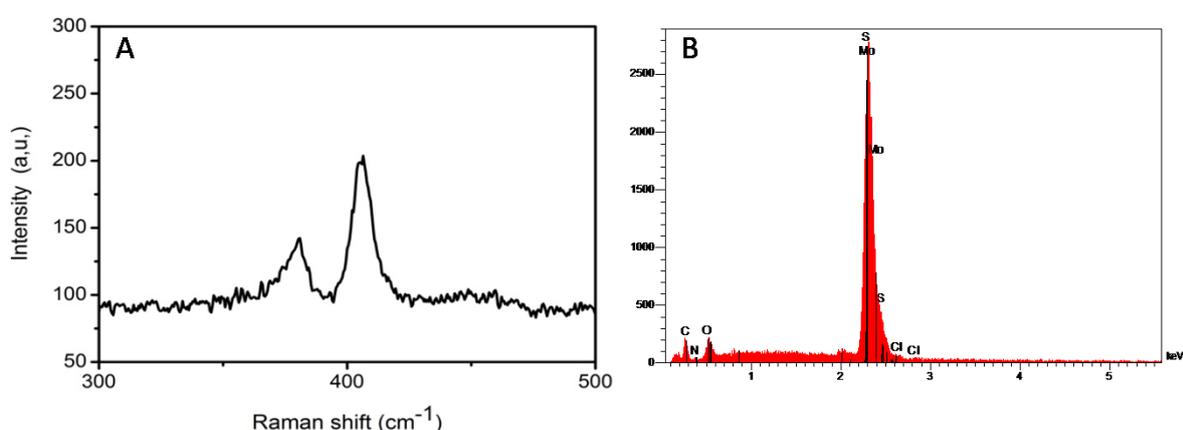


Figure 2.1. (A) Spectre Raman de MoS₂ (B) Spectre EDX de MoS₂

2.3. Elaboration du biocapteur

Une électrode imprimée de carbone (SPCE) a été utilisée comme socle pour la conception des biocapteurs. Ces derniers ont été développés en adoptant une stratégie simple : la méthode couche après couche (layer by layer) (**Schéma 2.2**).

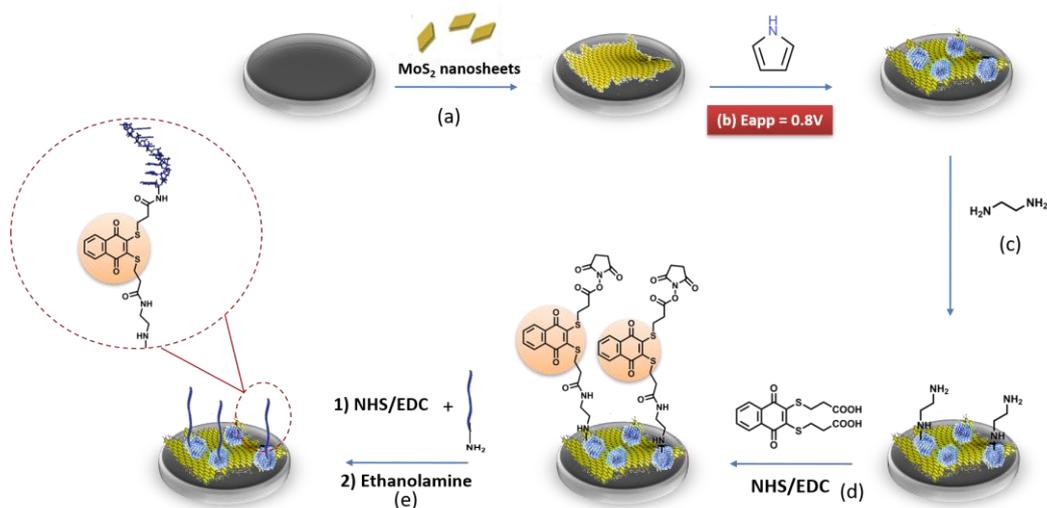


Schéma 2.2. Principe de conception du biocapteur hybride de l'AMP élaboré dans ce travail

2.3.1. 1ère étape : Dépôt des nanomatériaux

2.3.1.1. *Electrodéposition des nanofeuilles MoS₂*

Les nanofeuilles de MoS₂ dispersés dans une solution ont été déposés sur la surface de l'électrode. Par la suite le potentiel a été balayé de 0 à -0.95 V vs. Ag/AgCl à une vitesse de 50 mV s⁻¹ (**Figure 2.2**). Cette approche électrochimique a l'avantage par rapport aux méthodes d'électrodéposition conventionnelles, qui sont réalisées en présence des précurseurs moléculaires, est que cette dernière peut être conduite dans des conditions douces ; à un potentiel modéré, à température ambiante et dans des solutions aqueuses, pour aboutir à une couche nanométrique ayant les propriétés du nanomatériau d'origine. Cette méthode est basée sur l'application d'un potentiel électrique diminuant les forces répulsives inter-particules qui stabilisent la dispersion de nanomatériaux. Il a été démontré que le potentiel électrique appliqué provoquait l'oxydation ou la réduction de l'eau, ce qui modifiait le pH à la surface de l'électrode et éliminait la charge nette de surface des nanomatériaux dispersés, favorisant ainsi leur agrégation et déposition de manière irréversible sur la surface de l'électrode [16].

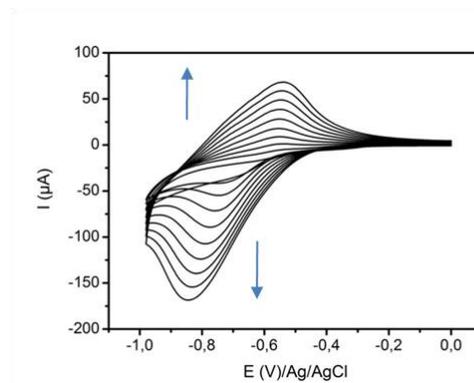


Figure 2.2. Voltamogrammes cycliques successifs au cours de l'électrodéposition de nanofeuilles MoS₂

2.3.1.2. *Electropolymérisation pulsée du film PPy*

L'électrode SPCE/MoS₂ a été ensuite modifiée par un film PPy nanostructuré obtenu par électropolymérisation pulsée du pyrrole. Cette approche repose sur deux régimes distincts de croissance du polymère : un régime « ON » où le potentiel appliqué permet l'oxydation du monomère et un régime « OFF » où le système est en repos (**Figure 2.3.A**). Pendant le temps ON, le potentiel est fixé et un courant est généré et appliqué sur la solution, contenant le monomère pyrrole, déposée sur la surface de l'électrode. Les monomères sont oxydés en radicaux cations, qui vont par la suite réagir entre eux pour former des nanoparticules de PPy.

Il s'agit de l'étape de la nucléation. Cette dernière est suivie d'une période de temps OFF pendant laquelle aucun courant ne circule. La croissance des nanoparticules de PPy pourrait être bloquée ou, lorsque le temps OFF est relativement long, pourrait être favorisée sur les chaînes de PPy déjà développées. Au cours du pulse suivant, une croissance par nucléation de PPy sur d'autres nouveaux sites peut se produire en raison de la stimulation de l'électrode par impulsion électrique. Ceci permet la formation d'un film de PPy nanostructuré avec une croissance orientée sur la surface et une structure contrôlable [17].

En revanche, lors du processus d'électropolymérisation du pyrrole par voltammétrie cyclique (**Figure 2.3.B**), les monomères qui se trouvent en suspension à la surface de l'électrode sont oxydés au cours du temps et la vitesse de propagation de la chaîne dépend fortement de la vitesse de diffusion des monomères de la solution vers l'interface où se déroule la réaction. Par conséquent, les nanoparticules de polymère générées pourraient être davantage développées par électropolymérisation du pyrrole sur des chaînes de polymère existantes à défaut de favoriser la nucléation et la croissance de nouvelles chaînes. Ceci abouti à une morphologie de surface irrégulière.

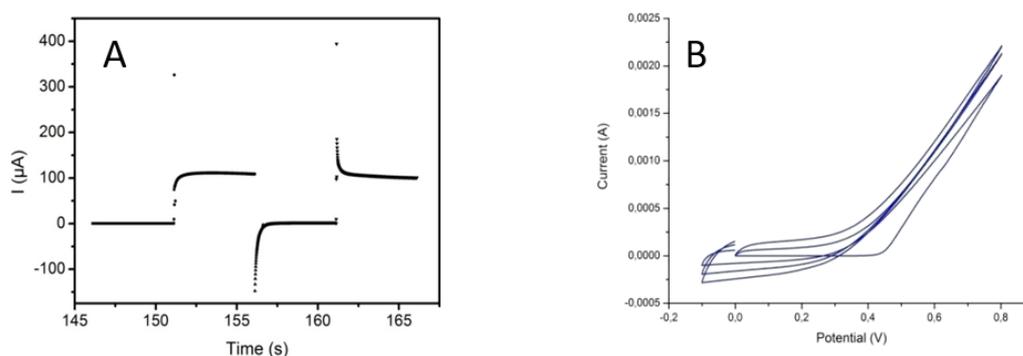


Figure 2.3. (A) Electropolymérisation pulsé du PPy (B) Voltammogrammes cycliques de l'électropolymerisation du PPy par VC

2.3.2. Fonctionnalisation de la surface par des groupes amines (2ème étape)

La modification de la surface par des groupes fonctionnels a été réalisée par le greffage électrochimique qui consiste à polariser l'électrode de travail en présence des molécules que l'on souhaite greffer, ce qui résulte en l'oxydation ou la réduction de la molécule et la formation d'un radical qui peut réagir avec la surface [18]. Cette technique fournit une voie simple pour la modification de la surface des électrodes.

L'éthylène diamine (EDA) possède deux fonctions amines (NH_2) susceptibles de se lier de manière covalente au film de polypyrrole après avoir subi une oxydation électrochimique générant des radicaux cations qui vont réagir pour former des liaisons covalentes avec le polypyrrole. Cette approche a été optimisée précédemment au sein de notre équipe pour la fonctionnalisation du pyrrole [19].

Au cours du premier cycle, on remarque l'apparition d'un pic d'oxydation intense à 0,8 V environ correspondant à l'oxydation des amines de l'EDA. L'intensité du courant de ce pic chute drastiquement lors du balayage suivant (**Figure 2.4**) ce qui correspond à une baisse du transfert de charge due à une inhibition de l'électrode suite à la fixation de l'EDA et la formation d'une couche épaisse non conductrice.

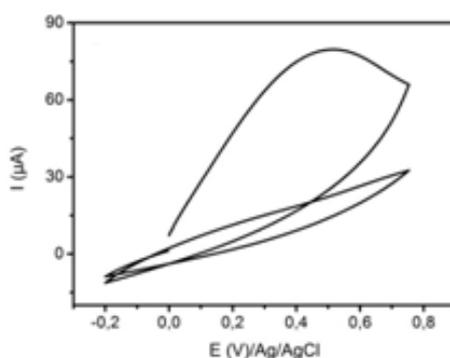


Figure 2.4. Voltammogrammes obtenus au cours de l'électro-oxydation de l'EDA

Dans le cas de la plateforme à base de MoS_2 , la cystamine a été utilisée pour obtenir des fonctions amines en surface. En effet, ce composé est utilisé en raison de la forte affinité du molybdène pour le soufre qui permet de former une monocouche et ainsi l'obtention de la fonction amine à la surface.

2.3.3. Greffage de NQ et de l'aptamère (3ème étape et 4ème étape)

La fixation covalente de NQ portant des groupes fonctionnels acides carboxyliques en positions terminales, a été obtenue en réagissant avec l'amine présente à la surface des électrodes, de MoS_2 , PPy et MoS_2 /PPy, en présence d'EDC comme agent de couplage pour former une liaison amide. Par la suite, une immobilisation orientée du biorécepteur sur l'électrode est réalisée en exploitant le deuxième groupe d'acide carboxylique libre de la NQ déjà fixée à la surface. En effet, l'aptamère utilisé dans ce travail possède une terminaison amine en position 5' (Voir tableau Partie expérimentale). La fixation du mono brin d'ADN est réalisée par la formation d'une liaison covalente C-NH *via une réaction d'amidation en*

présence de l'EDC. Cette réaction est effectuée par incubation de l'électrode pendant 30 min à 35°C dans la solution d'ADN sonde prise à la concentration 10 μM . Ces conditions ont été préalablement optimisées dans un précédent travail accompli par notre équipe portant sur l'immobilisation de l'ADN sonde où il a été montré que ces conditions sont optimales pour obtenir un très grand nombre d'oligonucléotides à la surface de l'électrode [20].

Après chaque étape, la surface est abondamment rincée à l'eau ultra pure puis séchée sous un flux d'argon. La biopuce est finalement stockée pendant une nuit à 4 °C dans une solution de PBS pour la stabilisation. Cette étape s'avère nécessaire pour avoir des résultats reproductibles.

2.4. Caractérisation du biocapteur

Nous avons eu recours à plusieurs techniques microscopiques spectroscopiques et électrochimiques afin de confirmer la modification multi-étape de la surface de l'électrode et de caractériser les propriétés morphologiques, structurales et électriques des biocapteurs obtenus.

2.4.1. Etudes structurale et morphologique de la surface

2.4.1.1. Analyses par MEB, EDX et AFM

Les caractéristiques morphologiques des nanoparticules ont été évaluées par microscopie électronique à balayage (MEB). Les clichés A et B de la **Figure 2.6** avant et après électrodéposition confirment la modification de la surface de l'électrode de carbone par les nanofeuilles MoS_2 . On observe que le matériau a été déposé selon une orientation verticale à la surface. Cette structure pourrait être expliquée par l'interaction entre les différents îlots de MoS_2 .

La modification d'électrode avec un film PPy a été réalisée par électropolymérisation pulsée (**Figure 2.6.C.a**) qui a abouti à des nanoparticules de polypyrrole avec une structure uniforme et une croissance orientée sur la surface. Cependant en comparant avec le film de polypyrrole obtenu par l'électropolymérisation avec la voltammétrie cyclique (**Figure 2.6.C.b**) on remarque une structure morphologique typique de chou-fleur avec une croissance irrégulière sur la surface.

Enfin, la modification par l'hybride MoS_2 / PPy a conduit à un nanofilm PPy recouvrant des nanofeuilles de MoS_2 avec une nanostructure bien définie et une distribution homogène sur la surface de l'électrode (**Figure 2.6.D**)

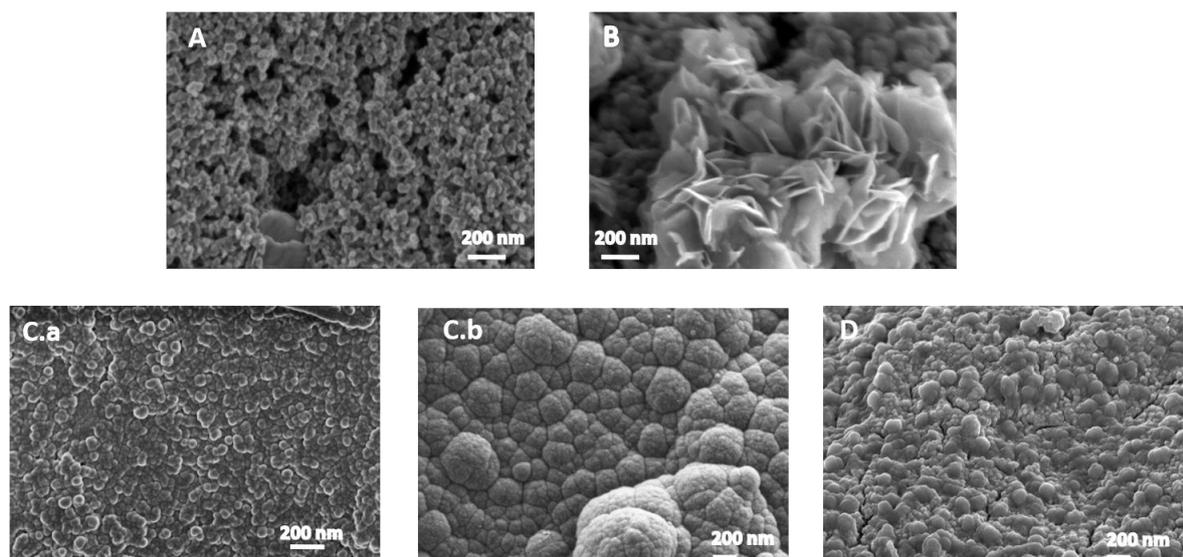


Figure 2.6. Les Micrographies au MEB de la surface d'électrode (A) Carbone (B) Carbone/MoS₂ (C.a) Carbone/PPy obtenu par électropolymerisation pulsée (C.b) Carbone/PPy obtenu par voltamètre cyclique et (D) Carbone/MoS₂/PPy

L'analyse élémentaire de la surface par EDX, après modification au polypyrrole, montre essentiellement la présence du C, N, Mo, S. (**Figure 2.7**). On trouve également des impuretés le Cl et O dont l'origine est due à l'utilisation de LiClO₄ comme électrolyte support pour l'électrodéposition et l'électropolymérisation du pyrrole. Les ions perchlorates sont emprisonnés dans la matrice où ils assurent la neutralité électrochimique des pyrroles chargés positivement.

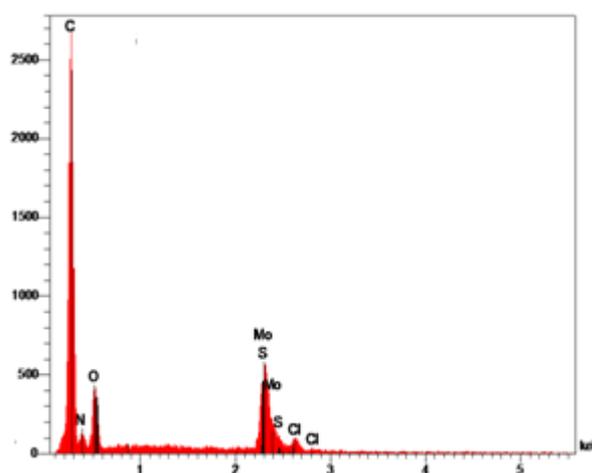


Figure 2.7. Spectre EDX de SPCE/MoS₂/PPy

Les propriétés de surface et les caractéristiques morphologiques des nanomatériaux électrodéposés ont été aussi observées par les images AFM tridimensionnelles (**Figure 2.8**). L'image AFM de l'électrode modifiée par MoS₂ (**Figure 2.8.A**) a montré une surface rigoureuse modifiée par des nanoagréats distribués d'une manière homogène à la surface.

Lors de la modification avec le nanofilm PPy, l'image AFM montre un changement dans la morphologie de la surface avec la formation d'îlots sphériques de grande taille en forme de chou-fleur (**Figure 2.8.B**). Dans le cas de la modification avec le nanocomposite, les études AFM ont confirmé que la présence des nanofeuilles de MoS₂ favorise la nanostructuration du nanofilm de PPy qui a conduit à un film homogène de MoS₂/PPy (**Figure 2.8.C**).

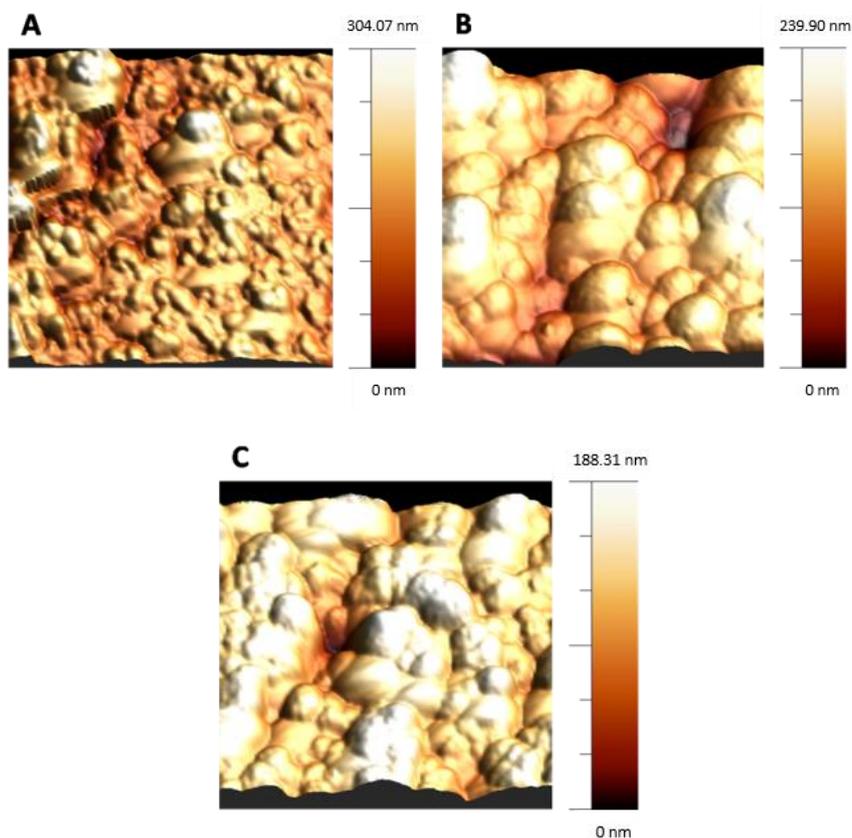


Figure 2.8. Images AFM de l'électrode modifiée (A) Carbone/MoS₂ (B) Carbone/PPy et (C) Carbone/MoS₂/PPy

2.4.1.2. Par spectroscopie infrarouge

La modification de l'électrode par les différents nanomatériaux MoS₂, PPy et MoS₂/PPy a été confirmée moyennant une analyse par spectroscopie infrarouge effectuée en mode réflexion en utilisant une platine ATR (**Figure 2.9**). En effet, une comparaison des spectres avant et après l'électropolymérisation fait apparaître les différents pics caractéristiques du PPy situés à 775, 1160, 1292, 1448 and 1551 cm⁻¹ qu'on retrouve dans le spectre du nanocomposite. Le pic situé à environ 1551 cm⁻¹ est attribué à la vibration du cycle pyrrolique et celui situé à 1160 cm⁻¹ correspond à la vibration d'élongation de liaisons C-N. Une faible variation est observée dans le cas du pic situé à 1551 cm⁻¹ avec un effet bathochrome (1525 cm⁻¹)

probablement dû à l'interaction de PPy et MoS₂ comme observé dans le cas du nanocomposite PPy/MoS₂ préparé par voie chimique [21].

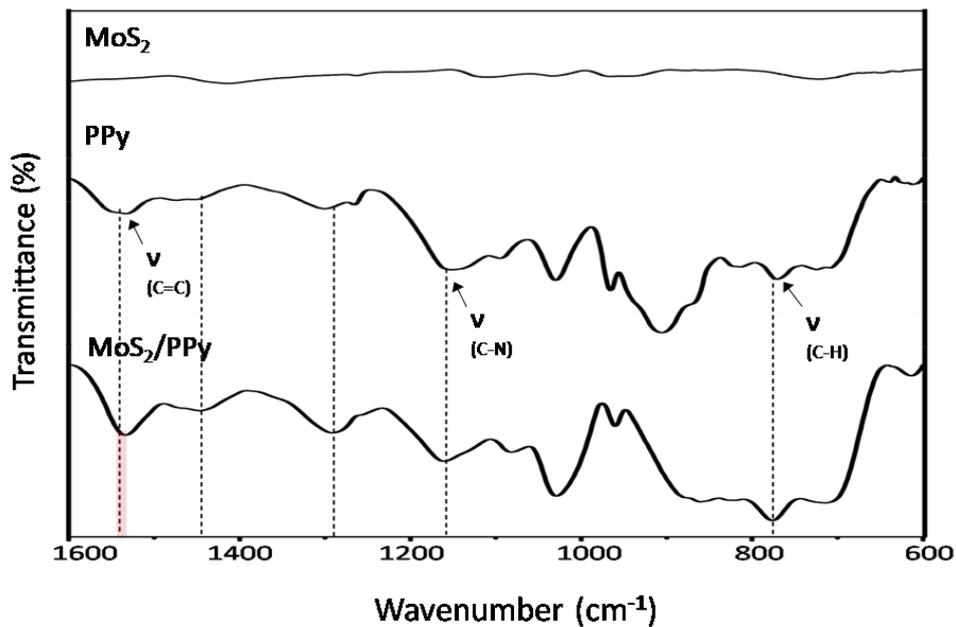


Figure 2.9. Spectres IR des différents nanomatériaux

2.4.1.3. Analyse par spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie XPS est une technique très puissante qui permet d'avoir des informations précises sur l'état de surface, le degré d'oxydation des éléments et leurs environnements chimiques. Des mesures XPS à haute résolution ont été effectuées pour étudier les propriétés électroniques des nanofeuilles de MoS₂ et du nanocomposite PPy/MoS₂. Les différents niveaux de cœur, à savoir Mo3d, S2p, N1s et C1s sont analysés. Comme le montre la **Figure 2.10 (A)**, le spectre de Mo3d mesuré sur MoS₂ présente deux pics distincts à 231,9eV et 228,8eV, qui sont respectivement associés aux composants de spin-orbite Mo⁴⁺3d^{3/2} et Mo⁴⁺3d^{5/2} de la phase semi-conductrice 2H, ce résultat est en accord avec la littérature [22]. De plus, le spectre S2p présente deux contributions à 162,81eV et 161,63eV (**Figure 2.10.B**) correspondant respectivement à S2p^{1/2} et S2p^{3/2} [23]. Pour le système MoS₂/PPy, on observe un déplacement d'environ 0,20 eV vers les énergies de liaison plus élevées. Un tel changement peut être lié à l'interaction de la couche de polypyrrole avec les nanofeuilles de MoS₂ et représente une preuve solide d'un processus de transfert de charge entre elles, conduisant à une amélioration de la conductivité de l'ensemble du système.

La déconvolution du large pic de N 1s du spectre XPS enregistré sur le composite MoS₂/PPy montre l'existence de quatre types distincts d'azote centrés à 399,70eV, 397,84eV, 394,60eV et 391,12 eV (**Figure 2.10.C**) qui sont attribuées à (-N-H⁺), (=N-H⁺), (-N-H) et (=N-) respectivement [21]. Conformément à la littérature, les composés aux énergies de liaison les

plus élevées sont très probablement liés à l'azote chargé positivement des espèces polaron ($-N-H^+$) et bipolaron ($=N-H^+$) alors que le composé avec l'énergie de liaison la plus faible, à 391 eV, correspond à la structure imine ($=N-$). Les composés à $\sim 394,60$ eV sont attribués à l'azote neutre dans le cycle Py (structures $-N-H$). Le spectre XPS N1s montre un déplacement des pics vers une énergie de liaison plus faible en comparant avec le spectre N1s du PPy seul où la valeur de l'énergie de liaison est obtenue à 402,58, 401, 399,85 et 398,88 eV [24]. Cet écart d'énergie montre une forte modification des propriétés du PPy en raison de l'interaction avec le MoS_2 . Le spectre C1s présenté dans la **Figure 2.10 (D)** permet de vérifier que le film de polypyrrole n'a subi aucune dégradation.

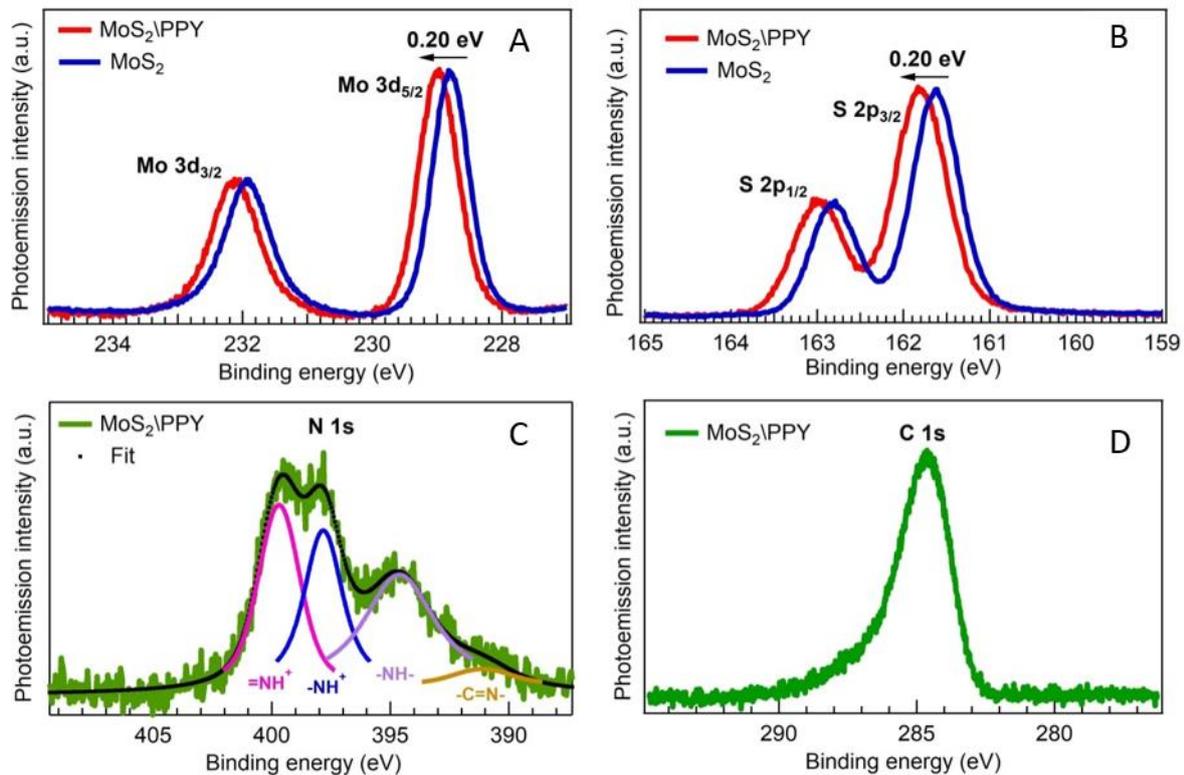


Figure 2.10. Spectres XPS haute résolution aux différents niveaux du cœur de (A) Mo3d, (B) S2p, (C) N1s et (D) C1s mesurés sur des nanofeuilles MoS_2 et sur MoS_2 / PPy

2.4.2. Caractérisation électrochimique

2.4.2.1. Fonctionnalisation de l'électrode par le système MoS_2 , PPy et MoS_2 / PPy

Pour mettre en évidence et comprendre l'effet engendré par la modification de l'électrode avec les différents nanomatériaux sur les propriétés de transfert d'électron, nous avons étudié la cinétique du transfert électronique en présence du système hexacyanoferrate ($[Fe(CN)_6]^{3/4-}$) comme sonde redox en solution. Cette étude est effectuée par voltammétrie cyclique sur des

électrodes SPCE modifiées par les nanofeuilles MoS₂ (b), le film PPy nanostructuré (c) et l'hybride MoS₂/PPy (d) (**Figure 2.11.A**).

Les courbes intensité-potentiel obtenues montrent que le signal du couple redox est fortement influencé par la présence des nanomatériaux. On note, une légère augmentation des courants d'oxydo-réduction lors de la modification par les nanofeuilles de MoS₂ (b) par rapport au signal obtenu dans le cas d'une électrode nue (a), ceci est dû à l'augmentation de la surface active de l'électrode. Lorsque le film du PPy est déposé sur la surface, une amplification significative de l'intensité du courant (c) est observée ce qui est prévisible puisque le polypyrrole est un polymère conducteur. En combinant ces deux matériaux organique/inorganique on remarque que les courants d'oxydo-réduction sont plus élevés (d) ce qui montre que le transfert électronique est favorisé grâce aux propriétés physicochimiques de MoS₂ associées à ceux du polypyrrole. Ainsi la nanostructuration de l'électrode par le nanomatériau hybride MoS₂/PPy affecte le transfert d'électrons à la surface en entraînant une amélioration du processus redox. Ceci peut s'expliquer par différents paramètres dont l'importance de la surface active dans le cas du composite favorisant une diffusion des entités redox de la solution électrolytique vers la surface modifiée.

Afin d'apporter plus d'informations sur les propriétés électriques interfaciales des surfaces obtenues, nous avons effectué une analyse complémentaire par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) (**Figure 2.11.B**). Les diagrammes de Nyquist de la SPCE nue et modifiée par les nanomatériaux ont été mesurés en mettant en jeu le même marqueur redox et par l'application d'un potentiel constant de + 0,2 V vs. Ag/AgCl dans un intervalle de fréquences de 100 kHz à 0.1 Hz. Ces spectres SIE ont été ensuite modélisés, selon le modèle de circuit électrique de Randles.

Le tableau II.1 ci-dessous regroupe les circuits équivalents associés à la modélisation des données d'impédance pour l'électrode nue et modifiée par le composite et les valeurs correspondant aux différents composants électriques.

Le circuit électrique est constitué par une résistance R_s qui représente la résistance de l'électrolyte, une résistance R_{ct} qui correspond à la résistance de transfert de charge, une capacitance de double couche (C_m/s) remplacée par un élément de constante de phase CPE1 relatif à un comportement capacitif non idéal des surfaces et une composante de Warburg ZW représentative du processus de diffusion des espèces ioniques qui peut être remplacé parfois par un élément de constante de phase CPE2 [25].

On note que la variation de la valeur R_s est négligeable car la force ionique de la solution est fixe alors qu'on assiste à une diminution très significative de la résistance de transfert de

charge R_{ct} après modification de la surface avec le nanocomposite qui passe de 411Ω pour la surface MoS_2 à 20Ω pour la surface MoS_2/PPy . Cette diminution de R_{ct} peut être liée à une augmentation de la conductivité de la couche MoS_2/PPy favorisant un meilleur transfert d'électron. L'examen du comportement de la capacité montre que lorsque la surface est modifiée avec MoS_2 , cette dernière présente un caractère purement capacitif. Cependant, les surfaces modifiées par le film PPy nanostructuré (dans le cas de PPy et MoS_2/PPy) un comportement de type CPE est obtenu qui montre une distribution non-homogène des charges à la surface et qui peut être expliqué par les défauts au niveau de la couche de PPy sous forme de nanoparticules.

Il ressort de cette étude que l'immobilisation du matériau sur la surface d'électrode provoque une baisse de la résistance de transfert de charge (R_{ct}) ce qui indique une augmentation au niveau de la conductivité électrique. Ceci est en bon accord avec les observations de VC confirmant ainsi l'effet exaltant du nanomatériau hybride sur le transfert électronique.

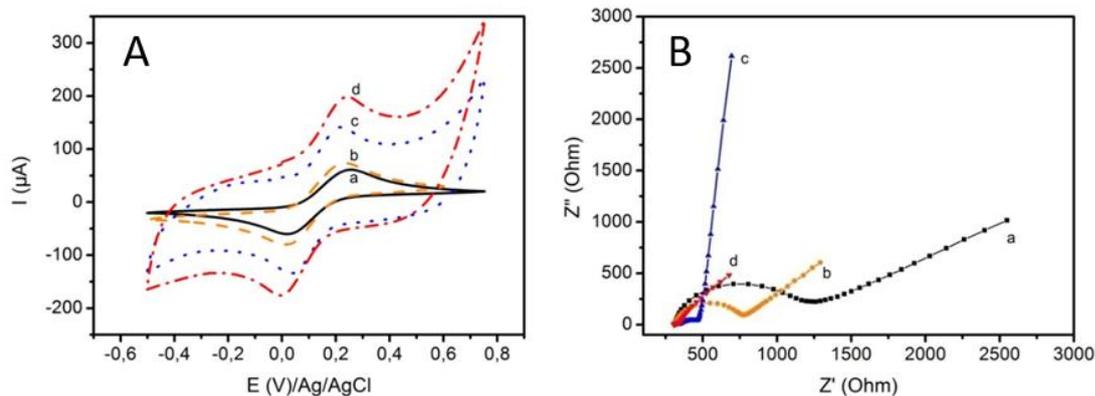
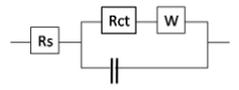
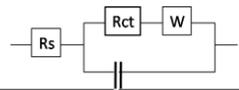
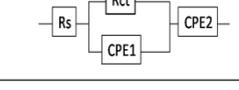
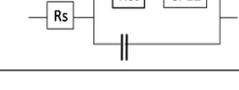


Figure 2.11. (A) Voltamogrammes cycliques et (B) diagrammes d'impédance en représentation de Nyquist pour une gamme de fréquence de 0,1 Hz à 100 kHz à un potentiel $E = + 0,2 \text{ V}$; observés en présence de 5 mM d'une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ après chaque étape de modification de l'électrode : (a) SPCE (b) SPCE/ MoS_2 (c) SPCE/PPy et (d) SPCE/ MoS_2/PPy

Tableau II.1 Paramètres de modélisation des spectres d'impédance.

Equivalent circuit model	Modified electrode*	R_s / Ω	R_{ct} / Ω	Capacitance μ F	CPE1 μ Mho	n	CPE2 μ Mho	n	W μ Mho	χ^2
	SPCE	321.01	849.7	0.976	-	-	-	-	669	0.1
	SPCE/MoS2	316.7	411.61	1.19	-	-	-	-	1410	0.029
	SPCE/PPy	303.34	197.14	-	288	0.54	860	0.95	-	0.001
	SPCE/MoS2/PPy	306.55	20.8	22.7	-	-	2190	0.634	-	0.01

2.4.2.2. Fonctionnalisation de l'électrode par EDA et la NQ

La fonctionnalisation de la surface a été réalisée par l'immobilisation de l'EDA suivant une approche électrochimique et par la cystamine dans le cas de MoS₂ en raison de la forte affinité du molybdène pour le soufre. La modification de l'électrode a été suivie par VC en utilisant du [Fe(CN)₆]^{3/4-} comme sonde redox. La courbe intensité-potential enregistrée montre une chute de l'intensité du courant d'environ 40% due à la formation d'une couche isolante au transfert d'électrons (**Figure 2.12.A**).

Les groupes fonctionnels amines ont servi par la suite à l'immobilisation de la NQ comme expliqué précédemment. Pour examiner le comportement électrochimique de l'électrode après greffage de la sonde redox, nous avons enregistré les VC pour toutes les plateformes nanométriques dans PBS sans sonde redox (**Figure 2.12.B**). Les voltamogrammes obtenus montrent clairement la présence d'un signal redox bien défini qui est attribué à la réaction d'oxydo-réduction de la NQ. On remarque que la courbe intensité-potential de l'hybride MoS₂/PPY (c) est déplacé vers les potentiel cathodiques par rapport aux voltamogrammes des plateformes à base des nanofeuilles MoS₂ (a) et du film PPY (b). Ce résultat montre que le nanocomposite présente un effet électrocatalytique vis-à-vis de l'oxydo-réduction de NQ.

L'analyse des caractéristiques de VC révèle que la différence entre les potentiels de pics anodiques et cathodiques (ΔE_p) est supérieure à la valeur théorique de $0,06/n$ V (avec, $n = 2$) indiquant ainsi que le transfert d'électrons à travers le nanomatériau est quasi-réversible.

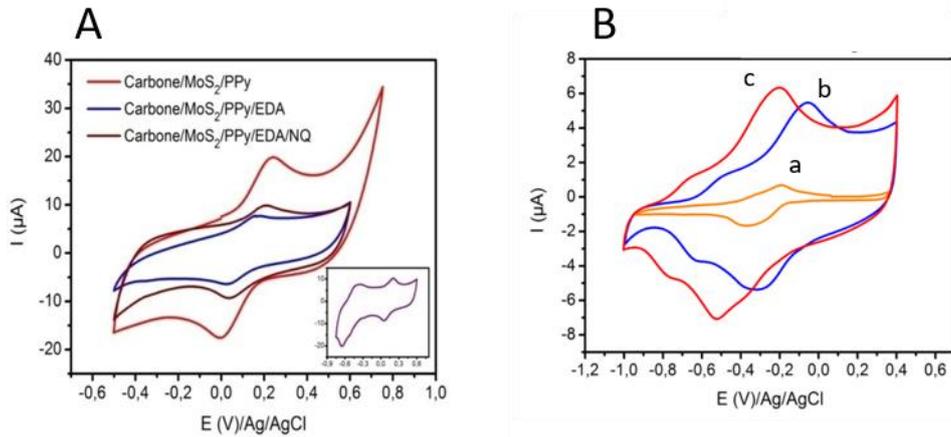


Figure 2.12. (A) Courbes voltampérométriques obtenues en présence de 5 mM d’une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ après fonctionnalisation (B) Courbes voltampérométriques réalisées dans PBS pH=7.4 après immobilisation de NQ pour les 3 plateformes : (a) SPCE/MoS₂/Cyst/NQ (b) SPCE/PPy/EDA/NQ et (c) SPCE/MoS₂/PPy/EDA/NQ

• *Etude cinétique*

Pour déterminer la nature du phénomène qui régit le transfert de matière au niveau du biocapteur, les voltamogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage (**Figure 2.13.A**). La **Figure 2.13.B**, montre que les intensités des courants des pics cathodiques et anodiques varient linéairement avec la vitesse de balayage ce qui confirme l’adsorption des molécules de naphthoquinone à la surface et que le système électrochimique est contrôlé par le transfert électronique.

La constante de transfert électron k_s peut être déterminée à partir des données de la VC en mesurant la variation du potentiel du pic en fonction de la vitesse de balayage. Elle peut être ainsi calculée en utilisant la méthode décrite par Gusmão et al. [26] selon l’équation 1. Cette équation est une version simplifiée de la méthode de calcul développée par Laviron [27].

$$k_s = (1 - \alpha) \frac{nFv_a}{RT} \quad \text{2.1. Equation 1}$$

avec : α : coefficient du transfert électronique

n : le nombre d’électrons échangés au cours de la réaction d’oxydo-réduction ($n=2$),

v : la vitesse de balayage la plus élevée,

F : la constante de Faraday,

R : la constante des gaz parfaits,

T : la température en Kelvin.

La valeur du coefficient du transfert électronique α peut être calculée selon l'équation 2 en étudiant la variation du potentiel de pic E_p avec le logarithme de la vitesse de balayage (**Figure 2.13.C**).

$$\text{pente} = \frac{2.3 RT}{(1-\alpha)n F} \quad \text{2.2. Equation 2}$$

Il est possible par la suite, à partir de l'équation 1, de calculer la valeur de la constante du transfert de charge k_s . Les valeurs obtenues pour les différentes surfaces sont comparables et correspondent à 7.60 s^{-1} , 7.83 s^{-1} et 7.85 s^{-1} pour les plateformes à base de nanofeuilles MoS_2 , film PPy et l'hybride MoS_2/PPy respectivement. Nous n'avons pas constaté une variation notable entre les différentes surfaces, par ailleurs ces valeurs sont largement supérieures comparées à celle rapportée dans le cas une monocouche de ω -mercaptopropyl naphthoquinone adsorbée sur une électrode d'or massif qui est de 0.23 s^{-1} [28]. Ceci montre l'intérêt de la modification de surface par des nanomatériaux et l'importance de la nanostructuration sur l'amélioration de la cinétique de transfert d'électrons grâce aux propriétés des nanofeuilles MoS_2 et du film polypyrrole nanostructuré.

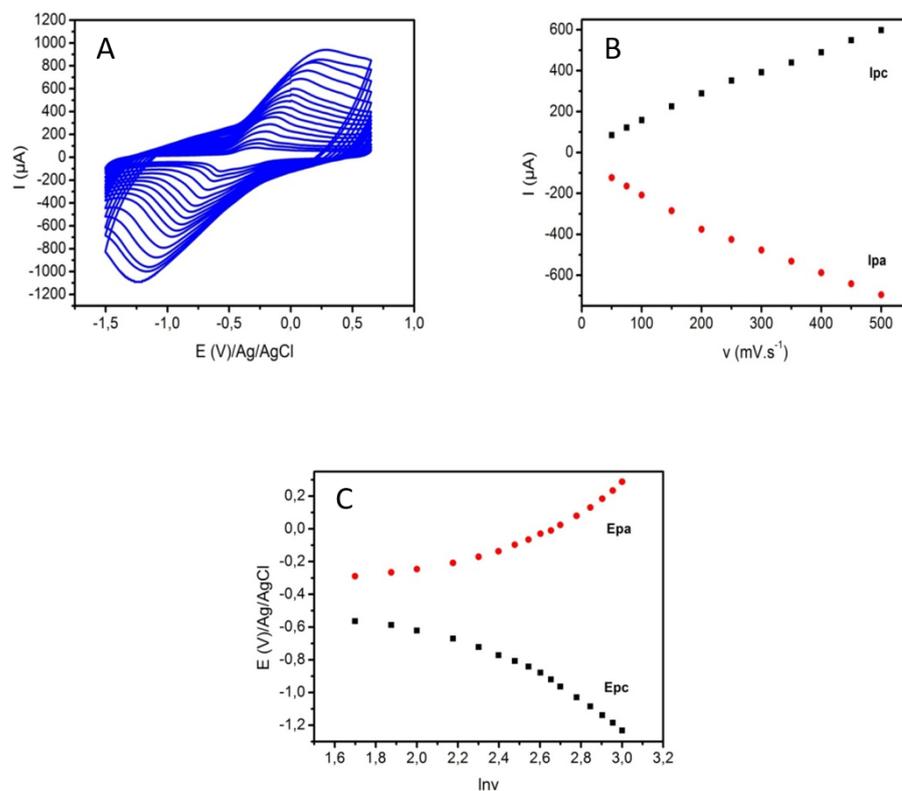


Figure 2.13. (A) Voltammétrie cyclique de l'électrode modifiée par $\text{MoS}_2/\text{PPy}/\text{EDA}/\text{NQ}$ à différentes vitesses de balayage dans une gamme de 0,01 à $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (B) Variation du courant

anodique et cathodique en fonction de la vitesse de balayage. (C) Variations du potentiel de pic E_p avec le logarithme de la vitesse de balayage Carbone/MoS₂/PPy/EDA/NQ (E_{pa} : potentiel anodique E_{pc} : potentiel cathodique).

2.4.2.3. Biofonctionnalisation par l'aptamère

L'étape de biofonctionnalisation de l'électrode a été caractérisée par voltammétrie cyclique. Les voltamogrammes enregistrés dans le ([Fe(CN)₆]^{3/4-}) avant et après greffage de l'élément biologique, sont représentés dans la **Figure 2.14.A,B,C**. On remarque que l'intensité du courant diminue après l'ajout de l'élément de biorecognition, indiquant ainsi son immobilisation réussie sur la surface de l'électrode. Cette diminution est probablement causée par le ralentissement du transfert d'électrons lié à l'effet stérique et électronique du brin d'ADN fixé et/ou à la diffusion lente des contre-ions vers la surface modifiée pour la compensation de charge au cours du processus redox. Pour confirmer davantage ces observations, nous avons eu recours à la spectroscopie d'impédance électrochimique en perturbant le système redox par un potentiel de l'ordre de + 0,2 V vs. Ag/AgCl. Les spectres SIE sont représentés dans la **Figure 2.14.D**. On note une augmentation significative de la R_{ct} de 6.76 kΩ pour l'électrode (SPCE/MoS₂/PPy/EDA/NQ/) pour atteindre la valeur de 8.34 kΩ après greffage de l'aptamère. Ceci explique la diminution du taux de transfert de charge au cours du processus redox.

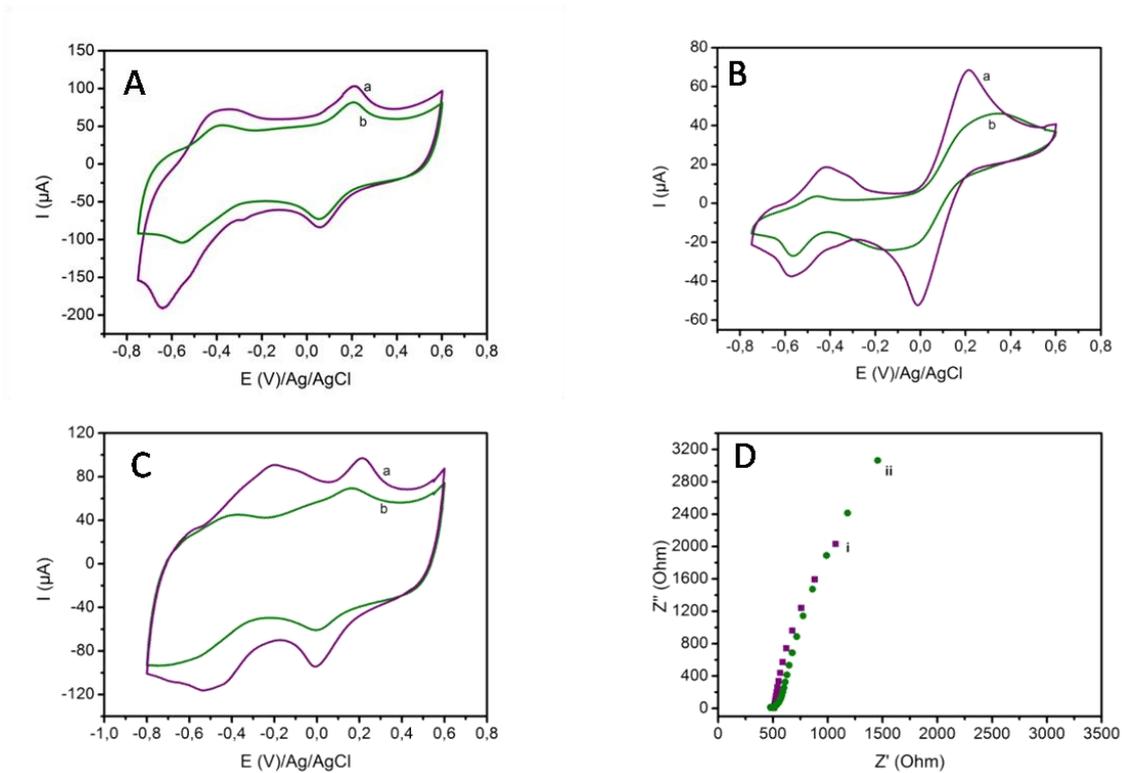


Figure 2.14. Courbes voltampérométriques (A) SPCE/MoS₂/PPy/EDA/NQ/APT (B) SPCE/MoS₂/Cyst/NQ/APT et (C) SPCE/PPy/EDA/NQ/APT (D) Diagrammes d'impédance en

représentation de Nyquist pour une gamme de fréquence de 0,1 Hz à 100 kHz à un potentiel $E=+0,2$ V ; obtenues en présence de 5 mM d'une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ (a) avant et (b) après immobilisation de l'aptamère

2.5. Performances analytiques des biocapteurs

2.5.1. Biodétection de l'AMP

2.5.1.1. Mise en évidence de l'interaction Aptamère-cible

L'examen par AFM d'une zone définie de l'électrode biofonctionnalisée (**Figure 2.15.A**) a montré après incubation dans une solution d'ampicilline, qu'il y a eu un changement de la morphologie de la surface en une structure globulaire (**Figure 2.15.B**). Cette modification de la surface a mis en évidence les interactions spécifiques entre l'aptamère et son analyte cible (AMP).

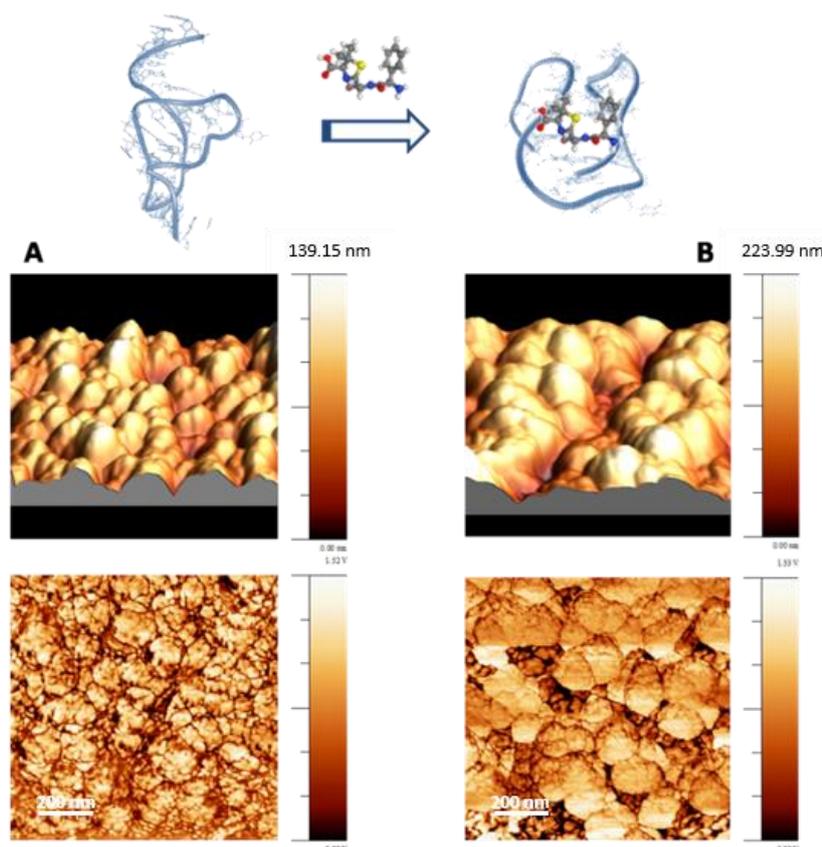


Figure 2.15. Images AFM de la bioelectrode (A) avant et (B) après interaction avec AMP

2.5.1.2. Détection ampérométrique de l'ampicilline

Nous avons eu recours à la voltammétrie à vagues carrées (SWV) pour étudier les performances analytiques du biocapteur car cette technique est précise et sensible et permet de s'affranchir des courants capacitifs. Dans les conditions optimisées, on remarque que

l'incubation de la bioélectrode dans des solutions contenant différentes concentrations de l'AMP provoque la diminution de l'intensité du pic anodique au fur et à mesure que la concentration de l'analyte cible augmente de 50 fg.mL^{-1} à 250 fg.mL^{-1} (**Figure 2.16.A**).

La diminution progressive du courant d'oxydation de NQ en présence d'AMP peut être justifiée par la formation d'un complexe d'affinité aptamère-cible qui affecte le processus de transfert de charge vers la surface active d'électrode. Ceci s'explique probablement par l'effet bloquant engendré par le complexe ou une structure sous forme de boucle ou G-quadruplex qui empêche la diffusion des ions et engendre une diminution du transfert électronique vers la surface. Par conséquent, plus la concentration de l'analyte à détecter est élevée plus cet effet est prononcé ce qui induit ainsi une chute importante du courant.

La **Figure 2.16.D** montre que la réponse du biocapteur hybride ΔI (où $\Delta I = I_0 - I$; I_0 et I sont les courants enregistrés, respectivement, avant et après incubation de la bioélectrode dans la solution d'AMP) varie linéairement avec le logarithme de la concentration de la cible dans le domaine de concentrations compris entre 50 et 250 fg.mL^{-1} avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$ et une limite de détection de 10 fg.mL^{-1} (30 fM), valeur calculée à partir des formules $3 \times s/m$ et où 's' est l'écart type du courant correspondant à 3 mesures de la plus faible concentration que la biopuce a détectée et 'm' la pente de la courbe d'étalonnage. Pour toutes ces expériences, une très bonne reproductibilité est observée avec un faible écart type. Pour mettre en valeur la contribution du composite MoS_2/PPY dans la conception du biocapteur, des expériences de contrôle dans les mêmes conditions expérimentales ont été effectuées sur des plateformes modifiées par les nanofeuilles de MoS_2 (**Figure 2.16.B**) et le film PPy (**Figure 2.16.C**) séparément. Ainsi on peut noter une diminution de la gamme de concentration ce qui a pour effet d'augmenter la limite de détection des biocapteurs (**tableau 2.2**).

Ces résultats s'expliquent par le fait que le composite MoS_2/PPy a contribué à l'amélioration du transfert d'électron entre la sonde redox NQ et la surface de l'électrode tout en fournissant une surface spécifique plus grande.

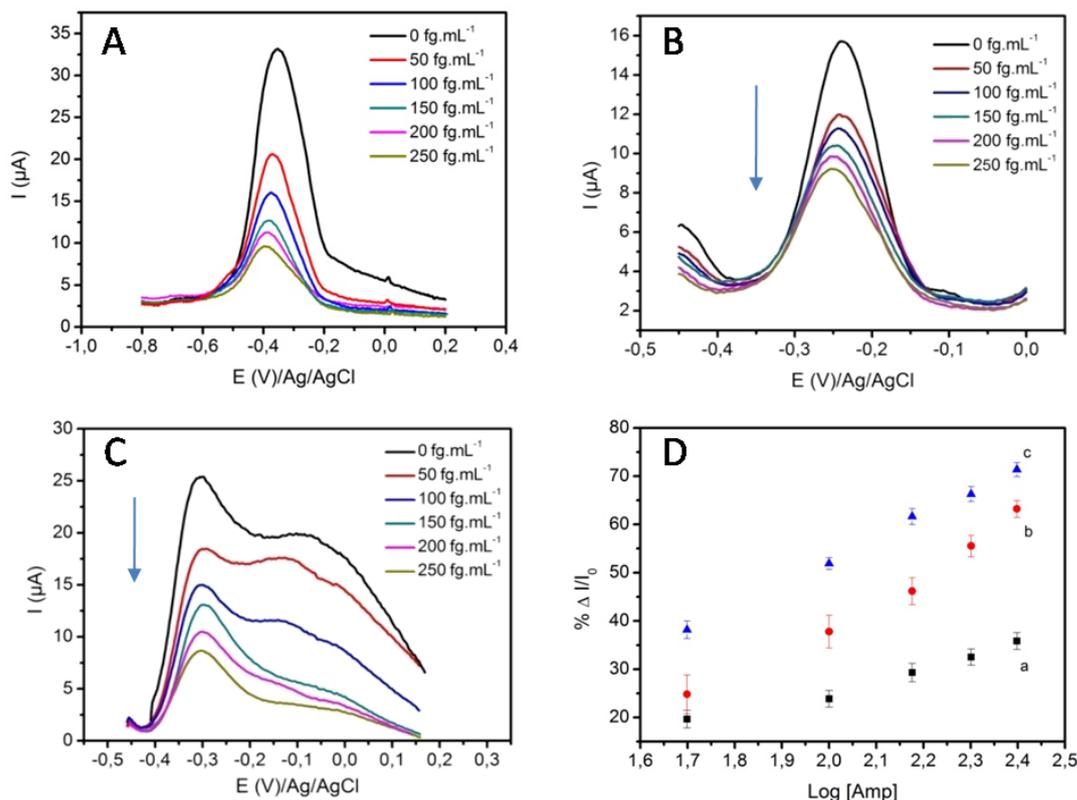


Figure 2.16. Courbes voltampérométriques obtenues par SWV du biocapteur (A) SPCE/MoS₂/PPy/EDA/NQ/APT (B) SPCE/MoS₂/Cyst/NQ/APT et (C) SPCE/PPy/EDA/NQ/APT; avant et après incubation dans différentes concentrations d'AMP dans une solution de PBS 0,01 M à pH = 7,4. (D) Courbes d'étalonnage de la biopuce affichant la variation de sa réponse en courant (ΔI) en fonction du log des différentes concentrations d'AMP : (a) SPCE/MoS₂/Cyst/NQ/APT (b) SPCE/PPy/EDA/NQ/APT et (c) SPCE/MoS₂/PPy/EDA/NQ/APT

Tableau 2.2. Comparaison du LOD et de la gamme dynamique des différents biocapteurs à base de MoS₂, PPy et MoS₂/PPy

Plateforme	LOD (fg.mL ⁻¹)	Gamme dynamique
MoS ₂	66.51	100-250
PPy	71.53	100-250
MoS ₂ / PPy	10.69	50-250

La reproductibilité a été étudiée en prenant en considération trois biocapteurs fraîchement préparés, par la suite l'écart type relatif (RSD) a été calculé pour les trois plateformes développées. Une bonne reproductibilité est observée avec un (RSD) de 1.78% pour la

plateforme MoS₂ qui doit sa stabilité en solution aqueuse aux forces Van Der Waals. En revanche, les polymères conducteurs tels que le film PPy sont moins stables au cours du temps car ces derniers sont susceptibles de subir une dégradation irréversible (suroxydation). Les polymères suroxydés perdent leurs propriétés, par exemple ; conductivité, conduisant ainsi à un RSD plus élevé 2.83%. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que la combinaison de ces deux matériaux confère au biocapteur à base de MoS₂ /PPy une conductivité et une stabilité améliorées d'où une bonne reproductibilité avec un RSD calculé de 1.54%.

2.5.2. Sélectivité

Pour vérifier la fiabilité du biocapteur, il est crucial de tester sa réponse en présence d'interférents dans les conditions optimales d'analyse. Pour cela, la sélectivité des différentes plateformes développées au cours de ce travail a été évaluée en présence de différents interférents tels que : pénicilline (PEN), l'amoxicilline (AMX) et lévofloxacine (LEVO) (**Figure 2.17**). Ces composés ont été sélectionnés en se basant sur le fait qu'ils possèdent des squelettes carbonés proches et qu'ils peuvent coexister dans le même environnement.

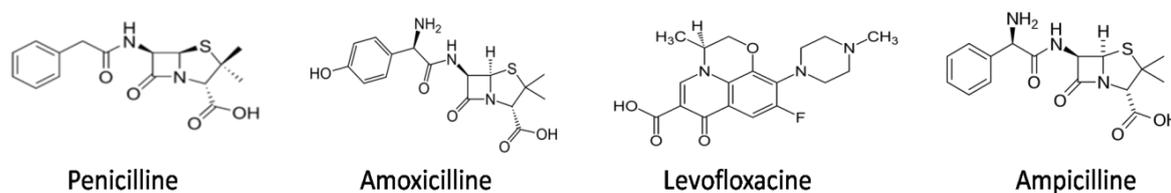


Figure 2.17. Structure de l'ampicilline et les interférents utilisés

Nous avons ensuite comparé la réponse des biocapteurs à celles obtenues lors de l'incubation en excès dans des solutions contenant les interférents mentionnés précédemment (concentration 10 fois supérieure à celle de l'AMP (50 fg.mL⁻¹). Les résultats obtenus à partir de SWV sont représentés en histogramme (**Figure 2.18**). Ce dernier indique que la bioélectrode de MoS₂ présente une bonne sélectivité vis-à-vis de la pénicilline et l'amoxicilline (**Figure 2.18.A**) tandis que la plateforme à base de PPy était plus sélective envers la lévofloxacine (**Figure 2.18.B**). D'autre part, le biocapteur hybride MoS₂ /PPy a révélé une excellente sélectivité pour tous les interférents (**Figure 2.18.C**), ceci montre que l'association du MoS₂ avec le PPy a contribué à l'amélioration de la sélectivité du biocapteur. Ces résultats confirment donc que le biocapteur hybride peut être utilisé pour la détection de l'analyte cible avec une haute sélectivité.

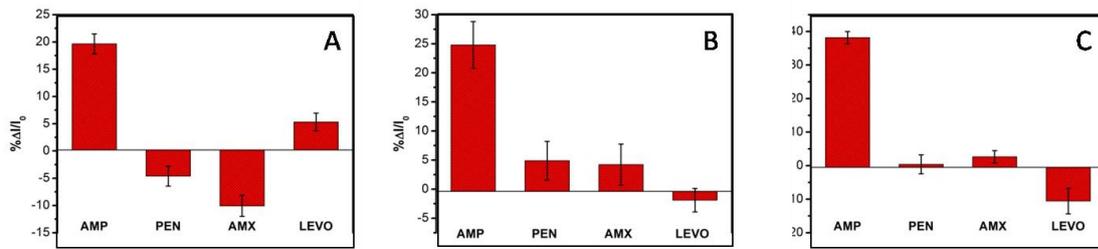


Figure 2.18. Histogramme représentant les réponses en courant (ΔI) des biocapteurs (A) Carbone/MoS₂/Cyst/NQ/APT (B) Carbone/PPy/EDA/NQ/APT et (C) Carbone/MoS₂/PPy/EDA/NQ/APT en présence des différents interférents

2.5.3. Application : Détection de l'ampicilline dans des échantillons réels

La performance pratique du dispositif analytique développé à base de MoS₂/PPy a été évaluée par la détermination de l'ampicilline dans des échantillons d'eau prélevés dans la rivière la plus polluée de Tunisie (Beja), en utilisant la méthode des ajouts dosés. Les échantillons récupérés ont été analysés par HPLC et spectrométrie de masse afin de vérifier toute absence de l'analyte cible (**Figure 2.19**).

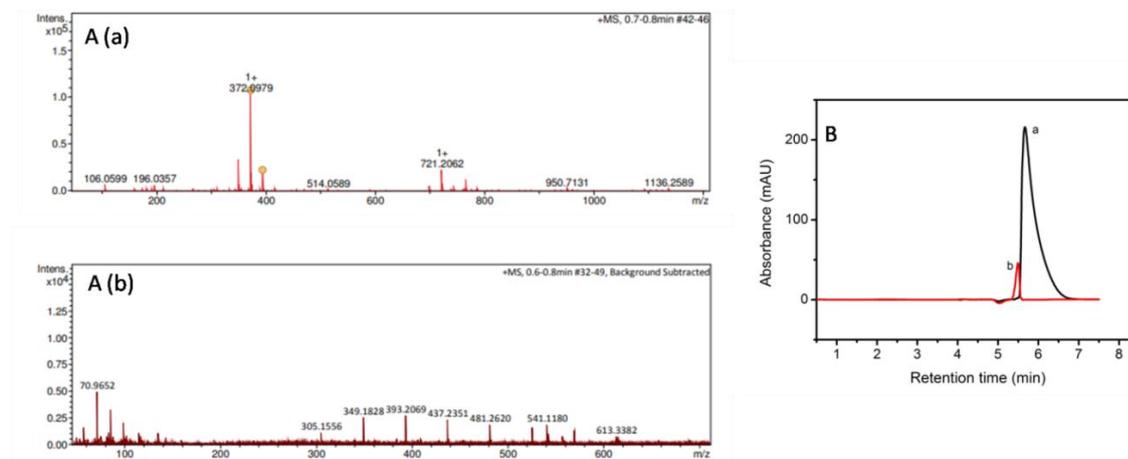


Figure 2.19. (A) Spectre de masse et (B) HPLC de (a) solution d'AMP, (b) échantillon de la rivière

Les échantillons ont été dopés avec différentes concentrations d'AMP de 50 à 250 fg.mL⁻¹. Par la suite le biocapteur a été incubé dans les solutions préparées. L'expérience a été répétée 3 fois ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage et comparer les résultats à ceux obtenus lors de l'incubation du biocapteur dans le PBS (**Figure 2.20**).

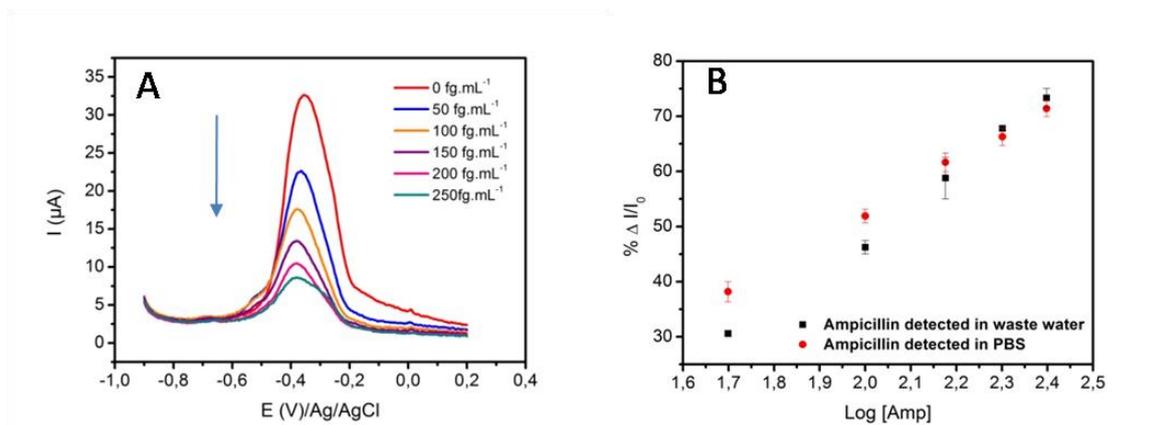


Figure 2.20. (A) Courbes voltampérométriques obtenues par SWV du biocapteur (Carbone/MoS₂/PPy/EDA/NQ/APT ; avant et après incubation dans différentes concentrations d'AMP et (B) Courbes d'étalonnage de la biopuce affichant la variation de sa réponse en courant (ΔI) en fonction du log des différentes concentrations d'AMP comparé aux résultats obtenus lors de la détection de la cible dans la solution tampon

Le **tableau 2.3** présente les taux de recouvrement qui ont été calculés en comparant les concentrations trouvées (T) dans les échantillons après ajout de l'AMP avec les concentrations réelles (R) (nulles) et ajoutées (A). Les résultats montrent un léger effet de la matrice pour les faibles concentrations mais pratiquement pas d'influence sur l'efficacité analytique du biocapteur. Il est à noter qu'aucun traitement préalable n'a été effectué sur les échantillons réels.

Le RSD est inférieur à 5% ce qui confirme la fiabilité de la méthode proposée et qu'elle peut donc être appliquée pour le dosage de l'ampicilline dans l'environnement.

Tableau 2.3. Détermination de l'AMP dans les échantillons d'eaux usées avec le biocapteur hybride

Echantillon	[AMP] _{ajoutée}	[AMP] _{trouvée}	Taux de recouvrement(%)
1	50	40 ±0.48	80 %
2	100	89.2±1.23	89.2 %
3	150	143.1 ±3.75	95.4 %
4	200	204.5 ±0.33	102.3%
5	250	256.7 ±1.7	102.7 %

2.5.4. Comparaison avec la littérature

Le **tableau 2.4** rassemble les performances analytiques du biocapteur hybride développé et ceux des travaux rapportés dans la littérature pour la détection de l'AMP avec diverses électrodes modifiées. Nos résultats montrent que cette biopuce présente des performances satisfaisantes en termes de limite de détection, de gamme dynamique avec une haute sélectivité envers l'analyte cible compte tenu de la plupart des travaux précédemment publiés. Les travaux de Yan et al. [29] montrent une limite de détection plus faible, néanmoins les matériaux utilisés restent relativement coûteux et ne sont pas simples à synthétiser en comparaison des matériaux utilisés dans notre travail.

Tableau 2.4. Les performances analytiques de quelques biocapteurs d'AMP rapportés dans la littérature

Electrodes	Méthode	Gamme dynamique	LOD	Références
GCE/AuNPs	Electrochimique: DPV	0.1-100nM	32pM	Wang et al. [30]
PEDOT:TsO/PEDOT-OH:TsO bilayer	Electrochimique: EIS	100pM-1mM	100pM	Daprà et al. [31]
ITO/BiFeO ₃ /utg-C ₃ N ₄	Photoelectrochimique	1 pM - 1 μM	0.33 pM	Ge et al.[1]
ITO/Zn _x Co _{3-x} O ₄ /N-GQDs/AgBiS ₂	Photoelectrochimique	0.5pM – 10 nM	0.25 pM	Yan et al.[29]
Carbone/MoS ₂ /PPy	Electrochimique: SQW	0.143-0.715 pM	0.03 pM	Notre contribution

GCE: Electrode de carbone vitreux, AuNPs : nanoparticules d'or, PEDOT:TsO ; tosylate doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT-OH:TsO :hydroxymethyl derivative, ITO: indium-tin-oxide, Nanoparticules BiFeO₃ de type p, utg-C₃N₄ : nanofeuilles de carbon nitride de type n, N-GQDs : Nitrogen doped graphene quantum dots, Zn_xCo_{3-x}O₄ ; oxide bimetallique

3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis au point une stratégie couche par couche pour la conception de différents biocapteurs à base de nanofeuilles de MoS₂, film PPy et le composite MoS₂/PPy afin de mettre en évidence l'effet de ces nanomatériaux sur les performances analytiques des

dispositifs développés. Comme application, nous nous sommes intéressés à la détection de l'ampicilline, qui est considéré comme un antibiotique à large spectre très utilisé et peut se trouver dans les eaux usées. Les études ont montré que l'architecture unique de MoS₂/PPy offre une grande surface électroactive et une activité électrocatalytique qui a contribué à l'amélioration des performances électrochimiques. Une sonde redox NQ a été synthétisée au cours de ce travail afin de servir à la fois : comme un échafaudage pour l'immobilisation de l'aptamère à la surface des nanomatériaux et pour le suivi de la réaction de biorecognition. Le biocapteur à base de l'hybride MoS₂/PPy a montré des performances analytiques satisfaisantes et une meilleure sélectivité vis-à-vis de l'ampicilline par rapport aux autres plateformes. De plus, l'exploitation de ce système pour la détection de l'AMP dans des échantillons prélevés d'une rivière a révélé son applicabilité pour l'identification de polluants dans les milieux complexes.

Références bibliographiques du Chapitre 2

- [1] L. Ge, Y. Xu, L. Ding, F. You, Q. Liu, K. Wang, Perovskite-type BiFeO₃/ultrathin graphite-like carbon nitride nanosheets p-n heterojunction: Boosted visible-light-driven photoelectrochemical activity for fabricating ampicillin aptasensor, *Biosensors and Bioelectronics*. 124–125 (2019) 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.093>.
- [2] A. Fernández-González, R. Badía, M.E. Díaz-García, Micelle-mediated spectrofluorimetric determination of ampicillin based on metal ion-catalysed hydrolysis, *Analytica Chimica Acta*. 484 (2003) 223–231. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00329-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00329-5).
- [3] K.-F. Kong, L. Schneper, K. Mathee, Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology, *APMIS*. 118 (2010) 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>.
- [4] I.Y. Mahmoud, S.N. Al-Bahry, S.K. Al-Musharafi, Fresh Water Habitat Pollution by Treated Sewage Effluent in Relation to Multiple-Antibiotic-Resistant Bacteria, *APCBEE Procedia*. 5 (2013) 363–367. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2013.05.062>.
- [5] European Union Council Regulation No. 2377/90.
- [6] K. Xie, L. Jia, D. Xu, H. Guo, X. Xie, Y. Huang, X. Chen, W. Bao, G. Dai, J. Wang, Simultaneous Determination of Amoxicillin and Ampicillin in Eggs by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection using Pre-Column Derivatization, *J Chromatogr Sci*. 50 (2012) 620–624. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms052>.
- [7] K. Sparbier, S. Schubert, U. Weller, C. Boogen, M. Kostrzewa, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics, *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (2012) 927–937. <https://doi.org/10.1128/JCM.05737-11>.
- [8] C. Andreou, R. Mirsafavi, M. Moskovits, C.D. Meinhardt, Detection of low concentrations of ampicillin in milk, *Analyst*. 140 (2015) 5003–5005. <https://doi.org/10.1039/C5AN00864F>.

- [9] B. Rezaei, N. Irannejad, Chapter 2 - Electrochemical detection techniques in biosensor applications, in: A.A. Ensafi (Ed.), *Electrochemical Biosensors*, Elsevier, 2019: pp. 11–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4>.
- [10] P.S. Guin, S. Das, P.C. Mandal, Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review, *International Journal of Electrochemistry*. 2011 (2011) 1–22. <https://doi.org/10.4061/2011/816202>.
- [11] M.M. Villalba, V.J. Litchfield, R.B. Smith, A.M. Franklin, C. Livingstone, J. Davis, A chromatographic tool for preparing combinatorial quinone–thiol conjugate libraries, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70 (2007) 797–802. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.04.008>.
- [12] X.H. Zhang, , C. Wang, , M.Q. Xue, B.C. Lin, X. Ye, W.N. Lei, Hydrothermal synthesis and characterization of ultrathin MoS₂ nanosheets , *Chalcogenide Letters*. 13 (2016) 27-34.
- [13] D. Sahoo, B. Kumar, J. Sinha, S. Ghosh, S.S. Roy, B. Kaviraj, Cost effective liquid phase exfoliation of MoS₂ nanosheets and photocatalytic activity for wastewater treatment enforced by visible light, *Scientific Reports*. 10 (2020) 10759. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67683-2>.
- [14] H. Li, Q. Zhang, C.C.R. Yap, B.K. Tay, T.H.T. Edwin, A. Olivier, D. Baillargeat, From Bulk to Monolayer MoS₂: Evolution of Raman Scattering, *Advanced Functional Materials*. 22 (2012) 1385–1390. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102111>.
- [15] C. Lee, H. Yan, L.E. Brus, T.F. Heinz, J. Hone, S. Ryu, Anomalous Lattice Vibrations of Single- and Few-Layer MoS₂, *ACS Nano*. 4 (2010) 2695–2700. <https://doi.org/10.1021/nn1003937>.
- [16] P.K. Rastogi, S. Sarkar, D. Mandler, Ionic strength induced electrodeposition of two-dimensional layered MoS₂ nanosheets, *Applied Materials Today*. 8 (2017) 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.04.004>.
- [17] X. Du, X. Hao, Z. Wang, X. Ma, G. Guan, A. Abuliti, G. Ma, S. Liu, Highly stable polypyrrole film prepared by unipolar pulse electro-polymerization method as electrode for

electrochemical supercapacitor, *Synthetic Metals*. 175 (2013) 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2013.05.013>.

[18] Zoski, C. G. C. *Handbook of Electrochemistry*; Elsevier, Ed.; 2007; Vol. 5.

[19] A. Miodek, N. Mejri-Omrani, R. Khoder, H. Korri-Yousoufi, Electrochemical functionalization of polypyrrole through amine oxidation of poly(amidoamine) dendrimers: Application to DNA biosensor, *Talanta*. 154 (2016) 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.076>.

[20] M. Haddaoui, C. Sola, N. Raouafi, H. Korri-Yousoufi, E-DNA detection of rpoB gene resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in real samples using Fe₃O₄/polypyrrole nanocomposite, *Biosens Bioelectron*. 128 (2019) 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.045>.

[21] Y. Chen, W. Ma, K. Cai, X. Yang, C. Huang, In Situ Growth of Polypyrrole onto Three-Dimensional Tubular MoS₂ as an Advanced Negative Electrode Material for Supercapacitor, *Electrochimica Acta*. 246 (2017) 615–624. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.06.102>.

[22] M. Lian, X. Wu, Q. Wang, W. Zhang, Y. Wang, Hydrothermal synthesis of Polypyrrole/MoS₂ intercalation composites for supercapacitor electrodes, *Ceramics International*. 43 (2017) 9877–9883. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.04.171>.

[23] X. Lu, Y. Lin, H. Dong, W. Dai, X. Chen, X. Qu, X. Zhang, One-Step Hydrothermal Fabrication of Three-dimensional MoS₂ Nanoflower using Polypyrrole as Template for Efficient Hydrogen Evolution Reaction, *Scientific Reports*. 7 (2017) 42309. <https://doi.org/10.1038/srep42309>.

[24] H. Wang, N. Leukosol, Z. He, G. Fei, C. Si, Y. Ni, Microstructure, distribution and properties of conductive polypyrrole/cellulose fiber composites, *Cellulose*. 20 (2013) 1587–1601. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9945-z>.

[25] C.P. Fonseca, D.A. de L. Almeida, M.C.D. de Oliveira, M.R. Baldan, N.G. Ferreira, Influence of the polymeric coating thickness on the electrochemical performance of Carbon Fiber/PAni composites, *Polímeros*. 25 (2015) 425–432. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1804>.

- [26] R. Gusmão, Z. Sofer, M. Pumera, Functional Protection of Exfoliated Black Phosphorus by Noncovalent Modification with Anthraquinone, *ACS Nano*. 12 (2018) 5666–5673. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01474>.
- [27] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusion less electrochemical system, *J. Electroanal. Chem. Interfacial.electrochemistry*, 1979,101, 19-25..
- [28] A. Hammami, R. Sahli, N. Raouafi, Indirect amperometric sensing of dopamine using a redox-switchable naphthoquinone-terminated self-assembled monolayer on gold electrode, *Microchim Acta*. 183 (2016) 1137–1144. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1739-6>.
- [29] T. Yan, X. Zhang, X. Ren, Y. Lu, J. Li, M. Sun, L. Yan, Q. Wei, H. Ju, Fabrication of N-GQDs and AgBiS₂ dual-sensitized ZIFs-derived hollow Zn_xCo_{3x}O₄ dodecahedron for sensitive photoelectrochemical aptasensing of ampicillin, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 320 (2020) 128387. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128387>.
- [30] T. Wang, H. Yin, Y. Zhang, L. Wang, Y. Du, Y. Zhuge, S. Ai, Electrochemical aptasensor for ampicillin detection based on the protective effect of aptamer-antibiotic conjugate towards DpnII and Exo III digestion, *Talanta*. 197 (2019) 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.010>.
- [31] J. Daprà, L.H. Lauridsen, A.T. Nielsen, N. Rozlosnik, Comparative study on aptamers as recognition elements for antibiotics in a label-free all-polymer biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*. 43 (2013) 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.058>.

**Chapitre 3 – Biocapteur à base
de l'ADNzyme et du composite
MoS₂/PPy pour la détection du
Pb²⁺**

1. Introduction

Le plomb est relativement abondant dans la croûte terrestre. Comme pour les micropolluants, la présence de ce composé dans l'environnement est considérée comme un problème écologique majeur. Son extraction et son utilisation ont commencé durant l'antiquité mais ont augmenté de façon spectaculaire durant la révolution industrielle. Ce dernier est toujours utilisé dans les peintures, les canalisations d'eau ou dans l'essence. Ces sources en font un polluant très répandu dans l'air, les sols et en particulier dans le milieu aquatique naturel. Cette exploitation intensive a entraîné la relargage intense de ce métal non biodégradable et par conséquent son accumulation massive dans l'environnement [1]. Sa biodisponibilité, engendrée par ses nombreuses formes organiques comme inorganiques, solubles en font un important contaminant des eaux et finit par être une menace pour l'homme.

L'intoxication par le plomb est généralement appelée saturnisme [2]. Le plomb peut pénétrer dans l'organisme humain par inhalation ou par ingestion. L'intoxication est le plus souvent chronique ; l'intoxication aiguë est plus rare et ne survient que dans le cas d'une ingestion massive. L'intoxication chronique endommage le système nerveux central, le squelette osseux, le système circulatoire, le système enzymatique, le système endocrinien et le système immunitaire [2].

Ce n'est qu'en découvrant la toxicité de ce métal lourd à l'origine du saturnisme que les législations se sont mises à interdire son utilisation dans les canalisations d'eau. En France, il est proscrit d'installer des canalisations en plomb depuis 1995. Une législation visant la limitation de la teneur du plomb dans l'eau de consommation a été mise en place dans un cadre national, européen [3] ou dans celui plus large des conventions internationales notamment à travers les recommandations (Guidelines for Drinking-water Quality) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [4]. En effet, la teneur maximale préconisée par l'OMS dans les eaux de consommation a été fixée à $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

Il est donc indispensable de mettre au point des méthodes analytiques fiables, sensibles et rapides pour la détection de Pb(II). On peut citer quelques méthodes rapportées dans la littérature comme la spectrométrie d'absorption atomique [5], et la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif [6] qui ont été utilisées pour ces fins. Cependant, ces techniques sont coûteuses, complexes et ne conviennent qu'à l'analyse en laboratoire. Par conséquent, il est nécessaire de développer des méthodes alternatives pour surmonter ces lacunes. Dans ce

contexte, les biocapteurs basés sur l'ADNzyme dépendants de Pb^{2+} ont été largement exploités en raison de leur spécificité [7].

C'est autour de cette problématique que nous nous sommes intéressés à la conception d'un système d'alerte qui va permettre la détection du plomb à l'état de trace. Le biocapteur proposé est basé sur l'ADNzyme qui peut s'hydrolyser en présence de l'ion plomb. Notre stratégie repose sur l'utilisation d'un intercalant acridine-ferrocène présentant l'avantage de combiner les propriétés redox du ferrocène et les propriétés d'intercalation de l'acridine dans le double brin d'ADN pour former un intercalant à ADN aux propriétés redox qui va permettre le suivi de la réaction d'hydrolyse. Le biocapteur est formé sur une surface modifiée avec le nanomatériau MoS_2/PPy et le système analytique est étudié pour détecter la cible sur une large gamme de concentrations. Le dispositif analytique sera par la suite testé en présence de quelques interférents qui risquent de coexister avec la cible afin de s'assurer de sa grande sélectivité. Il sera enfin utilisé pour la détection de Pb^{2+} dans des échantillons réels. Des essais préliminaires ont été réalisés dans l'objectif d'intégrer le biocapteur dans des dispositifs microfluidiques présentant ainsi une voie intéressante pour l'obtention d'un signal ON.

2. Biocapteur à base de composite MoS_2/PPy pour la détection le Pb^{2+}

2.1. Synthèse de la sonde redox intercalante

2.1.1. Acridine

L'intercalation se produit lorsque des ligands de taille et de natures chimiques appropriées s'insèrent entre des paires de bases pyrimidiniques et puriniques de l'ADN. Les intercalants d'ADN sont très utilisés dans le traitement chimiothérapeutique pour inhiber la réplication de l'ADN dans les cellules cancéreuses à croissance rapide on peut citer comme exemple la doxorubicine [8]. Ces molécules sont pour la plupart polycycliques, aromatiques et plans formant une plateforme d'une taille équivalente aux paires de bases de l'ADN (**Figure 3.1**). Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'acridine comme intercalant d'ADN en raison de sa stabilité et sa fonctionnalisation relativement aisée [9].

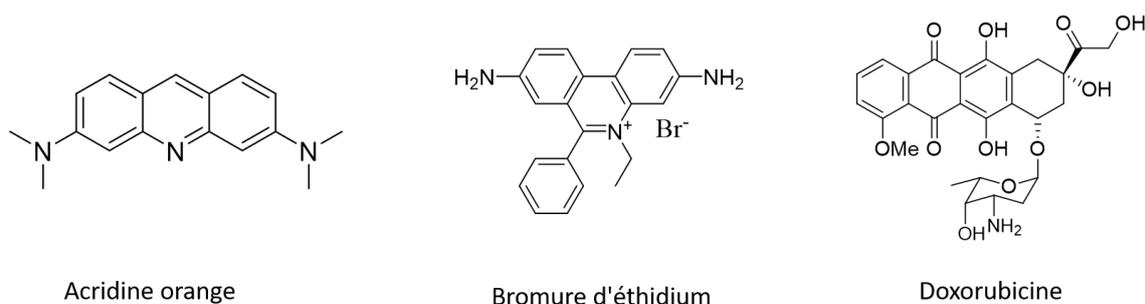


Figure 3.1. Quelques exemples d'agents intercalant d'ADN

2.1.2. Ferrocène

Le ferrocène est une excellente sonde redox vu sa stabilité chimique et électrochimique [10]. Ce dernier représente un système modèle en électrochimie [11]. Il subit un transfert monoélectronique réversible ou quasi-réversible et rapide et a lieu sans variation structurale car l'ion ferrocenium, formé par oxydation du ferrocène, est très stable même en présence de groupes nucléophiles [12].

2.1.3. Intercalant acridine-ferrocène

L'acridine-ferrocène (Acr-Fc) est une molécule synthétisée exclusivement dans ce travail dans l'objectif de combiner les propriétés intéressantes des réactifs de départ pour former un intercalant à ADN aux propriétés redox. Le **schéma 3.1** présente la voie de synthèse adoptée pour la synthèse de l'intercalant redox.

D'un point de vue mécanistique, la première étape consiste à la formation d'une imine en faisant réagir le ferrocène monoaldehyde (2) sur une acridine amine (1), en présence de quelques gouttes d'acide acétique afin d'augmenter l'électrophilie de l'atome de carbone du groupe carbonyle par protonation. La réaction est favorisée par l'élimination de l'eau du milieu au fur et à mesure de la formation de base de Schiff. L'insertion directe du NaBH_4 réduit sélectivement les imines en amines correspondants en présence d'un solvant organique protique polaire anhydre (le méthanol absolu MeOH abs) à 0°C suivi d'une hydrolyse du milieu à température ambiante avec de l'eau distillée, selon la réaction suivante. Le protocole expérimental ainsi que la caractérisation par RMN sont détaillés dans la partie expérimentale.

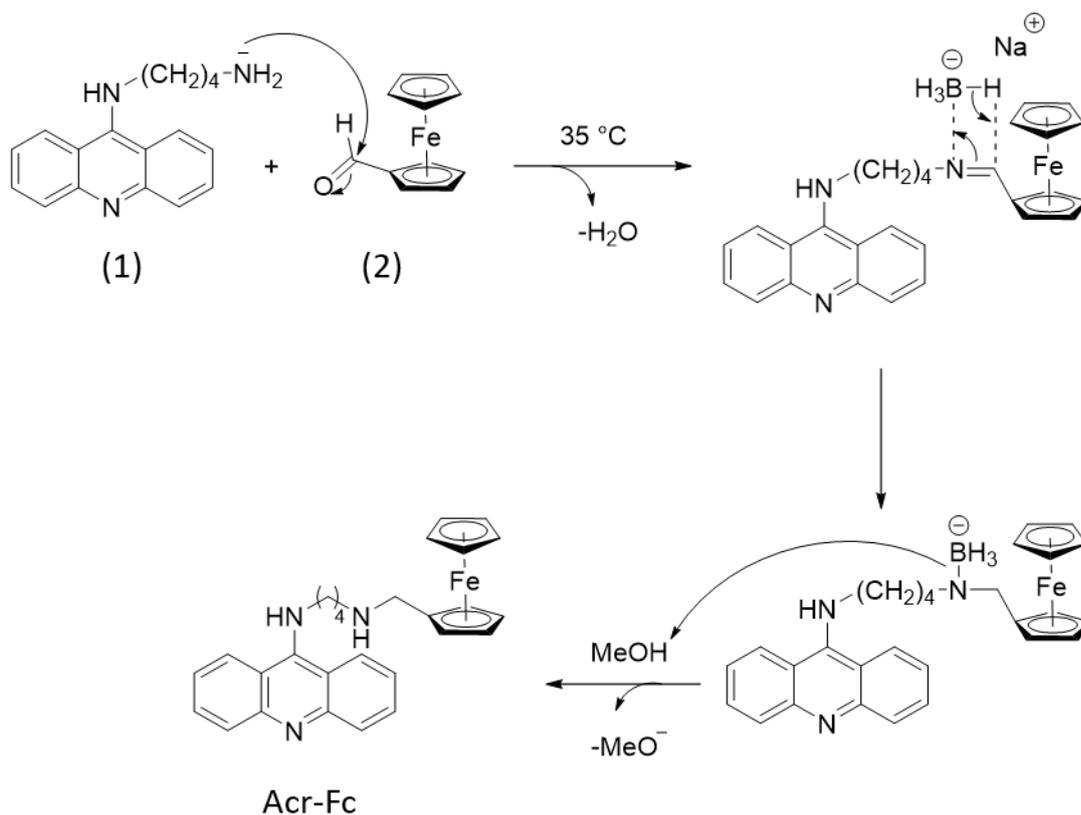


Schéma 3.1. Voie de synthèse de l'intercalant Acr-Fc

2.2. Elaboration du biocapteur

Une électrode imprimée de carbone (SPCE) a été utilisée comme substrat subissant des modifications successives pour la conception du biocapteur. La nanostructuration par les nanomatériaux a été réalisée suivant la méthode utilisée dans le chapitre précédent. Afin d'apporter des fonctions organiques à la surface nous avons opté pour un acide aminé ; la glycine qui va se fixer sur le polypyrrole par électrodéposition et servira par la suite comme un échafaudage pour l'immobilisation covalente de l'ADNzyme. Par la suite, l'électrode modifiée est incubée dans une solution contenant l'ADNzyme, son substrat et la sonde redox. Au fur et à mesure que l'ADNzyme s'hybride avec le substrat, la sonde redox interagit avec l'ADN hybridé pour s'intercaler entre ses bases. L'ADNzyme utilisé dans ce travail possède une terminaison aminoalkyl en position 5' (voir tableau Partie expérimentale) ce qui va permettre sa fixation covalente en réagissant avec les acides carboxyliques libres se trouvant à la surface de l'électrode. Après greffage, la surface modifiée de la bioélectrode est rincée soigneusement avec l'eau ultrapure puis séchée sous un flux de N_2 . L'ensemble des étapes mises en jeu pour l'élaboration de la biopuce est schématisé ci-dessous (**Schéma 3.2**).

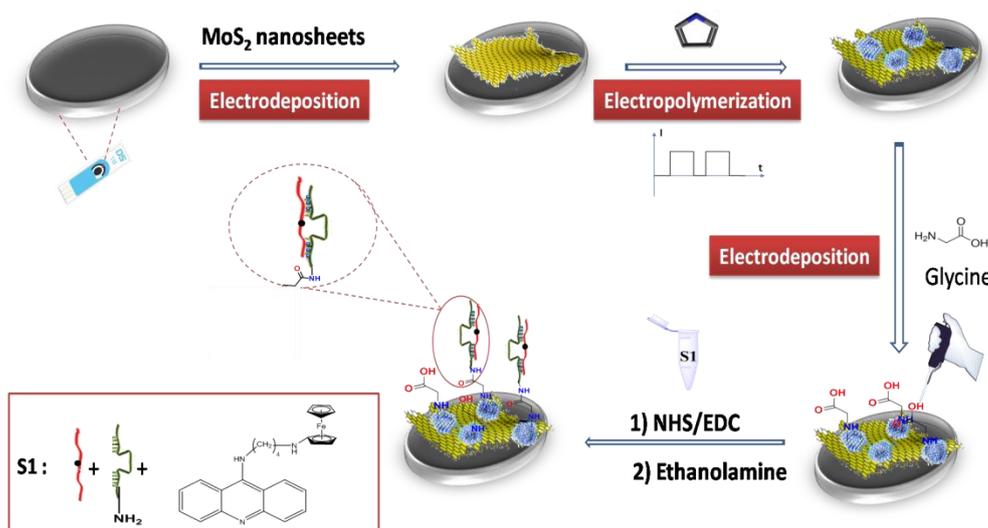


Schéma 3.2. Représentation schématique des différentes étapes pour le développement du biocapteur du plomb

2.2.1. Contrôle et vérification de la méthode proposée

Deux expériences de contrôle ont été effectuées afin de prouver la faisabilité de la stratégie proposée au cours de ce travail. Le premier test a été conduit dans l'objectif de montrer que le signal du ferrocène enregistré par VC provient de l'Acr-Fc qui est intercalé entre les bases de l'ADN et non pas suite à son adsorption à la surface de l'électrode (**Figure 3.2.A**). Pour ce faire, deux électrodes ont été utilisées ; la première électrode est incubée dans la solution S1 contenant l'intercalant, l'ADNzyme et le substrat comme décrit précédemment, et la deuxième électrode est mise en contact avec la solution S2 qui contient l'intercalant redox et l'ADNzyme sans le substrat. Après réaction les électrodes sont rincées pour enlever les molécules non attachées et analysées par VC. La **Figure 3.2.A** (courbe bleue (c)) montre après la réaction avec la solution S1 la présence d'un signal redox attribué à la réponse du ferrocène dont le pic d'oxydation situé à un potentiel de ($E_{pa} = + 295$ mV) et à la réduction à un potentiel de ($E_{pc} = + 180$ mV). Ce signal est obtenu seulement en cas de présence de DNAzyme et son substrat (S1). Pour l'électrode incubée dans la solution S2, le signal du ferrocène n'est pas observé (courbe rouge (b)). Ce résultat représente une preuve de la réussite de la stratégie intercalation de l'Acr-Fc et montre que d'une part l'intercalation ne se fait que sur le double brin d'ADN et d'autre part, le composé Acr-Fc ne s'adsorbe pas sur la surface de l'électrode $MoS_2/PPy/Gly$.

La deuxième expérience concerne l'immobilisation de l'ADNzyme et l'intercalation à faire en 2 étapes ou une seule étape. La **figure 3.2.B** montre les résultats de VC obtenus avec deux électrodes. On constate d'après ces résultats que les deux approches permettent l'intercalation

de l'Acr-Fc. Par ailleurs, un signal redox plus réversible avec un faible courant capacitif est obtenu lorsque la réaction est faite en une seule étape (courbe rouge (a)). La séparation de l'étape de l'immobilisation et de l'intercalation de l'ADN aboutit à un courant capacitif important et un signal très large (courbe noire (b)) qui montre probablement que les intercalants redox ne sont pas tous dans le même environnement. L'intercalation de l'acridine dans l'ADN double brin est connue pour se produire dans le grand sillon dans le plan parallèle à l'axe de l'ADN [13]. Dans ce cas, on peut supposer que l'Acr-Fc est probablement aussi intercalé dans le petit sillon de l'ADN (voir **Figure 3.2.C**) ce qui peut affecter l'environnement électronique du ferrocène attaché à l'acridine d'où l'obtention d'un large signal redox.

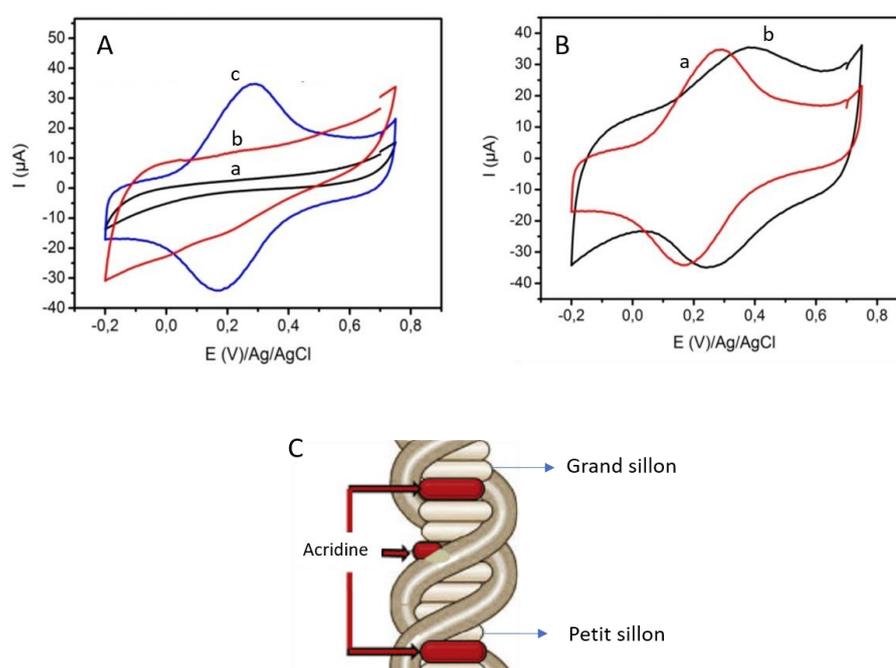


Figure 3.2. (A) Voltammogrammes cycliques de l'électrode modifiée après incubation dans S1 et S2 ; (B) Voltammogrammes cycliques de l'électrode après la formation de la biocouche ; (C) Représentation schématique de l'intercalation de l'acridine dans le petit et grand sillon de l'ADN

2.2.2. Optimisation du temps de la formation de la biocouche

L'immobilisation covalente de l'ADNzyme hybridé ainsi que l'intercalation contrôlée de ligands électroactives sont nécessaires pour la conception d'un biocapteur ayant de bonnes performances analytiques. Il est donc important d'optimiser le temps nécessaire pour assurer l'ensemble des réactions qui se produisent pendant cette étape : i) l'hybridation de l'ADNzyme avec son substrat, ii) l'intercalation de la sonde redox entre les bases de l'ADN et iii) enfin la réaction de la fonction amine présente à l'extrémité 5' de l'ADNzyme avec la

fonction acide carboxylique libre provenant de la glycine déjà immobilisé à la surface de l'électrode.

Pour ce faire, l'incubation de l'électrode dans la solution S1 a été réalisée pour des durées différentes (1,2, 3 et 4 h). L'histogramme de la **figure 3.3** montre l'intensité du courant provenant de l'oxydation de la sonde redox intercalée en fonction du temps d'incubation. Il est clair que plus le temps d'incubation augmente, plus le signal redox enregistré est intense, ce qui s'explique par l'obtention de concentrations superficielles plus élevées en ADNzyme immobilisé sur l'électrode et aussi de l'intercalation d'un grand nombre de ligands entre les bases de l'ADN. Ainsi, le temps de réaction de 3 heures a été choisi car il représente un bon compromis pour l'immobilisation de l'ADNzyme et l'intercalation de la sonde redox tout en fournissant un signal intense.

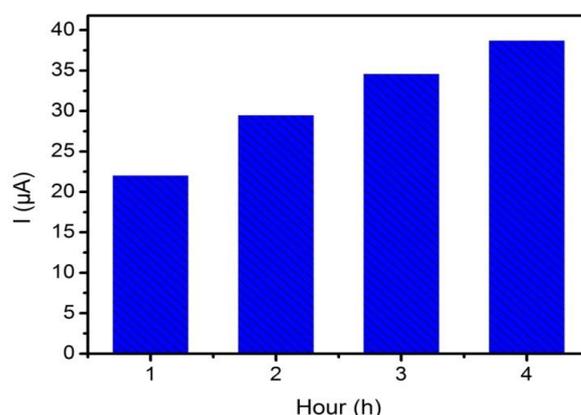


Figure 3.3. Histogramme présentant l'effet du temps d'incubation sur l'intensité du signal de l'intercalant Acr-Fc

2.3. Caractérisation de la biopuce

2.3.1. Etude structurale par FT-IR

La **figure 3.4** illustre les spectres FT-IR enregistrés après chaque étape de modification de l'électrode. Nous remarquons l'apparition de deux nouvelles bandes, après fonctionnalisation avec la glycine, une première bande large située entre 3010 et 3500 cm^{-1} qui correspond à la vibration d'élongation ν_{OH} et une deuxième bande située vers 1700 cm^{-1} associée à la vibration d'élongation $\nu_{\text{C=O}}$. Ces bandes sont caractéristiques de la fonction acide carboxylique qui provient de l'acide aminé.

On note qu'après la formation de la biocouche, le spectre FT-IR montre la disparition de la large bande de vibrations O-H contrairement à la bande associée à la vibration d'élongation

$\nu_{C=O}$ qui reste dans le spectre et qui justifie la formation de la liaison amide après réaction de l'ADN fonctionnalisé par une amine avec l'acide carboxylique de la glycine.

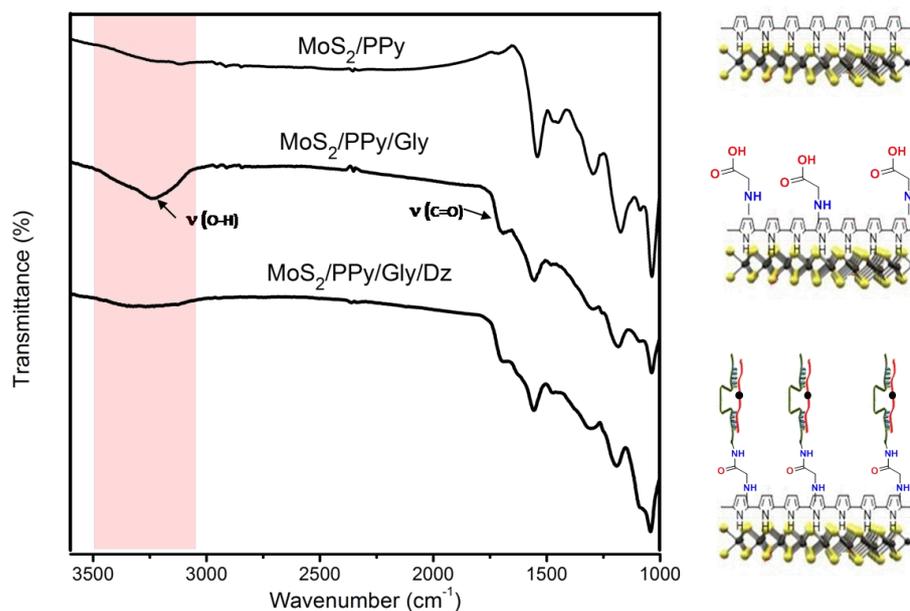


Figure 3.4. Spectre FTIR obtenu après chaque étape de modification de l'électrode

2.3.2. Caractérisation électrochimique

La caractérisation électrochimique a été réalisée par VC en absence de marqueur redox afin de confirmer la formation de la biocouche et d'étudier ses propriétés redox liées à l'intercalant redox.

La courbe intensité-potentiel obtenue à l'état stationnaire montre clairement la présence d'un signal redox typique du ferrocène (**Figure 3.5 (b)**). Cependant, nous pouvons constater que la valeur de la différence de potentiel ΔE_p enregistrée entre les deux pics anodique et cathodique de 0.115V est supérieure à celle prédite théoriquement ($0,06/n$ V, avec $n = 1$), ce qui suggère un transfert monoélectronique quasi-réversible. Ceci présente une preuve solide de la réussite de l'immobilisation de l'ADNzyme hybridé à son substrat à la surface de l'électrode.

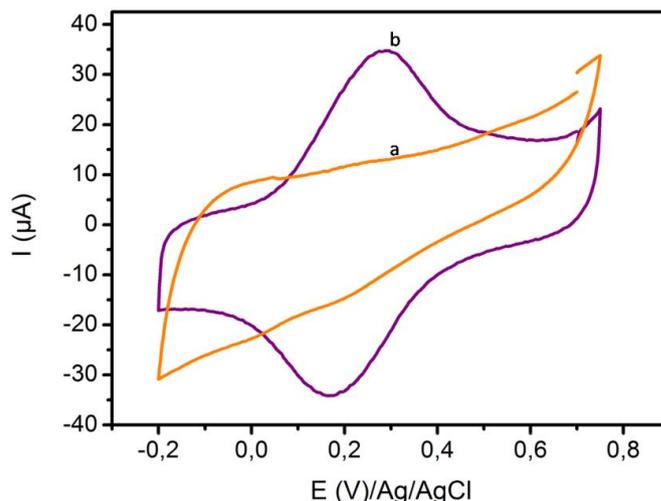


Figure 3.5. Courbes de voltammétrie cyclique de l'électrode modifiée (a) SPCE/MoS₂/PPy/Gly et (b) SPCE/MoS₂/PPy/Gly/Dz

Pour confirmer davantage ces observations, nous avons procédé à des mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique en présence d'une sonde redox externe en solution ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$) et en perturbant le système redox par un potentiel de l'ordre de + 0,2 V vs. Ag/AgCl.

Les spectres SIE sont représentés dans la **figure 3.6.A**. Nous remarquons une augmentation significative de la R_{ct} (ou encore du diamètre du diagramme de Nyquist) après greffage de l'ADNzyme à la surface de l'électrode préalablement fonctionnalisée par la glycine, et vu la taille importante de l'ADN et sa charge négative ceci entraîne la diminution du transfert de charge au cours du processus redox. La simulation du diagramme de Nyquist obtenu après immobilisation du biorécepteur est rapportée avec le circuit électrique équivalent, utilisé pour la modélisation des surfaces modifiées dans la **figure 3.6.B**. Ce circuit se trouve identique au modèle développé par Benvidi *et al.*[14] qui prend en considération les processus de transfert de charge ayant lieu aux interfaces électrolyte/film et film/électrode. Il est formé par deux dipôles placés en série avec une résistance associée à la solution électrolytique (R_s). Le premier dipôle correspond à la boucle à hautes fréquences décrivant l'ensemble de phénomènes qui se manifestent à l'interface électrolyte/film. Celui-ci est constitué par une résistance du transfert de charge (R_{ct1}) et un élément de constante de phase CPE relatif à un comportement capacitif non idéal du film. Le deuxième dipôle, correspond à la boucle à basses fréquences, est dédié à la modélisation de la réaction électrochimique se déroulant à l'interface

film/électrode et est composé par une résistance de transfert de charge (R_{ct2}) et une capacitance de double couche (C_{dl}).

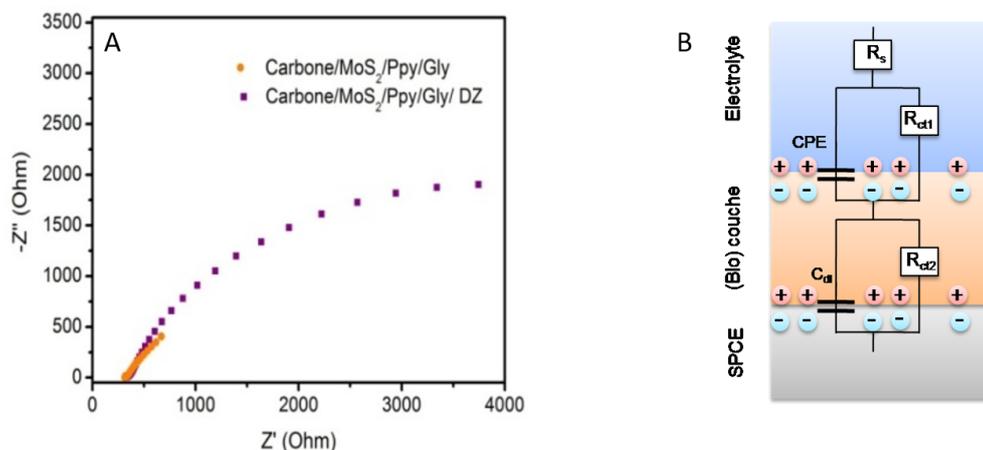


Figure 3.6. (A) Diagrammes d'impédance en représentation de Nyquist, pour une gamme de fréquence de 100 kHz à 0.1 Hz à un potentiel $E = + 0,2$ V vs. Ag/AgCl, SPCE/MoS₂/PPy/Gly/Dz en présence de 5 mM d'une solution de [Fe(CN)₆]^{4/3-} avant et après modification par l'ADNzyme et l'intercalant. (B) Circuit équivalent utilisé pour modéliser la surface de l'électrode après modification.

2.3.3. Étude cinétique

L'étude de la variation du courant des pics anodique et cathodique en fonction de la vitesse de balayage nous a permis de démontrer la nature du processus redox ayant lieu au niveau de l'électrode. En augmentant la vitesse de balayage de 150 à 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, l'intensité du courant augmente tandis que ΔE reste presque constante (**Figure 3.7.A**). À partir des courbes voltampérométriques, nous avons tracé l'évolution de l'intensité du courant de pics d'oxydation et de réduction en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage (**Figure 3.7.B**). L'évolution linéaire démontre que la réaction au sein de SPCE/MoS₂/PPy/Gly/ADNzyme est contrôlée par un processus diffusionnel.

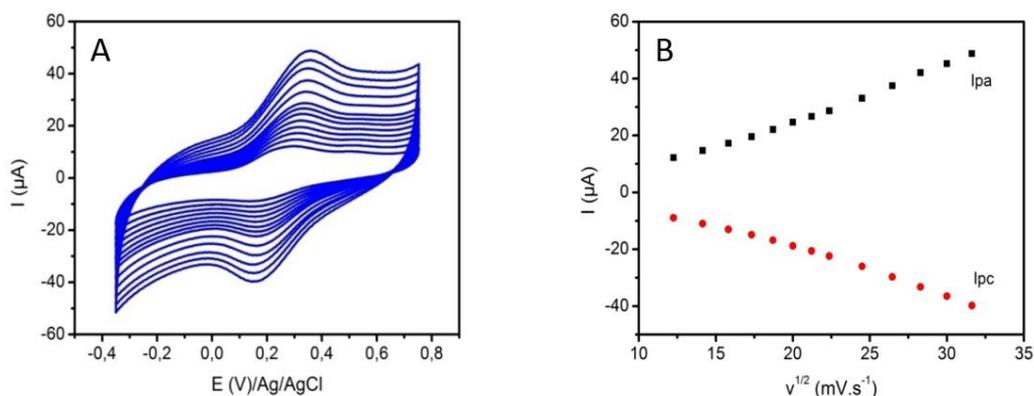


Figure 3.7. (A) Voltammétrie cyclique de l'électrode modifiée par MoS₂/PPy/Gly/ADNzyme à différentes vitesses de balayage dans une gamme de 0,15 à 1 V·s⁻¹ **(B)** Variation du courant anodique et cathodique en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

Afin de déterminer la concentration surfacique en intercalant redox à la surface de l'électrode, le taux de couverture (Γ) a été calculé en utilisant l'équation 3.1 :

$$\Gamma = Q/nFA \quad \text{Equation 3.1}$$

Avec ;

Γ : Taux de couverture ou concentration surfacique (mol · cm⁻²),

Q : Charge après soustraction de la contribution capacitive, déterminée à partir de l'intégration de l'aire du pic anodique ou cathodique correspondant au voltamogramme obtenu, à l'état stable dans la solution de PBS,

n : Nombre d'électrons transférés au cours de la transformation redox (n = 1, dans le cas de Fc/Fc⁺),

F : Constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹),

A : Surface effective d'électrode (cm²).

Il est à noter que dans le cas des couches autoassemblées de dérivés ferrocéniques, la valeur de Γ varie entre 10⁻¹² pour un faible recouvrement surfacique [15] en sites actifs et 10⁻¹⁰ pour une couche fortement saturée [16]. La valeur calculée pour notre cas est $\Gamma = 6.7 \times 10^{-8}$ mol.cm⁻² ce qui présente une valeur très élevée comparée à celles trouvées en littérature. Ceci confirme que la sonde redox ne se trouve pas à la surface de l'électrode mais intercalé entre les bases de l'ADN.

2.4. Réponse électrochimique du biocapteur

2.4.1. Biodétection de Pb²⁺

La réponse du biocapteur développé a été suivie par SWV suite à sa mise en contact avec différentes concentrations de Pb²⁺. On remarque, après étape de lavage, que l'intensité du pic cathodique diminue au fur et à mesure que la concentration de l'analyte cible augmente (**Figure 3.8.A**).

Cette diminution progressive du courant de réduction de l'Acr-Fc peut être expliquée par le clivage du substrat au niveau de l'adénine ribonucléotide en présence de Pb^{2+} et par conséquent, la libération de l'intercalant dans la solution. Après lavage de l'électrode, le signal de l'Acr-Fc qui reste intercalée sera alors mesuré d'où le signal OFF. Par conséquent, plus la concentration de l'analyte à détecter est élevée plus l'Acr-Fc est libérée provoquant ainsi une chute importante du courant. Une stratégie a été proposée vers la fin de ce chapitre dans le but de récupérer et doser l'Acr-Fc libérée afin d'aboutir à un signal ON.

La variation moyenne du courant ($\% \Delta I/I_0$) en fonction du logarithme de la concentration de la cible a permis de tracer la courbe d'étalonnage dans le domaine de concentrations compris entre 10 et 200 $ng.mL^{-1}$ (**Figure 3.8.B**). Cette dernière montre une équation de régression linéaire (ci-dessous).

$$\% \Delta I/I_0 = -24,97 + 38,83 \log[cible] / (ng.mL^{-1}) \quad (R = 0,992) \quad \text{Equation 3.2}$$

Dans le domaine de linéarité situé entre 10 et 70 $ng.mL^{-1}$. En outre, la limite de détection a été calculée à 1,33 $ng.mL^{-1}$ (4 nM) en considérant le critère de ratio signal sur bruit égal à 3. La reproductibilité du biocapteur a été estimée avec cinq électrodes différentes. L'écart-type relatif (RSD) a été calculé à 1,24%, ce qui indique que le capteur a une bonne reproductibilité d'une électrode à l'autre.

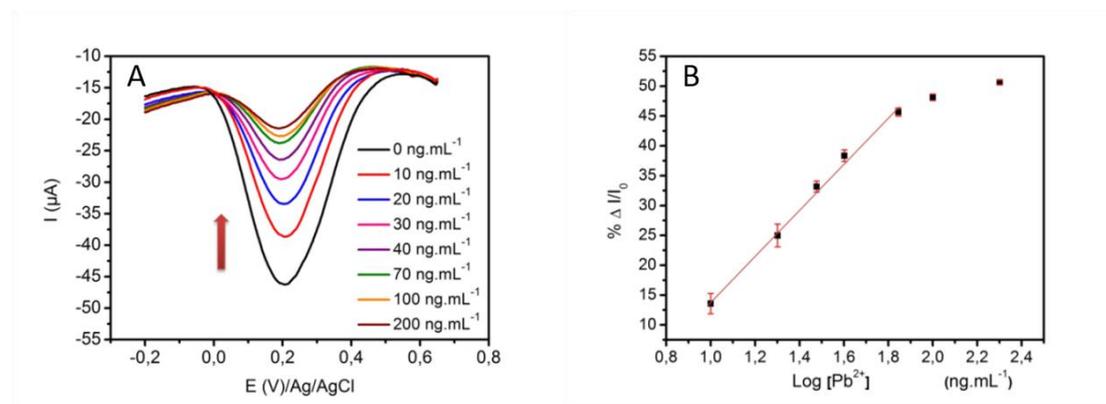


Figure 3.8. (A) Courbes voltampérométriques obtenues par SWV du biocapteur avant et après incubation dans différentes concentrations de Pb^{2+} dans une solution de PBS 0,01 M à pH 7,4. (B) Courbes d'étalonnage de la biopuce affichant la variation de sa réponse en courant (ΔI) en fonction du log des différentes concentrations de Pb^{2+}

2.4.2. Comparaison avec la littérature

Le biocapteur développé dans ce travail a démontré des performances satisfaisantes en termes de sensibilité et de limite de détection comparé au biocapteur électrochimique développé par

Tan et al. [17]. Le **tableau 3.1** montre la comparaison des différentes stratégies et méthodes pour l'élaboration de biocapteur à base d'ADNzyme ainsi que les performances analytiques de ces derniers. Liu et al.[18] ont conçu un biocapteur à fluorescence basé sur une puce à ADN. Dans le même contexte, Yun et al.[19] ont mis au point un biocapteur colorimétrique de Pb^{2+} utilisant une balise moléculaire MB et l'ADNzyme pour assurer l'amplification du signal. Ces méthodes se sont avérées efficaces, cependant il est important de souligner que la colorimétrie et la fluorescence ne conviennent pas à la détection du Pb^{2+} dans des échantillons d'eau colorée.

Tableau 3.1. Les performances analytiques de quelques biocapteurs de Pb^{2+} rapportés dans la littérature

Plateforme	Méthode	Gamme dynamique	LOD	Références
Lame de verre/ADNzyme-fluorophore	Fluorescence	1nM-1 μ M	1nM	Liu et al. [18]
AuNPs/ADNzyme/MB	Colorimétrique	0.05nM-5nM	20pM	Yun et al.[19]
ITO/ADNzyme-MB	Electrochimique: DPV	0.05 μ M – 1 μ M	18nM	Tan et al.[17]
Gold/ADNzyme-Ru(Phen) ₃	Electrochemiluminescence	2 pM-1000pM	0.9 pM	Gao et al.[20]
Carbone/MoS ₂ /PPy	Electrochimique: SQW	30 nM - 302 nM	4 nM	Notre contribution

2.4.3. Etude de la sélectivité

L'objectif de ce travail est la conception d'un dispositif analytique capable de détecter de façon très sélective la cible Pb^{2+} dans les eaux usées même en présence d'autres interférents. Pour cela l'étude de la sélectivité est primordiale. La réponse électrochimique du biocapteur a été évaluée, en présence de divers cations bivalents tels que Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} et Mn^{2+} qui sont considérés comme des interférents potentiels qui pourraient coexister avec Pb^{2+} . Les résultats obtenus par SWV dans les conditions optimales d'analyse sont représentés dans l'histogramme (**Figure 3.9**) qui montre la variation de l'intensité du courant obtenu après

incubation dans 100 ng.mL^{-1} des métaux mentionnés comparée à la réponse du biocapteur après avoir été mis en contact avec une solution de Pb^{2+} de concentration 70 ng.mL^{-1} . Il est remarquable que les interférents testés induisent une variation négligeable du courant par rapport à celle provoquée par la présence du plomb (II). Ces résultats révèlent donc que le biocapteur peut être utilisé pour la détection de l'analyte cible avec une haute sélectivité car le clivage de l'ADNzyme est assuré par la présence de Pb^{2+} .

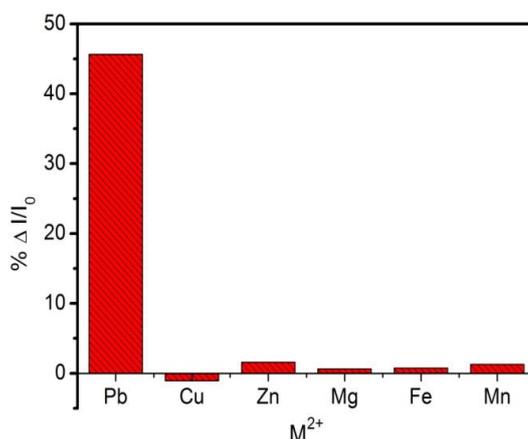


Figure 3.9. Histogramme représentant les réponses en courant (ΔI) du biocapteur en présence des différents interférents

2.5. Détection du Pb^{2+} dans les eaux usées

Afin d'évaluer l'applicabilité de la stratégie proposée pour le dosage du plomb dans des échantillons réels, nous l'avons testé sur les mêmes échantillons d'eaux usées, utilisés dans le chapitre 2. Suivant la même méthodologie, les échantillons ont été dopés avec différentes concentrations de Pb^{2+} de 10 à 100 ng.mL^{-1} puis ont été utilisés pour la détection du plomb. La courbe d'étalonnage a été tracée à partir des résultats de SWV (**Figure 3.10.A**) et comparée à celle obtenue lorsque le Pb^{2+} a été dosé dans la solution tampon (**Figure 3.10.B**). Les taux de recouvrement présents dans le **tableau 3.2** après ajouts successifs de la cible sont compris entre 96.7% et 107% pour les échantillons d'eaux usées avec des écarts types inférieurs à $2,1\%$. Ces résultats montrent que la méthode proposée est fiable et que le biocapteur développé peut être utilisé pour des applications pratiques pour la détection du Pb^{2+} dans les échantillons réels.

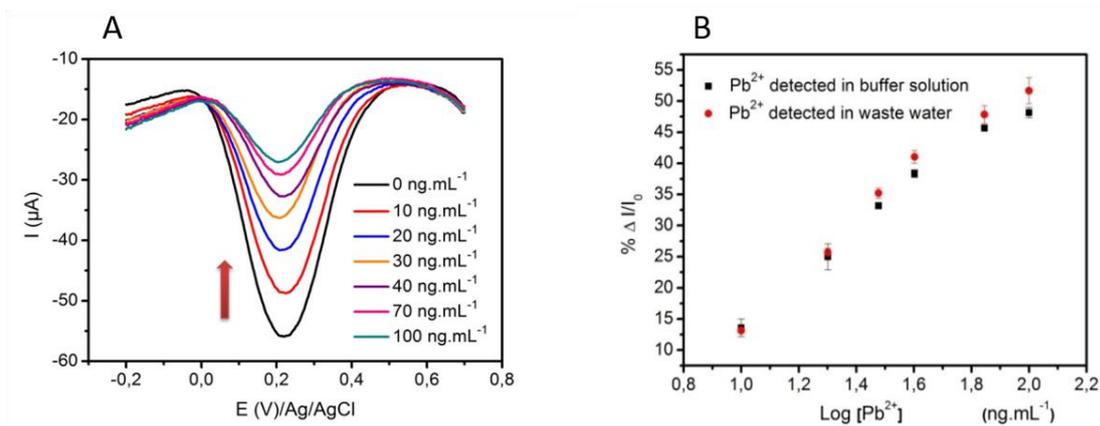


Figure 3.10. (A) Courbes voltampérométriques obtenues par SWV et après incubation dans différentes concentrations de Pb²⁺ (B) Courbes d'étalonnage de la biopuce affichant la variation de sa réponse en courant (ΔI) en fonction du log des différentes concentrations de Pb²⁺ comparé aux résultats obtenus lors de la détection de la cible dans la solution tampon.

Tableau 3.2. Détermination de Pb²⁺ dans les échantillons d'eaux usées

Echantillon	[Pb ²⁺] _{ajoutée}	[Pb ²⁺] _{trouvée}	Taux de recouvrement (%)
1	10	9.67 ±0,42	96.7 %
2	20	20.59 ±0,61	102.95 %
3	30	31.81 ±0,83	106 %
4	40	42.8 ±0,99	107 %
5	70	73.33 ±1,41	104.8 %
6	100	107.32 ±2,09	107.3 %

2.6. Intégration dans des puces microfluidiques

La microfluidique permet de développer des dispositifs sophistiqués et parfaitement adaptés pour des applications analytiques. Ces dispositifs analytiques plus souvent appelés « laboratoire-sur-puce » (de « Lab-on-a-Chip » en anglais) intègrent, sur quelques centimètres carrés, l'ensemble des fonctions d'analyses chimiques effectuées aujourd'hui en laboratoire. On peut ainsi analyser des échantillons avec des volumes extrêmement faibles (de quelques microlitres à quelques nanolitres). De même, séparer et détecter une cible au sein des microcanaux fluidiques est devenu possible ce qui a permis de réaliser des analyses sensibles, pour le diagnostic précoce et le suivi personnalisé dans plusieurs domaines d'application.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail d'intégrer le biocapteur développé dans une puce microfluidique. Notre stratégie consiste à utiliser un dispositif microfluidique possédant deux cellules électrochimiques qui sont connectées avec un canal fluide. Ce système permet de séparer la chambre dans laquelle le biocapteur est formé et où la réaction entre le plomb (II) et l'ADNzyme aura lieu. La deuxième chambre liée avec le canal sera celle dans laquelle l'intercalant l'Acr-Fc libéré pourra être accumulé et mesuré. Cette stratégie permet ainsi d'obtenir un signal d'oxydo-réduction qui augmente suivant la quantité de cible détectée conduisant ainsi à un « signal ON » (Schéma 3.3).

Pour fabriquer ce dispositif, nous avons décidé d'utiliser le même métal (Au) pour la conception des 3 électrodes, afin de simplifier le procédé de fabrication à un seul niveau de lithographie optique sur les substrats. Avec des microcellules électrochimiques à 3 électrodes en Au, l'électrode de référence est considérée comme une pseudo-référence. Par conséquent, un décalage au niveau du potentiel du ferrocène a été observé. Ce décalage n'aura pas d'influence majeure sur les performances analytiques du dispositif proposé. Par ailleurs, le signal observé peut être calibrer par rapport à une électrode de référence classique du type Ag/AgCl/KCl (3M).

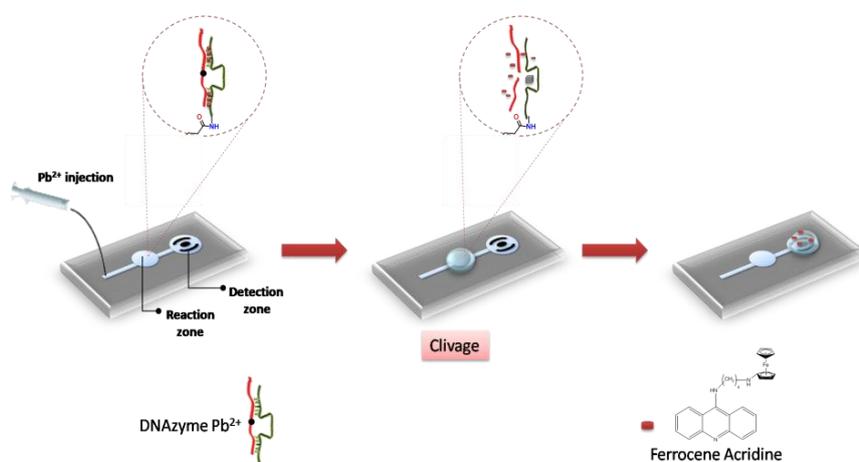


Schéma 3.3. Principe du biocapteur de Pb^{2+} intégré en puce microfluidique

Le clivage du substrat par l'ADNzyme en présence du Pb^{2+} est réalisé à température ambiante à l'intérieur de la biopuce fluide, en suivant un protocole quasi-dynamique basé sur deux étapes où on alterne haut flux et régime statique. La première étape consiste à appliquer un débit élevé de $100 \mu\text{L}/\text{min}$ pendant 1 minute afin de favoriser l'interaction de l'analyte cible injecté avec l'ADNzyme immobilisé à la surface de l'électrode de la cellule 1. Le flux est ensuite arrêté pendant 15 minutes produisant un régime de diffusion statique pendant lequel

l'intercalant libéré va diffuser de la chambre 1 vers la chambre 2 (électrode 2 non modifiée). Ce protocole à deux étapes a été ensuite répliqué quatre fois (total = 60 minutes) avec un suivi après chaque 15 min, en enregistrant les courbes voltampérométriques par voltammétrie différentielle pulsée (DPV) au niveau de l'électrode 2 (chambre de mesure). La **figure 3.11** montre l'évolution de l'intensité du courant en fonction du temps. On remarque que le signal de l'Acr-Fc augmente au cours du temps montrant ainsi l'efficacité de cette stratégie pour l'obtention d'un signal ON.

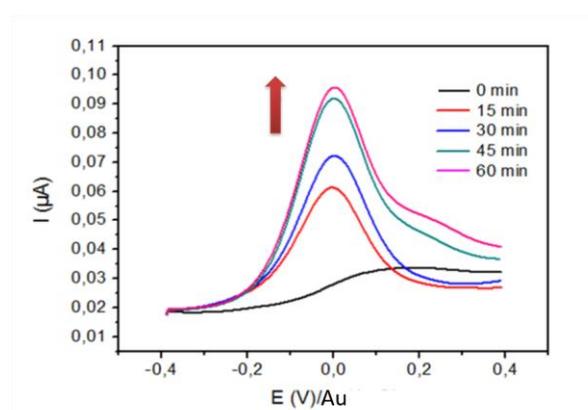


Figure 3.11. DPVs obtenues avant et après injection de Pb^{2+}

3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit une stratégie simple et pratique permettant la détection ampérométrique du Pb^{2+} par le biais des ADNzymes dans lesquels sont intercalés des ligands ferrocéniques en guise de médiateurs redox. En présence de l'analyte cible, la lyse catalytique du substrat entraîne le relargage de la sonde redox dans le milieu. Cette réaction est suivie par la diminution de l'intensité du signal du ferrocène permettant le dosage de Pb^{2+} dans le milieu. Le biocapteur développé présente d'excellentes performances analytiques en termes de sensibilité avec un LOD de 1.3nM et une forte sélectivité vis-à-vis d'autres ions métalliques. Son utilisation possible pour la détection du plomb dans des eaux de rivière a été démontrée. Des premiers essais de son intégration dans des dispositifs fluidiques ont montré des résultats très encourageants. Ce dispositif de détection conçu en utilisant deux cellules électrochimiques fluidiques connectés avec un canal de détection permet d'obtenir une lecture avec un signal redox qui augmente en fonction de l'analyte, permettant une détection avec un signal ON. Ce système ouvre des perspectives pour son utilisation après optimisation comme station de contrôle de contaminants métalliques dans les effluents.

Références bibliographiques du Chapitre 3

- [1] M.S. Sankhla, Mayuri Kumari, M. Nandan, R. Kumar, P. Agrawal, Heavy Metals Contamination in Water and Their Hazardous Effect on Human Health-A Review, Social Science Research Network, Rochester, NY, 2016. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3428216>.
- [2] R. Garnier, Toxicité du plomb et de ses dérivés, EMC - Toxicologie-Pathologie. 2 (2005) 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.emctp.2004.10.004>.
- [3] Parlement européen, Directive n° 2013/39/UE. 2013
- [4] W.H. Organization, Guidelines for Drinking-water Quality 4th edition, 2011.
- [5] J. Chen, S. Xiao, X. Wu, K. Fang, W. Liu, Determination of lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, Talanta. 67 (2005) 992–996. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.04.029>.
- [6] M.A. Mesquita da Silva, V.L. Azzolin Frescura, A.J. Curtius, Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 55 (2000) 803–813. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(00\)00147-6](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(00)00147-6).
- [7] G. Liang, Y. Man, A. Li, X. Jin, X. Liu, L. Pan, DNAzyme-based biosensor for detection of lead ion: A review, Microchemical Journal. 131 (2017) 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.010>.
- [8] F. Yang, S.S. Teves, C.J. Kemp, S. Henikoff, Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics, Biochim Biophys Acta. 1845 (2014) 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>.
- [9] J. Chiron, J.-P. Galy, Reactivity of the Acridine Ring: A Review, ChemInform. 35 (2004). <https://doi.org/10.1002/chin.200420246>.
- [10] C.M. Brett, B.E. Bursten, Theoretical studies of 18-electron $M(C_nH_n)(C_{10-n}H_{10-n})$ ($M=Fe, Ru, Os; n=3, 4, 5$) sandwich complexes, Polyhedron. 23 (2004) 2993–3002. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2004.09.015>.

- [11] D. Astruc, *Electron Transfer and Radical Processes in Transition-Metal Chemistry*, Wiley-VCH, New York, 1995.
- [12] N. Ito, T. Saji, S. Aoyagui, Electrochemical formation of stable ferrocene anion and the formal rate constant of the ferrocene^{0/-} electrode, *Journal of Organometallic Chemistry*. 247 (1983) 301–305. [https://doi.org/10.1016/0022-328X\(83\)85172-9](https://doi.org/10.1016/0022-328X(83)85172-9).
- [13] L.S. Lerman, The Structure of the Dna-Acridine Complex, *PNAS*. 49 (1963) 94–102. <https://doi.org/10.1073/pnas.49.1.94>.
- [14] A. Benvidi, N.M. Saucedo, P. Ramnani, C. Villarreal, A. Mulchandani, M.D. Tezerjani, S. Jahanbani, Electro-oxidized Monolayer CVD Graphene Film Transducer for Ultrasensitive Impedimetric DNA Biosensor, *Electroanalysis*. 30 (2018) 1791–1800. <https://doi.org/10.1002/elan.201700654>.
- [15] S.A.A. Ahmad, S. Ciampi, S.G. Parker, V.R. Gonçales, J.J. Gooding, Forming Ferrocenyl Self-Assembled Monolayers on Si(100) Electrodes with Different Alkyl Chain Lengths for Electron Transfer Studies, *ChemElectroChem*. 6 (2019) 211–220. <https://doi.org/10.1002/celec.201800717>.
- [16] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers, *Coord Chem Rev*. 254 (2010) 1769–1802. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>.
- [17] Y. Tan, J. Qiu, M. Cui, X. Wei, M. Zhao, B. Qiu, G. Chen, An immobilization free DNAzyme based electrochemical biosensor for lead determination, *Analyst*. 141 (2016) 1121–1126. <https://doi.org/10.1039/C5AN02114F>.
- [18] M. Liu, X. Lou, J. Du, M. Guan, J. Wang, X. Ding, J. Zhao, DNAzyme-based fluorescent microarray for highly selective and sensitive detection of lead(II), *Analyst*. 137 (2011) 70–72. <https://doi.org/10.1039/C1AN15633K>.
- [19] W. Yun, D. Cai, J. Jiang, P. Zhao, Y. Huang, G. Sang, Enzyme-free and label-free ultra-sensitive colorimetric detection of Pb²⁺ using molecular beacon and DNAzyme based amplification strategy, *Biosensors and Bioelectronics*. 80 (2016) 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.053>.

[20] A. Gao, C.-X. Tang, X.-W. He, X.-B. Yin, Electrochemiluminescent lead biosensor based on GR-5 lead-dependent DNzyme for Ru(phen)₃(²⁺) intercalation and lead recognition, *Analyst*. 138 (2013) 263–268. <https://doi.org/10.1039/c2an36398d>.

**Chapitre 4 – Biocapteur
bimodal à base du composite
MoS₂/PPy pour la détection
simultanée du Pb²⁺ et de
l'ampiciline**

1. Introduction

Au XXe siècle, la recherche scientifique a connu de grandes avancées particulièrement par le développement de l'électronique numérique qui, accompagnée par la progression exponentielle de la puissance de calcul des microprocesseurs, a fait en sorte que les ordinateurs électroniques soient désormais indispensables dans le monde moderne. En effet, des recherches poussées réalisées dans le domaine de la biologie moléculaire ont montré que le traitement de l'information ne se limite pas seulement aux ordinateurs mais qu'il s'agit d'une capacité fondamentale de tous les systèmes biologiques.

L'étude de cette capacité, en élucidant les différents mécanismes du traitement de l'information biologique, a orienté les scientifiques vers la conception des ordinateurs moléculaires synthétiques qui peuvent être plus biocompatibles que leurs homologues électroniques. D'un point de vue informatique non conventionnel, le développement des ordinateurs moléculaires, basé sur l'existence de milliards de molécules dans chaque système expérimental, peut rendre possible l'exécution de calculs massivement parallèles dans un très petit volume et aussi de mettre en œuvre de nouvelles architectures de calcul qui utilisent la dynamique des interactions entre les composants des circuits moléculaires [1] permettant ainsi de concevoir des systèmes de calcul autonomes qui peuvent survivre et prospérer dans des environnements inaccessibles aux microprocesseurs en silicium, comme dans la circulation sanguine ou dans les cellules vivantes. En effet, ces systèmes de calcul sont réalisés par le biais de circuits logiques booléens ; concept sur lequel sont construits les processus de calcul de tous les systèmes informatiques. Ces circuits sont basés sur l'algèbre de Boole, définie au début du XXe siècle par plusieurs mathématiciens, Jevons, Schröder et Huntington [2]. L'algèbre de Boole permet de manipuler des informations binaires qui ont : soit la valeur VRAI, soit la valeur FAUX (le fameux système binaire 1/0). Les circuits logiques sont assemblés à partir de portes logiques qui sont les briques élémentaires composables pour construire des circuits logiques répondant aux fonctions logiques voulues. La **figure 4.1** montre les portes logiques basiques à partir desquelles sont réalisés les circuits logiques.

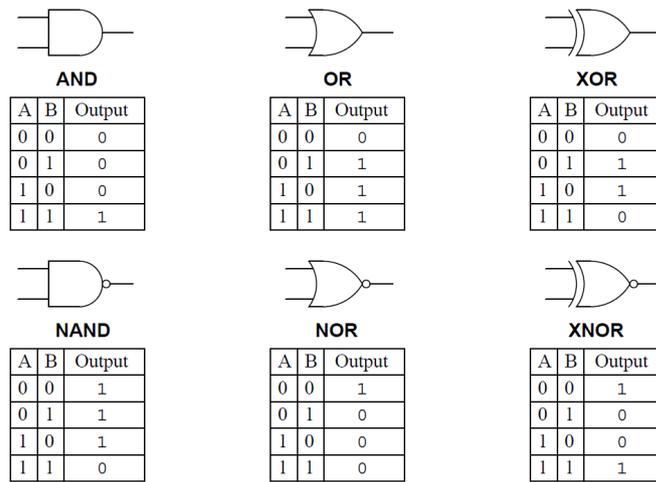


Figure 4.1. Les portes logiques basiques associées à leur table de vérité

C'est dans ce contexte que les systèmes moléculaires sont développés de manière à ce que le schéma des signaux de sortie soit lié au schéma des signaux d'entrée par la fonction logique souhaitée.

Le champ de recherche de la bio-informatique se poursuit en exploitant l'ADN, et ont déjà conduit à la création de plusieurs composants à base d'ADN : des portes logiques [3], de la mémoire [4] et des oscillateurs [5]. C'est un domaine maintenant bien maîtrisé. Guo et al.[6] ont proposé une séquence d'un mono brin d'ADN riche en thymine et en guanine (GT24: 5'-GGGTTTTGGGTTTTGGGTTTTGGG-3'), utilisée comme interrupteur fluorescent en se liant, en présence de différents analytes, avec le colorant N-méthyl mesoporphyrin IX qui est spécifique au G-quadruplex. La **figure 4.2** montre plusieurs types de portes logiques basées sur cette séquence unique, qui peut effectuer des opérations logiques OUI, NON, OU, INHIBIT, NON et ET sous l'action de différentes entrées et avec comme sortie une molécule fluorescente.

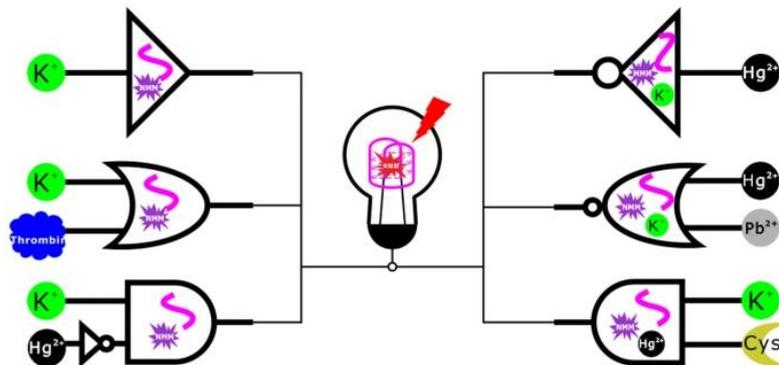


Figure 4.2. Présentation schématique de différentes portes logiques basées sur le complexe formé par un ADN G-quadruplex et la sonde fluorescente

Récemment, Pan et al.[7] ont développé une stratégie pour construire une porte logique ET en utilisant deux entrées sous la forme de deux fragments du génome COVID-19 (spécifique et homologue). La détection du COVID-19 est basée sur l'exonucléase III et un ADNzyme. En effet, le brin spécifique a été utilisé pour activer le 1^{er} processus de recyclage (I) permettant la réaction d'amplification du signal tandis que le brin homologue a été utilisé pour l'activation du 2^{ème} processus de recyclage (II). Les produits obtenus grâce à une réaction synergique dans les cycles I et II permettent de former un ADNzyme actif dépendant de Mg^{2+} (**Figure 4.3**). La formation de l'ADNzyme actif est donc obtenue seulement lorsque les deux fragments du génome COVID-19 (spécifique et homologue) sont présents dans la solution d'où la porte logique ET.

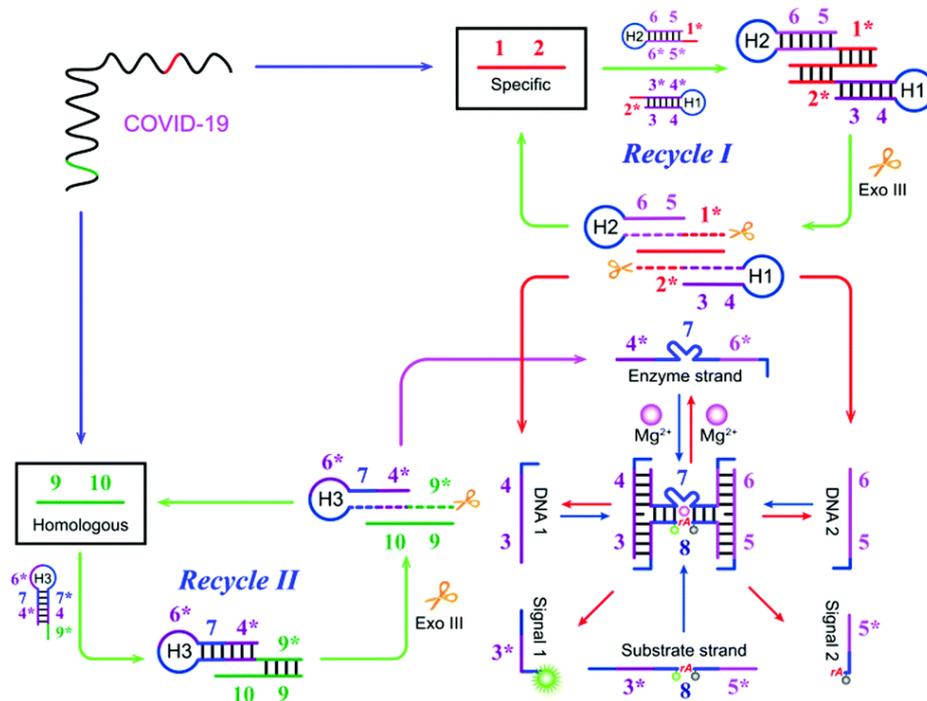


Figure 4.3. Illustration schématique la double reconnaissance contrôlée par une porte logique ET basée sur l'exo III et l'ADNzyme pour la détection du COVID-19

Dans ce travail nous avons proposé une nouvelle stratégie d'association d'aptamère et d'ADNzyme pour former des aptazymes grâce à un connecteur composé seulement de quelques nucléobases (**Figure 4.4**). Ce travail présente une preuve de concept en vue de réaliser la détection simultanée de l'ampicilline (AMP) et du Pb^{2+} en attribuant chaque signal redox des deux sondes utilisées ; le ferrocène et la naphthoquinone, qui opèrent à des potentiels redox différents, à l'analyte cible correspondant. Le choix des sondes redox utilisés au cours de cette thèse est basé sur leurs potentiels redox qui devaient être distincts afin d'éviter tout chevauchement des signaux et assurer le suivi de chaque analyte présent dans la solution d'une manière à pouvoir l'associer à un signal redox bien déterminé

Cette stratégie nous a permis de mettre au point un système biologique ayant la capacité d'effectuer des fonctions logiques sous l'action de différentes entrées (AMP et Pb^{2+}) et avec comme sortie la variation du signal redox de la NQ et du ferrocène.

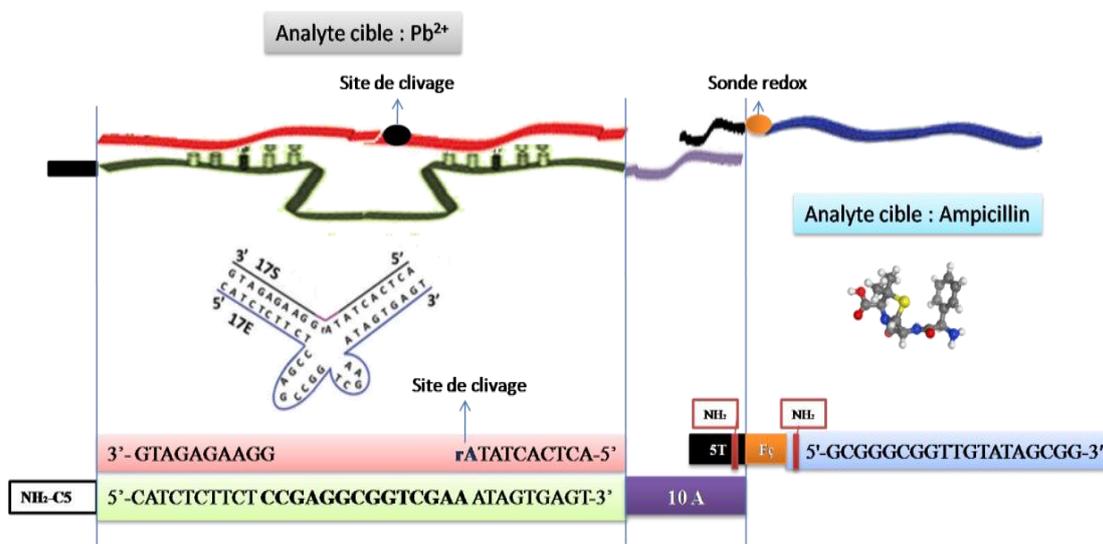


Figure 4.4. Représentation schématique du principe de l'aptazyme pour la détection bimodale de l'AMP et de Pb^{2+}

2. Biocapteur bimodal à base du composite MoS_2/PPy pour la détection simultanée du Pb^{2+} et de l'AMP

2.1. Elaboration du biocapteur

Nous avons utilisé les mêmes électrodes imprimées de carbone (SPCE) que dans les chapitres précédents pour le développement du biocapteur bimodal. La première étape consiste à la modification de la surface par les nanomatériaux suivant la méthode optimisée précédemment. Ensuite, l'immobilisation covalente de l'ADNzyme est assurée par la glycine préalablement fixée sur le polypyrrole par électrodéposition. L'ADNzyme utilisée dans cette partie est différent de celui utilisé dans le chapitre 3. Ce dernier possède quelques nucléobases supplémentaires en position 3' pour s'hybrider avec un ADN mono brin complémentaire modifié par une fonction amine en position 5 (Schéma 4.1. Étape c).

Par la suite, la fonction amine introduite à la surface de l'électrode va réagir avec la deuxième sonde redox NQ diacide pour former un amide. La dernière étape consiste à l'immobilisation de l'aptamère suite à sa réaction avec la deuxième fonction acide carboxylique libre à la surface de l'électrode. Après greffage, la surface modifiée de la bioélectrode est rincée soigneusement avec l'eau ultrapure puis séchée sous un flux de N_2 .

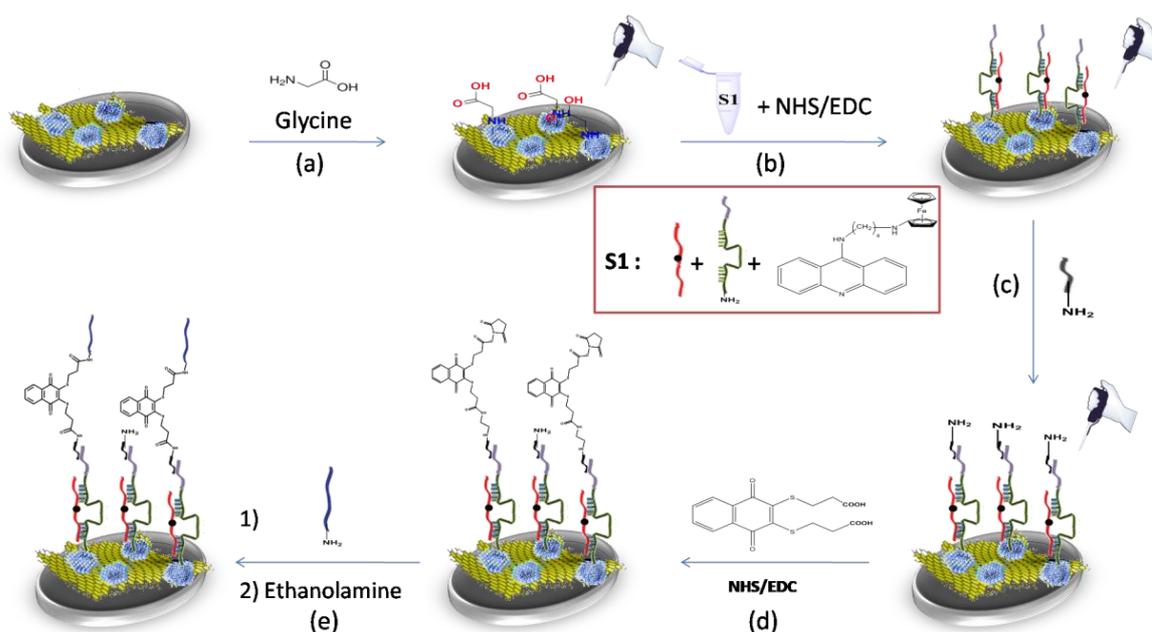


Schéma 4.1. Représentation schématique des différentes étapes pour le développement du biocapteur bimodal

2.2. Caractérisation électrochimique

La caractérisation électrochimique a été réalisée par CV en absence de marqueur redox (PBS 10 mM, pH = 7,4) à une vitesse de balayage $v = 0.1 \text{ V.s}^{-1}$, afin de confirmer l'immobilisation efficace des sondes redox NQ et Acr-Fc à la surface de l'électrode. La courbe intensité-potentiel montre clairement la présence de deux signaux redox bien définis attribués à la réaction d'oxydo-réduction de la NQ et du noyau ferrocène (**Figure 4.5**). Nous pouvons constater que les valeurs de la différence de potentiel ΔE_p enregistrée entre les deux pics anodique et cathodique ($\sim 0.150\text{V}$) dans le cas du ferrocène et ΔE_p enregistrée ($\sim 0.155\text{V}$) dans le cas NQ sont supérieures à celles prédite théoriquement, ce qui suggère un transfert quasi-réversible. Ceci présente une preuve solide de la réussite de l'immobilisation de l'aptazyme à la surface de l'électrode.

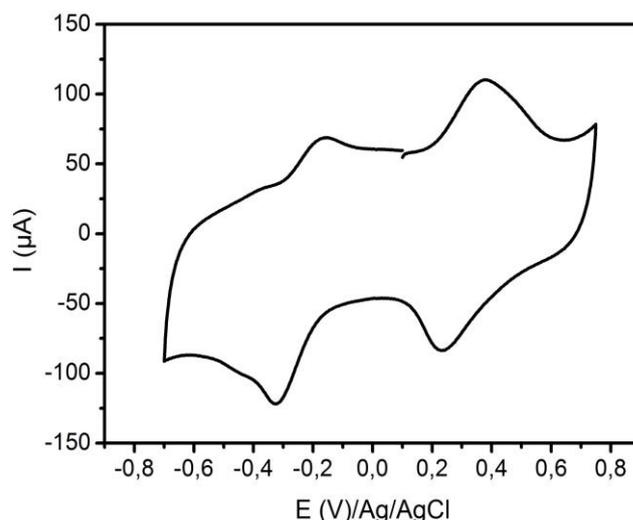


Figure 4.5. Voltamogramme cyclique de l'électrode après la formation de la biocouche aptazyme

2.3. Réponse électrochimique du biocapteur

2.3.1. 1^{ère} expérience

Les séquences d'ADN utilisées pour la conception du système aptazyme sont rassemblées dans le **tableau 4.1**. Le connecteur permet de relier la partie ADNzyme à la partie aptamère grâce à la fonction amine qui va réagir avec la NQ bifonctionnelle synthétisée au cours de ce travail.

Tableau 4.1.

Oligonucléotides	Séquences
ADNzyme-Connecteur	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'-CAT-CTC-TTC-TCC-GAG-GCG-GTC-GAA-ATA-GTG-AGT- AAA-AAA-AAA-A-3'
ADN mono brin (+ connecteur)	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'- TTT-TT-3'
Aptamère	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'-GCG-GGC-GGT-TGT-ATA-GCG-G-3'
Substrat	ACT-CAC-TAT-rAG-GAA-GAG-ATG

Nous avons eu recours à la voltammétrie à vagues carrées (SWV) pour suivre la présence de l'ampicilline et du plomb tout en exploitant le signal redox de la naphtoquinone et le ferrocène comme information de sortie en vue de réaliser la porte logique correspondante. Pour cela, 3 bioélectrodes ont été incubées dans une série de solutions contenant l'AMP, le Pb²⁺ et le mélange des 2 analytes avec des concentrations croissantes. Les résultats SWV

font apparaître une diminution notable et continue dans l'intensité du courant des deux sondes redox pour les 3 électrodes (**Figure 4.6.A**). Ces résultats ne sont pas exploitables et montrent que les deux systèmes aptamère et ADNzyme sont dépendants l'un de l'autre ce qui ne permet pas le suivi qualitatif et quantitatif des deux analytes lorsqu'ils coexistent dans la même solution ou séparément. Ceci s'explique probablement par l'instabilité du système au niveau du connecteur, dont la température de fusion, température à laquelle la moitié des molécules d'ADN est dénaturée, $T_m = 13.7^\circ\text{C}$ (**Figure 4.6.B**), alors que les incubations sont réalisées à température ambiante. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons proposé d'augmenter le T_m du connecteur en ajoutant quelques nucléobases (guanine et cytosine) afin de le rendre plus stable.

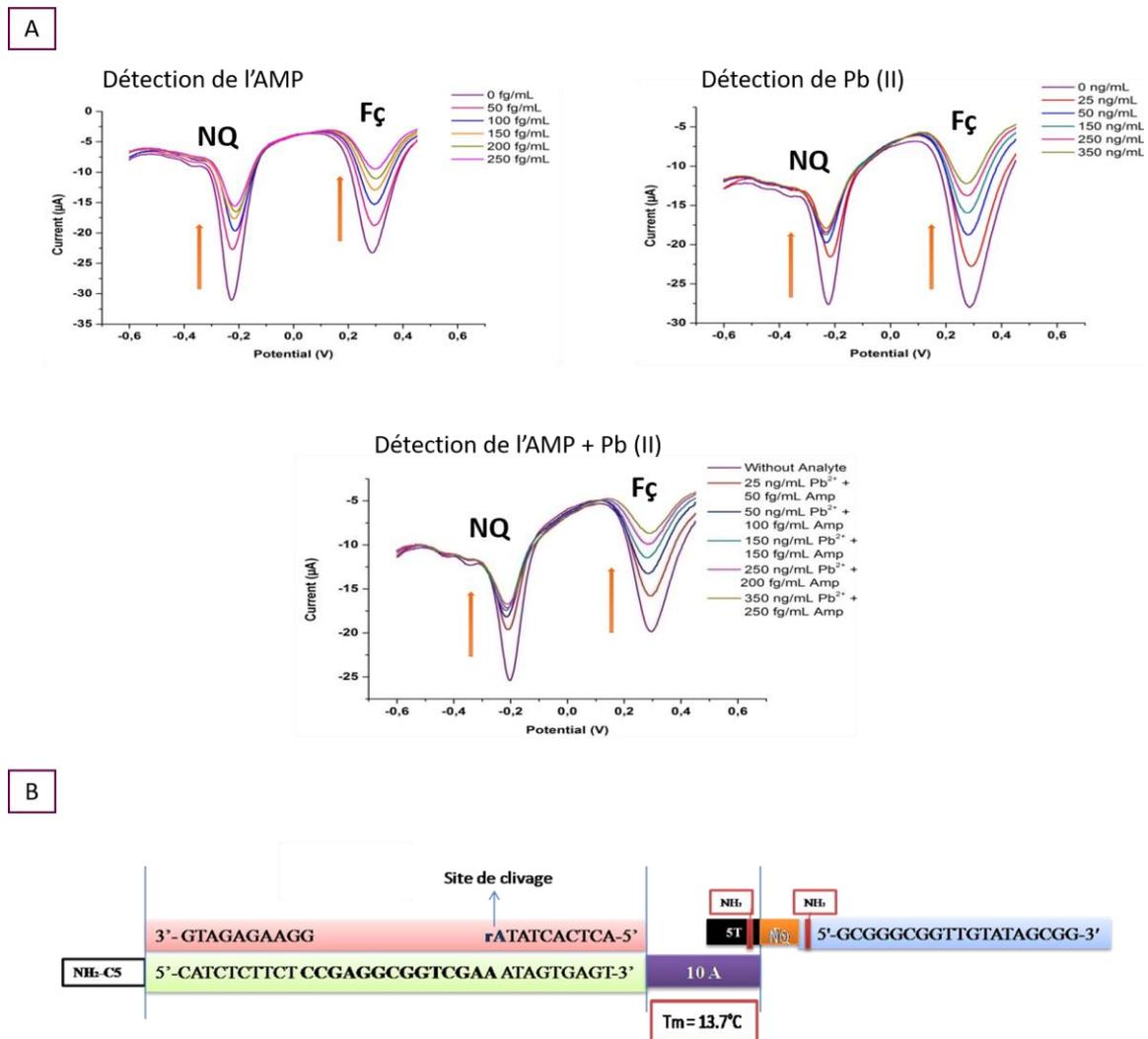


Figure 4.6. (A) Courbes voltampérométriques obtenues par SWV pour la détection de l'AMP, du Pb (II) et de l'AMP + Pb(II) ; (B) Représentation schématique de l'aptazyme avec T_m du double brin connecteur

2.3.2. 2^{ème} expérience

Les séquences d'ADN utilisées pour le deuxième test sont rassemblées dans le **tableau 4.2**. Les modifications réalisées au niveau du connecteur sont marquées en rouge. Ceci a permis d'augmenter le T_m en ajoutant les nucléobases pour atteindre une valeur $T_m = 46^\circ\text{C}$. Les T_m sont calculés par l'application « T_m Calculator » développée par *Thermo FisherScientific*.

Tableau 4.2.

Oligonucléotides	Séquences
ADNzyme-Connecteur	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'-CAT-CTC-TTC-TCC-GAG-GCG-GTC-GAA-ATA-GTG-AGT- AAA-AAG-GGG-GGG-GG -3'
ADN mono brin (+ connecteur)	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'- CCC-CCC-CCC-TTT-TT -3'
Aptamère	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -5'-GCG-GGC-GGT-TGT-ATA-GCG-G-3'
Substrat	ACT-CAC-TAT-rAG-GAA-GAG-ATG

La première expérience réalisée a été reproduite dans les mêmes conditions expérimentales avec le connecteur modifié. On remarque qu'en présence de l'AMP seul le signal de NQ directement lié à l'aptamère diminue tandis que le signal du ferrocène intercalé entre les bases de l'ADNzyme reste constant. Des constatations similaires ont été faites en présence de Pb²⁺ où seul le signal de l'Acr-Fc subit une diminution. Bien évidemment en présence des deux analytes les deux signaux redox diminuent simultanément. Cette analogie nous permet de considérer la détection de l'AMP ou du Pb²⁺ séparément comme une porte OU et la détection simultanée des deux analytes comme une porte ET. On constate que dans le cas de la détection simultanée le signal des deux sondes redox diminue considérablement (**Figure 4.7.B.b**) comparé au signal de la NQ et du ferrocène lorsque l'AMP et le Pb(II) sont détectés séparément (**Figure 4.7.A.a'/a''**). Ceci peut être expliqué par un changement important au niveau de la surface probablement lié à un réarrangement conformationnel de l'aptazyme.

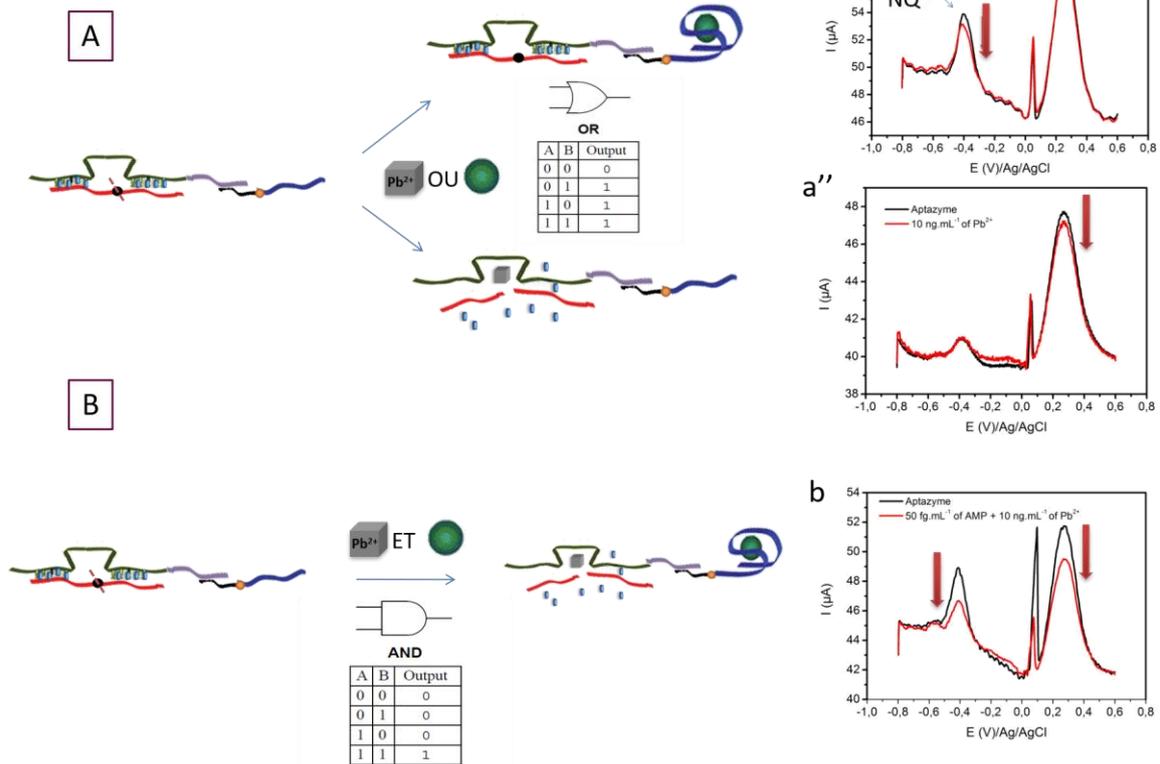


Figure 4.7. (A) Réponse du biocapteur en présence de l'AMP ou Pb^{2+} avec (a') Courbe voltampérométrique obtenue par SWV avant (noir) et après (rouge) incubation dans 50 fg.mL^{-1} d'AMP et (a'') Courbe voltampérométrique obtenue par SWV avant et après incubation dans 10 ng.mL^{-1} de Pb^{2+} ; (B) Réponse du biocapteur en présence de l'AMP et Pb^{2+} avec (b) Courbe voltampérométrique obtenue par SWV avant et après incubation dans AMP + Pb^{2+}

3. Conclusion

Pour conclure, nous avons proposé dans ce chapitre une nouvelle stratégie pour la détection simultanée de l'AMP et du Pb(II) en suivant la variation du signal redox associé à chaque analyte. L'aptazyme a été obtenu par l'ADNzyme et de l'aptamère par hybridation des connecteurs. Ce mode d'association par simple hybridation a été choisi car en variant les séquences d'ADN des éléments de biorecognition, nous avons accès à un large choix d'analytes cibles.

Le système biologique proposé a permis de construire deux portes logiques ; une porte logique OU lorsqu'on a une détection d'une seule cible et la porte logique ET lorsque les deux cibles sont détectées simultanément et dont la variation des signaux redox est importante.

Néanmoins, ce travail reste à compléter, des tests de sélectivité et l'application dans des échantillons réels sont essentiels pour mettre en évidence la fiabilité du système proposé. Comme application de cette stratégie, nous avons envisagé d'adapter cette méthode dans l'objectif de détecter une bactérie donnée tout en assurant un suivi de son activité grâce à l'un de ses métabolites.

Références bibliographiques du Chapitre 4

- [1] X. Liang, W. Zhu, Z. Lv, Q. Zou, *Molecular Computing and Bioinformatics*, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24132358>.
- [2] E. V. Huntington. New sets of independent postulates for the algebra of logic, with special reference to Whitehead and Russell's *Principia mathematica*. *Trans. Amer. Math. Soc*, pages 274–304, 1933
- [3] C. Wu, S. Wan, W. Hou, L. Zhang, J. Xu, C. Cui, Y. Wang, J. Hu, W. Tan, A Survey of Advancements in Nucleic Acid-based Logic Gates and Computing for Applications in Biotechnology and biomedicine, *Chem Commun (Camb)*. 51 (2015) 3723–3734. <https://doi.org/10.1039/c4cc10047f>.
- [4] Y. Dong, F. Sun, Z. Ping, Q. Ouyang, L. Qian, DNA storage: research landscape and future prospects, *National Science Review*. 7 (2020) 1092–1107. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa007>.
- [5] N. Srinivas, J. Parkin, G. Seelig, E. Winfree, D. Soloveichik, Enzyme-free nucleic acid dynamical systems, *SYNTHETIC BIOLOGY*. (2017) 11.
- [6] Y. Guo, L. Zhou, L. Xu, X. Zhou, J. Hu, R. Pei, Multiple types of logic gates based on a single G-quadruplex DNA strand, *Scientific Reports*. 4 (2014) 7315. <https://doi.org/10.1038/srep07315>.
- [7] J. Pan, Y. He, Z. Liu, J. Chen, Dual recognition element-controlled logic DNA circuit for COVID-19 detection based on exonuclease III and DNAzyme, *Chem. Commun.* (2020). <https://doi.org/10.1039/D0CC06799G>.

Conclusion générale

Les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse ont pour objectif le développement de nouvelles plateformes à base de nanocomposite MoS₂/Polypyrrole pour la (bio)détection électrochimique de composés chimiques et d'ions métalliques, considérés comme des polluants, responsables de la contamination des eaux de rivières.

Dans la première partie de ces travaux, nous avons mis au point différents biocapteurs à base de nanofeuilles de MoS₂, des nanoparticules de PPy et un composite formé par MoS₂/PPy suivant une stratégie couche par couche sur des électrodes imprimées. Ces nanomatériaux ont été modifiés par un aptamère qui est capable de reconnaître sélectivement l'ampicilline, un antibiotique très utilisé dans l'élevage et considéré comme un potentiel polluant des rivières. Nous avons montré qu'en utilisant cette approche, l'architecture de MoS₂/PPy offre une grande surface électroactive et une activité électrocatalytique importante obtenues grâce à l'assemblage de ces deux nanomatériaux dont les propriétés électroniques et structurales sont très différentes. Nous avons mis en évidence par XPS haute résolution l'effet synergétique entre les nanofeuilles MoS₂ et la couche de PPy qui se traduit par l'augmentation de la capacité de transfert de charge et de la conductivité du composite qui a conduit à des meilleures performances électrochimiques du nanomatériau. La sonde redox naphthoquinone bifonctionnelle synthétisée au cours de la thèse a été immobilisée sur la surface des nanomatériaux par une liaison covalente. Cette sonde redox a servi comme un échafaudage pour l'immobilisation de l'aptamère à la surface de l'électrode et pour le suivi électrochimique de la réaction de bio-reconnaissance. Nous avons montré que les 3 biocapteurs MoS₂, PPy et MoS₂/PPy permettent la détection de l'ampicilline avec des faibles seuils de détection de 66.51, 71.51 et 10.69 fg.mL⁻¹ respectivement. Cependant, le biocapteur formé à base de l'hybride MoS₂/PPy a montré des meilleures performances analytiques en termes de sensibilité et de sélectivité. Ce dernier a été appliqué pour la détection de l'AMP dans des échantillons d'eaux prélevés d'une rivière en Tunisie et a montré que l'identification de ce composé à l'état de trace dans les eaux de rivières était possible.

Dans un second temps, en utilisant la plateforme MoS₂/PPy, nous avons décrit une stratégie qui permet la détection ampérométrique des ions métalliques. Nous avons choisi des ADNzymes dans lesquels sont intercalés des ligands acridine modifiés avec le ferrocène en guise de marqueurs redox et d'intercalants de l'ADN double brins. En présence de Pb²⁺, la lyse catalytique du substrat par le biais de l'ADNzyme, entraîne le relargage de l'intercalant portant la sonde redox dans le milieu. Cette réaction est suivie par la diminution de

l'intensité du signal du ferrocène permettant le dosage de l'analyte. Le biocapteur développé présente d'excellentes performances analytiques en termes de sensibilité et de sélectivité avec une limite de détection de 1.33 nM. D'autant plus, des tests dans des eaux de rivière montrent son applicabilité pour le contrôle de la présence des ions métalliques dans des échantillons réels. Par la suite, ce biocapteur a été intégré dans un dispositif microfluidique comportant un canal fluide et deux cellules électrochimiques. Les premiers résultats obtenus montrent un signal ON mesuré dans le deuxième compartiment électrochimique de la cellule fluide attestant de l'hydrolyse de l'ADNzyme et du relargage de l'intercalant redox (qui se trouve dans le premier compartiment de la cellule fluide). Ce résultat ouvre des perspectives prometteuses qui permettront par la suite l'utilisation de ce dispositif avec un signal positif permettant ainsi de s'affranchir des faux positifs.

Enfin, nous avons proposé dans le dernier chapitre une nouvelle stratégie pour la conception d'un biocapteur bimodal qui permet de détecter deux analytes de natures chimiques différentes tel que l'AMP et le Pb^{2+} . Le biorecepteur a été constitué donc, de l'ADNzyme et de l'aptamère connectés par une chaîne oligonucléotidique qui par hybridation a permis d'avoir le système biologique aptazyme. Le choix des sondes redox utilisés au cours de ce travail est basé sur leurs potentiels redox distincts évitant ainsi tout chevauchement des signaux et assurant le suivi de chaque analyte présent dans la solution. Ce biosystème de détection proposé a permis de détecter individuellement et aussi simultanément les deux analytes. Il a permis de construire deux portes logiques ; une porte logique OU lorsqu'on a une détection d'une seule cible et la porte logique ET lorsque les deux cibles sont détectées simultanément.

En résumé, l'ensemble des résultats de ce travail de thèse démontre le potentiel remarquable de MoS_2 et du nanocomposite à base de MoS_2/PPy pour la réalisation des biocapteurs très sensibles et d'architectures multifonctionnelles permettant la détection sensible des micropolluants dans des matrices complexes tel que les eaux de rivière. Les travaux réalisés ont permis de réduire le temps d'analyse et d'accéder à des niveaux de sensibilité comparables aux techniques conventionnelles avec de très faibles limites de détection. Nous avons montré aussi que le choix de la sonde de capture permet d'étendre les applications de ces biocapteurs et proposer d'associer plusieurs systèmes biologiques dans un seul capteur pour obtenir des circuits logiques.

Ce travail ouvre la voie à plusieurs perspectives aussi bien sur son aspect fondamental qu'applicatif. Il a permis de mettre au point des approches qui peuvent être appliquées pour la détection simple ou simultanée de différents pathogènes et contaminants. Le dispositif bimodal peut être appliqué dans des systèmes de détection liée ; par exemple dans le cas de la détection des bactéries photogènes et leurs métabolites qui permettent de renseigner sur la viabilité. Il ouvre aussi la voie vers le design des portes logiques qui sont les éléments de base pour le développement des processeurs à ADN.

D'un point de vue applicatif, ces capteurs peuvent être intégrés dans des dispositifs microfluidiques en vue de développer des outils d'analyse portatifs pour servir au contrôle dans une centrale de mesure sur site.

Partie expérimentale

Ce chapitre a pour objectif de présenter les méthodes et appareillages utilisés au cours de ce travail de thèse. Dans une première partie on décrit la synthèse des différentes sondes redox ainsi que les techniques expérimentales mises en œuvre.

1. Synthèse organique

- *Solvants et réactifs utilisés*

Les réactions ont été effectuées, sous atmosphère inerte (argon), dans de la verrerie séchée à l'étuve. Les réactifs et solvants commerciaux ont été utilisés sans purification préalable achetés chez Sigma-Aldrich (Allemagne) ou Acros (Belgique).

- *Méthodes de purification et d'identification*

Chromatographie

L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie analytique sur couche mince (CCM) avec des plaques commerciales de silice sur support d'aluminium 60 F₂₅₄ d'origine Fluka. La révélation a été réalisée par irradiation UV à 254 nm. Les produits des réactions ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice 60 (0,040-0,063 mm) d'origine Fluka.

Analyse spectroscopique de résonance magnétique nucléaire (RMN)

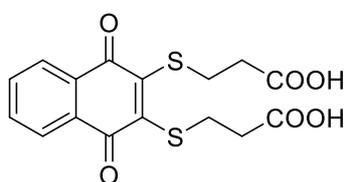
Les spectres RMN du proton et du carbone ont été enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectromètre Bruker AV 300 (300 MHz). Ils ont été réalisés sur des échantillons en solution dans le CDCl₃, le CD₃OD et dans le DMSO-d₆. Les déplacements chimiques "δ" sont exprimés en partie par million (ppm) en prenant comme référence interne le signal du tétraméthylsilane (TMS) pris à 0,00 ppm. Pour l'interprétation des spectres, les abréviations suivantes sont utilisées : singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet ou massif (m).

1.1. Synthèse et caractérisation du dérivé de la quinone (NQ)

A une solution de 3 mmol de 1,4 naphthoquinone dans 20 mL de méthanol (MeOH) est ajouté (10,0 mmol) d'acide 3-mercaptopropanoïque en présence de quelques gouttes d'acide acétique. Le mélange réactionnel est agité pendant 5 heures à reflux d'éthanol. L'avancement de la réaction est contrôlé par chromatographie sur couche mince (CCM). La réaction est refroidie et le solvant est évaporé sous vide. Le produit final est précipité dans

un mélange (éthanol/hexane : 1/5) puis récupéré par filtration. L'acide 3,3'-(1,4-dihydro-1,4-dioxo-2,3-naphtylène-dithio)di-propionique (0,48 g, 42,8 %) est obtenu sous forme d'une poudre jaune.

3,3'-((1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalene-2,3-diyl)bis(sulfanediyl))dipropionic acid

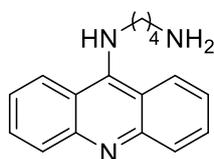


RMN ^1H (d_6 -DMSO) δ (ppm) : 2.67 (t, 2H, 2 x CH_2), 3.11 (t, 2H, 2 x CH_2), 7.81–7.86 (m, 2H, CH_{arom}), 7.95–7.97 (m, 2H, CH_{arom}); RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ 24.76, 31.95, 126.03, 126.34, 127.28, 131.43, 131.68, 133.65, 134.74, 153.40, 172.48, 180.95, 181.83.

1.2. Synthèse et caractérisation du N-(acridin-9-yl)-1,4-butanediamine

Le 9-chloroacridine (2,49 mmol, 0,531 g), le NH-Bocbutylamine (2,81 mmol, 1.3 eq) et le *N,N*-Diisopropylethylamine (4,98 mmol, 2 eq) sont mélangés en une fois dans du DMF (40 ml) comme solvant. Le milieu réactionnel est agité à 70 °C pendant 6h. Le DMF est évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$:2:98 à 10:90), le dérivé aminé protégé est obtenu. Il est à noter qu'une étape de protection supplémentaire est essentielle. Le composé intermédiaire est dissous dans du TFA (20 ml) et agité pendant une nuit à température ambiante. Après évaporation sous pression réduite, le brut réactionnel est passé sur une résine échangeuse d'ions Dowex Cl. Le composé désiré est obtenu avec un rendement de 60 % sous la forme d'une poudre jaune.

*N*¹-(acridin-9-yl)butane-1,4-diamine

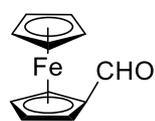


RMN ^1H (CD_3OD): δ 1.85 (q, 2H, CH_2), 2.10 (q, 2H, CH_2), 3.03 (t, 2H, CH_2), 4.24 (t, 2H, CH_2), 7.58 (t, 2H, 2 x CH), 7.84 (d, 2H, 2 x CH), 7.97 (t, 2H, 2 x CH), 8.57 (d, 2H, 2 x CH); RMN ^{13}C (CD_3OD): δ 19.35, 25.62, 27.55, 40.24, 113.15, 119.40, 124.77, 135.95, 140.56,

1.3. Synthèse et caractérisation du ferrocène carboxaldéhyde

La réaction est réalisée dans un tube de Schlenk, sous atmosphère d'argon. A une solution de ferrocène (4,0 g, 21,0 mmol) dans le THF anhydre (200 ml) à -74°C est ajouté goutte à goutte une solution de *t*-butoxyde de potassium (0,30 g, 2,67 mmol) et de *t*-BuLi (1.6M)

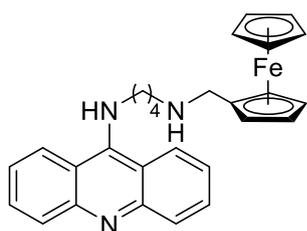
(25,3 ml, 43,01 mmol) tout en maintenant une température inférieure à -70°C . Après 1h d'agitation, (4,0 ml, 50,4 mmol) de DMF (préalablement distillé et séché sur du CaH) est ajouté à -70°C . Le bain de refroidissement est retiré et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation jusqu' à atteindre une température de -40°C . Le milieu réactionnel est hydrolysé avec de l'eau distillée. Le THF et le t-butanol sont évaporés sous pression réduite. Le brut réactionnel est extrait avec plusieurs portions de CH_2Cl_2 . La phase organique est séchée sur du MgSO_4 . Le résidu réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice par une série d'éluant : (1) hexane pour éliminer le ferrocène ; (2) CH_2Cl_2 pour récupérer le ferrocène carboxaldéhyde et (3) CH_2Cl_2 /éther diéthylique 1:1 pour éliminer le ferrocène dialdéhyde. Le ferrocène carboxaldéhyde, est obtenu avec un rendement de 90,7 % sous la forme d'un solide rouge brique.



RMN ^1H (CDCl_3): δ 4.81 (t, 2 H, Cp), 4.60 (t, 2 H, Cp), 4.29 (m, 5 H, Cp). 9.95 (s, 1 H, CHO);

1.4. Synthèse et caractérisation du dérivé Acridine-Ferrocène (Acridine-F ζ)

Une solution équimolaire de (1 mmol) de ferrocène monoaldéhyde et de N-(acridin-9-yl)-1,4-butanediamine dans 10 mL de méthanol absolu est agitée à température ambiante pendant 1h. La formation de la base de Schiff correspondante est suivie par CCM dans un mélange de solvant (AcOEt/CycloHex. : 3/1). Après refroidissement du mélange à l'aide d'un bain de glace, 1.5 éq. de NaBH_4 sont ajoutés progressivement à 0°C . Après 30 min d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé avec de l'eau distillée jusqu'à la formation d'un précipité jaune foncé. Le précipité formé est filtré sous vide pour récupérer le produit Acridine-Ferrocène avec un rendement de 99%.



RMN ^1H (360 MHz, CD_3OD): δ 1.85 (q, 2H, CH_2), 2.10 (q, 2H, CH_2), 3.03 (t, 2H, CH_2), 4.24 (t, 2H, CH_2), 7.58 (t, 2H, 2 x CH), 7.84 (d, 2H, 2 x CH), 7.97 (t, 2H, 2 x CH), 8.57 (d, 2H, 2 x CH); 3.51(s, CH_2), 4.81 (2 H, t, Cp), 4.6 (t, 2 H, Cp), 4.29 (m, 5 H, Cp)

2. Préparation de nanofeuilles de MoS₂

1,24 g de tétrahydrate d'hexaammonium heptamolybdate et 2,28 g de thiourée ont été dissous dans 36 ml d'eau distillée et laissés sous agitation vigoureuse pendant 30 minutes. La solution a ensuite été transférée dans un autoclave de 50 ml en acier inoxydable avec revêtement en téflon. L'autoclave est chauffé par la suite à 220°C pendant 24 h, puis refroidi à température ambiante. Les particules noires ont été récupérées par centrifugation ensuite lavées par une solution hydroalcoolique à plusieurs reprises, et enfin séchées sous vide à 60°C pendant 24 h.

3. Présentation des oligonucléotides

Toutes les séquences d'oligonucléotides (ADN) sont obtenues de chez Eurogentec company.

Oligonucléotides	Séquences	K _d
Aptamère de l'ampicilline	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ - GCGGGCGGTTGTATAGCGG-3'	13.4nM
ADNzyme dépendant de Pb ²⁺	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ - CAT CTC TTC TCC GAG CCG GTC GAA ATA GTG AGT-3'	0.71μM
Substrat	5'-ACT CAC TAT rA GGA AGA GAT G-3'	

4. Construction des biocapteurs

4.1. Nanostructuration de l'électrode par (MoS₂, PPy et MoS₂/PPy)

Brièvement, 5 mg.mL⁻¹ de nanofeuilles de MoS₂ ont été dispersés par ultrason dans une solution aqueuse de LiClO₄ (0,5 M). La SPCE a été recouverte de 50 μL de la solution préparée et le potentiel a été balayé de 0 à -0,95 V avec une vitesse de balayage de 50 mV s⁻¹ pendant 10 cycles.

L'électropolymérisation du pyrrole sur SPCE et SPCE/MoS₂ a été réalisée avec la même méthode après optimisation. Une solution de 50 μL contenant 10 mM de pyrrole dans une solution de LiClO₄ 0,5 M a été utilisée pour recouvrir l'électrode SPE. Par la suite le potentiel a été balayé de 0 à 0,8 V pendant 5 s en 2 pulses, pour aboutir à une surface modifiée par le film de polypyrrole nanostructuré.

4.2. Fonctionnalisation de la surface

L'EDA (6mM) a été préparé dans une solution aqueuse 0,5 M de LiClO_4 et déposé sur l'électrode, le potentiel a ensuite été balayé entre -0,2 et 0,8 V pendant 2 cycles avec une vitesse de balayage de $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

La modification de l'électrode par la cystamine (6mM) a été réalisée en balayant le potentiel entre -0,2V à 1,2V, pendant 4 cycles avec une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.3. Formation de l'aptacapteur

La sonde redox NQ a été attachée de manière covalente aux amines terminales présentes sur EDA/PPy/MoS₂ en incubant l'électrode dans une solution contenant 10 mM d'EDC et 0.3 mM de NHS pendant 1 h. La surface de l'électrode a été soigneusement lavée avec du PBS pour éliminer les molécules NQ non attachées. Enfin, l'incubation des électrodes dans 10 μM de l'aptamère fonctionnalisé par un groupement aminé en 5', pendant 30 min à 35°C, conduit à leur fixation covalente par une liaison amide.

Afin d'empêcher toute interaction non spécifique, une étape de blocage a été réalisée en incubant l'électrode pendant 30 min dans une solution aqueuse de 1 mM d'éthanolamine. Le biocapteur a finalement été stocké dans une solution de PBS à 4 °C pour la stabilisation.

4.4. Formation du complexe d'affinité aptamère/analyte

La formation du complexe d'affinité Aptamère/analyte est obtenue par incubation de la bioélectrode dans des solutions contenant différentes concentrations de l'AMP à température ambiante pendant 30min. Par la suite, la surface de l'électrode est soigneusement lavée avant de procéder à l'analyse.

4.5. Association de l'ADNzyme avec l'intercalant Redox

La réaction consiste à plonger l'électrode modifiée dans une solution tampon contenant un mélange de ADNzyme 10nM portant des groupes amines en position 5', l'ADN complémentaire (10nM), 1mM d'intercalant ou acridine-ferrocène et 10 mM d'EDC comme agent de couplage à 35° C, pendant 3heures. La fixation covalent de l'ADNzyme à l'acide carboxylique terminal présent sur Gly/PPy/MoS₂ est accompagnée par l'hybridation de l'ADNzyme avec son substrat puis de l'intercalation de l'acridine-ferrocène entre les bases de la paire d'ADN. Enfin, la surface de l'électrode a été soigneusement lavée avec de l'eau désionisée pour éliminer les molécules non fixées.

4.6. Clivage de l'ADNzyme par Pb^{2+}

Le clivage de l'ADNzyme en présence de Pb^{2+} est réalisé par incubation de l'électrode à température ambiante pendant 30 min. Le lavage de l'électrode avant d'effectuer les mesures électrochimiques permet d'éliminer l'intercalant acridine-ferrocène libéré.

4.7. Intégration dans des puces microfluidiques

4.7.1. Fabrication des puces microfluidiques

Le masque chromé pour la lithographie optique est obtenu en utilisant la lithographie électronique. Les dessins sont réalisés en utilisant le logiciel L-edit. Les principales étapes de la fabrication des puces substrat/PDMS sont :

- La lithographie des électrodes et des pistes électriques sur le substrat (verre ou SiC/graphène).
- La métallisation de ces électrodes et le lift-off.
- La fabrication du moule SU8 puis le moulage du capot en PDMS contenant les chambres et les canaux microfluidiques (dans lesquels circulent les analytes).

Par la suite les puces microfluidiques ont été fonctionnalisées par Gly par voies électrochimiques et modifiées par l'ADNzyme suivant le protocole décrit précédemment.

4.7.2. Les paramètres fluidiques

Le clivage du substrat par l'ADNzyme en présence du de Pb^{2+} est réalisé à température ambiante à l'intérieur de la biopuce fluidique, en suivant un protocole quasi-dynamique basé sur deux étapes où on alterne haut flux et régime statique. La première étape consiste à appliquer un débit élevé de $100 \mu\text{L}/\text{min}$ de Pb^{2+} pendant 1 minute. Le flux est ensuite arrêté pendant 15 minutes produisant un régime de diffusion statique. Ce protocole à deux étapes a été ensuite répliqué quatre fois (total = 60 minutes) avec un suivi après chaque 15 min.

5. Techniques de caractérisation et d'exploitation

5.1. Techniques de caractérisation

5.1.1. Les méthodes spectrales

Les expériences de photoémission à haute résolution ont été réalisées en utilisant le rayonnement synchrotron de la ligne de faisceaux TEMPO du synchrotron SOLEIL, en France. Les données XPS ont été enregistrées au moyen d'un analyseur MBS A -1. Les mesures ont été effectuées avec une énergie de passage de 100 eV et l'énergie des photons utilisée pour les niveaux du cœur indiqués ici est de 580 eV. La résolution énergétique globale (ligne de faisceau et spectromètre) est estimée à moins de 0,1 eV. Tous les spectres XPS ont été calibrés avec de l'Au 4f7/2 à une énergie de liaison de 84 eV sur un substrat d'Au propre.

Les caractérisations FT-IR ont été obtenues à l'aide d'un spectromètre Bruker IFS66 FT-IR (Bruker, Allemagne) équipé d'un détecteur au mercure cadmium-tellure (MCT) et d'un cristal de germanium à réflectance totale atténuée (ATR).

Les spectres Raman ont été obtenus à température ambiante par un spectrographe Raman Horiba Jobin Yvon avec un détecteur CCD.

5.1.2. Les méthodes microscopiques

Les images de microscopie à force atomique (AFM) ont été acquises en mode tapping par une pointe en silicone Nanosensors (PPP NCSTR) avec une gamme de fréquence de 76 à 263 kHz. Les images ont été enregistrées avec le logiciel WsXM. La topographie en mode tapping et le phasage des images sont effectués par le biais du logiciel Innova AFM Bruker avec NanoDrive v8.02.

Des micrographies au microscope électronique à balayage (MEB) et des spectres de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) ont été enregistrés à l'aide d'un MEB environnemental FEI (Institut ICMMO, France).

5.2. Techniques d'exploitation

Les mesures électrochimiques : voltampérométrie cyclique (CV), spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) ont été enregistrées à l'aide d'un Metrohm AutolabPGstat 12 contrôlé

par le logiciel Nova® et la voltampérométrie à ondes carrées (SWV) a été enregistrée à l'aide de μ Stat8000Multi Potentiostat/Galvanostat contrôlé par DropView 8400.

Toutes les études électrochimiques présentées dans ce travail ont été développées sur des électrodes de carbone sérigraphiées (réf. DRP-110) achetées chez DropSens (Metrohm France). Les électrode imprimées de carbone sont formées par une électrode de travail, d'une électrode auxiliaire en carbone graphite, et d'une référence en Ag/AgCl. L'ensemble permet d'avoir des cellules jetables utilisables pour des analyses sur le terrain à des coûts raisonnables. (**Figure Pe.1**). Une activation préalable de la surface de l'électrode de travail s'avère nécessaire. Cette étape est réalisée en déposant 25 μ L d'une solution de H_2SO_4 0,5 M sur l'électrode de travail et en balayant le potentiel durant 5 cycles à une vitesse de 50 mV/s de 0 V à 1,5 V.

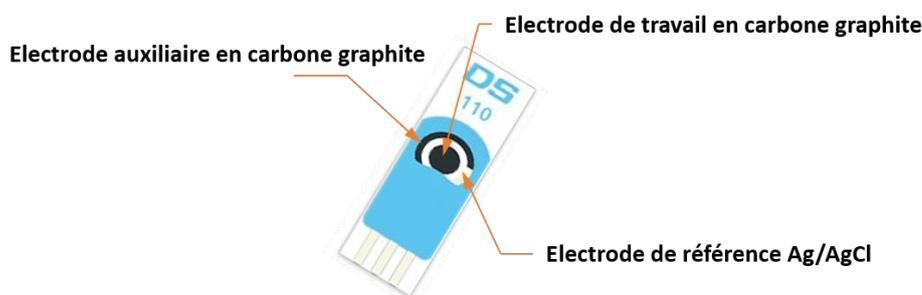


Figure Pe.1. Représentation schématique d'une électrode imprimée de carbone

Les techniques électrochimiques d'analyse utilisées :

a. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique est la plus universelle des méthodes électrochimiques, pouvant servir à la fois comme méthode d'élucidation de mécanismes de réactions, ou comme technique analytique. Le principe général de la voltampérométrie est l'enregistrement du courant quand on fait varier le potentiel. Cette technique nous permet essentiellement d'avoir des informations sur la réversibilité des systèmes redox.

b. Voltampérométrie à signaux carrés

La voltampérométrie à signaux carrés (ou SWV pour l'anglais square wave voltammetry) utilise des impulsions rectangulaires de potentiel d'amplitude constante et de durée égale à la moitié de la période de la « vague ». Le courant est alors mesuré avant le début de l'impulsion et juste avant la fin de celle-ci (le courant capacitif étant quasiment nul). Les

variations des courants faradique et capacitif mesurés à chaque impulsion évoluent au cours du temps.

c. Spectrométrie d'impédance électrochimique

La spectrométrie d'impédance électrochimique est une méthode puissante de caractérisation de la surface. Elle est basée sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation imposée du système électrochimique étudié. Couramment, la perturbation est sinusoïdale. Le signal appliqué est donc de la forme suivante :

$$E(t) = E_m \cos(\omega t)$$

La réponse en courant parcourant le composant électrochimique est de la même forme avec un déphasage φ comme l'illustre l'équation suivante :

$$I(t) = I_m \cos(\omega t - \varphi)$$

L'impédance électrochimique se définit comme étant le nombre complexe $Z(\omega)$ résultant du rapport :

$$Z(\omega) = E(\omega) / I(\omega) = 1/j \omega c$$

Où, en mode potentiostatique, $E(\omega)$ est la perturbation imposée à un potentiel maximal choisi

E_m et $I(\omega)$ est la réponse en courant du composant étudié.

[A good scientist is a person in whom the childhood quality of perennial curiosity lingers on. Once he gets an answer, he has other questions]

Frederick Seitz

Titre : Nanobiocapteurs pour la détection de micropolluants

Mots clés : Biocapteurs électrochimiques, Nanocomposites, ADNzyme, Aptamère

Résumé : La surveillance des polluants environnementaux nécessite des approches complémentaires aux méthodes physico-chimiques actuels pour pallier le manque de données sur la contamination des cours d'eau et évaluer les risques pour la santé publique et la sécurité environnementale. Les biocapteurs peuvent constituer une solution pertinente car ils sont dotés d'excellentes performances analytiques. C'est dans ce contexte, que s'inscrivent les travaux de cette thèse. L'objectif de ce travail consiste en la mise au point de biocapteurs électrochimiques de micropolluants organiques et de métaux lourds. Au cours de cette étude nous avons porté un intérêt particulier à la détection de deux micropolluants de nature chimique différente ; l'ampicilline qui est un antibiotique à large spectre, et le plomb. Pour ce faire, diverses stratégies pour élaborer ces biocapteurs ont été adoptées tenant compte d'une part le transducteur et d'autre part les biorécepteurs. Ainsi, pour le transducteur, des électrodes imprimées ont été modifiées par des nanocomposites formés de nanoparticules de polymères organiques conducteurs : le polypyrrole et de nanomatériaux inorganiques semi-conducteurs de type 2D : les nanofeuilles MoS₂. Le but est de démontrer l'effet synergétique de leurs propriétés respectives sur les performances analytiques du biocapteur.

Selon l'applications envisagées, différents biorécepteurs oligonucléotidiques ont été utilisés. Nous avons ainsi développé trois types de biocapteurs. Les premiers sont des biocapteurs à base d'aptamère qui est capable de se lier spécifiquement à l'ampicilline. Le deuxième est un capteur à base de l'ADNzyme qui s'hydrolyse en présence de l'ion plomb (II). Le dernier biocapteur est formé avec un nouveau système biologique proposé au cours de ce travail, ce dernier se base sur la combinaison de l'aptamère avec un ADNzyme pour former un aptazyme en vue de réaliser la détection simultanée des deux micropolluants. Des approches pour obtenir une détection ampérométrique ont été également étudiées en jouant sur le choix de la sonde redox et la stratégie de son introduction dans le système de détection. Selon leur mode de fonctionnement, différentes sondes redox ont été synthétisées permettant le suivi de la biorecognition. Les résultats obtenus montrent le potentiel remarquable des nanomatériaux hybrides organique/inorganique pour la réalisation des systèmes de détection électrochimique sensibles, sélectives et stables. Par ailleurs ces travaux ouvrent la voie à plusieurs perspectives vers l'intégration dans des dispositifs fluidiques en vue de les utiliser comme station de contrôle de contaminants métalliques dans les effluents ainsi que la construction de portes logiques.

Title : Nanobiosensors for micropollutant detection

Keywords : Electrochemical biosensors, Nanocomposites, DNAzyme, Aptamer

Abstract : The monitoring of environmental pollutants requires complementary approaches to current physico-chemical methods to address the lack of data on water contamination and to assess risks to public health and environmental safety. Biosensors can be a relevant solution as they have excellent analytical performances.

The aim of this thesis is based on the development of electrochemical biosensors for organic micropollutants and heavy metals detection. We have shown a particular interest in the detection of two micropollutants with different chemical structure; ampicillin which is a broad-spectrum antibiotic, and lead. For this purpose, various strategies were adopted for the design of biosensors taking into consideration the choice of both the transducer and the bioreceptors. Thus, for the transducer, screen-printed carbon electrodes have been modified by nanocomposites made of nanoparticles of conductive organic polymers: polypyrrole and 2D semiconducting inorganic nanomaterials: MoS₂ nanosheets. This study demonstrates the synergistic effect resulting from the use of nanocomposites, on the biosensor's analytical performances.

Different oligonucleotide bioreceptors have been used in this work. We have thus developed three types of biosensors. The first is an aptamer-based biosensor that is capable to bind specifically the ampicillin. The second is a DNAzyme based sensor that is cleaved in the presence of lead (II). The last biosensor is formed with a new biological system, biosensor is formed with a new biological system, proposed in this work, which is based on the combination of an aptamer with a DNAzyme to form an aptazyme in order to perform the simultaneous detection of both micropollutants. According to the bioreceptor behavior, different redox probes have been synthesized allowing the monitoring of the biorecognition. The results obtained show the remarkable potential of organic/inorganic hybrid nanomaterials for the conception of sensitive, selective, and stable electrochemical detection systems. Moreover, this work paved the path to several perspectives with their integration in microfluidic devices in order to use them as a control station for metallic contaminants wastewater as well as the construction of logic gates.