



HAL
open science

Développement de capteurs électrochimiques pour la détection du Cr(VI), interleukine-10 et des allergènes

Nazha Hilali

► **To cite this version:**

Nazha Hilali. Développement de capteurs électrochimiques pour la détection du Cr(VI), interleukine-10 et des allergènes. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I; Université Hassan II (Casablanca, Maroc), 2022. Français. NNT : 2022LYO10013 . tel-04719172

HAL Id: tel-04719172

<https://theses.hal.science/tel-04719172v1>

Submitted on 3 Oct 2024

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.



N°d'ordre NNT :
2022LYO10013

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

en cotutelle avec
l'Université Hassan II-Casablanca

Ecole Doctorale ED 206
Ecole Doctorale de chimie de Lyon

Discipline : Chimie analytique, Biotechnologie

Soutenue publiquement le 24/09/2022, par :
Nazha HILALI

Développement de capteurs électrochimiques pour la détection du Cr(VI), interleukine-10 et des allergènes

Devant le jury composé de :

Nom, prénom	grade/qualité	établissement/entreprise
ABOUDKHIL, Souad	Professeure, UHII-Casablanca	Présidente
FOURNIER-WIRTH, Chantal	Directrice de recherche, EFS-Montpellier	Rapporteuse
KORRI-YOUSSOUFI, Hafsa	Directrice de recherche, CNRS-Paris	Rapporteuse
BAUSELLS ROIGE, Joan	Chercheur, Université de Barcelone	Examineur
EL BARI, Nezha	Professeure, UMI-Meknès	Examinatrice
LEONARD, Didier	Professeur des universités, UCBL1	Examineur
AMINE, Aziz	Professeur, UHII-Casablanca	Directeur de thèse
ERRACHID EL-SALHI, Abdelhamid	Professeur des universités, UCBL1	Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A mes très chers parents, à la mémoire de mes grands-parents,

A qui je dois ce que je suis. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma vive gratitude, mon intime attachement et ma profonde affection. Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, tous les mots ne sauraient exprimer ma reconnaissance.

A tous les membres de ma famille sans aucune exception, qui sans leur encouragement ce travail n'aura jamais vu le jour

A mes chères amies et collègues

Narjiss, Raouia, Maliana, Ghita, Dounia, Loubna, Sophia, Jihane, Ampere, Aminu abdullahi, Abdelali, Anis, Isaac, Pouyan, Abdelghani, Abdelhafid, Abderrahman, Abdellatif et Mehdi pour les agréables moments que nous avons partagés.

A tous mes amis (es)

A toutes les équipes du laboratoire GPE, FST Mohammedia, Université Hassan II Casablanca. Et du laboratoire de Micro-Nanobiotechnologies à l'institut des Sciences Analytiques, Université Lyon1.

A tous les doctorants et les doctorantes et tous mes encadrants tout au long de ma thèse, sans oublier les enseignants qui ont contribué à ma formation.

A tous ceux et celles qui me sont très chers (es).

Remerciements

La réalisation de ce travail n'a pu aboutir que par l'assistance et l'intervention inconditionnelle de plusieurs personnes dont les apports ne pourraient être qu'infiniment reconnus.

Le présent travail est réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre le laboratoire de Génie des Procédés et d'Environnement à la Faculté des Sciences et Technique Mohammedia de l'Université Hassan II Casablanca-Maroc sous la direction du Professeur **Aziz AMINE**, et l'équipe de Micro-Nanobiotechnologies à l'Institut des Sciences Analytiques-Université Claude Bernard Lyon 1, France sous la direction du Professeur **Abdelhamid ERRACHID EL SALHI**. Je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements pour leurs soutien, encouragements, disponibilité, précieux conseils et la confiance qu'ils m'ont accordée.

Mes remerciements sont adressés également à mes co-directrices de thèse Professeurs **Hasna MOHAMMADI** et **Nadia ZINE LOUKILI** pour l'aide qu'elles m'ont apportée afin d'élaborer ce travail. Je vous remercie profondément pour votre encouragement et aussi d'être toujours là pour m'écouter et m'aider.

Je tiens à remercier ensuite les membres de jury qui m'ont fait l'honneur d'avoir bien voulu participer à l'évaluation de ce travail : Dr. **ABOUDKHIL Souad**, Professeur des Universités à la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Dr. **FOURNIER-WIRTH Chantal**, Directrice de Recherche à l'Etablissement Français du Sang (EFS) à Montpellier, Dr. **KORRI-YOUSOUFI Hafsa**, Directrice de Recherche CNRS à Orsay Cedex, Dr. **BAUSSELLS ROIGE Joan**, Professeur au Campus UAB à Bellaterra (Barcelona), Dr. **EL BARI Nezha**, Professeure à l'université Moulay Ismail Meknès et Dr. **LEONARD Didier**, Professeur des Universités à l'université Lyon 1, qui ont accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je remercie également et j'exprime ma profonde considération et ma grande estime au Professeurs **Nicole JAFFEREZIC** et **Abdelhamid ELAISSARI**. Mes remerciements sont adressés également à **Marie HANGOUET**, **Marie MARTIN** et **Francesca BELLAGAMBI** pour leur disponibilité tout au long de mon séjour à l'Institut des Sciences Analytiques. J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres des deux laboratoires, professeurs et techniciens.

Je remercie aussi toutes les personnes que j'ai côtoyées au quotidien tout au long de ma thèse, un grand merci aux étudiants qui m'ont accompagné durant le début de ma recherche au laboratoire de génie des procédés et d'Environnement, merci Abdelghani, Youness, Jihane, Abdellatif, Sophia, loubna, Mehdi. Merci pour leurs moralités, soutien et aide. Un grand merci aussi à Narjiss, Raouia, Abderrahman, Maliana, Dounia et hafid. Merci à mes amis et collègues de l'équipe Micronanobiotechnologies, Anis, Ampere, Isaac, Kahina, Hamdi, Ibrahim et Pouyan.

Ce travail a été financé par **PHC Maghreb 2018** (n° 39382RE), **Bourse EIFFEL 2020** (n° P739362H) et **CNRST** (Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique - Maroc).

Liste des publications

- **Hilali, N.**, Ghanam, A., Mohammadi, H., Amine, A., García-Guzmán, J. J., Cubillana-Aguilera, L., & Palacios-Santander, J. M. (2018). **Comparison between modified and unmodified carbon paste electrodes for hexavalent chromium determination.** *Electroanalysis*, 30(11), 2750-2759.
- **Hilali, N.**, Mohammadi, H., Amine, A., Zine, N., & Errachid, A. (2020). **Recent advances in electrochemical monitoring of chromium.** *Sensors*, 20(18), 5153.
- **Hilali, N.**, Abdullahi, M. A., Bellagambi, F. G., Hangouër, M., Elaissari, A., Jaffrezic-Renult, N., ... & Errachid, A. **Copper-Free Click Chemistry Assisted Antibodies Immobilization for Immunosensing Of IL-10 Cytokine.** In *2021 International Workshop on Impedance Spectroscopy (IWIS)* (pp. 20-25). IEEE.

Articles en phase de révision et soumission

- **Nazha Hilali**, Francesca G. Bellagambi, Marie Hangouët, Marie Martin, Joan Bausells, Hasna Mohammadi, Aziz Amine, Nadia Zine, Abdelhamid Errachid. **“copper-free click chemistry based electrochemical immunosensor for monitoring il-10 cytokine in saliva”**
- **A new immunosensor based on copper-free click chemistry for detection of specific IgG associated with peanuts and hazelnuts allergens in rabbit sera**
- **Copper-free click chemistry assisted peptides immobilization for detection of IgG and/or IgE associated with hazelnuts and peanuts allergens in rabbit and human sera**

Liste des communications orales

- **Nazha HILALI**, Musbahu AMINU ABDULLAHI, Francesca G. BELLAGAMBI, Marie HANGOUËT, Abdelhamid ELAISSARI, Nicole JAFFREZIC-RENUIT, Joan BAUSELLS, Hasna MOHAMMADI, Aziz AMINE, Nadia ZINE, & Abdelhamid ERRACHID “**Copper-free click chemistry assisted antibodies immobilization for immunosensing of IL-10 cytokine.** 14th international workshop on impedance spectroscopy, qui s’est déroulé le 29 septembre-01 octobre 2021 à l’université de Chemnitz, Allemagne.

Liste des communications par affiche

- **N. Hilali**, H. Mohammadi, A. Amine, J. Bauselles, N. Zine, A. Errachid. « **Development of gold interdigitated electrodes for measurements of heart failure biomarkers in saliva** » 9th international workshop on Biosensors, qui s'est déroulé le 09-11 Octobre 2019, Hôtel El Ati, Erfoud, Maroc.
- **Nazha Hilali**, Abdelghani Ghanam, Hasna Mohammadi, Aziz Amine « **Comparaison entre les électrodes à pâte de carbone modifiées et non modifiées pour la détermination du chrome hexavalent** » 3^{ème} édition de la Journée doctorale, 04 Avril 2019, FSTM, Maroc.
- Aziz Amine, **Nazha Hilali**, Abdelghani Ghanam, Hasna Mohammadi « **Electrochemical determination of lead, cadmium and hexavalent chromium at trace levels using modified carbon paste electrodes** » 11^{èmes} Journées Matériaux et Applications aux Dispositifs et Capteurs (MADICA 2018), 07-08 Novembre 2018, Mahdia, Tunisie.
- **Nazha Hilali**, Abdelghani Ghanam, Hasna Mohammadi, Aziz Amine « **Détermination électroanalytique des ions de chrome hexavalent à l'aide des électrodes modifiées et non modifiées** ». 2^{ème} édition des Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques, qui s'est déroulée le 26-27 Avril 2018 à l'hôtel Adam Park, Marrakech, Maroc. Prix de la meilleure communication affichée.
- Abdelghani Ghanam, **Nazha Hilali**, Hasna Mohammadi, Aziz Amine « **Highly sensitive detection of chromium (VI) using carbon paste electrode modified with gold nanoparticles** ». 8^{ème} international workshop sur « Biosensors for food safety and environmental monitoring » qui s'est déroulé le 12-14 Octobre 2017 à Rabat, Maroc.

Autres Activités

- Membre du comité d'organisation des «9th international workshop on Biosensors», qui s'est déroulé le 09-11 octobre 2019, à Hôtel El Ati, Erfoud, Maroc.
- Membre du comité d'organisation de la 2^{ème} et la 3^{ème} édition des « Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (JPFSA) », qui se sont déroulées en Avril 2018 et 2019 à Hôtel Adam Park, Marrakech, Maroc.

Table des matières

Résumé	11
Abstract.....	12
الملخص	13
Liste des abréviations.....	14
Liste des figures	16
Liste des tableaux	20
Introduction générale.....	21
Chapitre I : Etude bibliographique	23
Partie I : Capteurs électrochimiques pour les métaux lourds : cas du chrome.....	23
I.1. Introduction et généralités :.....	23
I.2. Propriétés physico-chimiques du chrome	24
I.3. Impact toxicologique.....	25
I.4. Spéciation.....	26
I.5. Méthodes analytiques d'analyse du chrome.....	26
I.6. Capteurs électrochimiques pour la détection du chrome.....	27
I.6.1. Electrodes à base de nanomatériaux de carbone	28
I.6.2. Électrodes à base de nanoparticules métalliques	32
I.6.3. Électrodes à base de nanocomposites	39
I.7. Biocapteurs électrochimiques pour la détermination du chrome hexavalent	56
I.8. Capteurs électrochimiques et biocapteurs pour la détermination du chrome trivalent.....	60
I.9. Capteurs et biocapteurs électrochimiques pour la spéciation du chrome	66
Partie II : Biocapteurs à base de la chimie clic pour des applications cliniques.....	70
I.1. Biocapteurs.....	70
I.1.1. Élément de reconnaissance d'un biocapteur	71
I.1.1.1. Biorécepteurs métabolique.....	71
I.1.1.2. Biorécepteurs d'affinité	71
I.1.2. Élément de transduction	72
I.1.2.1. Transducteur optique	72
I.1.2.2. Transducteur à effet de champ (FET).....	72
I.1.2.3. Transducteur à effet piézoélectrique.....	72
I.1.2.4. Transducteur thermique	72
I.1.2.5. Transducteur électrochimique.....	73
I.2. Chimie clic	73
I.2.1. Les types de la chimie clic	73
I.2.1.1. La cycloaddition d'azoture-alcyne de Huisgen.....	74

I.2.1.2. Cycloaddition D'alkyne-azide en absence du catalyseur du cuivre (SPAAC).....	75
I.2.1.3. La chimie du clic thiol-ène (addition thiol-Michael).....	76
I.2.1.4. La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA).....	77
I.2.2. Biocapteurs à base de la chimie clic	78
Partie III : Méthodes de mesure électrochimique	83
I.1. Voltamétrie cyclique (CV).....	83
I.2. Voltamétrie à impulsion différentielle (DPV).....	84
I.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	85
Chapitre II : Comparaison entre les électrodes en pâte de carbone modifiées et non modifiées pour la détermination du chrome hexavalent.....	99
Résumé	99
II.1. Introduction	100
II.2. Expérimentation	102
II.2.1. Produits chimiques et réactifs	102
II.2.2. Appareillage.....	102
II.2.3. Solutions	103
II.2.3.1. Synthèse de la solution H ₂ AuCl ₄	103
II.2.3.2. Synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs).....	103
II.2.3.3. Préparation de la solution acide.....	103
II.2.3.4. Autres solutions	103
II.2.4. Préparation des électrodes.....	104
II.2.4.1. Préparation des électrodes EPC.....	104
II.2.4.2. Préparation des électrodes EPC modifiées électrochimiquement avec AuNPs (AuNPsE/EPC).....	104
II.2.4.3. Préparation des électrodes EPC modifiées avec des AuNPs synthétisés et coulés en goutte (AuNPs/EPC).....	104
II.2.4.4. Préparation du EPC non modifié en présence de DPC en solution	104
II.2.5. Techniques d'analyse électrochimique	105
II.3. Résultats et discussion.....	105
II.3.1. Caractérisation des AuNPs synthétisés	105
II.3.2. Caractérisation électrochimique des électrodes modifiées	106
II.3.3. Comportement électrochimique du chrome hexavalent (Cr(VI)).....	107
II.3.4. Détermination du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC modifié et non modifié	108
II.3.4.1. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC modifié électrochimiquement avec des AuNPs (AuNPsE/EPC).....	108
II.3.4.2. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'électrodes modifiées par AuNPs par coulage en goutte (AuNPs/EPC).....	111

II.3.4.3. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC non modifié	113
II.3.4.4. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC non modifié en présence de DPC.....	113
II.3.5. Étude des interférences.....	114
II.3.6. Performances analytiques des électrodes EPC modifiées et non modifiées	117
II.3.7. Échantillon réel.....	118
II.4. Conclusions	119
Références	120
Chapitre III : Immobilisation d'anticorps assistée par la chimie du clic sans cuivre pour l'immunodétection de la cytokine IL-10 dans la salive	123
Résumé	123
III.1. Introduction.....	124
III.2. Expérimentation	128
III.2.1. Produits chimiques et réactifs.....	128
III.2.2. Appareillage	129
III.2.3. Préparation de solutions étalons et collecte de salive réelle	130
III.2.4. Mesures électrochimiques.....	131
III.2.5. Bio-fonctionnalisation des microélectrodes en or	131
III.2.6. Impression par microcontact (Micro-tamponnage)	132
III.2.7. Nanoplotter.....	134
III.2.8. Mesure de l'angle de contact (CAM).....	136
III.3. Résultats et discussion	136
III.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	136
III.3.2. Microscopie à fluorescence	137
III.3.3. Angle de contact.....	138
III.3.4. Mesures électrochimiques	139
III.3.4.1. Caractérisation électrochimique de la microélectrode de travail modifiée	139
III.3.4.2. Optimisation de la concentration de DBCO-COOH	140
III.3.4.3. Détection d'Ag-IL-10 sans marquage.....	142
III.3.4.4. Etude d'interférence	144
III.3.4.5. Analyse d'un échantillon de salive dopé.....	145
III.4. Conclusions.....	146
Références	148
Chapitre IV : Développement de nouveaux immunocapteurs basés sur la chimie clic en absence du cuivre pour la détection d'IgG spécifiques associées à des allergènes de cacahuètes et de noisettes dans le sérum.....	153
Résumé	153

IV.1. Introduction	154
IV.2. Produits chimiques et réactifs	156
IV.3. Appareillage	157
Partie 1 : développement d'un nouvel immunocapteur basé sur la chimie du clic sans cuivre pour la détection d'IgG spécifiques associés aux allergènes des cacahuètes et des noisettes dans les sérums de lapin	158
IV.1. Bio-fonctionnalisation de l'électrode en or	158
IV.2. Préparation des solutions standards	159
IV.3. Mesures électrochimiques	160
IV.4. Résultats et discussion	160
IV.4.1. Analyse par fluorescence	160
IV.4.2. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS)	162
IV.4.3. Electrogreffage de la CMA	163
IV.4.4. Application du biocapteur pour la détection des IgG dans les sérums de cacahouète et de noisette en utilisant des peptides de cacahouète	164
IV.4.5. Application du biocapteur pour la détection d'IgG dans le sérum de noisette et de cacahouète en utilisant des peptides de noisettes	167
Partie 2 : Un nouvel immunocapteur basé sur la chimie du clic sans cuivre pour la détection d'IgG spécifiques associés aux allergènes des cacahuètes et des noisettes dans les sérums de lapin et de l'être humain	168
IV.1. Résultats et discussion	170
IV.1.1. Microscopie à fluorescence	170
IV.1.2. Caractérisation électrochimique par la voltammétrie cyclique	174
IV.1.3. Application du biocapteur pour la détection des IgG dans les sérums du lapin	175
IV.1.4. Application du biocapteur pour la détection des IgE dans le sérum de l'être humain	177
IV.2. Conclusions	179
Références	180
Conclusion générale et perspectives	182

Résumé

Les capteurs et les biocapteurs électrochimiques sont largement utilisés en raison de leur faible coût, portabilité, miniaturisation, rapidité, facilité d'utilisation ainsi que leur sensibilité. Ils constituent l'alternative la plus attractive aux méthodes conventionnelles (spectroscopie, ELISA, ...) dans de nombreux domaines tels que les applications cliniques ou environnementales. Dans ce travail, nous nous sommes concentrés dans la première partie sur le développement d'une méthode électrochimique simple pour la spéciation du chrome hexavalent Cr (VI). Pour cette raison, des électrodes à pâte de carbone (EPC) non modifiées et modifiées ont été testées pour la détermination du Cr (VI) en présence d'un excès de Cr (III) en utilisant la voltamétrie différentielle à impulsions. Plusieurs paramètres affectant la performance analytique des électrodes conçues ont été étudiés, notamment : la technique de dépôt de nanoparticules d'or (AuNPs) sur la EPC, la quantité des AuNPs, l'électrolyte support, la présence d'ions chlorure et la concentration de diphénylcarbazine. Enfin, la méthode proposée a été appliquée avec succès pour la détection du Cr (VI) dans des échantillons d'eau de robinet avec des résultats satisfaisants. La deuxième partie de ce travail s'est concentrée sur le développement de nouveaux immunocapteurs basés sur la chimie click en absence de cuivre destinés à des applications cliniques. Tout d'abord, l'approche de la chimie click a été mise en œuvre avec succès pour développer un nouvel immunocapteur électrochimique pour la détection de la cytokine interleukine-10 (IL-10) dans la salive pour le suivi de l'insuffisance cardiaque (IC). La stratégie impliquait la liaison de la dibenzocyclooctyne-amine (DBCO-NH₂) sur des microélectrodes en or modifiées par un thiol-azide. L'utilisation de dibenzocyclooctynes a diminué l'énergie d'activation de la réaction click de cycloaddition, permettant sa réalisation sans avoir recours à la catalyse par le cuivre et avec une efficacité supérieure à celle de la ligation catalysée par le cuivre. Ensuite, la biofonctionnalisation a été réalisée en incubant le capteur préparé dans l'anticorps de capture de l'IL-10 (Anti-IL-10). Enfin, les performances du dispositif développé pour la détection de l'IL-10 ont été évaluées (reproductibilité, limite de détection et application à la salive réelle). En ce qui concerne la dernière partie de ce travail, la même stratégie de chimie click sans cuivre en association avec plusieurs peptides fonctionnalisés par l'azide a été employée pour élaborer un nouvel immunocapteur électrochimique pour la détection d'IgG/IgE spécifiques aux allergènes de cacahuètes et de noisettes dans les sérums de lapin et de l'être humain. Sept peptides fonctionnalisés ont été testés en termes de sensibilité et de spécificité pour la détection des allergènes. La stratégie a consisté à lier la dibenzocyclo-octyne amine (DBCO-NH₂) à l'acide 4-aminophénylacétique ou à l'acide mercaptohexadécanoïque déjà immobilisés sur la surface de l'électrode en or. Ensuite, les peptides avec des azide-linkers ont été couplés au DBCO-NH₂ via une approche de chimie click sans cuivre. En outre, la détection électrochimique d'anticorps (IgG) de lapin anti-cacahuète et anti-noisette et d'anticorps humains (IgE) anti-cacahuète a été réalisée avec succès.

Mots-clés : Capteur, Biocapteur, Chimie click sans cuivre, Micro-nanobiotechnologie, Cr(VI), Interleukine-10, Insuffisance cardiaque, Allergènes, Cacahuète, Noisette, Sérum, Salive, Micro-tamponnage, Nanoplotter.

Abstract

Electrochemical sensors and biosensors are widely used owing to their low cost, portability, miniaturization, rapidity, ease to use and their sensitivity. They were the most attractive alternative for the conventional methods (spectroscopy, ELISA, ...) in numerous fields such as clinical or environmental applications. Herein, we focused in the first part on the development of a simple electrochemical method for the speciation of hexavalent chromium Cr (VI). For this reason, unmodified and modified carbon paste electrodes (CPE) were tested for the determination of Cr (VI) in the presence of excess Cr (III) using differential pulse voltametry. Several parameters affecting the analytical performance of the designed electrodes were investigated, including: gold nanoparticles (AuNPs) deposition technique on the CPE, quantity of AuNPs, supporting electrolyte, presence of chloride ions and diphenylcarbazide concentration. Finally, the proposed method was successfully applied for the determination of Cr (VI) in tap water samples with satisfactory results. However, the second part of this work focused on developing new immunosensors based on copper-free click chemistry intended to clinical applications. First, the approach of click chemistry has been successfully implemented to develop a new electrochemical immunosensor for cytokine interleukin-10 (IL-10) detection in saliva for heart failure (HF) monitoring. The strategy involved the binding of dibenzocyclooctyne-amine (DBCO-NH₂) onto the azide-thiol modified gold microelectrodes. The use of dibenzocyclooctynes decreased the activation energy for the cycloaddition click reaction, enabling its realization without the need for copper catalysis and with an efficiency greater than that of the copper catalysed ligation. Then, the biofunctionalization was performed through incubating the prepared sensor in the capture antibody of IL-10 (Anti-IL-10). Then, the performance of the developed device for detection of IL-10 was evaluated (reproducibility, limit of detection and the application in real saliva). Regarding the last chapter of our work, the same strategy of copper-free click chemistry in association with several functionalized peptides were employed for elaborating a new electrochemical immunosensor for the detection of specific IgG/IgE towards peanuts and hazelnuts allergens in rabbit and human sera. Seven functionalized peptides were tested in terms of sensitivity and specificity for allergen detection. The strategy involved binding of dibenzocyclo-octyne amine (DBCO-NH₂) to 4-aminophenylacetic acid or mercaptohexadecanoic acid already immobilized onto the gold electrode surface. Then, the peptides with azide-linkers were coupled to DBCO-NH₂ via copper-free click chemistry approach. Moreover, the electrochemical detection of rabbit anti-peanut and anti-hazelnut antibodies (IgG) and human anti-peanut antibody (IgE) were successfully done.

Keywords: Sensor, Biosensor, Copper-free click chemistry, Micro-nanobiotechnology, Cr(VI), Interleukin-10, Heart failure monitoring, Allergens, Peanut, Hazelnut, Serum, Saliva, Micro-contact printing, Nanoplotter.

المخلص

تستخدم المستشعرات الكهروكيميائية وأجهزة الاستشعار الحيوية على نطاق واسع نظراً لتكلفتها المنخفضة وإمكانية حملها وتصغيرها وسرعتها وسهولة استخدامها فضلاً عن حساسيتها. لذلك فإنها تشكل البديل الأكثر جاذبية للطرق التقليدية في العديد من المجالات مثل التطبيقات السريرية أو البيئية. لذلك ركزنا في هذا الجزء الأول على تطوير طريقة كهروكيميائية بسيطة لاتباع الكروم السداسي. لهذا السبب، أقطاب معجون الكربون غير المعدلة والمعدلة تم اختياره لتحديد الكروم (6) في وجود فائض الكروم (3) الزائد باستخدام قياس الفولتية النبضية التفاضلية. تم فحص العديد من المعلمات التي تؤثر على الأداء التحليلي للأقطاب المصممة، بما في ذلك: الترسيب لجسيمات الذهب النانوية على أقطاب معجون الكربون، كميتها، الإلكتروليت الداعم، ووجود أيونات الكلوريد وتركيز ثنائي فينيل كاربازيد. في الأخير، تم تطبيق الطريقة المقترحة بنجاح لتقدير الكروم (6) في عينات مياه الصنبور بنتائج مرضية. في حين، ركز الجزء الثاني من هذا العمل على تطوير أجهزة استشعار مناعية جديدة تعتمد على كيمياء النقر الخالية من النحاس والمخصصة للتطبيقات السريرية. أولاً، تم تنفيذ نهج النقر الكيميائي بنجاح لتطوير جهاز استشعار مناعي كهروكيميائي جديد للكشف عن السيبتوكين إنترلوكين-10 في اللعاب لمراقبة قصور القلب. تضمنت الإستراتيجية ربط ثنائي بنزوسيكلو أكتين أمين على أقطاب الذهب الدقيقة المعدلة بالثيول-ازيد. أدى استخدام ثنائي بنزوسيكلو أكتينات إلى تقليل طاقة التنشيط لتفاعل النقرات الحلقية، مما يتيح تحقيقه دون الحاجة إلى تحفيز النحاس وبكفاءة أكبر من كفاءة الربط المحفز بالنحاس. بعد ذلك، تم إجراء الوظيفة الحيوية من خلال نقر المستشعر المُجهز في الجسم المضاد للقبض على إنترلوكين-10 بعد ذلك، تم تقييم أداء الجهاز المطور للكشف عن إنترلوكين-10. فيما يتعلق بالفصل الأخير من عملنا، تم استخدام نفس استراتيجية كيمياء النقرات الخالية من النحاس بالاشتراك مع العديد من البيبتيدات الوظيفية لتطوير جهاز استشعار مناعي كهروكيميائي جديد للكشف عن الأجسام المضادة للقول السوداني وللبندق المسببة للحساسية والمتواجدة في مصلي الأرانب والبشر. لهذا الغرض تم اختبار سبعة بيبتيدات وظيفية من حيث الحساسية والنوعية للكشف عن مسببات الحساسية. تضمنت الإستراتيجية ربط ثنائي بنزو سيكلو-أوكتين أمين بحمض 4-أمينوفينيل أسيتيك أو حمض مركابتوهيكساديكانويك المثبت على سطح القطب الكهربائي الذهبي. بعد ذلك، تم إقران البيبتيدات-ازيد مع ثنائي بنزو سيكلو-أوكتين أمين بواسطة كيمياء النقر الخالي من النحاس. علاوة على ذلك، تم إجراء الكشف الكهروكيميائي للأجسام المضادة للقول السوداني وللبندق في مصل الأرانب والأجسام المضادة المضادة المضادة للقول السوداني في المصل البشري بنجاح.

الكلمات الرئيسية: المستشعر، المستشعر الحيوي، كيمياء النقر الخالية من النحاس، التكنولوجيا الحيوية الدقيقة، قصور القلب، مسببات الحساسية، القول السوداني، البندق، المصل، اللعاب، التخزين، إنترلوكين-10، الكروم (6) المؤقت الدقيق، النانوبلوتر

Liste des abréviations

AuNPs : nanoparticules d'or

Cacahouète 1-t0 : Sérums pré-immuns de lapin injecté avec de la cacahouète

Cacahouète 1-t2 : Sérums hyper-immuns de lapin injecté avec de la cacahouète

CMA : carboxymethylaniline (Acide 4-aminophénylacétique)

Cu(I) : Cuivre

CV : voltammétrie cyclique

DBCO-COOH : dibenzocyclooctyne acide

DBCO-NH₂ : dibenzocyclooctyne amine

DPC : diphénylcarbazine

DPV : voltammétrie à impulsions différentielle

DXR : doxorubicin hydrochloride

EDC : 1-Ethyl-3-(3- diméthylaminopropyl) carbodiimide

EDS : Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie

EPC : électrode à pâte de carbone

ET : electrode de travail

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

IC : Insuffisance cardiaque

IgE : Immunoglobulines E

IgG : Immunoglobulines G

IL-10=Ag-IL-10 : Interleukine-10

LOD : Limite de détection

mAb-IL-10 : Anticorps monoclonal de l'interleukine-10

MHDA=thiol-acide : acide mercaptohexadécanoïque

Peptide-N₃ : peptide fonctionnalisé par l'azide

NHS : N-hydroxysuccinimide

Noisette 1-t0 : Sérums pré-immuns de lapin injecté avec de la noisette

Noisette 1-t2 : Sérums hyper-immuns de lapin injecté avec de la noisette

pAb-IL-10 : Anticorps polyclonal de l'interleukine-10

PBS : Tampon phosphate

IL-10 : Antigène de l'interleukine-10

RSD : écart-type relatif

SIE : Spectroscopie d'impédance électrochimique

Liste des figures

Figure 1. Schéma des différents nanomatériaux utilisés pour la détection du chrome (Hilali et al. 2018).....	28
Figure 2. Réponse typique du Cr(VI) à : (a) Électrode non modifiée ; (b) Électrode modifiée par des AuNPs utilisant une stratégie d'électrodéposition ou de coulée en goutte.	34
Figure 3. Schéma des différents biocapteurs utilisés pour la détermination du chrome (Hilali, N et al. 2018).....	56
Figure 4. Classification des biocapteurs.	70
Figure 5. Réactions de cycloadditions entre l'alcyne et l'azoture par voie thermique et catalytique...	75
Figure 6. Schéma de la réaction SPAAC A) avec les deux isomères formés et B) entre le dibenzocyclooctyne et l'azide.	76
Figure 7. A) différents acrylates et leurs dérivés, et B) La réaction thiol-Michael	77
Figure 8. La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA)	78
Figure 9. Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans la préparation de l'immunocapteur pour la détermination de CXCL7 : synthèse assistée par chimie click d'IgG-alcyne-azide-MWCNT et modification de SPCE (1) ; étape de blocage à la caséine et immobilisation de l'anti-CXCL7 (2) ; essai sandwich avec CXCL7 et Biotinanti-CXCL7 (3); incubation avec AP-Strept (4); ajout de 1 NPP et suivi voltamétrique DP de l'oxydation du 1-NP (5) (Guerrero, S. et al. 2019).	81
Figure 10. Schéma des différentes étapes impliquées dans la préparation de l'immunocapteur AP-strept-biotine-dAb-IL-1 β -cAb-IgG-MWCNTs/SPCE par chimie électro-clic (Guerrero, S. et al. 2020).	82
Figure 11. Séquence de balayage de potentiel utilisée en CV (gauche) et exemple de courbe courant potentiel obtenue (droite) (Suparna rudra, 2021).	83
Figure 12. Signal d'excitation pour la voltamétrie à impulsion différentielle (Wang, J. 2006).	84
Figure 13. Représentation du circuit électrique équivalent de Randles.....	86
Figure 14. Représentation d'un diagramme typique de Nyquist	86
Figure 15. A) Histogramme de distribution de taille de DLS et B) Spectre d'absorption UV-Vis des AuNPs synthétisés. Voltammogrammes cycliques de EPC modifiés : C) avec AuNPsE (déposé électrochimiquement) et D) avec AuNPs coulés en goutte, dans une solution aqueuse de KCl 0,1 M contenant 5 mM [Fe(CN) $_6$] $^{3-/4-}$. Vitesse de balayage 0,1 V \cdot s $^{-1}$	106
Figure 16. Voltammogrammes impulsions différentiels pour : A) EPC de +0,6 V à -0,5 V, B) AuNPsE/EPC et C) AuNPs/EPC de +0,6 V à +0,0 V, obtenus dans une solution tampon acétate 0,05 M (pH 4,0) contenant 2 mg \cdot L $^{-1}$ de Cr(VI). D) Voltammogrammes impulsions différentiels de +0,0 V à +0,6 V à EPC enregistrés en solution acide (pH 1,14) en présence de : a) 970 μ g \cdot L $^{-1}$ de DPC et des concentrations ajoutées de Cr(VI) b) 104 μ g \cdot L $^{-1}$, c) 208 μ g \cdot L $^{-1}$	107
Figure 17. Effet du temps de dépôt. A) Chronoampérogrammes correspondant à l'électrodéposition des AuNPs (0,1 mM HAuCl $_4$ dans 0,5 M H $_2$ SO $_4$, Edep = 0,18 V) à l'électrode en pâte de carbone. B) Le premier balayage de la polarisation de AuNPsE/EPC enregistré dans 0,05 M H $_2$ SO $_4$. Valeurs de temps de dépôt testées : 20, 200 et 400 s.....	109
Figure 18. Effet du temps de dépôt (20, 200, 400 s) des AuNPs sur l'intensité du courant de 2 mg \cdot L $^{-1}$ de Cr(VI) à AuNPsE/EPC dans une solution tampon acétate 0,05 M (pH 4,0)	110
Figure 19. A) Valeurs d'intensité de courant obtenues avec AuNPsE/EPC pour une solution contenant 2 mg \cdot L $^{-1}$ de Cr(VI) dans diverses solutions acides (0,3 M) et dans une solution tampon Britton Robinson 0,04 M (pH 2,0). B) Valeurs d'intensité de courant obtenues à l'aide d'AuNPsE/EPC en fonction du pH pour une solution contenant 2 mg \cdot L $^{-1}$ de Cr(VI) dans des solutions de tampon acétate (0,05 M) et de tampon Britton Robinson (0,04 M).	111

Figure 20. Effet de la quantité d'AuNPs sur l'intensité du courant au EPC dans un tampon acétate 0,05 M (pH 5,5) contenant 1 ppm de Cr (VI).....	112
Figure 21. Effet de la concentration du DPC sur la réduction du signal à l'aide d'un EPC non modifié en milieu acide (pH 1,14) en présence de 52, 104, 208, 416 et 832 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI).....	114
Figure 22. Effet de la concentration de chlorure sur 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de signal Cr(VI) dans un tampon acétate 0,05 M (pH 5,5) à a) AuNPsE/EPC et b) AuNPs/EPC.	115
Figure 23. Effet de la concentration de chlorure sur 1,25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de détection de Cr(VI) en présence de 9,69 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPC à un EPC non modifié en milieu acide (pH1,14).	116
Figure 24. Effet de la concentration en chrome trivalent sur la détection du chrome hexavalent en présence de A) 0,97 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPC et B) 9,69 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPC à un EPC non modifié en milieu acide (pH1,14).	116
Figure 25. A) Voltammogrammes impulsions différentiels pour la détermination du Cr(VI) en solution acide (pH 1,14) en présence de : (a) 970 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPC, et (b) 52, (c) 104, (d) 156, (e) 208 et (f) 260 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI) sur une électrode en pâte de carbone non modifiée. B) Courbe d'étalonnage correspondante du Cr(VI) dans les mêmes conditions expérimentales.	118
Figure 26. A) Voltammogrammes pulsés différentiels obtenus avec un EPC non modifié dans de l'eau du robinet en présence de a) 970 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPC et b) 52 c) 104, d) 156 et e) 208 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI). B) Le % de diminution du signal de DPC en présence de 52, 104, 156 et 208 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI) dans l'eau du robinet.....	119
Figure 27. Résumé graphique de l'immunocapteur destiné à la détection de l'IL-10	124
Figure 28. Image de la plate-forme de biocapteur passivée avec de la résine époxy, intégrant une contre-électrode, une électrode de référence et 4 électrodes de travail en or.	130
Figure 29. Illustrations schématiques des étapes utilisées pour la fonctionnalisation des électrodes d'or : (a) Thiol-azide ($\text{HS-C}_{11}\text{-EG}_4\text{-N}_3$), (b) DBCO-COOH, (c) activation avec EDC/NHS, (d) biofonctionnalisation avec mAb-IL-10 et (e) blocage avec de l'éthanolamine.	132
Figure 30. Montage pas à pas du poste de moulage : a) mélange du mélange PDMS et aspiration de la solution avant dégazage b) dégazage c) positionnement du support, d) positionnement du joint Téflon, e) fixation du tampon et de son bouchon, f) injection du mélange g) poste de moulage après polymérisation et h) tampon PDMS	133
Figure 31. Tampon de PDMS et l'amplification de ses micro-motifs (grossissement $\times 60$)	133
Figure 32. Principales étapes de la fonctionnalisation du substrat en or a) encrage du tampon PDMS b) estampage, c) thiol- CH_3 imprimé par microcontact, incubation dans d) thiol-azide e) DBCO- NH_2 f) mAb-IL-10 g) Antigène Ag- IL-10 et h) Anticorps fluorescent d'IL-10.	134
Figure 33. Schéma d'un cycle de dépôt d'une micro-goutte avec les étapes d'alimentation et d'évacuation de liquide du système (reproduit du site de Gesim bioInstruments).	135
Figure 34. Image du nanoplottter à gauche. Paramètres du nanoplottter pour le dépôt de gouttes, avec axe configuré pour le dépôt de gouttes (axe sur la puce d'or) et axe défini pour la position du site (axe sur le rectangle en verre (support pour la puce d'or)) à droite.	136
Figure 35. Spectres FTIR de (a) Au nu, (b) Au/thiol-azide (c) Au/thio-azide/DBCO-COOH (d) Au/thiol-azide/DBCO-COOH/EDC/NHS et (e) Au /thiol-azide/DBCO/mAb-IL-10 substrats.	137
Figure 36. Image de fluorescence obtenue après incubation dans l'anticorps conjugué Alexa Fluor® 488 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	138
Figure 37. Les images fluorescentes correspondant à l'anticorps conjugué Alexa Fluor® 488 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se lie biologiquement à l'Ag-IL-10 qui est immobilisé sur le substrat en or.....	138
Figure 38. Image de A) Or nu avant nettoyage, B) Or nu après nettoyage, C) HS- $\text{C}_{11}\text{-EG}_4\text{-N}_3$, D) DBCO-COOH, E) EDC/NHS, F) mAb-IL-10	139
Figure 39. Voltammogrammes cycliques (A) et diagramme de Nyquist (B) obtenus pour différentes étapes de fonctionnalisation : (a) Électrode en or (ligne noire) ; (b) après incubation dans le thiol-azide; (c) acide dibenzocyclooctyne, et (d) après l'immobilisation de mAb-IL-10. Les mesures ont été	

effectuées à température ambiante (20 ± 2 °C) en utilisant 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (dans du PBS à pH 7,4) comme sonde rédox.....	140
Figure 40. A) Tracé d'impédance de Nyquist dans 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ pour la détection d'Ag-IL-10 à des concentrations de 5, 25, 50, 75 et 100pg/mL. B) Courbe de calibration avec 0.5mM de DBCO-COOH (ligne rouge) et 2mM of DBCO-COOH (ligne bleu).....	141
Figure 41. A) Diagrammes de Nyquist dans 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ pour la détection d'Ag-IL-10 à 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 pg/mL et B) Étalonnage courbe des données normalisées de l'SIE après utilisation du modèle de circuit équivalent de Randles ($R_1+(Q_1/(R_2+W_1))$) pour la détection d'Ag-IL-10.....	142
Figure 42. Présentation logarithmique des courbes de sensibilité du capteur à chimie clic en absence du cuivre fonctionnalisé avec mAb-IL-10 pour la détection du TNF- α (points rouges) et Ag-IL-10 (points noirs) à différentes concentrations (0.1; 0.25; 0.5; 1 et 5 pg/mL).	145
Figure 43. Tracés d'impédance de Nyquist dans 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ pour la détection d'Ag-IL-10 dans la salive réelle avec des concentrations supplémentaires d'Ag-IL-10 de 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 pg/mL et B) Courbe d'étalonnage des données normalisées de l'SIE après utilisation du modèle de circuit équivalent de Randles ($R_1+(Q_1/(R_2+W_1))$) pour la détection d'Ag-IL-10 à 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 pg/mL dans de la salive réelle non dopée (ligne rouge) et de la salive dopée avec 84 pg/mL d'Ag-IL-10 (ce qui correspond à 4,2 pg/mL après dilution de la salive 20 fois) (ligne verte).	146
Figure 44. Image de la plate-forme de biodétection avec 4 ETs d'or, une électrode de référence interne et une contre-électrode, a) avant le câblage, b) après le câblage, c) protection des connexions et d) la plate-forme finale.	158
Figure 45. Schéma de la procédure de fonctionnalisation de l'électrode en or pour la détection des allergènes.....	159
Figure 46. A) Principales étapes de la fonctionnalisation des ETs d'or par le DXR, B) Images fluorescentes liées au DXR (20 μ g/mL) chimiquement lié au CMA qui est électrographié sur les ETs d'or (a, b et c) et non sur d.	161
Figure 47. Grossissement du ET d'or bio-fonctionnalisé avec peptide en a) absence et b) présence d'IgG de lapin et d'anticorps marqués au FITC (Ab*-IgG). Images fluorescentes liées à l'anticorps FITC biologiquement lié à l'IgG de lapin anti-noisette avec le peptide ID c) EO14 ; d) T12 et e) S4, et à l'IgG de lapin anti-noisette avec le peptide ID f) S14 ; g) EO13 ; h) HL19 et i) GL4.....	162
Figure 48. Spectrogramme de spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie de l'électrode d'or avant (spectrogramme jaune) et après électrodéposition de CMA (spectrogramme marron).	163
Figure 49. Voltammogrammes cycliques de A) électrogreffage de CMA sur ET d'or en variant le potentiel de 0.0 V à -1.2 V vs Ag/AgCl, avec un taux de balayage de 0.05V/s et 15cycles. B) caractérisation de l'électrode dans 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ dans PBS (10mM ; pH 7.4) avant (noir) et après son électrogreffage par CMA (rouge).	164
Figure 50. A) Courbes d'impédance de Nyquist dans 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ préparé dans le PBS (10mM ; pH 7.4) pour la détection d'IgG dans le sérum du lapin à des dilutions de 1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 et 1:5000. Courbes d'étalonnage relatives à la détection d'IgG avec des peptides de cacahouète (S4, EO14, T12) dans 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ en PBS (10mM ; pH 7.4) dans B) le sérum de cacahouète 1-t2 et C) le sérum de noisette 1-t2 pour l'étude des interférences.....	167
Figure 51. Courbes d'étalonnage relatives à la détection d'IgG à différentes dilutions de sérum du lapin (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 et 1:5000) avec des peptides de noisettes (S14, GL4, EO13, HL19) dans 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ en PBS (10mM ; pH 7.4) dans A) le sérum de noisette 1-t2 et B) le sérum de cacahouète 1-t2 (étude des interférences).	168
Figure 52. Schéma de la procédure de fonctionnalisation de l'électrode en or pour la détection des allergènes.....	169
Figure 53. Paramètres du nano-plotter pour le dépôt de gouttelettes, avec l'axe réglé pour le dépôt de gouttes (1) et l'axe réglé pour la position du site (2).	170

Figure 54. Gouttelettes de fonctionnalisation avec différents volumes dans l'ordre allant de 1 à 9. Peptide utilisé est le EO14 (5µM) avec le sérum cacahouète hyper-immunisé (1 :5000).....	172
Figure 55. Schéma du mouvement dynamique des particules dispersées dans une gouttelette évaporée (Hu, H et al. 2005).....	172
Figure 56. Gouttelettes de fonctionnalisation de volume 1000pL avec différents peptides (EO14 ; S4 et T12) (5µM) avec le sérum cacahouète (1 :5000) A) hyper-immunisé (cacahouète 1-t2) et B) pré-immunisé (cacahouète 1-t0).	174
Figure 57. Voltammogrammes cycliques de la micro-électrode d'or dans 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ dans PBS (10mM ; pH 7.4) avant (noir) et après son incubation dans le MHDA (rouge).	175
Figure 58. Courbes d'étalonnage relatives à la détection d'IgG dans les sérum du lapin à différentes dilutions (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 et 1:5000) dans 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ dans le PBS (10mM ; pH 7.4) tout en utilisant A) peptide de cacahouète T12 et B) peptide de noisette GL4.	177
Figure 59. Spectres d'impédance électrochimique dans $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ dans du PBS (10mM ; pH 7.4) pour (a) Peptide ID T12, (b) Sérum humain 1 :250, (c) MNPs-proteine A et (d) Glycine.....	178

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des données électroanalytiques des électrodes à base de nanomatériaux de carbone rapportées pour la surveillance du chrome hexavalent dans plusieurs échantillons réels.	30
Tableau 2. Résumé des données électroanalytiques des électrodes modifiées rapportées par des nanoparticules métalliques pour la surveillance du chrome hexavalent.....	37
Tableau 3. Résumé des données électroanalytiques des électrodes à base de nanocomposites rapportées pour la surveillance du chrome hexavalent.....	44
Tableau 4. Résumé des données électroanalytiques des capteurs photoélectrochimiques rapportés pour la surveillance du chrome hexavalent.....	49
Tableau 5. Résumé des données électroanalytiques des électrodes solides en or modifié rapportées pour la surveillance du chrome hexavalent.	55
Tableau 6. Résumé des données électroanalytiques des capteurs électrochimiques et des biocapteurs rapportés pour la surveillance du chrome trivalent.	64
Tableau 7. Interférence de certains cations testés dans la détection de Cr(VI) à AuNPsE/EPC dans un tampon acétate (pH 5,5).	115
Tableau 8. Comparaison des performances analytiques du EPC modifié et non modifié pour la détermination du Cr(VI).	117
Tableau 9. Détermination du Cr (VI) dans l'eau du robinet à l'aide d'une électrode à pâte de carbone non modifiée en présence de $970 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPC.	119
Tableau 10. Comparaison du rendement analytique avec les données de la littérature	143
Tableau 11. Récapitulatif de tous les essais réalisés dans le sérum du lapin tout en utilisant les peptides ID T12 et GL4.....	176

Introduction générale

Les techniques électrochimiques se basent sur l'interaction entre l'électricité et la chimie. Les grandeurs mesurées sont de nature électriques (courant, potentiel ou la charge) sont proportionnelles aux interactions chimiques. Une telle utilisation de mesures électriques à des fins analytiques a été fortement utilisée pour de nombreuses applications, y compris la surveillance environnementale (détection de métaux lourds, polluants organiques ...), le contrôle de la qualité industrielle mais aussi l'analyse biomédicale (biomarqueurs de maladies, substance biologiques...) (Wang, J. 2006).

La vaste gamme d'applications de capteurs électrochimiques est liée à leurs applications dans le diagnostic précoce de certaines maladies, la surveillance et la détection précise des métaux lourds ayant des effets nocifs suite à une exposition entraînant une toxicité aiguë ou à effet cumulatif. (Agarwal, S et al. 2011; Alissa, E. M et al. 2011; Tellez-Plaza, M et al. 2013; Solenkova, N. V et al. 2014 ; Chowdhury, R., et al. 2018). L'intérêt mondial croissant pour minimiser l'effet néfaste des métaux lourds sur la santé, ainsi que pour rendre les analyses dans le domaine clinique plus fiable, ont créé la nécessité de développer des méthodes analytiques sensibles, spécifiques, rapides et faciles à utiliser permettant la détection des substances diverses que ce soit dans le domaine environnemental ou clinique. Pour cela, nombreuses sont les techniques analytiques utilisées pour la détection et l'analyse des substances chimiques ou biologiques. Parmi elles on cite les techniques spectrophotométriques et chromatographiques... Malgré cela, ces techniques présentent des inconvénients puisqu'elles sont coûteuses, elles manquent de souplesse et elles ne permettent pas une analyse simultanée de plusieurs composés. D'où l'intérêt de s'orienter vers les techniques électrochimiques comme alternatives qui peuvent fournir plusieurs avantages y compris la précision, la performance, la facilité de la manipulation et le plus important c'est qu'elles sont rapides. Leur application dans divers domaines que ce soit environnemental, clinique ou autre fait d'elles une bonne alternative vis-à-vis aux techniques analytiques traditionnelles assez compliquées.

Dans les dernières décennies, les capteurs et les biocapteurs électrochimiques ont fait l'objet d'un nombre important de travaux de recherche grâce à leur simplicité, portabilité, capacité à fournir des informations analytiques quantitatives ou semi-quantitatives spécifiques à travers la transformation d'un signal chimique ou biochimique en un signal électrique facilement exploitable. Ce signal peut être amélioré à travers l'intégration des nanomatériaux grâce à leur conductivité électrique élevée. Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse, qui a une

application environnementale, vise le développement d'un capteur électrochimique à base d'électrodes à pâte de carbone (EPC) non modifiées en absence et en présence du diphénylcarbazine, des EPCs modifiées par un film d'or et par le dépôt des nanoparticules d'or formées chimiquement (AuNPs) pour la détermination du Cr(VI) (toxique) en présence d'un excès de Cr (III) (non toxique).

Par ailleurs, le deuxième objectif de ce travail, lié à la partie clinique, vise l'élaboration d'un biocapteur électrochimique à base de la chimie clic en absence du cuivre comme catalyseur permettant ainsi d'éviter la toxicité liée au cuivre, la stabilité, la spécificité et la bio-orthogonalité tout en utilisant un dispositif à base de multi-capteurs en or permettant la multi-détection ou l'électro-adressage. Pour cela, trois biocapteurs à base de la chimie clic ont été développés pour la détection de l'interleukine-10, biomarqueur de l'insuffisance cardiaque dans la salive, d'une part, et les allergènes liés aux noix et aux cacahouètes d'autre part, à travers la mesure des immunoglobulines G dans le sérum du lapin.

Le présent mémoire est subdivisé en quatre chapitres qui vont se répartir comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique générale sur les capteurs électrochimiques en tant qu'alternatifs aux techniques analytiques classiques pour la détection des métaux lourds : cas du chrome VI, ainsi que les biocapteurs électrochimiques à base de la chimie clic pour des applications cliniques. Les méthodes de mesure électrochimiques seront également présentées.
- Le deuxième chapitre présente également une comparaison entre les électrodes à pâte de carbone modifiées et non modifiées pour la détermination du chrome hexavalent en absence et en présence du chrome trivalent.
- Le troisième chapitre sera consacré au développement des immunocapteurs à base de la chimie clic en absence du cuivre comme catalyseur pour la détection dans la salive de l'interleukine 10 comme biomarqueur des maladies cardiovasculaires.
- Le quatrième chapitre sera consacré au développement de deux immunocapteurs basés sur la chimie clic en absence du cuivre pour la détection des IgG spécifiques aux noix et aux cacahouètes à l'issue d'une hypersensibilité immunologique.

Ce travail se termine par une conclusion générale sur l'ensemble des résultats obtenus et des perspectives pour la continuation du travail dans le futur.

Chapitre I : Etude bibliographique

Les capteurs chimiques sont des petits dispositifs qui peuvent être utilisés pour la mesure directe de l'analyte dans la matrice d'échantillon. Les capteurs chimiques se composent d'un transducteur et d'un élément de reconnaissance qui peut être chimique ou biologique. Cet élément interagit avec l'analyte cible, et les changements issus de cette interaction sont traduits par le transducteur en un signal électrique.

Le développement de capteurs chimiques est l'un des domaines les plus actifs de la recherche analytique. Les capteurs électrochimiques représentent une sous-classe importante de capteurs chimiques dans laquelle une électrode est utilisée comme élément de transduction. De tels dispositifs occupent une position de leader parmi les capteurs actuellement disponibles, ont atteint le stade commercial et trouvent un large éventail d'applications importantes dans les domaines des analyses cliniques, industrielles, agricoles et environnementales. Le domaine des capteurs est interdisciplinaire, et les progrès futurs sont susceptibles de se produire à partir de progrès dans plusieurs disciplines (Wang, J. 2006).

La recherche sur les capteurs électrochimiques se poursuit dans plusieurs directions, dans les parties suivantes nous allons décrire le progrès des capteurs électrochimiques pour la détection des métaux lourds : cas du chrome. On détaillera ensuite l'utilisation de la chimie clic pour l'élaboration de biocapteurs destinés pour des applications cliniques.

Partie I : Capteurs électrochimiques pour les métaux lourds : cas du chrome.

I.1. Introduction et généralités :

L'histoire des métaux lourds n'a pas été écrite. Et pourtant, ils paraissent étroitement liés à la civilisation. L'or, l'argent, le cuivre ont permis de fabriquer les premières pièces de monnaie. Sans métaux lourds, il n'y aurait pas eu de distribution d'eau potable à Rome par les canalisations en plomb, il y aura pas non plus de peintures, car les peintures anciennes ont résisté au temps grâce aux métaux incorporés aux pigments (le « jaune de Naples » à base de plomb, le « vermillon de mercure »...), ni vitraux dans les cathédrales, ni miroirs, étamés d'un amalgame d'étain et de mercure...

L'homme a utilisé les métaux lourds et continue à les utiliser, parfois avec excès, souvent avec inconscience, ou pire, en toute conscience. Si les métaux lourds ont fait la civilisation, ils peuvent aussi la défaire, car les métaux lourds sont aussi des toxiques puissants (Miquel, G et al. 2001).

Les éléments métalliques appelés autrefois les métaux lourds sont, sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement. A l'état de traces, ils sont nécessaires voire indispensables aux êtres vivants. A concentration élevée, en revanche, ils présentent une toxicité plus ou moins forte. La présence des métaux lourds dans l'environnement résulte des causes naturelles et des activités humaines. Elle pose un problème particulier, car les métaux lourds ne sont pas biodégradables. Ceux-ci ne présentent pas tous les mêmes risques en raison de leurs effets sur les organismes, leurs propriétés chimiques, physico-chimiques et biologiques. Leur toxicité est très variable et leur impact sur l'environnement très différent (Gheid, A et al. 2008).

La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation « éléments en traces métalliques » -ETM- ou par extension « éléments traces ». Ces éléments traces se caractérisent par une masse volumique supérieure à 5 g/cm^3 , à l'exception des éléments alcalino-terreux.

L'agence américaine de protection environnementale (EPA, 1992) identifie 13 ETM comme des « polluants prioritaires », soit l'antimoine (Sb), l'argent (Ag), l'arsenic (As), le béryllium (Be), le sélénium (Se), le thallium (Tl), le cadmium (Cd), **le chrome (Cr)**, le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn). Les six derniers éléments sont les principaux ETM impliqués dans les cas de contamination des sols. Et dans le cadre d'analyses chimiques en laboratoire, ces éléments sont souvent reconnus comme les « 6 métaux de base », à l'exception du mercure.

Parmi les ETM mentionnés ci-dessus, nous avons choisi d'étudier le chrome vu son utilisation extensive par plusieurs industries conduisant à la décharge d'une quantité énorme de ses différentes formes dans l'environnement (cas des tanneries au Maroc) affectant par la suite les vies de façon radicale surtout dans le cas du chrome hexavalent. D'où l'intérêt de développer des méthodes d'analyses pour surveiller le taux du chrome.

I.2. Propriétés physico-chimiques du chrome

Le chrome est un métal dur, d'une couleur blanche grisâtre. Il a été découvert par le chimiste français Vauquelin en 1798. Son étymologie vient du grec « chroma » qui signifie couleur, parce que les composés du chrome sont diversement colorés. Il est le 10ème élément le plus abondant dans le manteau terrestre (Krim, M et al. 2014).

Le chrome est un élément chimique, métallique, de symbole Cr, de numéro atomique 24 et de masse atomique 51,996 uma, il appartient au groupe 6 du tableau périodique. Il est

classé dans un groupe de métaux, il a la physionomie typique d'un élément de transition. Sa température de fusion est située à 1875 °C.

L'isotope du chrome le plus abondant est le ^{52}Cr . Comme les autres métaux de transition, il existe à différents états d'oxydation : de la forme métallique Cr(O) à Cr(VI) la forme la plus oxydée. Cependant seuls les états d'oxydation (III) et (VI) sont les plus abondants (Loyaux-Lawniczak, S et al. 1999).

Le chrome (III) se présente, en solution, sous plusieurs formes y compris le Cr^{3+} , Cr(OH)^{2+} , Cr(OH)_3 , Cr(OH)_4^- . La forme $\text{Cr(OH)}_3(\text{s})$ présente une solubilité très faible comme elle peut également être incluse dans des hydroxydes de la forme, $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$, ou bien se substituer au fer dans les oxydes ou former des complexes avec la matière organique. La mobilité du Cr(III) dépend donc à la solubilité de la matière organique, qui est liée au pH (Liliane, J et al. 2007).

Pour le Cr(VI) qui est fortement mobile, ses espèces majeures sont le chromate (CrO_4^{2-}) et le dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Celles-ci peuvent précipiter en présence d'espèces cationiques telles que le baryum (Ba^{2+}), le plomb (Pb^{2+}) et l'argent (Ag^+), et s'adsorber sur des surfaces solides dont les oxydes de fer et d'aluminium, plus particulièrement (Liliane, J et al. 2007; Galvez-Cloutier, R et al., 2005)

I.3. Impact toxicologique

L'accumulation du chrome dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains, des animaux et de l'environnement en général (Achelhi, K et al. 2012). En fait, le risque sur la santé est d'abord associé aux propriétés de ce métal à polluer les eaux, l'atmosphère, les aliments et les sols. Et dépendent également de l'état chimique de leur forme chimique, de leur concentration, du contexte environnemental, de la possibilité du passage dans la chaîne du vivant (Taulan, M et al. 2004).

Le chrome trivalent (Cr(III)) est essentiel pour le corps humain, avec une quantité de 50-200 $\mu\text{g/jour}$ (Arain, M.B et al. 2018). Au contraire, le chrome hexavalent (Cr(VI)) est connu par sa toxicité puisqu'il peut pénétrer facilement à l'intérieur de la cellule et l'endommager (Jin, W et al. 2015). L'exposition courte et longue au chrome hexavalent influe directement sur la santé de l'être humain comme il peut provoquer diverses maladies comme le cancer (Taylor, P et al. 2011). Il peut provoquer aussi la mort de plusieurs organes du corps.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a cité la valeur de 50 $\mu\text{g/L}$ comme valeur indicative provisoire pour le Cr(VI) dans les eaux souterraines (World Health Organization

guidelines. 2008), tandis que 100 µg/L était réglementé par l'Environmental Protection Agency (EPA) pour le chrome total dans l'eau potable (Chromium in Drinking Water. 2020).

I.4. Spéciation

Le concept de spéciation est le fait de développer des méthodes d'analyse permettant l'identification et l'évaluation de toutes les formes d'un élément dans un échantillon au lieu de mesurer sa concentration totale (Ure, A. M et al. 1993). Le terme de spéciation est utilisé maintenant en chimie de l'environnement, écotoxicologie et toxicologie. Nous allons montrer dans ce travail l'importance de la spéciation du chrome.

Pour le chrome, les échantillons ne fournissent pas suffisamment d'informations sur les risques liés à la santé, car la toxicité et la biodisponibilité des espèces du chrome dépendent de leurs états d'oxydation et de leur composition complexe. Par conséquent, la détermination des traces de chrome ainsi que sa spéciation dans les échantillons environnementaux sont des tâches importantes en raison de leur impact négatif, de la toxicité et de la biodisponibilité du chrome.

I.5. Méthodes analytiques d'analyse du chrome

En raison d'une concentration de chrome assez faible et du caractère complexe de la matrice d'échantillons, des méthodes spécifiques, sensibles et précises sont nécessaires pour son analyse. Très souvent, des procédures de prétraitement appropriées sont requises impliquant des séparations et / ou des étapes de pré-concentration. On peut distinguer entre deux principales techniques pour la détermination du Cr (VI) et les traces du Cr (III), les uns qui permettent la mesure directe de Cr (VI) même en présence de Cr (III), comme la spectrophotométrie d'absorption moléculaire ou la voltamétrie. Ces méthodes sont basées sur la différence de capacité entre Cr (III) et Cr (VI) à former des complexes. Les autres permettent la détermination du chrome total seulement (Bobrowski et al. 2009).

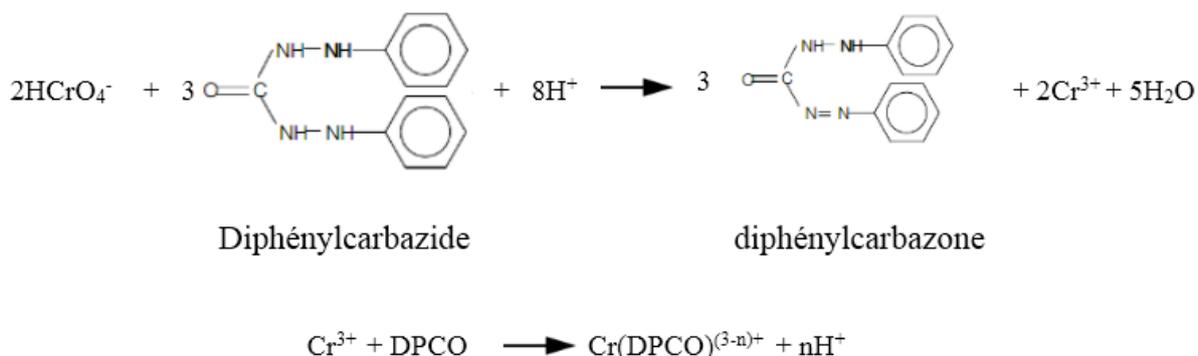
Les méthodes standard ou conventionnelles connues pour la détermination du chrome, sont la spectroscopie d'absorption atomique, la chromatographie ionique et la méthode colorimétrique avec l'utilisation du diphénylcarbazine.

En effet, la chromatographie ionique permet la séparation des molécules polaires et des ions en fonction de leur affinité avec l'échangeur d'ions. Alors que la spectroscopie d'absorption atomique est basée sur la détermination quantitative de différents éléments chimiques à leur forme atomique à l'état gazeux à travers la mesure de leur absorption de rayonnement optique. L'utilisation de ces techniques présente plusieurs inconvénients tels que le coût élevé, le besoin

d'une personne qualifiée, la complexité des matériaux, et les différentes étapes nécessaires pour l'analyse.

La méthode colorimétrique pour la détermination du Cr(VI) est basée sur la formation d'un complexe avec le diphénylcarbazine en milieu acide pendant 10min, puis le complexe rouge-violet produit peut être mesuré par spectroscopie à une longueur d'onde de 540 nm (American Public Health Association. 1915). L'utilisation de la technique colorimétrique est limitée aux échantillons non turbides et non colorés.

Le mécanisme de cette technique est basé sur une réaction redox accompagnée d'une complexation entre l'espèce réduite du Cr(VI) qui est le Cr(III) et la forme oxydée du DPC qui est la diphénylcarbazonne DPCO (Sanchez-Moreno et al. 2010 ; Ali et al. 2012).



La plupart des techniques d'analyse existantes présentent un manque de souplesse et ne permettent pas une analyse simultanée des composés. D'où l'intérêt de développer des techniques électrochimiques qui présentent une bonne alternative grâce à leur faible coût, leur simplicité, leur sensibilité et leur sélectivité.

I.6. Capteurs électrochimiques pour la détection du chrome

Un capteur électrochimique est un dispositif qui transforme l'interaction électrochimique entre l'analyte et l'électrode en un signal mesurable sur le plan analytique. Les composants basiques d'un capteur sont le matériau de détection ou le récepteur, qui surveille et détecte les changements moléculaires et le transducteur qui transforme les changements observés par le récepteur en signaux mesurables.

De nos jours, la nanotechnologie prend de plus en plus d'importance. Les électrodes activement modifiées de différents nanomatériaux présentent d'énormes avantages, par exemple l'augmentation du rapport surface/volume, le faible coût, la porosité élevée, la facilité de modification,... (Maduraiveeran, G et al. 2017; 2018; Zamora-Galvez, A et al. 2017; Llobet, E

et al. 2013; El Rhazi, M et al. 2018). De plus, ces modifications permettent d'éviter les surtensions (Amine, A et al. 2018), les problèmes d'interférences (Amine, A et al. 2018), l'encrassement de surface (Ghanam, A et al. 2017) et offrent une longue durée de vie (Salimi, A et al. 2015). Dans ce travail, plusieurs combinaisons entre différents nanomatériaux et l'utilisation de produits chimiques comme composés catalyseurs pour modifier les électrodes pour la surveillance des espèces de chrome dans différents échantillons réels ont eu lieu (Figure 1).

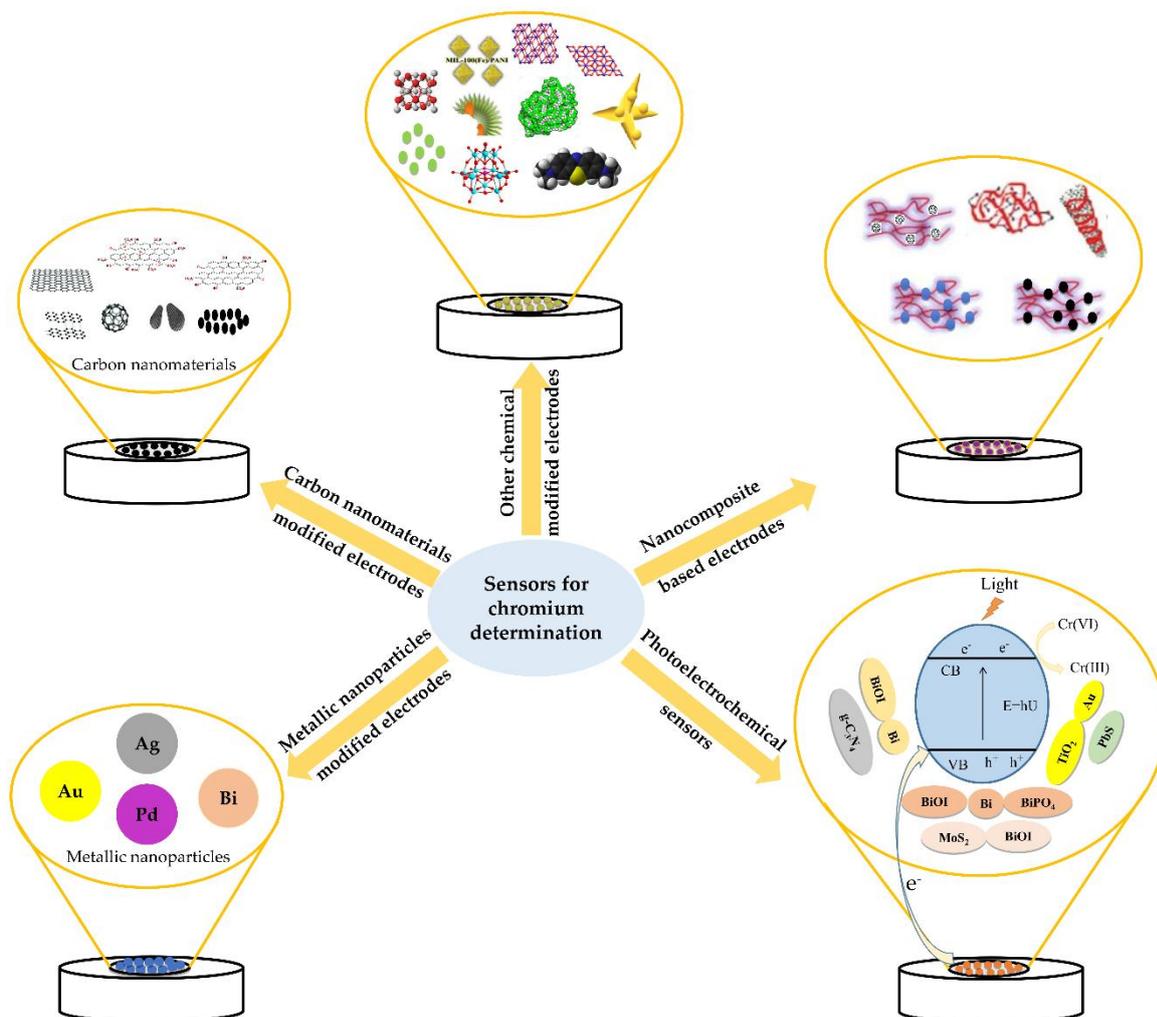


Figure 1: Schéma des différents nanomatériaux utilisés pour la détection du chrome (Hilali et al. 2018)

I.6.1. Electrodes à base de nanomatériaux de carbone

Les nanomatériaux de carbone présentent plusieurs avantages tels que la facilité de préparation, le renouvellement, la stabilité mécanique et chimique, ainsi qu'une conductivité électrique élevée (Jin, W et al. 2015). En outre, la capacité de la fonctionnalisation de leur

surface par différentes fonctions. De plus, ils sont largement utilisés dans la modification de différentes électrodes pour améliorer la sensibilité et obtenir une limite de détection basse (Jin, W et al. 2015).

Tableau 1. Résumé des données électroanalytiques des électrodes à base de nanomatériaux de carbone rapportées pour la surveillance du chrome hexavalent dans plusieurs échantillons réels.

Nano-capteur	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
CNT/FTO	Revêtement par doctor blading	CV, ampérométrie	0–100	5	eau de purge de la tour de refroidissement	(Wang, C et al. 2016)
CNT/électrode en papier souple	Peinture directe sur papier filtre Whatman en cellulose					
CNT/SPE	Imprimé carbone					
Sol-gel/SWCNT/GCE	électrodéposition	SWV	5–300	0.8	sang de porc cendré	(Rosolina, S.M et al. 2016)
Graphène/GCE	Coulée en goutte	DPCSV	10.4–52,000	7.8	Eau du robinet	(Liu, C et al. 2015)
Système GQD/peroxo-disulfate	méthode d'oxydation chimique	Électro-chimiluminescence	2.6–3120	1.04	l'eau de rivière	(Chen, Y et al. 2015)
Matériaux cristallins à base de phosphomolybdate-CB/GCE	Coulée en goutte	ampérométrie	26–19,656	1.35	Eau du lac	(Wang, Y et al. 2020)
CB/GCE	Goutte coulée (15 μL)	ampérométrie	1.3–25,127.7	0.52	Pas fini	(Liu, D et al. 2017)

CB : noir de carbone ; NTC : nanotube de carbone ; CV : voltamétrie cyclique ; DPCSV : voltampérométrie différentielle à impulsions cathodiques ; FTO : oxyde de fluor étain ; GCE : électrode en carbone vitreux ; GQD : points quantiques de graphène ; LSV : voltamétrie à balayage linéaire ; Pani : polyaniline ; SPE : électrode sérigraphiée ; SWCNT : nanotubes de carbone monoparois ; SWV : voltamétrie à onde carrée.

Des nanotubes de carbone imprimés (NTC) sur différents types d'électrodes (électrode sérigraphiée, électrode en papier flexible et sur verre d'oxyde d'étain dopé au fluor) ont été réalisés pour fabriquer un capteur ampérométrique spécifique pour la mesure du Cr(VI). L'utilisation de NTC permet d'augmenter la réponse en courant, entraînant la détermination du Cr(VI) à l'état de traces à une concentration aussi faible que $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Wang, C et al. 2016). De même, la modification de l'électrode de carbone vitreux (GCE) par des nanotubes de carbone à paroi unique carboxylés et un film mince sol-gel fonctionnalisé au pyridinium a été réalisée avec succès par Samuel M. Rosolina et ses collègues pour la surveillance du Cr (VI) par voltamétrie à onde carrée (SWV) (Rosolina, S.M et al. 2016). L'accumulation de chromate a eu lieu sur le pyridinium protoné, suivie d'une réduction du chrome, entraînant son élimination de la surface de l'électrode et sa détection ultérieure. L'ajout de SWCNT a réduit la limite de détection de $4,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Carrington, N.A et al. 2006) à $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Rosolina, S.M et al. 2016).

Outre les nanotubes de carbone, le nanomatériau de graphène peut également être utilisé pour la détection du Cr(VI). Chenglun Liu et son équipe (Liu, C et al. 2015) ont modifié avec succès le GCE par le graphène comme dispositif de détection pour la mesure du Cr(VI). Selon les auteurs, les groupes -OH et -COOH du graphène peuvent facilement devenir des cations (-OH₂⁺ et -COOH₂⁺), qui attirent les anions chrome (HCrO₄⁻, CrO₄²⁻ et Cr₂O₇²⁻) en solution acide par interaction électrostatique qui augmente la concentration de Cr(VI) à la surface de l'électrode. Le Cr(VI) adsorbé a été réduit en Cr(III) avec des groupes fonctionnels comme C=O et C-OH, qui ont été oxydés à leur tour en -COOH. Ainsi, la réaction de réduction du Cr(VI) a pu être observée électrochimiquement. L'ajout de graphène accélère le transfert d'électrons et diminue la résistance de transfert d'environ neuf fois par rapport au GCE nu permettant la détection de Cr(VI) à $7,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec un recouvrement satisfaisant de 99 à 102 % (Liu, C et al. 2015). Dans une autre approche, un capteur d'électrochimiluminescence (ECL) basé sur l'extinction du signal cathodique ECL de Cr(VI) sur les points quantiques de graphène et le peroxydisulfate a été rapporté. L'augmentation de la concentration des points quantiques de graphène entraîne la diminution de l'écart type relatif de l'intensité de l'électrochimiluminescence parallèlement à l'augmentation du rapport signal/bruit. Le capteur développé a montré une grande importance pour détecter une concentration de Cr(VI) aussi faible que $1,04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec une grande précision (Chen, Y et al. 2015). Pour atteindre des limites de détection basses pour le Cr(VI) et des sensibilités élevées, le noir de carbone peut être utilisé pour la modification des électrodes en raison de ses nombreux avantages, tels qu'une

grande surface, une stabilité chimique et mécanique élevée, respectueuse de l'environnement, une conductivité électrique élevée et un coût très faible (Arduini, F et al. 2012; Cinti, S et al. 2015; Yammouri, G et al. 2017). En outre, l'utilisation d'un tel nanomatériau pour la modification des capteurs conduit à une grande amélioration de la sensibilité. Yali Wang et ses collaborateurs (Wang, Y et al. 2020) ont développé un nouveau capteur ampérométrique pour la surveillance du Cr(VI) dans l'eau des lacs. Le noir de carbone a été introduit dans la fabrication de l'électrode de travail permettant l'amélioration de l'électroconductivité des matériaux cristallins isomorphes synthétisés à base de polyoxométalate destinés à l'analyse du Cr(VI). Le capteur développé présente un temps de réponse extrêmement rapide (1 s), une limite de détection remarquablement basse de $1,35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une bonne sensibilité de $3,43 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. De même, du GCE modifié au noir de carbone a été fabriqué pour la mesure du Cr(VI) (Liu, D et al. 2017). L'amélioration de l'efficacité de détection a eu lieu grâce au noir de carbone à liaison sp^2 , qui possède une grande quantité de mésopores comme canaux de transport de charge dans la surface intérieure. Le capteur développé affiche une bonne sensibilité de $2,79 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ et atteint la limite de détection de $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Liu, D et al. 2017). Cependant, la dispersion de polyoxométalate-noir de carbone dans une solution de nafion (Wang, Y et al. 2020) diminue l'accessibilité des mésopores du noir de carbone. Il est supposé que, très probablement, une répulsion entre le nafion et l'anion chromate a eu lieu, entraînant une faible sensibilité et une limite de détection élevée par rapport au GCE modifié au noir de carbone (Liu, D et al. 2017).

Le tableau 1 montre une comparaison entre les performances analytiques des stratégies citées basées sur l'utilisation de différents nanomatériaux de carbone pour la détection du Cr(VI) dans plusieurs échantillons réels. Leur incorporation en tant que nanomatériaux de détection conduit à une amélioration de la sensibilité, de la sélectivité, de bons recouvrements et permet la détermination du Cr(VI) à l'état de traces ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) par rapport aux électrodes non modifiées.

I.6.2. Électrodes à base de nanoparticules métalliques

Au cours des dernières années, une attention considérable a été accordée à l'évolution des nanosciences et des nanotechnologies. Parmi les nanomatériaux, les nanoparticules métalliques ont suscité un large intérêt en tant que nanocapteurs, marquage biologique et catalyseur. Cette énorme utilisation de ces nanoparticules pour l'élaboration de capteurs s'explique par leur grand rapport surface/volume, leur activité de réaction de surface, leur conductivité électrique élevée et leur grande capacité catalytique (Chen, S et al. 2013).

Plusieurs nanoparticules métalliques ont été utilisées pour la surveillance du chrome. Sixing Xu et al. (Xu, S et al. 2015) ont proposé un nouveau capteur basé sur la modification d'une électrode de carbone mésoporeux par un film de bismuth pour la détection du Cr(VI) à $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentration. Le mécanisme de détection était basé sur la préconcentration et l'adsorption du chélate formé entre l'acide diéthylène triamine pentacétate (DTPA) et le Cr(III) issu du Cr(VI) réduit sur le bismuth. Le capteur fabriqué a montré la capacité de détection du Cr(VI) avec un faible bruit de fond dû à la décoration du cadre en carbone par du bismuth électrodéposé. Dans un autre travail, la galvanoplastie de bismuth sur l'électrode de carbone vitreux avec un médiateur de zinc déposé de manière réversible en présence de DTPA a été réalisée avec succès (Tyszczuk-Rotko, K et al. 2018). L'utilisation du zinc comme médiateur a considérablement amélioré l'intensité du signal analytique de Cr(VI), $1 \mu\text{A}$ contre $3,3 \mu\text{A}$ pour l'électrode à film de bismuth préparée respectivement sans et avec médiateur de zinc, conduisant à la détection d'une concentration extrêmement faible de $3,01 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Le capteur développé a été appliqué pour la surveillance du Cr(VI) dans l'eau de rivière avec un recouvrement de 95 à 97 %.

Outre le bismuth, l'incorporation de l'argent comme matériau de détection pour la détermination du chrome a également suscité un grand intérêt en raison de son effet catalytique. Généralement, les nanoparticules métalliques ont d'excellentes propriétés catalytiques et conductrices qui les rendent plus aptes à agir comme fils électroniques pour améliorer le transfert d'électrons entre les centres redox à la surface des électrodes et aussi comme catalyseurs pour favoriser les réactions électrochimiques (Oularbi, L. 2018). Zorica Stojanović et al. (Stojanovic, Z et al. 2018) ont fabriqué un capteur basé sur la galvanoplastie in situ de GCE par un film d'argent pour la détection du Cr(VI) à l'ordre de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ par voltampérométrie différentielle à impulsions anodiques. L'électrodéposition d'argent produit des signaux de haute qualité, améliore la sensibilité 4 fois par rapport à l'électrode nue et présente la détection de Cr(VI) à un niveau de $5,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. De plus, le capteur fabriqué permet la détermination du Cr(VI) avec un recouvrement satisfaisant entre 97 et 105 % dans l'eau du robinet. Dans une autre étude réalisée par Shahbakhsh et al. (Shahbakhsh, M et al. 2019), l'électrode en pâte de graphite a été modifiée par des nanoparticules d'argent décorées sur des nanorubans bidimensionnels (2D) -biphénol biphénoquinone (BP/BPQ) pour la mesure indirecte du Cr(VI) par la diminution de l'intensité du courant du système redox BP/BPQ. Les AgNPs augmentent l'intensité du courant et augmentent la réversibilité du capteur fabriqué. De plus, le transfert d'électrons est devenu plus rapide. Le capteur développé permet la détection

du Cr(VI) dans différents échantillons d'eau avec un bon taux de recouvrement allant de 97 à 103 % et une limite de détection de $1,04 \cdot 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Shahbakhsh, M et al. 2019).

Au cours de la dernière décennie, les nanomatériaux d'or (AuNPs) ont suscité un grand intérêt en tant que matériaux de détection intégrés pour l'élaboration de capteurs pour la surveillance du chrome en utilisant plusieurs stratégies de modification. Ils ont également été utilisés comme catalyseur efficace pour la réduction du Cr(VI) (Figure 2).

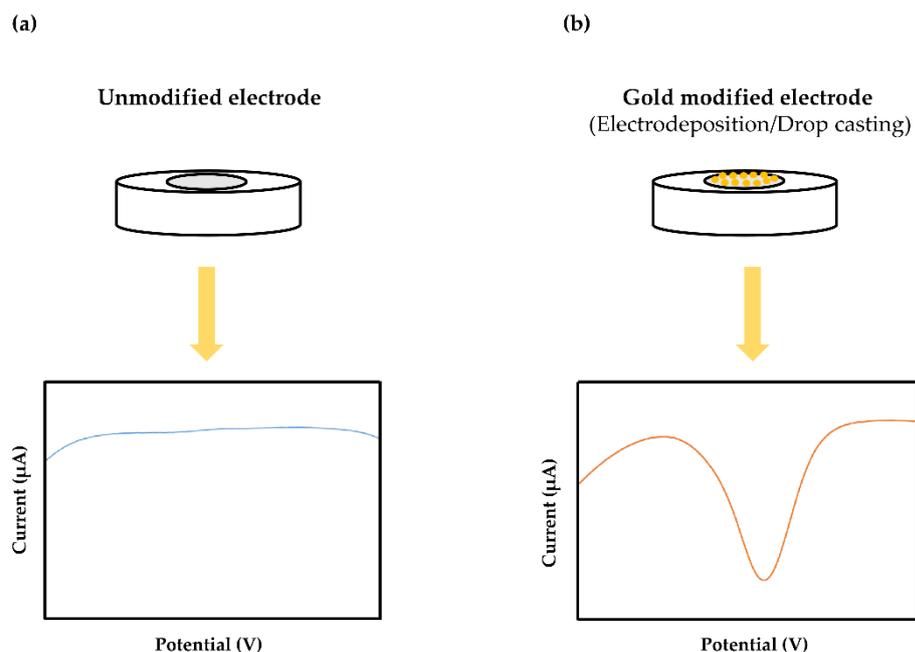
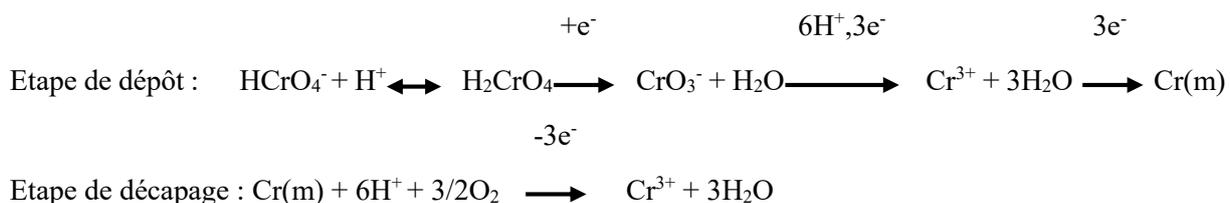


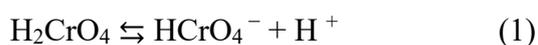
Figure 2. Réponse typique du Cr(VI) à : (a) Électrode non modifiée ; (b) Électrode modifiée par des AuNPs utilisant une stratégie d'électrodéposition ou de coulée en goutte.

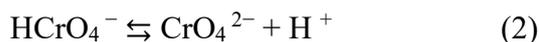
La détection du Cr(VI) par les nanoparticules d'or a plusieurs stratégies. Parmi elles, l'électrodéposition et le drop-casting sont les plus courants. En effet, Salamatu Aliyu Tukur et al. (Tukur, S.A et al. 2015) ont modifié l'électrode sérigraphiée par des nanoparticules d'or pour la mesure du Cr(VI) au niveau du pg dans des échantillons d'eau. Selon les auteurs, la méthode de détection était basée sur la réduction du chrome hexavalent en chrome métallique sur la surface de l'électrode, suivie de la détection du chrome via son oxydation selon les équations suivantes :



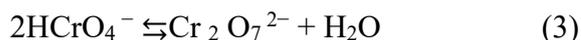
Les nanoparticules d'or sont utilisées pour le développement des méthodes de dosage du chrome et elles permettent de doser le Cr(VI) à une concentration aussi faible que $1,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. En raison de leur effet catalytique (Chirea, M et al. 2007), les AuNPs ont considérablement amélioré le courant de crête de 27 fois ainsi que l'amélioration de la surface microscopique et du taux de transfert d'électrons. Le capteur fabriqué présente de nombreux avantages, notamment une sensibilité élevée, une sélectivité élevée, de faibles volumes d'échantillons et une facilité de fabrication. Dans une autre étude, le processus d'auto-assemblage a été utilisé pour l'activation du GCE afin de maximiser sa couverture par les AuNPs (Wyantuti, S et al. 2015). Le groupe hydrogène peut-être remplacé par un groupe amine lors de l'auto-assemblage. Plus d'AuNPs peuvent être attachées à la surface de l'électrode grâce à la nature du groupe amine. La voltamétrie cyclique a été effectuée pour la détection du Cr(VI) dans une gamme linéaire de 0,05 à 0,25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ avec une limite de détection de 2,38 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Plus tard, un système portable électrochimique miniaturisé basé sur une électrode de carbone sérigraphiée modifiée avec des AuNPs a été conçu par Jiawei Tu et ses collègues (Tu, J et al. 2018) pour la mesure du Cr(VI) dans l'eau de rivière avec un bon taux de recouvrement entre 90 et 106 %. Le système électrochimique comprenant un analyseur, un module de détection combiné à l'électrode de travail et un ordinateur portable/smartphone, était bien conçu pour des applications in situ et montrait une limite de détection de 5,4 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. En outre, une comparaison entre la forme des nanomatériaux d'or a été réalisée récemment entre la nanoétoile d'or (AuNS) et une électrode sérigraphiée modifiée par des nanoparticules d'or de forme sphérique pour les mesures de Cr (VI) dans un milieu acide (Dutta, S et al. 2019). Les AuNS ont fourni la réponse de courant la plus élevée au Cr(VI) par rapport aux AuNP avec une limite de détection de 3,5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Le capteur préparé a été utilisé pour la détermination du Cr(VI) dans les eaux souterraines contaminées avec un recouvrement moyen de 96 %. Huy Du Nguyen et al. (Du Nguyen, H et al. 2015) ont rapporté un nouveau capteur voltamétrique construit sur la modification d'une électrode à disque rotatif en platine par des nano-flocons d'or et du 4-pyridine-éthanethiol par une approche d'électrodéposition. Le capteur développé a montré d'excellentes propriétés pour la détection du Cr(VI) dans les eaux côtières avec une sensibilité et une reproductibilité améliorées et une limite de détection très basse (0,001 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

La plupart des études décrites ci-dessus ont montré qu'un dosage adéquat du chrome hexavalent nécessite un milieu acide. En général, pour de faibles concentrations de Cr(VI), les principales réactions sont (1) et (2) (Mohan, D et al. 2006; Sankararamakrishnan, N et al. 2014)





A pH inférieur à 1, le chrome hexavalent existe sous forme de H_2CrO_4 sous forme de sels d'acide chromique, il existe également sous forme d'ion hydrogénochromate (HCrO_4^-) dans des gammes de pH de 1 à 6 et sous forme d'ion chromate (CrO_4^{2-}) lorsque la valeur du pH dépasse 6. La formation du dimère de HCrO_4^- sous la forme de l'ion bichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) a lieu lorsque la concentration de chrome hexavalent dépasse $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ comme indiqué dans l'équation (3) (Mohan, D et al. 2006; Sankararamakrishnan, N et al. 2014):



Parallèlement à la diminution du pH, la concentration en HCrO_4^- et H_2CrO_4 augmente (Equations (1) et (2)). En milieu acide, le HCrO_4^- est l'espèce électroactive du chrome, ce qui explique l'utilisation extensive du milieu acide pour le dosage du Cr(VI) (Tu, J et al. 2018).

Les ions chlorure affectent négativement la détermination du Cr (VI) sur les capteurs basés sur des nanoparticules d'or, comme indiqué récemment dans nos travaux précédents, dans lesquels nous étudions l'effet des ions chlorure sur les AuNP électrodéposés et coulés sur des électrodes en pâte de carbone (Hilali, N et al. 2018). Les deux électrodes en or modifiées ont montré des limitations pour la détection de Cr(VI) en présence d'ions chlorure en raison de la possibilité de former le complexe de CrO_3Cl^- . L'intensité du courant de Cr(VI) a considérablement diminué dans l'eau du robinet en raison de la présence d'ions chlorure. Dans le même travail, une électrode à pâte de carbone non modifiée (EPC) a été testée pour la surveillance du Cr(VI) en présence et en l'absence de diphénylcarbazine. L'utilisation de EPC non modifiée en présence de diphénylcarbazine a permis la mesure du Cr(VI) même en présence d'ions chlorure grâce à la forte affinité du Cr(VI) pour former un complexe avec le diphénylcarbazine par rapport à celui du chlorure (Hilali, N et al. 2018).

Différentes fonctionnalisations par des nanoparticules métalliques ont été réalisées pour le dosage du Cr(VI). Les performances analytiques des électrodes à nanoparticules métalliques modifiées citées sont résumées dans le tableau 2. Ce type de nanomatériaux offre des améliorations importantes à la détection du Cr(VI), telles que l'amélioration de la sélectivité, de la reproductibilité, l'élargissement des gammes de linéarité et l'amélioration des limites de détection.

Tableau 2. Résumé des données électroanalytiques des électrodes modifiées rapportées par des nanoparticules métalliques pour la surveillance du chrome hexavalent.

Nano-capteur	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
Bi/MCE	Spin coating- > Photolithographie- > carbonisation- > Gravure et modification	AdSV	1–25	0.05	-	(Xu, S et al. 2015)
BiFE avec médiateur de zinc/GCE	réduction de Bi(III) et Zn(II) à l'état métallique à -1,1 V pendant 60 s Zn : médiateur réversible	DPCAdSV	1.04×10^{-5} – 6.5×10^{-5}	3.01×10^{-6}	L'eau de rivière	(Tyszczyk-Rotko, K et al. 2018)
Ag plaqué-GCE	Placage in situ	DP-ASV	18.2–2080	5.2	eau du robinet	(Stojanovic, Z et al. 2018)
Ag NPs-BP-BPQ/GPE	Pâte tassée dans l'électrode	DPV	3LR $4,16 \times 10^{-3}$ –0,52 ; 0,52–52 ; 52–5200	1.04×10^{-4}	eau du robinet, eau de rivière et eaux usées de galvanoplastie	(Shahbakhsh, M et al. 2019)
AuNPs/SPE	Goutte coulée 5 μ L	LSASV	0.7–35.0	1.6×10^{-3}	robinet et eau de mer	(Tukur, S.A et al. 2015)
AuNPs/GCE	Processus d'auto-assemblage	DPV	0.05–0.25	2.38×10^{-3}	-	(Wyantuti, S et al. 2015)
AuNPs/SPCE	Électrodéposition	VBV	20–200	5.4	l'eau de rivière	(Tu, J et al. 2018)
AuNS/CPSPE	Moulage en goutte	VBV	10–75	3.5	Eau souterraine contaminée	(Dutta, S et al. 2019)
PET/nano-Au/Pt-RDE	Électrodéposition	DPAdCSV	2.5×10^{-3} – 40×10^{-3}	10^{-3}	Eaux côtières	(Du Nguyen, H et al. 2015)
AuNPs/EPC	AuNPs déposés électrochimiquement		40–3000	7		
AuNPs/EPC	AuNPs drop-casted	DPV	100–3000	54	Eau du robinet	(Hilali, N et al. 2018)
EPC			250–1500	26		

Nano-capteur	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
EPC en présence de DPC			50–260	19		

AdSV : voltampérométrie de décapage par adsorption ; Ag : argent ; NP Ag : nanoparticules d'argent ; AuNPs : nanoparticules d'or ; AuNS : nanoétoiles d'or ; Bi : bismuth ; BiFE : électrode à film de bismuth ; BP : biphénol ; BPQ : biphénoquinone ; CPSPE : électrode sérigraphiée en pâte de carbone ; CV : voltamétrie cyclique ; DPAdCSV : voltampérométrie différentielle par décapage cathodique par adsorption d'impulsions ; DPASV : voltampérométrie différentielle à impulsions anodiques ; DPCAdSV : voltampérométrie différentielle par adsorption cathodique à impulsions ; DPC : diphénylcarbazine ; DPV : voltamétrie impulsionnelle différentielle ; GCE : électrode en carbone vitreux ; GPE : électrode à pâte de graphite ; LSASV : voltamétrie par décapage anodique à balayage linéaire, LSV : voltamétrie à balayage linéaire ; MCE : électrode mésoporeuse en carbone ; PET : 4-pyridine-éthanethiol ; Pt-RDE : électrode à disque rotatif en platine ; SPCE : électrode en carbone sérigraphié ; SPE : électrode sérigraphiée.

I.6.3. Électrodes à base de nanocomposites

Les caractéristiques uniques et fascinantes des matériaux nanocomposites ont attiré une attention considérable au cours des dernières années. Plusieurs combinaisons de nanomatériaux ont été étudiées pour améliorer les performances des capteurs (Shrivastava, S et al. 2016 ; El Rhazi, M et al. 2018; Shoaie, N et al. 2019). L'incorporation de nanocomposites en tant que matériau de détection offre divers avantages, notamment une sélectivité élevée, une surface élevée et un taux de transfert d'électrons rapide de l'espèce électroactive à la surface de l'électrode (Liu, J et al. 2017; Sari, T.K et al. 2018; Breslin, C.B et al. 2019; Hussein, M.A et al. 2019; Karthika, A et al. 2020). De plus, ces nanocomposites offrent une conductivité électrique élevée grâce à l'effet synergique qui est rarement expliqué dans la littérature. En fait, dans le cas des nanoparticules bimétalliques, une sélectivité et une activité plus élevées sont offertes par rapport aux nanoparticules monométalliques qui pourraient être la conséquence du transfert de charge électronique entre les nanoparticules métalliques utilisées. Dans le cas de systèmes non alliés, cela peut être dû aux limites de formation entre deux phases métalliques (Prati, L et al. 2007; Wang, D et al. 2008; Li, L et al. 2013; Moakhar, R.S et al. 2016).

Trisna K. Sari et al. (Sari, T.K et al. 2017) ont développé une électrode de travail composite à partir de graphite et de copolymère styrène-acrylonitrile pour la détection du Cr(VI) dans différents échantillons d'eau avec des recouvrements satisfaisants qui varient entre 97 et 101 %. Le mécanisme est basé sur la réduction du Cr(VI) en Cr(III) à la surface de l'électrode lors de l'étape de préconcentration suivie d'un décapage anodique. Le capteur tel que développé a montré une rigidité mécanique élevée, une facilité de régénération, une sensibilité élevée et des performances supérieures à celles de l'électrode en carbone vitreux grâce à la forte interaction entre le groupe terminal nitrile du copolymère préparé et le Cr(III), avec une limite de détection de $4,5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

L'utilisation de nanocomposites basés sur la combinaison de polymères à empreinte ionique (IIP) et de nanomatériaux de carbone pour la détection du Cr(VI) a également une part. Professeur Songjun Li et son équipe (Wu, S et al. 2018) ont construit un nouveau capteur basé sur une électrode en or modifiée par des nanocomposites de chitosane et de graphène à empreinte ionique dédiée à la détection du Cr(VI) avec des recouvrements allant de 99 à 104 % et de 96 à 97 % dans l'eau du robinet et de rivière respectivement. Le capteur conçu a montré une sélectivité élevée en raison des cavités créées dans le PII et de la chimie métal-ligand, une

excellente stabilité, une bonne répétabilité et une faible limite de détection de $3,33 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Très récemment, une modification de l'électrode en carbone vitreux par du nitrure de carbone graphène décoré de molybdate d'argent immobilisé avec du nafion a été utilisée comme plate-forme pour la détermination sensible du Cr(VI) (Karthika, A et al. 2020). De plus, le nanocomposite incorporé possédait une surface active élevée, une sensibilité, une sélectivité, une répétabilité et une reproductibilité améliorées. De plus, le système développé permet la détection de Cr(VI) à un niveau de $8,32 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Weidong Kang et al. (Liu, J et al. 2017) ont rapporté un nouveau capteur ampérométrique basé sur des nanoparticules bimétalliques Ni/Fe pour la détection sensible du Cr(VI) dans les eaux souterraines avec un bon recouvrement de 98 à 104 %. Le Ni/Fe possédait plusieurs états d'oxydation qui rendaient la surface très active. Le capteur préparé présente une bonne précision, une sensibilité élevée, une simplicité, une large gamme linéaire de 1,3 à 5112 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une limite de détection de 0,52 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans une autre approche, des nanoparticules d'or ont été associées à différents nanomatériaux et/ou polymères de carbone pour l'élaboration de nanocomposites destinés à la détection du Cr(VI). La mousse 3D NiO/Polyaniline est un autre matériau d'électrode qui a aidé à détecter le Cr(VI) en utilisant des barrières de potentiel interfaciales (He, Y et al. 2018). Le mécanisme est basé sur l'augmentation de la hauteur de la barrière de potentiel de la jonction pp après l'adsorption de HCrO_4^- sur le film de polyaniline conduisant à une diminution du courant électrochimique. Cette nouvelle approche présente de nombreux avantages dont une limite de détection extrêmement basse de $2,06 \times 10^{-5} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, une sensibilité élevée par rapport à la majorité des stratégies électrochimiques citées.

Annamalai Senthil Kumar et son équipe (Nellaiappan, S et al. 2018) ont rapporté une analyse par injection de flux avec un détecteur électrochimique double à 0,1 V et 1 V vs Ag/AgCl pour la réduction du Cr(VI) et l'oxydation du Cr(III) respectivement. Dans ce travail, des nanoparticules d'or conçues en nanofibres de carbone-chitosane ont été utilisées comme matériau modifié pour les électrodes. L'incorporation d'AuNPs dans les nanofibres de carbone-chitosane préparées a été la clé du succès de l'activité du capteur vis-à-vis du Cr(VI) car leur absence entraîne un signal de non-réponse. Le capteur développé a été utilisé pour la détection du Cr(VI) dans les eaux usées industrielles avec un recouvrement satisfaisant de 98 à 103 % et 0,32 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ comme concentration la plus faible détectée. Dans leurs travaux, Trisna K. SARI et ses collègues (Sari, T.K et al. 2018) ont développé un capteur ampérométrique basé sur la modification d'une électrode de carbone vitreux par du graphène-AuNPs pour la détection de

Cr(VI) dans l'eau de rivière avec un bon taux de recouvrement allant de 101 à 104 %. Le capteur développé présente l'activité électrocatalytique la plus élevée pour la réduction du Cr(VI), ainsi qu'une stabilité élevée, une sensibilité élevée et une faible limite de détection de $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. De même, la modification de GCE par de l'oxyde de graphène réduit et des AuNP par un processus d'électrodéposition a été réalisée par Ye Liu et al. pour la détermination du Cr(VI) dans les eaux lacustres et fluviales avec un recouvrement de 93 à 114 % (Liu, Y et al. 2018). La croissance et la nucléation des nanoparticules métalliques à la surface du rGO ont eu lieu grâce à l'oxygène résiduel à sa surface. De plus, l'agrégation de nanoparticules métalliques peut être empêchée en raison de la grande surface spécifique de rGO. Le capteur élaboré présente de nombreux avantages, dont une excellente stabilité, une sensibilité élevée, une bonne sélectivité et une faible limite de détection de $2,392 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans un contexte similaire, Carmel B. Breslin et ses collaborateurs (Breslin, C.B et al. 2019) ont proposé un nouveau capteur ampérométrique basé sur des AuNP décorés de MWCNT sur une électrode en or comme plateforme de mesure du Cr(VI). Le matériau composite préparé offrait plusieurs avantages, parmi lesquels la conductivité élevée fournie par les MWCNT et la grande surface qui facilite la nucléation des AuNPs. Le capteur élaboré a montré une assez bonne détection du Cr(VI) à un niveau de $37,44 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, avec une bonne sélectivité.

Une autre stratégie basée sur la précipitation d'une couche mince du copolymère poly(aniline-co-o-toluidine)/oxyde de graphène suivie de l'électrodéposition d'AuNPs sur la surface d'électrode d'or a été réalisée par l'équipe de recherche de Mahmoud A. Hussein (Hussein, M.A et al. 2019). l'oxyde de graphène augmente la porosité du nanocomposite et les AuNP assurent un transfert d'électrons élevé. Ce capteur permet la détection du Cr(VI) dans l'eau du robinet avec une récupération de 94 à 117 % avec une concentration aussi faible que $1,12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. De plus, il a montré une bonne sélectivité, sensibilité et stabilité pour la mesure. Dans une autre étude, un nanocomposite de points quantiques de polyaniline et de graphène a été utilisé pour la modification d'une électrode de carbone sérigraphiée pour la détection du Cr(VI) (Punrat, E et al. 2016). La détection a été réalisée par une analyse stop-flow couplée à une technique de voltamétrie cathodique à balayage linéaire. Le capteur développé a montré une réponse de courant élevée grâce à la conductivité fournie par la polyaniline et les propriétés citées ci-dessus du GQD, une réponse rapide (moins de 1 min), une limite de détection de $97 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une récupération satisfaisante de 80 à 106 % pour la mesure du Cr(VI) dans l'eau minérale (Punrat, E et al. 2016). Récemment, un GCE modifié avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées au graphène et à la pyridine a été exploité avec succès par Yiwei Xu et ses collègues (Xu, Y et al.

2019) pour détecter le chrome hexavalent par voltamétrie différentielle par adsorption à impulsions à une concentration aussi faible que $1,16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Une grande surface, une excellente conductivité électrique et une forte capacité de complexation sont fournies respectivement par le graphène, les AuNPs et le groupe pyridine. Les électrodes préparées ont été appliquées pour déterminer le Cr(VI) dans des échantillons d'eaux usées avec une récupération satisfaisante de 97 à 105 %.

Dans un autre travail, Fei Li et al. ont développé un nouveau capteur voltamétrique pour la surveillance du Cr(VI) dans les eaux côtières avec une récupération de l'ordre de 96 à 105 % (Han, H et al. 2015). La modification de GCE a été effectuée par du carbure de nano-titane cubique (Nano-TiC) utilisé comme support pour le chargement des AuNPs. Le capteur développé a fourni une excellente réponse au Cr(VI) avec une sensibilité élevée grâce aux effets synergiques du Nano-TiC et des AuNPs. Il fournit également une large gamme linéaire de $5,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $1040 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec une limite de détection de $2,08 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les nanoparticules de TiO_2 dopées à l'Ag sont un autre nanomatériau d'interface utilisé pour la surveillance du Cr(VI) dans divers échantillons d'eau par ampérométrie (Ravishankar, T.N et al. 2015). En cela, le TiO_2 dopé Ag₂ a été utilisé pour modifier le GCE. De plus, cette combinaison a amélioré la sélectivité et présente une détection aussi faible que $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En outre, les matériaux préparés ont montré une meilleure activité photocatalytique à la lumière du soleil par rapport à la lumière UV.

Honggui Wang (Zhang, Y et al. 2016) a publié un nouveau capteur électrochimique basé sur la modification du GCE par $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MoS}_2$ pour la surveillance du Cr(VI). L'activité électrochimique et l'intensité du courant étaient plus élevées pour le $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MoS}_2/\text{GCE}$ par rapport au GCE nu, ainsi qu'avec l'électrode modifiée au Fe_3O_4 pur ou au MoS_2 . Dans les conditions optimisées, le capteur fabriqué a montré une bonne performance électrocatalytique pour le Cr(VI) dans une large gamme linéaire de $52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $136760 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, avec une limite de détection de $26 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Dans une autre approche, les nanoparticules bimétalliques AuPd et l'oxyde de graphène réduit ont également été utilisés dans la construction d'un capteur composite destiné à la mesure du Cr(VI) (Hu, J et al. 2018). En raison des nombreux avantages parmi lesquels un processus de préparation facile (approche électrochimique en une étape), une sélectivité, une sensibilité et une stabilité élevées, le capteur préparé a montré un grand potentiel pour la surveillance du Cr(VI) avec une récupération de plus de 95 % dans les eaux des lacs et des rivières et $0,676 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ comme concentration la plus faible détectée.

Il convient de souligner que l'incorporation d'AuPdNPs bimétalliques comme matériaux de détection pour l'élaboration de capteurs nanocomposites a montré une performance plus élevée pour la détermination du Cr(VI) que l'incorporation d'un métal avec un nanomatériau de carbone. AuPdNPs/ErGO/GCE a fourni la limite de détection la plus basse par rapport aux capteurs composites AuNPs-nanomatériau de carbone (tableau 3). Dans un concept similaire, Gregory Kia Liang Goh (Moakhar, R.S et al. 2016) a développé des nanoparticules bimétalliques (or-palladium) décorées d'oxyde d'indium et d'étain pour la surveillance du Cr(VI). Le capteur développé a permis la détermination du Cr(VI) même en présence de plusieurs ions parmi lesquels Cl^- sans aucune interférence. Le capteur développé présente la limite de détection la plus basse ($1,56 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) parmi tous les capteurs composites, ce qui peut s'expliquer par l'effet synergique de l'or-palladium. De plus, le capteur IIP-S (Wu, S et al. 2018) a fourni une excellente limite de détection ($3,33 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de Cr(VI) comme le montre le tableau 3. La sensibilité la plus élevée peut-être due à la grande surface donnée par le graphène et aux cavités créées dans l'IIP (chimie métal-ligand forte)

Par rapport aux électrodes en carbone modifié et aux électrodes en nanoparticules métalliques modifiées, les nanocomposites (tableau 3) fournissent les performances analytiques les plus élevées résultant en un effet catalytique amélioré, améliorant la sélectivité, la limite de détection et permettant une large gamme linéaire de Cr(VI) avec de bonnes récupérations dans différents échantillons réels. Ces avantages sont liés à l'effet synergique des nanomatériaux utilisés. Les nanomatériaux de carbone fournissent une surface élevée, améliorent la porosité du nanocomposite, en cas de nanocomposite avec des nanoparticules métalliques, aident à prévenir leur agrégation et la capacité de saisir le Cr(VI) par différents groupes fonctionnels en cas de fonctionnalisation du nanocomposite. De plus, les nanoparticules métalliques offrent une grande surface, une conductivité élevée et un transfert d'électrons élevé entre la surface de l'électrode et l'analyte.

Tableau 3. Résumé des données électroanalytiques des électrodes à base de nanocomposites rapportées pour la surveillance du chrome hexavalent.

Capteur nanocomposite	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
Électrode composite graphite/polystyrène-acrylonitrile	Méthode chimique	SWASV	0–150	4.5	Eau du robinet, eau de rivière, eau minérale	(Sari, T.K et al. 2017)
IIP-S	Électrodéposition en une étape	DPV	5.2×10^{-2} –5.2	3.33×10^{-2}	Eau du robinet, eau de rivière	(Wu, S et al. 2018)
$\text{gC}_3\text{N}_4/\text{AgM/Nf}/\text{GCE}$	Coulée en goutte	ampérométrie	5.2–36.4	8.32×10^{-2}	Robinet, potable, rivière et eaux usées industrielles	(Karthika, A et al. 2020)
NiFe NPs-CB/GCE	Coulée en goutte	ampérométrie	1.3–5111.6	0.52	eaux souterraines	(Liu, J et al. 2017)
Mousse 3D NiO / PANI	Dépôt électrolytique de PANI	DPV	0–235.3	2.06×10^{-5}	-	(He, Y et al. 2018)
AuNPs@CNF-CHIT /GCE	revêtement en goutte de 5 μL de CNF-CHIT et Au^{3+} suivi de CV	Double détecteur électrochimique couplé à l'analyse par injection de flux (FIA-DECD)	100–100,000	0.32	Eaux usées	(Nellaiappan, S et al. 2018)
Au NPs/GR/GCE	Graphène/AuNPs (méthode sonochimique) Modification de GCE par drop-casting	ampérométrie	0–1040	0.52	l'eau de rivière	(Sari, T.K et al. 2018)
AuNPs/rGO/GCE	Électrodéposition par CV	SWV	5.2–1560	2.392	Eau de lac, eau de rivière	(Liu, Y et al. 2018)
Ox.MWCNT-Au _{nano} /Au	Goutte coulée 20 μL	ampérométrie	41.6–11,960	37.44	l'eau	(Breslin, C.B et al. 2019)

Capteur nanocomposite	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
AuNPs/poly(aniline-co-o-toluidine)/oxyde de graphène/AuE	Incubation de AuE dans le copolymère (précipitation d'une couche mince)	SWV	2600–26,000	1.118	Eau du robinet	(Hussein, M.A et al. 2019)
SPCE modifié PANI / GQD	électro-polymérisation	VBV	100–10,000	97	Eau minérale	(Punrat, E et al. 2016)
AuNPs fonctionnalisés à la pyridine/3D rGO/GCE	-RGO 3D (réduction électrochimique) -Électrodéposition d'AuNPs -auto -assemblage de pyridine	AdSV	25–300	1.16	Eaux usées (usines de galvanoplastie)	(Xu, Y et al. 2019)
AuNPs/Nano-TiC/GCE	-Drop casting 10 μ L de Nano-TiC Electrodéposition d'AuNPs	DPV	5.2–1040	2.08	eaux côtières	(Han, H et al. 2015)
TiO ₂ dopé Ag / GCE	Coulée en goutte	Ampérométrie	5–155	0.52	Eau du robinet ; eau du lac	(Ravishankar, T.N et al. 2015)
Fe ₃ O ₄ /MoS ₂ /GCE	Coulée en goutte	ampérométrie	52–136,760	26		(Zhang, Y et al. 2016)
AuPdNPs/ERGO/GCE	Electrodéposition par 2 voies (CV-ampérométrie)	DPV	2,6–260 et 260–52 000	0.676	Eau de lac, eau de rivière	(Hu, J et al. 2018)
Nanoparticules Au-Pd/ITO	Électrodéposition par CV	LSV et chronoampérométrie	0.052–5200	1.56 \times 10 ⁻²	Robinet et rivière	(Moakhar, R.S et al. 2016)

3D rGO : oxyde de graphène réduit tridimensionnel ; AdSV : voltampérométrie de décapage par adsorption ; Ag : argent ; AgM : molybdate d'argent ; AuE : électrode en or ; AuNPs : nanoparticules d'or ; AuPdNPs : nanoparticules bimétalliques or-palladium ; CB : noir de carbone ; CHIT : chitosane ; CNF : nanofibres de carbone ; DPV : voltamétrie impulsionnelle différentielle ; ERGO : oxyde de graphène réduit électrochimiquement ; Fe₃O₄ : nanoparticules métalliques ; FIA-DECD : Détecteur électrochimique double couplé à l'analyse par injection de flux ; GCE : électrode en carbone vitreux ; gC 3 N 4 : nitrure de carbone de graphène ; GQD : point quantique de graphène ; GR : graphène ; IIP-S : capteur à empreinte ionique ; LSV : voltamétrie à balayage linéaire ; MoS₂ : disulfure de molybdène ; Nano-TiC : nano-carbure de titane cubique ; Nf : nafion ; NiFe : nanoparticules bimétalliques de NiFe ; NiO : oxyde de nickel ; Ox.MWCNT : nanotubes de

carbone multiparois fonctionnalisés ; Pani : polyaniline ; rGO : oxyde de graphène réduit ; SPCE : électrode en carbone sérigraphié ; SWASV : voltampérométrie par décapage anodique à onde carrée ; SWV : voltamétrie à onde carrée ; TiO₂ : dioxyde de titane.

I.6.4. Capteur photoélectrochimique

Le capteur photoélectrochimique est un nouveau type de dispositif d'analyse. Le mécanisme est basé sur les propriétés photoélectrochimiques de matériaux tels que le dioxyde de titane et l'oxyde de fluor et d'étain (Fang, T et al. 2016; Moakhar, R.S et al. 2017 ; Wang, P et al. 2018). Du fait de sa sensibilité remarquable et de sa facilité d'intégration, les capteurs photoélectrochimiques (PEC) deviennent des dispositifs analytiques de choix.

Un élément de détection photoélectrochimique nanostructuré basé sur l'utilisation d'un polymère imprimé d'ions Cr(VI) et d'un nitrure de carbone graphitique incorporé d'ions formiate a été exploré par le groupe Tian Fang (Fang, T et al. 2016) pour la mesure du Cr(VI) dans différents échantillons d'eau avec une bonne récupération de 89,8 –105 % à $0,006 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Le capteur conçu présente une sélectivité et une sensibilité élevées envers le Cr(VI) grâce à la réduction efficace des électrons photogénérés offerte vers le Cr(VI).

Au cours des dernières années, l'utilisation intensive de BiOI a été réalisée pour l'élaboration du capteur photoélectrochimique (PEC) en raison de son excellente capacité d'absorption de la lumière visible. Cependant, son utilisation est limitée par son faible rendement de conversion d'énergie (Li, M et al. 2019; Li, M et al. 2020; Chen, R et al. 2020). Récemment, Mengying Li et al. (Li, M et al. 2019) ont développé un capteur PEC conçu par des composites de BiOI avec Bi/BiOI-X pour la surveillance du Cr(VI) dans des échantillons d'eau avec une récupération satisfaisante de 98 à 102 % à une concentration aussi faible que $15,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Le mécanisme de détection était basé sur la réduction des espèces de chrome de Cr(VI) en Cr(III) par des électrons photogénérés. Ensuite, les électrons consommés conduisent à l'amélioration de la densité de photocourant. Le même groupe de recherche a proposé un autre capteur PEC pour la détection du Cr(VI) basé sur la résonance plasmon de surface du bismuth favorisée par les hétérostructures $\text{BiPO}_4/\text{BiOI}$ (Li, M et al. 2020). Une amélioration de l'efficacité de conversion d'énergie a été réalisée grâce aux avantages de la structure à hétérojonction pn de $\text{BiPO}_4/\text{BiOI}$ et à l'effet du Bi métal SPR. Ils ont suggéré que la PEC conçue a une excellente sélectivité vis-à-vis du Cr(VI), une large gamme linéaire de $26 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $9\,360 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une limite de détection basse de $15,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans un autre travail, Cheng Chen et al. (Chen, R et al. 2020) ont rapporté la modification de l'oxyde d'indium et d'étain par MoS_2/BiOI pour la détection de Cr(VI) sous irradiation de lumière visible. La quantité adéquate de MoS_2 a fourni un transfert d'électrons rapide et une bonne conductivité électrique. Cependant, l'excès de MoS_2 affecte la capacité du matériau construit à absorber la

lumière visible. Le capteur tel que préparé permet la détermination du Cr(VI) dans l'eau du robinet et du lac avec une excellente récupération de 98 à 100 % au niveau de $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Dans une autre approche, le groupe Junwei Di (Wang, P et al. 2018) a développé un nouveau capteur PEC modifié avec des points quantiques de PbS sur la surface de l'ITO pour mesurer le Cr(VI) dans des échantillons d'eau avec une récupération de 91,8 à 98,2 %. Les photoélectrons générés par les QD PbS ont été capturés par Cr(VI) conduisant à la séparation des trous d'électrons et à l'intensification du photocourant généré. Un tel semi-conducteur de type p proposé offre divers avantages tels qu'un faible coût, un temps de réponse court, une irradiation à la lumière visible, une bonne sensibilité et une limite de détection de $5,2 \times 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La modification du verre FTO par des nanobâtonnets de dioxyde de titane rutile monocristallin a été effectuée par la méthode hydrothermale suivie de leur décoration par des AuNPs destinés à la détermination directe du Cr (VI) dans l'eau du robinet et de rivière avec des récupérations de 98–99% et 98–101 % (Moakhar, R.S et al. 2017). Le capteur proposé a démontré une réduction rapide du Cr(VI) en 30 min au lieu de 90 min de haute sensibilité grâce à l'utilisation d'AuNPs qui diminuent la résistance au transfert de charge avec $0,312 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ car la concentration la plus faible a pu être détectée. De même, Roozbeh Siavash Moakhar et al. ont décoré un TiO_2 sérigraphié avec des nanoparticules d'or pour le suivi direct du Cr(VI) à une concentration aussi faible que $0,208 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Moakhar, R.S et al. 2015). Le capteur fabriqué fournit une haute densité de sites réactifs, une charge électrique de surface supplémentaire fournie par les nanoparticules d'or, une bonne fiabilité, une précision, une réponse rapide, une grande sensibilité de $11,88 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$. En outre, le capteur GCE à base de nanoparticules de TiO_2 dopées Au a été étudié pour l'analyse du Cr (VI) par Ravishankar et ses collègues (Ravishankar, T.N et al. 2017). Le capteur élaboré a été utilisé pour la détection ampérométrique du Cr(VI) dans les eaux usées du robinet et industrielles avec un grand taux de recouvrement entre 98 % et 100 % et une limite de détection de $520 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Il est à noter que la majorité des capteurs photoélectrochimiques cités (tableau 4) présentent l'aptitude de la détermination du Cr(VI) même en présence de fortes concentrations d'ions chlorure grâce à leur grande sensibilité et sélectivité vis-à-vis du Cr(VI) due à la réduction d'électrons photogénérée efficace offerte vers Cr(VI).

Tableau 4. Résumé des données électroanalytiques des capteurs photoélectrochimiques rapportés pour la surveillance du chrome hexavalent.

Capteur	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
FTO (électrode photoactive)	Anion formiate incorporé nitrure graphitique-carbone (FgC ₃ N ₄ /IIP) Coulée en goutte	Mesures photoélectrochimiques	0.01–100.00	0.006	Eau	(Fang, T et al. 2016)
Bi/BiOI-X/ITO (où x peut être 1, 2, 3 ou 4)	Coulée en goutte (20 μL)	détection photoélectrochimique	52–11,960	15.6	eau du robinet, eau du lac	(Li, M et al.2019)
(BiPO ₄ / BiOI / ITO)	Coulée en goutte	Bi-SPR (résonance plasmon de surface du bismuth)	26–9360	7.8	Eau du robinet et du lac	(Li, M et al.2020)
MoS ₂ / BiOI / ITO	Coulée en goutte (20 μL)	détection photoélectrochimique	2.6–520 520–8320	0.52	Eau du robinet et du lac	(Chen, R et al.2020)
PbS QD/ITO	Incubation Assemblage avec le linker poly(chlorure de diallyl dimethyl ammonium)	Détection photoélectrochimique	1.04×10^{-3} –104	5.2×10^{-4}	eau du robinet, eau du lac	(Wang, P et al. 2018)
Au-TiO ₂ /FTO	Nanobâtonnets de TiO ₂ : méthode hydrothermale AuNPs : électrodéposition par CV	technique de chronoampérométrie sous irradiation solaire simulée hachée (100 mW·cm ⁻² , cycles marche/arrêt lumière : 30 s)	0.52–2600	0.312	eau du robinet et de la rivière	(Moakhar, R.S et al. 2017)
Au-TiO ₂ /SPE	Sérigraphie du TiO ₂ dans la pâte Electrodéposition des AuNPs par CV	Ampérométrie	0.52–5200	0.208	eau du robinet et de la rivière	(Moakhar, R.S et al. 2015)
Au/TiO ₂ NPs/GCE	(NPs Au@TiO ₂ par méthode hydrothermale) Coulée en goutte	ampérométrie	5200–140,400	520	Eau du robinet, Eaux usées industrielles	(Ravishankar, T.N et al. 2017)

Au : or ; Bi : bismuth ; BiPO₄ : Phosphate de bismuth ; BiOI : Oxyde d'iodure de bismuth ; GCE : électrode en carbone vitreux ; FTO : oxyde de fluor étain ; ITO : oxyde d'indium et d'étain ; MoS₂ : disulfure de molybdène ; PbS QDs : points quantiques de sulfure de plomb(II) ; SPE : électrode sérigraphiée ; TiO₂ : dioxyde de titane ; NPs de TiO₂ : nanoparticules de dioxyde de titane.

I.6.5. Autres capteurs

Outre les stratégies déjà évoquées pour le dosage du Cr(VI), il existe d'autres capteurs qui seront abordés dans ce paragraphe.

De nos jours, de grands efforts ont été fournis pour l'utilisation des polyoxométalates (POM) comme catalyseurs fonctionnels dans plusieurs applications parmi lesquelles la catalyse (Wang, S.S et al. 2015 ; Blazevic, A et al. 2016 ; Zheng, Q et al. 2018), la conversion d'énergie (Dong, Y et al. 2017 ; Xin, X et al. 2019 ; Zhang, Y et al. 2019) l'électronique et les biocapteurs (Chen, L et al. 2019 ; Du, N et al. 2019 ; Zang, D et al. 2019; Zhu, D et al. 2020; Wang, Q et al. 2018; Boussema, F et al. 2018). Récemment, Zhangang Han et al. (Wang, Y et al. 2020) ont publié deux articles sur l'élaboration de capteurs à base de POM pour la détection du Cr(VI). Trois types de phosphomolybdates $\{P_4Mo_6\}$ Des matériaux cristallins basés sur des clusters ont été synthétisés avec trois métaux centraux différents (Co, Ni et Cd). Le GCE modifié par le matériau synthétisé avec Co comme métal central fournit la réponse de courant la plus élevée au Cr(VI) avec une sensibilité élevée dans une gamme de (52 à 39 312 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), une limite de détection de 2,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ qui pourrait être due à l'effet synergique entre le phosphomolybdate et le métal central Co (Wang, Y et al. 2020). Plus tard, la même équipe (Xin, X et al. 2020) a rapporté un capteur électrochimique basé sur un matériau cristallin à base de deux POM réducteurs pour la détermination du Cr(VI). Composé 1" $(H_2bpp)_2[Na_4Fe(H_2O)_7][Fe(P_4Mo_6O_{31}H_6)_2]\cdot 2H_2O$ révèle une charpente poreuse inorganique tridimensionnelle unique tandis que le composé 2" $(H_2bpp)_6(bpp)_2[Fe(P_4Mo_6O_{31}H_8)_2]_2\cdot 13H_2O$ existe discrètement dans 0D. une telle différence a un effet significatif sur les performances électrochimiques des électrocatalyseurs. Le composé 1/GCE a montré d'excellentes performances électroanalytiques pour le Cr(VI), une gamme linéaire de 104 à 135 720 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une limite de détection de 9,05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Xin, X et al. 2020). En outre, l'utilisation de ces composés catalytiques cristallins comme matériaux de détection a montré une excellente sélectivité vis-à-vis de l'analyte, une bonne stabilité, une bonne reproductibilité ainsi qu'une résistance élevée contre les interférons coexistants.

En effet, Enrique Barrado et al. ont suggéré la modification de l'électrode sérigraphiée avec du chlorure de pol(1-allyl-3-méthylimidazolium) magnétique pour la détermination du Cr(VI) dans des échantillons d'eau du robinet. La détection a été réalisée par voltampérométrie cathodique adsorbante sans ajout d'agent complexant contrairement aux études rapportées (Xu, S et al. 2015). L'utilisation de particules magnétiques garantit la facilité de modification du capteur (Ferreira, T.A et al. 2018).

La modification de SPE par deux composés de nanostructures $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pour l'étude de l'effet de l'exposition au plan (001) sur les performances de détection du Cr(VI) a été exploitée avec succès par Li Fu et ses collègues (Fu, L et al. 2019). La nanostructure $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ à forte exposition du plan (001) facilite l'adsorption du Cr(VI) grâce à sa densité accrue de groupements hydroxyles. Le capteur développé permet la détection de Cr(VI) de 5 à 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. De plus, sa capacité à détecter le Cr(VI) à 1,17 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ niveau avec une bonne reproductibilité et stabilité. Dans une autre approche, une électrode en or jetable a été élaborée par Wan Wang et ses collègues pour la mesure du Cr(VI) dans l'eau du robinet, l'eau du lac et les plastiques avec un taux de recouvrement de 99 à 106 %. Dans cette étude, la mesure du Cr(VI) a été effectuée dans les gammes linéaires de 1–50 et 50–120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ comme concentration la plus faible détectée (Wang, W et al. 2016).

Un capteur chimirésistif élaboré à l'aide de AuNPs fonctionnalisés par le 1,4-dithiothréitol (DTT) et d'oxyde de graphène réduit (rGO) a été réalisé pour la détermination du Cr(VI) (Tan, F et al. 2017). Le mécanisme est basé sur la liaison sélective entre les AuNPs fonctionnalisés par le DTT situés dans les canaux conducteurs rGO (DTT-AuNPs1) et les AuNPs fonctionnalisés par le DTT en solution (DTT-AuNPs2) par la formation de ponts disulfures induits par le Cr(VI) dans des conditions acides résultant dans l'agrégation de DTT-AuNPs2 à la surface des canaux rGO qui produit un changement de résistance mesurable. Le capteur fabriqué permet une surveillance rapide en temps réel du Cr(VI) en environ 50 s. La plus faible concentration de Cr(VI) pouvant être détectée était de l'ordre de $4,68 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

GCE modifié à double membrane polymère opéré par électropolymérisation de poly (3-octylthiophène) et coulée en goutte de poly (chlorure de vinyle) pour le dosage des ions chromate d'hydrogène (HCrO_4^-) par voltampérométrie de stripping (Izadyar, A et al. 2016). Les anions chromate avaient la capacité d'être piégés dans la membrane PVC pendant le temps de l'étape de préconcentration (4 min), puis strippés exclusivement. Le capteur préparé fournit une réponse sélective et sensible dans une gamme linéaire de concentration allant de 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à 67,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et détecte le Cr(VI) à un niveau de 0,642 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Dans une autre stratégie, la détermination du Cr(VI) s'est faite au moyen de la modification d'électrode sérigraphiée par du vanadate de bismuth (BiVO_4). L'ajout de BiVO_4 améliore l'activité électrocatalytique pour la détection du Cr(VI) attribuable à la surface élevée du catalyseur préparé et à sa cristallinité élevée. En outre, le capteur préparé présentait une grande activité électrocatalytique, une bonne stabilité, une recyclabilité (4 fois), une large gamme linéaire (0,52–13,754 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) avec la capacité de détecter le Cr(VI) au niveau de 0,182

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Jaihindh, D.P et al. 2019). Les catalyseurs nanocomposites sont un outil polyvalent et puissant utilisé pour la réduction du Cr(VI). Par exemple, un photocatalyseur composite basé sur l'utilisation de la polyaniline et de la charpente organique métallique MIL-100 (Fe), qui est composé de clusters métalliques Fe-O, de lieur organique et d'acide trimésique, a été préparé et analysé par Chong-Chen Wang et coll. (Chen, D.D et al. 2020). Lors de l'irradiation lumineuse, les électrons photogénérés dans la bande de conduction du MIL-100(Fe), qui possède une capacité de réduction plus faible, se recombinent avec les trous photogénérés dans la bande de valence de la polyaniline qui a une capacité d'oxydation plus faible. Ainsi, les électrons photogénérés dans la polyaniline conduisent à une capacité de réduction élevée. Cependant, une capacité d'oxydation élevée résulte des trous photogénérés dans le MIL-100(Fe). Il en résulte une amélioration des performances photocatalytiques attribuées au schéma dit en Z du mécanisme précité (Low, J et al. 2017). De plus, il offre une bonne stabilité et une bonne réutilisabilité dans les échantillons d'eau. Dans une autre stratégie, Dong-Hau Kuo et al. (Zelege, M.A et al. 2019) ont proposé la synthèse du catalyseur nanoflower $(\text{In,Ga})_2(\text{O,S})_3$ chargé par différents pourcentages de V_2O_5 pour la réduction du Cr(VI). Quarante pour cent de V_2O_5 chargé $(\text{In, Ga})_2(\text{O, S})_3$ a montré la capacité de réduction la plus élevée en 2 min, des propriétés électriques plus élevées et un taux de transfert d'électrons plus élevé par rapport au catalyseur nanocomposite non chargé, ainsi que d'autres pourcentages chargés de V_2O_5 (30 % et 50%).

La technique couche par couche en conjonction avec la polyaniline et le poly(acide vinylsulfonique) (PVS) a également été proposée pour l'élaboration de films minces fabriqués à partir de cellulose microcristalline non modifiée (MC) ou MC modifiée par un groupe phosphate (PC) qui améliore la conductivité et la stabilité du PANI en présence du métal (Teixeira, P.R.S et al. 2015). Le capteur préparé (PVS/PANI(PC)/ITO) en combinaison avec la voltamétrie à onde carrée a montré la capacité de surveiller le Cr(VI) de façon linéaire de 759,2 à 3120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Il a également été testé pour la mesure du Cr(VI) dans l'eau du robinet avec un taux de recouvrement de 80 % à 97 %. Dans le même contexte, des polysaccharides naturels préparés à partir d'agar et de carraghénane ont été déposés par auto-assemblage couche par couche en alternance avec de la polyaniline sur la surface d'oxyde d'indium dopé à l'étain (De Oliveira Farias, E.A et al. 2015). Le film préparé a montré une stabilité électrochimique améliorée de la polyaniline en milieu acide en raison de l'activité antioxydante de l'agar et du carraghénane employés. Dans les conditions optimisées, le capteur construit a montré de hautes performances dans la détection du Cr(VI) linéairement de 129 à 2600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. L'étude présentée

a montré les avantages de l'incorporation de couches minces de polymère naturel pour l'élaboration de capteurs électrochimiques pour le Cr(VI) par rapport au polymère PVS largement utilisé.

La pile à combustible à flux laminaire (LFFC) est également connue sous le nom de pile à combustible microfluidique sans membrane. Elle est basée sur les caractéristiques du fluide dans les régimes à faible nombre de Reynolds (<2100). Le LFFC bénéficie d'une architecture simple qui élimine les problèmes liés à la membrane, parmi lesquels la dégradation de la membrane et la gestion de l'eau (Ferrigno, R et al. 2002). En raison de ses nombreux avantages, notamment un temps de rétention hydraulique court d'environ 2 min, un rendement énergétique élevé et un temps de réponse rapide (quelques minutes), le LFFC a ouvert de nouvelles opportunités pour la détection de l'activité électrochimique des micro-organismes (Li, Z et al. 2012; Wang, H.Y et al. 2013). En fait, Dingding Ye et al. (Ye, D et al. 2015) ont fabriqué un capteur à pile à combustible à flux laminaire pour la surveillance du Cr(VI) dans les eaux usées industrielles. Dans des conditions optimales, le capteur LFFC conçu détecte le Cr(VI) à une concentration aussi faible que $2500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en moins de 1 min avec une bonne reproductibilité.

Des nanoparticules d'oxyde métallique ont également été utilisées comme matériau de détection efficace pour la surveillance du Cr(VI). Parmi elles, des nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO) destinées à être déposées sur une plaque d'oxyde d'étain dopé au fluor. Le capteur développé a pu détecter le Cr(VI) avec une linéarité de 5×10^3 à $50 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. D'autres modifications du capteur par l'incorporation d'autres nanomatériaux de détection sont nécessaires pour améliorer la réponse de l'électrode et détecter la plus faible concentration de Cr(VI) (Kowsalya, B et al.2019).

Plusieurs publications ont rapporté l'utilisation de capteurs électrochimiques basés sur la modification d'une électrode solide en or pour la surveillance électrochimique du Cr(VI) grâce à sa large fenêtre de potentiel, sa stabilité à long terme et son faible courant de fond (Korshoj, L.E et al. 2015; Wei, J et al. 2015; Bhanjana, G et al. 2019; Kochana, J et al. 2019). Comme indiqué dans le tableau 5 , différentes électrodes en or modifiées ont été efficacement utilisées pour quantifier le Cr(VI). Pour cela, Lee E. Korshoj et ses collaborateurs (Korshoj, L.E et al. 2015) ont proposé un capteur ionique électrochimique pour la détection hautement spécifique du Cr(VI) basé sur l'interaction entre le Cr(VI) et le bleu de méthylène (MB) immobilisé sur la surface de l'électrode en or. Tout d'abord, le MB a été réduit à la surface de l'électrode pour former du bleu de leucométhylène, qui a réduit le Cr(VI) en Cr(III) et régénéré le MB au cours du processus. Le capteur élaboré a montré une sensibilité et une sélectivité élevées et l'aptitude

à détecter le Cr(VI) à un niveau de $26 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans une autre étude, un capteur impédimétrique électrochimique basé sur l'auto-assemblage de la monocouche d'azacrown sur l'électrode d'or en combinaison avec la spectroscopie d'impédance électrochimique a été fabriqué pour la détection de Cr(VI) à des niveaux de trace ($0,0014 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La stratégie de détection était basée sur la haute affinité et la liaison spécifique de la monocouche d'azacouronne vis-à-vis de HCrO_4^- . Le capteur impédimétrique développé présente une grande sélectivité vis-à-vis du Cr(VI) en présence d'autres ions interférents dans une gamme linéaire de concentration de 1 à $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une grande récupération de $99,6 \pm 3,3 \%$ dans l'eau de rivière (Wei, J et al. 2015). Une autre stratégie basée sur la détection redox directe de différentes concentrations de Cr(VI) linéairement de 50 à $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a été développée via le revêtement des nanopuces d'oxyde de manganèse (Mn_3O_4) sur la surface de l'électrode en or (Bhanjana, G et al. 2019). L'utilisation de Mn_3O_4 présente divers avantages, notamment la facilité de synthèse, le faible coût, une stabilité électrochimique élevée, la capacité de fournir une charge élevée en peu de temps et une activité catalytique élevée. De plus, le capteur développé pouvait détecter le Cr(VI) à un niveau de concentration de $9,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Récemment, Jolanta Kochana et al. (Kochana, J et al. 2019) ont rapporté un capteur capacitif pour la détermination du Cr(VI). Le capteur proposé est basé sur la monocouche auto-assemblée (SAM) de thiol fonctionnalisé sur la surface de l'électrode en or. Le SAM a été préparé à partir du mélange de thiol-décane-thiol et de S-{12-[1-(pyridin-4-ylméthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]dodécyl}. Le capteur capacitif développé affiche une limite de détection de $1,612 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tableau 5. Résumé des données électroanalytiques des électrodes solides en or modifié rapportées pour la surveillance du chrome hexavalent.

Nano-capteur	Stratégie de modification	Technique	Linear Range ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
MB/Au	Incubation	CV	$26-52 \times 10^4$	26	Pas fini	(Korshoj, L.E et al. 2015)
monocouche azacrown/Au	Auto-assemblage	SIE	1-100	0.0014	l'eau de rivière	(Wei, J et al. 2015)
$\text{Mn}_2\text{O}_4/\text{Nf}/\text{Au}$	Revêtement Mn_3O_4	CV	50-400	9.5	Eau du canal et Eaux usées	(Bhanjana, G et al. 2019)
Monocouche de thiol/Au	Monocouche auto-assemblée	Mesure capacitive	0.052-0.52; 0.52-2.6; 5.2-26	1.612×10^{-2}	solutions synthétiques	(Kochana, J et al. 2019)

Au : or ; CV : voltamétrie cyclique ; SIE : spectroscopie d'impédance électrochimique ; Nf : nafion ; MB : bleu de méthylène.

I.7. Biocapteurs électrochimiques pour la détermination du chrome hexavalent

Selon la définition de l'IUPAC, un biocapteur est un dispositif récepteur-transducteur intégré qui combine des matériaux de détection biologiques (biorécepteur) avec un transducteur. L'interaction entre l'analyte et l'élément de biorecognition est ensuite convertie en un signal mesurable au moyen du système de transduction. Ensuite, le signal est converti en une lecture ou un affichage.

Pour étudier l'existence du chrome, de nombreuses stratégies sont utilisées pour la modification des biocapteurs électrochimiques (Figure 3). La pile à combustible microbienne (MFC) est l'une des approches utilisées. Ces MFC présentent quatre caractéristiques uniques, aucune exigence ni d'enzymes externes ni de micro-organisme pur à charger, une réponse rapide des bactéries anaérobies, aucun besoin de source d'alimentation externe en raison de la capacité des MFC à générer de l'électricité à partir des eaux usées, ainsi que l'attente d'avoir des réponses différentes à plusieurs chocs subis par le rejet de fortes concentrations de contaminants dont les métaux lourds (Biswas, P et al. 2017).

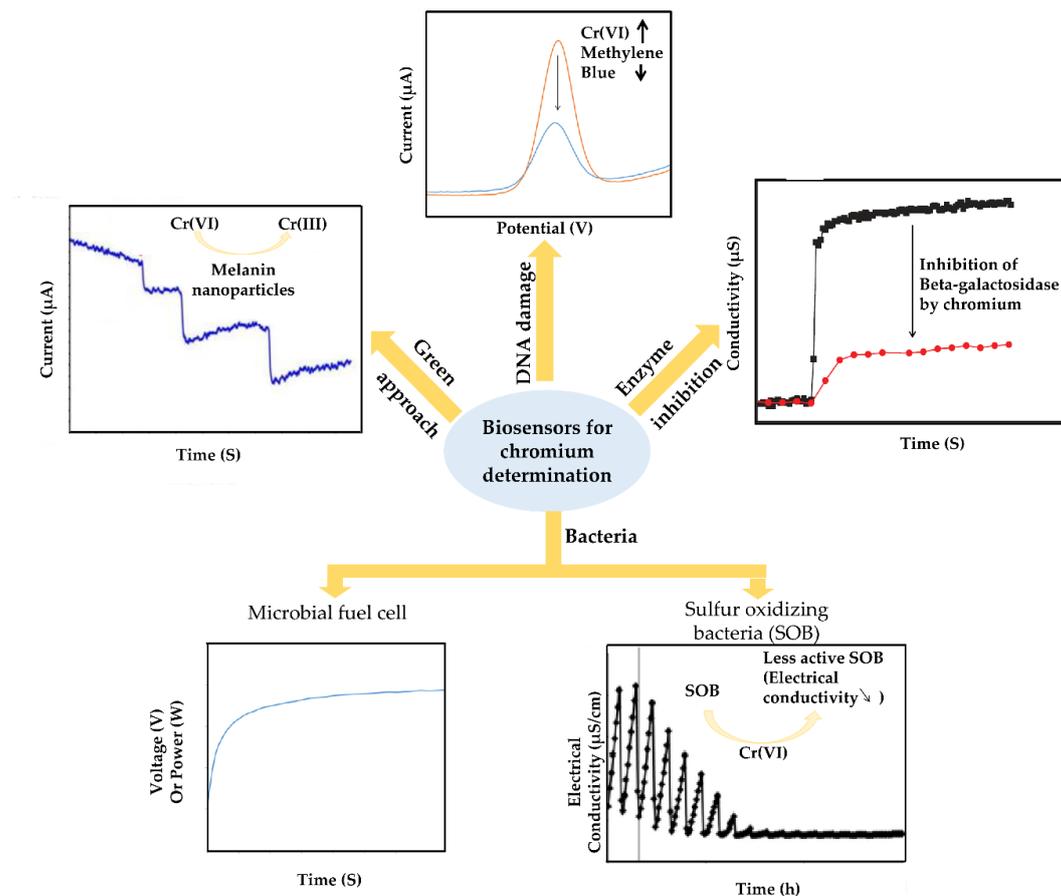


Figure 3. Schéma des différents biocapteurs utilisés pour la détermination du chrome (Hilali, N et al. 2018).

Zhiheng Xu et al. (Xu, Z et al. 2015) ont rapporté un MFC à base de membrane. Encre de carbone recouverte de deux membranes filtrantes de compactage destinées à la surveillance du Cr(VI). Le capteur proposé offre une sensibilité et une stabilité élevées ainsi qu'une microporosité et une hydrophilie élevées des membranes offrant de nombreux avantages, parmi lesquels une durée d'acclimatation raccourcie (quelques heures) car la microporosité minimise la distance entre les cellules conduisant à une acclimatation plus rapide et l'hydrophilie simplifie le processus permettant un court temps d'incubation.

Le développement de MFC à deux chambres au lieu d'une chambre a été réalisé par Hyeonyong Chung et al. (Chung, H et al. 2016) pour la détection du Cr(VI) dans l'eau. La tension générée a été utilisée pour suivre le changement de la concentration de Cr(VI) dans différentes conditions en co-présence de Fe(II) jusqu'à un rapport molaire de 1:15 et en co-présence d'acide fulvique jusqu'à $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Le dispositif d'avertissement développé a mesuré avec succès les concentrations de Cr(VI) dans la gamme de 100 à $1500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Néanmoins, les MFC proposés ont montré des limites dans la détection du Cr(VI) dans des conditions de pH plus élevées. Ce qui a été surmonté plus tard (Wang, G.H et al. 2016, Wu, L.C et al. 2017). Guey-Horng Wang et al. (Wang, G.H et al. 2016) ont suggéré l'utilisation d'un biocapteur à base de MFC inoculé avec un anaérobie facultatif, un *Ochrobactrum anthropi* YC152 réducteur de Cr(VI) pour les mesures de Cr(VI) dans l'eau. L'*Ochrobactrum anthropi* YC152 a montré une grande capacité d'adaptation au pH (5–8), à la salinité, à la température et à la qualité de l'eau dans des conditions anaérobies. Parallèlement à l'augmentation de la concentration de Cr(VI) dans le MFC, la tension du MFC diminue. Le capteur développé a montré que deux relations linéaires entre la concentration de Cr(VI) et la tension de sortie ont été obtenues $12,5\text{--}300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $300\text{--}5000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Li-Chun Wu et al. (Wu, L.C et al. 2017) propose un biocapteur MFC inoculé avec un réducteur de Cr(VI), *Exiguobacterium aestuarii* YC211, bactérie tolérante au sel, anaérobie facultative et exoélectrogène pour évaluer sa capacité en tant que biocapteur Cr(VI). Le biocapteur MFC proposé n'a pas été affecté par les paramètres du milieu environnant, notamment le pH (5–9), la température (20–35 °C), la salinité et les ions coexistants. La tension de sortie du MFC et la concentration de Cr(VI) étaient inversement proportionnelles dans une gamme varie de $2\ 500$ à $60\ 000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Une nouvelle stratégie basée sur l'intégration d'une pile à combustible microbienne multi-anodes (PMMFC) en tant que papier autoportant jetable avec un système de gestion de l'alimentation (PMS) pour la mesure en temps réel du Cr (VI) dans les eaux usées a été étudiée

par Zhiheng Xu et son équipe (Xu, Z et al. 2016). Le capteur PMMFC a été testé à trois types de chocs, le Cr(VI) comme métal toxique, l'acétate de sodium comme contaminant organique et le sodium hypochloreux comme désinfectant dans les eaux usées dans une chambre en mode batch. Le PMMFC développé offre d'énormes avantages, notamment une durée d'acclimatation plus courte (2 à 3 h) par rapport à l'anode en tissu de carbone MFC CCMMFC traditionnelle (3 à 15 jours), une puissance de sortie améliorée quatre fois par rapport au MFC à anode unique et six fois par rapport au CCMMFC. Le PMMFC démontre une plus grande sensibilité de sortie de puissance par rapport à la sortie de tension (Xu, Z et al. 2016).

Récemment, Shuai Zhao et ses collaborateurs ont exploré une nouvelle pile à combustible microbienne à sédiments en tant que biocapteur pour la surveillance en temps réel et in situ du Cr(VI) dans les eaux usées industrielles (Zhao, S et al. 2018). Dans les conditions optimisées (pH 6,4, température 25 °C), le biocapteur développé a affiché une excellente sélectivité et précision, ainsi qu'une linéarité allant de 200 à 700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a également montré une haute spécificité et aucune interférence en présence d'autres les ions co-existants qui indiquent sa grande fiabilité.

Comme il a été indiqué dans la référence (Biswas, P et al. 2017), le biocapteur à base de MFC pourrait être considéré comme un outil utile pour la surveillance du Cr(VI) dans les eaux usées car sa tension/puissance de sortie est liée aux activités des bactéries électrogéniques anaérobies. Le MFC à chambre unique est limité par son long temps de récupération. Plus tard, le MFC à deux chambres a été utilisé pour la mesure du Cr(VI). Cependant, son application était restreinte en milieu acide (pH 1–2). Récemment, les PMS intégrés PMMFC ont été utilisés pour la détection du Cr (VI) avec l'hypochloreux de sodium et l'acétate de sodium. Le PMMFC a raccourci la durée d'acclimatation et amélioré la puissance de sortie.

Outre les capteurs microbiens de la pile à combustible, le biocapteur microbien peut être défini comme un dispositif analytique qui couple des micro-organismes (bactéries oxydantes du soufre (SOB), algues, bactéries nitrifiantes, bactéries oxydant le fer, bactéries bioluminescentes et bactéries aérobies) avec un transducteur physicochimique pour produire un signal électronique proportionnel à la concentration de l'analyte. Ce type de capteurs permet une détection aisée, une rentabilité et une bonne reproductibilité. Dans le même contexte, Heonseop Eom et son équipe ont établi un système de détection basé sur les propriétés métaboliques du SOB pour oxyder le soufre (S^0) et produire de l'acide sulfurique (SO_4^{2-}) dans des conditions aérobies, comme le montre l'équation (4) (Biswas, P et al. 2017; Eom, H et al. 2019), entraînant une augmentation de la conductivité électrique (CE) et une diminution du pH.



La présence de substances toxiques entraîne une inhibition de l'activité SOB, entraînant une production moindre d'acide sulfurique, une diminution du pH et des valeurs EC plus faibles. Dans leurs travaux, Heonseop Eom et al. (Eom, H et al. 2019) ont élaboré un bioréacteur fed-batch basé sur l'utilisation du SOB pour mesurer le Cr(VI) dans l'eau. Une concentration efficace (CE_{50}) de $1180 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a été obtenue après une demi-exposition de 2 h au Cr(VI) ce qui le rend sensible et adapté au dosage rapide du Cr(VI) dans l'eau.

Des biocapteurs basés sur l'inhibition enzymatique ont également été utilisés pour la détection du Cr(VI). Dans ce type de biocapteur, l'analyte (Cr(VI)) inhibe l'enzyme entraînant une diminution du produit enzymatique, qui est liée à la concentration de l'inhibiteur (analyte). Le principe du biocapteur enzymatique repose sur la quantification de l'inhibiteur, par la mesure de l'activité enzymatique en présence et en absence de l'inhibiteur selon l'équation suivante (Bachan Upadhyay, L.S et al. 2013) : $I(\%) = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100$ où A_0 est l'activité en l'absence d'inhibiteur et A_i est l'activité en présence d'inhibiteur. En utilisant cette approche, Fourou et al. ont présenté un biocapteur enzymatique sélectif, simple et sensible pour la mesure des métaux toxiques dont le Cr(VI). Le principe de la détection reposait sur l'inhibition de la β -galactosidase (β -gal) d'*Aspergillus oryzae* après son immobilisation sur une électrode d'or interdigitée par réticulation avec du glutaraldéhyde. L'inhibition enzymatique par Cr(VI) a été notée par la diminution de l'activité β -gal mesurée par le signal conductimétrique. Dans les conditions optimisées, le biocapteur conçu affichait une limite de détection de $9,17 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fourou, H et al. 2016).

Dans une autre approche, Marta Jarczewska et ses collègues (Jarczewska, M et al. 2015) ont proposé une stratégie alternative pour la détermination des dommages à l'ADN causés par le Cr(VI). Dans cette approche, l'ADNdb a été adsorbé sur la surface des électrodes à disque d'or par adsorption physique. L'analyse suggérée repose sur la mesure du changement de courant du bleu de méthylène (MB) en tant qu'indicateur redox externe avant et après son incubation dans une solution de chromate de potassium à pH 3. Cette méthode a montré une manière plus efficace de préparer l'analyse à base d'ADN (facilité de préparation, pas de préincubation dans MB) en comparaison avec les études déjà proposées qui reposent sur l'évaluation des dommages à l'ADN par l'espèce active redox MB (Ensafi, A.A et al. 2013). De plus, du peroxyde d'hydrogène et de l'acide ascorbique ont été ajoutés pour ajuster l'effet dégradant de CrO_4^{2-} . Le biocapteur développé fonctionne efficacement dans un temps d'incubation de 30 min avec une gamme linéaire de 52 à $5200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Une nouvelle stratégie basée sur le développement d'essais biologiques photoélectrochimiques destinés à la détection du Cr(VI) a été proposée par Kheibar Dashtian et son équipe (Dashtian, K et al. 2019). Un sulfoiodure de plomb photoactif ($\text{Pb}_5\text{S}_2\text{I}_6$) a été synthétisé par voie hydrothermale à basse température (160 °C), puis il a été conjugué avec les groupes hydroxyle et amino de la polydopamine suivi de son revêtement sur du TiO_2 nanoporeux par in situ polymérisation, qui a été développée sur une feuille de Ti par anodisation. L'électrode Ti/ TiO_2 se couple idéalement avec $\text{Pb}_5\text{S}_2\text{I}_6$, obtenant de grandes propriétés photoélectrochimiques. Le capteur fabriqué a montré des résultats satisfaisants pour la détection du Cr(VI) avec une grande stabilité, de larges gammes de concentration linéaire de 0,52 à 4 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une très faible limite de détection de 0,156 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Un tel capteur avantageux a fourni une mobilité élevée des électrons et des trous, des bandes de conduction et une valence d'image miroir de la constante diélectrique élevée $\text{Pb}_5\text{S}_2\text{I}_6$ et sa bande d'énergie correspond à celle de TiO_2 (Liu, Y et al. 2016). De plus, le $\text{Pb}_5\text{S}_2\text{I}_6$ a un faible taux de recombinaison des porteurs de charge qui pourraient être produits après excitation lumineuse (absorption de photons), conduisant à une sortie photo-électron plus élevée (Wang, G.L et al. 2015). De plus, le capteur développé fournit une amplification facile du signal pour le dosage biologique sensible du Cr(VI).

Récemment, des nanoparticules de mélanine naturelle (MNP) ont été utilisées dans l'élaboration de biocapteurs comme alternative verte à l'oxyde métallique et aux nanoparticules métalliques (Piacenti da Silva, M et al. 2014). En effet, Gizem Kaleli-Can et al. (Kaleli-Can, G et al. 2020) ont décrit l'élaboration d'un nouveau biocapteur ampérométrique basé sur la modification d'une électrode de carbone sérigraphiée (SPCE) par des MNP naturels destinés au suivi du Cr(VI) dans des échantillons d'eau. Les SPCE ont été décorés par des MNP via la méthode d'assemblage couche par couche (LBL-A) pour différents temps de cycle et la technique d'auto-assemblage induite par l'évaporation (EI-SA). L'incorporation de MNP en tant que matériau de biodétection améliore la réponse de l'électrode de 35 et 60 fois avec la technique (LBL-A) et (EI-SA) respectivement.

I.8. Capteurs électrochimiques et biocapteurs pour la détermination du chrome trivalent

L'état d'oxydation est un facteur crucial généralement négligé dans la détermination de la toxicité des espèces de chrome. Le chrome trivalent qui existe sous plusieurs formes selon le pH (Cr^{3+} , CrOH^{2+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$) est en général moins toxique que le chrome hexavalent entraînant quelques articles publiés consacrés aux capteurs électrochimiques et aux biocapteurs pour la surveillance du chrome trivalent.

Plusieurs capteurs nanocomposites ont été développés pour la surveillance du Cr(III) (Salimi, A et al. 2015; Wu, S et al. 2016; Heidari, Z et al. 2016, 2018). En effet, ZAHRA HEIDARI et al. (Heidari, Z et al. 2016) ont rapporté une électrode nanocomposite à base de MWCNT/Zéolite pour la détection du Cr(III). La zéolite a été utilisée comme ionophore sélectif et les MWCNT pour leurs propriétés chimiques et physiques attrayantes telles qu'une stabilité chimique élevée, une bonne conductivité, une bonne résistance mécanique et une surface spécifique maximale (Arain, M.B et al. 2018). Une quantité appropriée de chaque composite a été mélangée avec de la pâte de carbone, puis combinée avec une potentiométrie pour la mesure du Cr(III). Le capteur développé a affiché une réponse de courant stable vers le Cr(III) à un pH allant de 3 à 10, ce qui pourrait s'expliquer par aucune formation de complexe hydroxyle et aucune protonation de zéolite. De plus, il fournit un temps de réponse rapide (moins de 10 s) avec une linéarité entre 5,2 et $52 \times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec une limite de détection de $5,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Plus tard, le même groupe de recherche (Heidari, Z et al. 2018) ont rapporté une comparaison entre deux électrodes en pâte de carbone modifiées basées sur l'utilisation de zéolite pour la surveillance du Cr(III) dans différents échantillons d'eau avec une récupération de 82 à 97 %. Le capteur 1 a été modifié par du 3-méthylpyrazol-5-one et le capteur 2 par des MWCNT chlorés et ils présentent des linéarités entre 5,2 et $52 \times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et de 5,2 à $52 \times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivement. En utilisant le capteur 2, une gamme linéaire plus large et une limite de détection plus basse ont été obtenues grâce à la présence de MWCNT chlorés qui augmentent éventuellement la conductivité et améliorent la linéarité, tandis que le temps de réponse le plus court a été obtenu par le capteur 1 qui présente des performances plus élevées pour la détection du Cr(III) que le capteur 2 en raison de la forte interaction entre le Cr(III) et la 3-méthylpyrazol-5-one entraînant des fluctuations plus faibles de la différence de potentiel. Dans une autre stratégie où l'électrode de carbone vitreux a été modifiée par un nanocomposite de chitosane et de MWCNT puis utilisée comme plate-forme pour l'immobilisation de nanoflakes d'oxyde de manganèse électrodéposés via une combinaison de technique de voltamétrie cyclique (Salimi, A et al. 2015). Le capteur fabriqué affiche une activité électrocatalytique élevée envers les nanoflocons d'oxyde de manganèse Cr(III) conduisant à une détection électrochimique grandement améliorée du Cr(III) en raison de leur agglomération réduite et de leur microstructure poreuse. De plus, l'utilisation du chitosane comme agent dispersant était avantageuse pour la capacité électrochimique en raison de sa grande aptitude à l'encapsulation de plus d'oxyde de manganèse. Dans les conditions optimales, le capteur fabriqué présente une réponse stable sur la gamme de pH de (3 à 7), une stabilité élevée (3 mois), une bonne sensibilité, une reproductibilité convenable, un encrassement de surface minimal, une

détermination linéaire du Cr(VI) de 156 à 10,400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec une limite de détection commode de 15,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Salimi, A et al. 2015). Santhy Wyantuti et al. (Wyantuti, S et al. 2015) ont rapporté l'utilisation de GCE modifiés par AuNPs pour la mesure du Cr (III) par voltamétrie à impulsions différentielles. Le capteur développé a montré la capacité de surveillance du Cr(III) dans les eaux usées avec une récupération de 97 % à une très faible concentration (0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Shixin Wu et autres (Wu, S et al. 2016) ont proposé la modification de l'électrode sérigraphiée (SPE) par un nanocomposite de chitosane-or pour la surveillance du Cr(III) dans les eaux usées industrielles avec une grande récupération de 99 à 100 %. Parmi les capteurs préparés, on trouve SPE nu, Au/SPE, Chi/SPE et Chi-Au/SPE. Le Chi-Au/SPE fournit la plus grande réponse d'oxydation liée au Cr(III) grâce à l'utilisation de chitosane qui offre une forte capacité de chélation vis-à-vis du Cr(III). De plus, la réponse actuelle pourrait être améliorée grâce à l'incorporation d'Or conduisant à de grandes propriétés électrochimiques et à une conductivité élevée. L'utilisation de plus d'une nanostructure offre de nombreux avantages en termes de sensibilité et de sélectivité en raison de l'effet synergique entre les différents nanomatériaux utilisés. Pour bénéficier de ces avantages, Anish Khan et al. (Khan, A et al. 2015) ont rapporté un capteur nanocomposite basé sur la modification d'une électrode d'argent par polymérisation d'aniline en présence d'oxyde de graphène réduit et d'oxyde de tungstène pour la surveillance du Cr(III) à une concentration aussi faible que $1,612 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Le capteur proposé offre divers avantages, notamment un faible coût, un temps de réponse court de 10 s, une bonne sensibilité, une stabilité à long terme et une large gamme de linéarité allant de $5,2 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $52 \times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ qui sont probablement en raison de la porosité de surface et de la forte activité de décomposition catalytique des nanocomposites.

Mohammad Musarraf Hussain et al. (Hussain, M.M et al. 2020) ont modifié l'électrode en carbone vitreux par une fine couche de composé (E)-N'-(4-Bromobenzylidène)-benzènesulfonohydrazide avec l'ajout de nafion comme membrane polymère (Nf/4-BBBSH/GCE). L'ajout de 4-BBBSH augmente l'intensité du courant, ce qui pourrait probablement être dû au complexe formé entre le Cr(III) et le 4-BBBSH. Le capteur fabriqué affiche une bonne sélectivité vis-à-vis de la détermination du Cr(III) dans les échantillons environnementaux et permet sa détection à un niveau de $4,97 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Le polymère nanostructuré à empreinte ionique (IIP) sur l'électrode de platine a été signalé comme modificateur de capteur pour la surveillance du Cr(III) dans les eaux usées industrielles avec une récupération d'environ 97 % (Aravind, A et al. 2018). Le Cr(III)-IIP a été préparé en utilisant des MWCNT fonctionnalisés par le groupe vinyle, de l'acide méthacrylique, du N,

N'Méthylène-bis-acrylamide, de l'ion Cr(III) et du peroxydisulfate de potassium comme monomère fonctionnel, l'agent de réticulation, la molécule modèle et l'initiateur respectivement. L'utilisation de MWCNT-IIP comme modificateur améliore le transfert d'électrons grâce à l'adsorption de l'analyte à sa surface grâce aux cavités formées par le Cr(III). De plus, l'adsorption du Cr(III) était fortement influencée par le pH du milieu. Elle était supérieure à un pH inférieur à 5, ce qui pourrait s'expliquer par la formation d'hydroxyde à un pH supérieur à 5 et la protonation du site de liaison à un pH < 3. Une voltampérométrie pulsée différentielle a été réalisée pour la détection du Cr(III) avec une bonne sensibilité, sélectivité et reproductibilité.

Une plate-forme de biocapteurs à nanocanaux a été développée pour la mesure du Cr(III) et des microARN en utilisant une porte moléculaire détachable qui est la nanostructure de la réaction en chaîne d'hybridation de coupure (nHCR), qui répond à la séquence Y. Le transfert de Cr(III) dans l'acide nucléique X a été réalisé par clivage DNazyme dépendant des ions métalliques. L'acide nucléique X résultant pourrait être encore amplifié et converti en séquence universelle Y. Le désassemblage de la porte moléculaire de la nanostructure nHCR a activé le signal de courant ionique à l'intérieur du nanocanal, lors de l'ajout de la séquence Y dans le nanocanal fonctionnalisé nHCR. Le rapport ON-OFF a montré une linéarité avec des gammes de concentration de Cr(III) de $1,04 \times 10^{-5}$ à $1,04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zhu, L et al. 2019).

Martin Leimbach et al. (Leimbach, M et al. 2018) ont rapporté l'utilisation d'une microbalance électrochimique à cristal de quartz (EQCM) pour la caractérisation électrochimique du chrome déposé à partir de Cr(III) dans des solutions. Le dépôt électrolytique à partir de la solution de chrome trivalent a été facilité par l'ajout de sulfure benzoïque (BSI) qui facilite la réduction du Cr(III) en Cr(0).

Les performances analytiques des capteurs et biocapteurs modifiés cités pour la mesure du chrome trivalent sont résumées dans le tableau 6

Tableau 6. Résumé des données électroanalytiques des capteurs électrochimiques et des biocapteurs rapportés pour la surveillance du chrome trivalent.

Nano-capteur	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
MWCNT/zéolite/EPC	Incorporation en pâte	Potentiométrie	$5.2\text{--}52 \times 10^4$	5.2	Eaux usées	(Heidari, Z et al. 2016)
Capteur 1 : 3-méthylpyrazol-5-one/zéolite/EPC Capteur 2 : MWCNT chlorés/zéolite/EPC	Incorporation en pâte	potentiométrie	$52\text{--}52 \times 10^4$ $5.2\text{--}52 \times 10^4$	20.82.6	Eau potable, eau de rivière	(Heidari, Z et al. 2018)
MnOxNP/MWCNTs/Chit/GCE	Drop casting de MWCN/Chit. dépôt de MnOxNP par CV	CV et ampérométrie	156–10,400	15.6	Boire de l'eau	(Salimi, A et al. 2015)
AuNPs/GCE	Processus d'auto-assemblage	DPSV	0.5–75	0.01	Eaux usées	(Wyantuti, S et al. 2015)
Chitosane-or/SPE	électrodéposition	DPSV	52–5200	20.8	eaux usées industrielles	(Wu, S et al. 2016)
PANI-g-rGO @ WO ₃ / AgE	liants conducteurs : acétate de butyl carbitol (BCA) et acétate d'éthyle (EA)	IV	$5.2 \times 10^{-3}\text{--}52 \times 10^4$	$1.612 \times 10^{-3} \pm 5.2 \times 10^{-4}$	-	(Khan, A et al. 2015)
Nf/BBBSH/GCE	Coulée en goutte	IV	$5.2 \times 10^{-3}\text{--}52 \times 10^4$	4.97×10^{-3}	Eau de charbon, Effluent industriel, Eau de mer rouge, Eau du robinet, Eau de puits	(Hussain, M.M et al. 2020)
MWCNT-IIP/Pt	Fabrication de pâte de MWCNT-IIP sur électrode Pt	DPV	$1 \times 10^3\text{--}5 \times 10^3$	266.1	eaux usées industrielles	(Aravind, A et al. 2018)
Nanocanaux avec n-HCR		IV	$1.04 \times 10^{-5}\text{--}1.04$	1.04×10^{-5}	-	(Zhu, L et al. 2019)

Nano-capteur	Stratégie de modification	Technique	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Échantillon réel	Référence
Électrode en cristal de quartz	Galvanoplastie	EQCM	-	-	-	(Leimbach, M et al. 2018)

AgE : électrode d'argent ; BBBSH : (E)-N'-(4-bromobenzylidène)-benzènesulfonohydrazide; Chit : chitosane ; EPC : électrode en pâte de carbone ; CV : voltamétrie cyclique ; DPSV : voltampérométrie à impulsions différentielles ; DPV : voltamétrie impulsionnelle différentielle ; EQCM : microbalance électrochimique à cristal de quartz ; GCE : électrode en carbone vitreux ; IV : courant-tension ; IIP : polymère à empreinte ionique ; MnOxNP : nanoflocons d'oxyde de manganèse ; MWCNT : nanotubes de carbone multiparois ; Nf : nafion ; nHCR : réaction en chaîne d'hybridation de coupure ; PANI-g-rGO : oxyde de graphène greffé polyaniline ; Pt : platine ; SPE : électrode sérigraphiée ; WO 3 : trioxyde de tungstène.

I.9. Capteurs et biocapteurs électrochimiques pour la spéciation du chrome

Pour étudier les effets critiques des espèces de chrome sur les vies écologiques et biologiques, l'analyse de la spéciation est généralement intéressante. Les espèces de chrome existent sous plusieurs formes selon la valeur du pH (Cr^{3+} , CrOH^{2+} , Cr(OH)_2^+ , Cr(OH)_3 , HCrO_4^- , CrO_4^{2-} , H_2CrO_4 , HCrO_4^- et $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Pour cela, différents capteurs électrochimiques et biocapteurs ont été développés pour quantifier les concentrations de Cr(VI) ou Cr(III) et de chrome total par oxydation de Cr(III) en Cr(VI) si le capteur conçu est développé pour le Cr (VI) ou par réduction de Cr(VI) en Cr(III) si le capteur développé est destiné à la détermination de Cr(III).

En fait, comme il a déjà été mentionné, Santhy Wyantuti et al. (Wyantuti, S et al. 2015) ont développé un capteur basé sur la modification de GCE par des AuNPs pour la détection de Cr(VI) et Cr(III). La voltamétrie cyclique a été réalisée pour la détection des deux espèces de chrome. Cependant, leur spéciation a été possible grâce à l'utilisation de différents milieux avec des valeurs de pH différentes. L'oxydation du Cr(III) a été effectuée dans un tampon acétate à pH 5 et la réduction du Cr(VI) a été effectuée dans HCl (0,01 M (pH = 2)).

Dans une autre étude, un capteur PEC basé sur la combinaison d'un polymère à empreinte d'ions Cr(VI) et d'un anion formiate incorporant du nitrure de carbone graphitique ($\text{IIP@FgC}_3\text{N}_4$) a été développé et destiné à la détection de Cr(VI). Le capteur construit pourrait également être utilisé pour la quantification du chrome total et cela après l'oxydation du Cr(III) par l'utilisation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) alors que la teneur en Cr(III) a été calculée en soustrayant la concentration de Cr(VI) de Cr totale (Fang, T et al. 2016). Un autre groupe de recherche a développé un capteur spécifique pour la détermination du chrome au niveau ppt (Tyszczyk-Rotko, K et al. 2018). Le GCE électroplaque in situ par un film de bismuth en présence d'un médiateur de zinc a été combiné avec une voltamétrie différentielle par adsorption cathodique à impulsions pour la détection de Cr (VI). La détermination du chrome total a été réalisée après l'oxydation du Cr(III) en Cr(VI) au cours de la minéralisation UV. Ensuite, la concentration de Cr(III) a été facilement calculée en soustrayant Cr(VI) du chrome total (Tyszczyk-Rotko, K et al. 2018). Wan Wang et al. (Wang, W et al. 2017) ont rapporté une électrode en plastique jetable fabriquée par pulvérisation d'une fine couche d'or sur la surface d'un substrat en polyéthylène téréphtalate. Dans ce travail, des techniques d'ampérométrie et de voltamétrie par décapage cathodique adsorbant (AdCSV) ont été menées pour les mesures de Cr(VI) et de chrome total respectivement. La détection du chrome total a été effectuée après réduction de toutes les espèces de chrome en Cr(III) par $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ suivie

de sa complexation avec le 4-(2-pyridylazo) résorcinol (PAR). Le complexe PAR-Cr(III) formé a ensuite été mesuré par AdCSV. La méthode élaborée a montré de grands avantages, notamment sa spécificité, sa facilité de détection, son faible coût et sa fiabilité.

Une électrode sérigraphiée (SPE) modifiée par des nanocomposites chitosan-or en combinaison avec une voltamétrie différentielle à impulsions décapantes (DPSV) a été utilisée pour la mesure du Cr (III). Cependant, un suivi du Cr total a été effectué après l'ajout d'un excès de Na_2SO_3 qui permet la réduction de tout le Cr(VI) en Cr(III). L'utilisation du nanocomposite chitosane-or apporte une amélioration supplémentaire du signal grâce à la bonne conductivité de l'Or (Wu, S et al. 2016).

Subramanian Nellaiappan et al. (Nellaippan, S et al. 2018) ont développé une analyse par injection de flux (FIA) couplée à un double détecteur électrochimique basé sur la modification du GCE par des nanofibres de carbone-chitosane décorées par des nanoparticules d'or comme système de détection pour l'analyse de la spéciation du chrome. La détection des espèces de chrome a été réalisée par le même capteur dans du PBS pH 2. La capacité de spéciation du système de détection préparé a été confirmée par l'utilisation d'un bipotentiostat, où une augmentation de la réponse en courant dans FIA sur l'électrode W_1 pour l'oxydation du Cr(III) a eu lieu après l'addition de Cr(III), alors qu'aucun courant réponse a été observée sur l'électrode W_2 destinée à la détection de la réduction du Cr(VI) et vice versa.

Le capteur d'électrochimiluminescence (ECL) est un dispositif basé sur la combinaison de la luminescence visuelle et de l'électrochimie. En plus du potentiel appliqué sur l'électrode, sa surface est excitée, ce qui entraîne la production d'un transfert d'électrons entre les molécules et la lumière émise produite est mesurée. Selon les travaux précédents, les capteurs ECL pour la détection du Cr(VI) permettent sa spéciation grâce à sa capacité à éteindre le signal d'électrochimiluminescence (Chen, Y et al. 2015; Ma, H et al. 2016). Contrairement au Cr(III), le Cr(VI) a montré la capacité d'éteindre le fort signal d'électrochimiluminescence cathodique des points quantiques de peroxydisulfate et de graphène en présence d'EDTA, ce qui n'est pas le cas avec le Cr(III) (Chen, Y et al. 2015). Le même principe a été rapporté par Hongmin Ma et al. avec un capteur ECL à base de nanoparticules d'or hybridées Pb (II) - β -cyclodextrine structure métallo-organique (Ma, H et al. 2016).

La détermination électroanalytique du Cr(VI) et du Cr(III) a été étudiée à l'aide d'un nouveau biocapteur microbien basé sur la modification de l'électrode en pâte de carbone (EPC) par une cellule bactérienne *Citrobacter freundii* (Prabhakaran, D.C et al. 2017). Le mécanisme

de détection est basé sur la liaison de l'ion cible à la surface des cellules bactériennes suivie de leur réduction, dans laquelle la préconcentration de chaque espèce de chrome a été réalisée à différents potentiels appliqués (+1V pour Cr(VI) et -1V pour Cr(III)). De plus, les pics de réduction obtenus dépendent du pH du milieu et de l'état d'oxydation de la cible (Cr(VI) ou Cr(III)). L'incorporation de la cellule bactérienne dans le EPC a démontré une amélioration des performances (double) par rapport au EPC nu qui peut s'expliquer par l'exposition de groupes fonctionnels dans *Citrobacter freundii* vis-à-vis de l'adsorption des ions (Prabhakaran, D.C et al. 2017). Récemment et dans un contexte similaire, Prabhakaran et ses collaborateurs (Prabhakaran, D.C et al. 2020) ont élaboré un biocapteur bactérien par la bio-modification du EPC par *Sphingopyxis macrogoltabida* *SUK2c* pour la surveillance du Cr(VI) et du Cr(III) en solution aqueuse.

Une évaluation des toxicités du Cr(VI) et du Cr(III) dans l'eau a été réalisée à l'aide d'essais biologiques de bactéries oxydantes du soufre (SOB) dans des conditions discontinues et alimentées (Qambrani, N.A et al. 2016). Le principe d'inhibition du SOB est le même que celui cité ci-dessus en mesurant la conductivité électrique, le pH et la production de sulfate. Contrairement au Cr(VI), il a été démontré que le Cr(III) n'a pas de toxicité pour des concentrations jusqu'à $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dans les deux conditions. À une concentration de 500, 1 000 et 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI), l'activité de SOB était inhibée de 30, 60 et 98 % respectivement, tandis qu'à des concentrations inférieures à $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Cr(VI) n'a pas affecté l'activité SOB.

Lanjunzi Liu (Liu, L et al. 2019) et ses collègues ont synthétisé un biocomposite de polynoradrénaline-péroxydase de raifort-glucose oxydase. La noradrénaline (NA) a été utilisée comme monomère et la peroxydase de raifort (HRP) comme catalyseur pour effectuer la polymérisation de NA avec piégeage simultané de la glucose oxydase (GOx) et de la HRP. Dans ce travail, la spéciation du chrome est basée sur l'utilisation du biocomposite décrit dans deux plateformes différentes. Ce biocomposite a été coulé sur l'électrode de platine pour la détermination du Cr(VI). Alors qu'avec l'ajout de polyaniline (PANI), l'électrode résultante a été utilisée pour la détermination du Cr(III). Les deux mécanismes sont basés sur l'inhibition enzymatique où le pourcentage d'inhibition est proportionnel à la concentration finale d'inhibiteur en solution selon l'équation d'inhibition susmentionnée donnée. Le biocapteur préparé a montré d'excellentes performances dans la détermination de plusieurs analytes parmi lesquels Cr(III) et Cr(VI) simultanément avec une sensibilité et une sélectivité élevées. Le capteur PNA-HRP-GOx/Pt fabriqué a montré une capacité de détection du Cr(VI) à $1,04 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ niveau avec des gammes de concentration de $2,6 \times 10^{-2}$ à $0,312 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. PNA-HRP-

GOx/PANI/Pt permet la détermination du Cr(III) dans une gamme linéaire de concentration entre 0,52 et 197,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Liu, L et al. 2019).

Les méthodes électrochimiques d'analyse du chrome se sont considérablement développées au cours des cinq dernières années, en particulier pour le chrome hexavalent. Cependant, il existe peu d'études concernant le dosage du chrome trivalent en raison de sa toxicité négligeable par rapport au chrome hexavalent.

Cet article a résumé les progrès récents dans la surveillance électrochimique des deux espèces de chrome. Par rapport aux méthodes conventionnelles/standard précédentes (chromatographie ionique, spectrométrie d'absorption atomique, méthode colorimétrique au diphénylcarbazine) pour la détection du chrome, les techniques électrochimiques peuvent être considérées comme une bonne alternative. Ils offrent des systèmes très sensibles pour les mesures de chrome avec des limites de détection bien inférieures à 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans la plupart des cas. La sensibilité et la conductivité des capteurs électrochimiques pourraient être améliorées parallèlement à l'augmentation de la surface grâce à l'incorporation de différents matériaux de détection, notamment des nanomatériaux de carbone ou des nanoparticules métalliques. Un large intérêt a été porté à l'utilisation des nanoparticules d'or au cours des cinq dernières années en raison de leur conductivité et de leur grande surface. Cependant, ils ont parfois montré des limites pour la détection du chrome hexavalent en présence de certains ions coexistants tels que le chlorure. Récemment, afin d'améliorer la sensibilité, d'augmenter la gamme de linéarité, de détecter des concentrations extrêmement faibles, un capteur ultrasensible basé sur un dépôt électrolytique de film de bismuth avec un médiateur de zinc déposé réversible a été développé pour la détermination du chrome hexavalent. De la même manière, l'application de la barrière de potentiel pour la surveillance du chrome peut développer davantage la gamme de linéarité et permettre sa détermination au niveau ppt. Le noir de carbone est le nanomatériau le moins cher (1 euro/kg) (Yammouri, G et al. 2017) et se compare avantageusement aux autres nanomatériaux pour différentes applications.

Des avancées significatives pour la mesure électrochimique du chrome ont été signalées à l'aide de capteurs nanocomposites en raison de leurs propriétés fascinantes, notamment l'effet synergique des nanomatériaux utilisés, une surface élevée et un taux de transfert d'électrons rapide. Depuis peu, grâce aux propriétés attractives du capteur photoélectrochimique, on constate un intérêt croissant pour ce type de capteurs pour la mesure du chrome hexavalent avec une sensibilité remarquable, une facilité d'intégration et une grande sélectivité de mesure du chrome en présence de différentes espèces interférentes.

De plus, les biocapteurs électrochimiques sont de plus en plus utilisés pour la détermination du chrome, en mettant l'accent sur le chrome hexavalent en raison de ses effets critiques sur la vie écologique et biologique. Par ailleurs, des études s'intéressant à l'analyse de la spéciation des espèces de chrome ont été rapportées sur la base du pH du milieu, de l'activité de l'élément de reconnaissance biologique (génération d'électricité, inhibition enzymatique, conductivité électrique...) ou par modification chimique ou électrochimique du capteur.

Davantage d'optimisations de la spécificité, de la réutilisabilité, de la sensibilité et de la stabilité sont nécessaires. De plus, les recherches futures doivent élargir le champ d'application en détectant le chrome dans d'autres matrices que les échantillons d'eau. La détection en ligne est fortement demandée à travers le développement de dispositifs miniaturisés de surveillance in situ et en temps réel.

Partie II : Biocapteurs à base de la chimie clic pour des applications cliniques

I.1. Biocapteurs

Un biocapteur peut être défini comme un capteur associant un élément biologique (peptide, anticorps, antigène, enzyme, ADN, ARN...) à un transducteur afin de produire un signal électronique proportionnel au signal d'analyte.

Une définition couramment citée est celle acceptée par l'UICPAC : « Un biocapteur électrochimique est un dispositif intégré autonome, capable de fournir des informations analytiques quantitatives ou semi-quantitatives spécifiques à l'aide d'un élément de reconnaissance biologique (récepteur biochimique) qui est maintenu en contact spatial direct avec un élément de transduction électrochimique » (Thévenot et al. 2001).

Les biocapteurs peuvent être classés selon l'élément de reconnaissance et le transducteur comme le montre la figure 4.

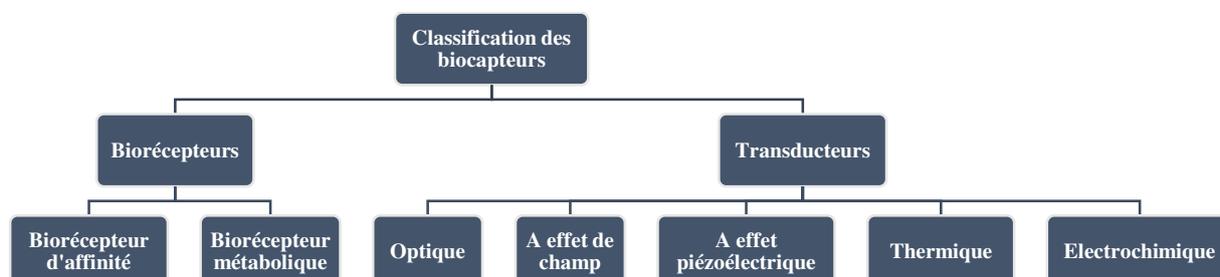


Figure 4. Classification des biocapteurs.

I.1.1. Élément de reconnaissance d'un biocapteur

L'élément de reconnaissance appelé aussi biorécepteur est l'entité biologique immobilisée à la surface du transducteur par physisorption, chimisorption ou par piégeage dans une membrane inerte qui offre une spécificité et une sensibilité élevées à l'analyte, ainsi qu'une réponse rapide facilement exploitable.

Selon leurs activités, les biorécepteurs peuvent être classés en trois classes : biorécepteurs métaboliques qui possèdent une activité catalytiques, récepteurs biomimétriques et les biorécepteurs d'affinité qui réagissent avec l'analyte sans modification.

I.1.1.1. Biorécepteurs métabolique

Les biorécepteurs métaboliques possédant une activité catalytique sont basés sur la capacité des systèmes biologiques à réagir en présence d'une molécule particulière (analyte) et à catalyser la production du produit, qui est détecté directement par le transducteur sélectionné (Muguruma et al. 2017). Ce type de biocapteur permet de suivre la vitesse de formation des produits, la disparition des réactifs et l'inhibition des réactions. Les enzymes, les micro-organismes, les cellules végétales ou animales et les coupes de tissus peuvent être utilisés comme biocatalyseurs.

I.1.1.2. Biorécepteurs d'affinité

Les biorécepteurs d'affinité sont des dispositifs dans lesquels une biomolécule se lie de manière irréversible et sélective à l'analyte cible pour provoquer un changement physicochimique détecté par le transducteur. Ces récepteurs peuvent être des anticorps, des peptides, des acides nucléiques, des aptamères, des hormones ou des récepteurs membranaires (Farzin et al. 2017).

Le processus de reconnaissance biomoléculaire est régi principalement par la forme et la taille de la poche réceptrice et par le ligand d'intérêt (l'analyte). Un tel processus associatif est régi par des considérations thermodynamiques contrairement aux systèmes biocatalytiques qui sont contrôlés par la cinétique). La haute spécificité et affinité des réactions de liaison biochimiques (telles que le complexe antigène-anticorps, l'hybridation de l'ADN) conduisent à des dispositifs de détection hautement sélectifs et sensibles. Ces dispositifs reposent sur la mesure les signaux électrochimiques résultant du processus de liaison (Wang, J. 2006).

Dans les chapitres suivants, nous allons présenter en détail les différents biocapteurs d'affinité développés tout au long de la thèse pour des applications cliniques.

I.1.2. Élément de transduction

Les transducteurs sont des composants de biocapteurs qui détectent les changements physiques qui se produisent dans les éléments de reconnaissance moléculaire à la suite du couplage d'analytes et les convertissent en signaux de sortie exploitables. Les transducteurs peuvent être divisés en différentes catégories : optiques, transistors à effet de champ (FET), piézoélectriques et électrochimiques. Le choix du transducteur est lié aux modifications biochimiques générées par le biorécepteur.

I.1.2.1. Transducteur optique

Ce type des transducteurs reçoit l'information sous forme d'une grandeur physique et par la suite la transforme en information sous forme d'une grandeur optique.

I.1.2.2. Transducteur à effet de champ (FET)

Les dispositifs de biodétection à base de FET comprennent les transistors à effet de champ sensibles aux ions (ISFET), les nanofils de silicium, les FET organiques, les FET au graphène et les FET à semi-conducteur composite (Syu et al. 2018).

Lorsque des molécules chargées (ex. biomolécules) se lient à la grille du FET (généralement un matériau diélectrique), la distribution de charge du matériau semi-conducteur sous-jacent peut changer, modifiant potentiellement la conductance du canal du FET (Lin et al. 2007). Le BioFET se compose de deux compartiments principaux (l'élément de reconnaissance biologique et le transistor à effet de champ) (Lee et al. 2014).

I.1.2.3. Transducteur à effet piézoélectrique

Les capteurs piézoélectriques ou acoustiques sont des dispositifs qui utilisent des cristaux qui subissent une transformation de phase lorsqu'un courant électrique est appliqué. En fait, lorsqu'un courant alternatif est appliqué au cristal, il commence à vibrer à une fréquence caractéristique. Cette fréquence de vibration est fortement affectée par les propriétés physiques et mécanique de surface du cristal.

I.1.2.4. Transducteur thermique

Les capteurs thermiques sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à la réaction enzymatique (Kumaran Ramanathan et al. 2001).

Ce type de transducteur est utilisable pour les réactions exo ou endothermiques, cette chaleur générée par la réaction biochimique est proportionnelle à la concentration en analyte.

I.1.2.5. Transducteur électrochimique

Ce type de transducteur convertit une transformation chimique en un signal électrique mesurable qui est proportionnel à la concentration de l'analyte. Les capteurs électrochimiques peuvent être classés en fonction du mode de transduction et peuvent être divisés en trois catégories : titrage potentiométrique, mesure de la conductivité et ampérométrie ou voltamétrie

- Un capteur potentiométrique est un capteur chimique qui fournit des informations sur la concentration analytique d'analyte. Le signal est mesuré comme une différence de potentiel (tension) entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Le courant traversant l'électrode est proche ou égal à zéro.
- Capteurs conductimétrique : sont des capteurs qui permettent de mesurer la conductivité d'une solution. Ceci est directement lié à la présence d'une charge mobile constituée de tous les ions de la solution.
- Capteurs voltamétrique ou ampérométrique : La voltamétrie est une technique basée sur la détermination de l'intensité du courant en fonction du potentiel appliqué (voltampérométrie linéaire, périodique, à décapage anodique, voltamétrie impulsionnelle différentielle). Tandis que l'ampérométrie est basée sur la mesure du courant traversant une cellule électrochimique à un potentiel appliqué (Saloua HELALI, 2005).

I.2. Chimie clic

I.2.1. Les types de la chimie clic

La modification chimique et électrochimique de surface sont les meilleures stratégies pour assurer la liaison covalente des molécules biologiques. La fixation de ces entités biologiques peut être effectuée par une réaction carbodiimide entre le carboxyl et l'amine, mais cette réaction ne permet pas la bio-orthogonalité (Devaraj, 2018), aussi, les différents groupes fonctionnels d'acides aminés qui possèdent ces molécules biologiques peuvent réagir avec la cible dans différents sites. D'autres réactions de bioconjugation standard comme le succinimidyl ester-amine et le thiol-maleimide sont couramment utilisées malgré leurs problèmes de reproductibilité. Pour cela, le développement de réactions plus spécifiques

pourrait aider à contrôler des sites de liaison spécifiques et la chimie clic a été utilisé pour surmonter ces problèmes.

La chimie des clics a été découverte par Huisgen dans les années 1950. Le terme « chimie des clics » a été inventé par Sharpless pour décrire les réactions qui sont utilisées pour cliquer ou lié deux composés organiques au moyen d'un lien hétéroatomique (C-X-C), ce qui a mené à des réactions synthétiques très efficaces qui tolèrent divers groupes fonctionnels et qui se sont produites dans des conditions synthétiques légères (Kolb et coll., 2001; M. Zhang et all., 2012). Parmi ces réactions de la chimie clic on trouve la cycloaddition d'azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) (X. Zhang et Zhang., 2013). Cette réaction a également fait son chemin vers les sciences biologiques (Zhang. D et all., 2014) puisqu'elle fournit un outil polyvalent pour cliquer sur les biomolécules, y compris les acides aminés, les lipides et les nucléotides avec des molécules de détection, comme les colorants fluorescents et les résidus de biotine (El-Sagheer et Brown, 2012). La présence de cuivre a grandement modifié le mécanisme de réaction, amélioré les rendements, accéléré considérablement la réaction de cycloaddition, et le plus important, il peut être effectué en dessous de la température ambiante (X. Zhang & Zhang, 2013). En raison de la toxicité du Cu(I) sur les systèmes vivants, la réaction de clic sans cuivre était introduite avec le cyclooctyne comme réactif essentiel (SPAAC) (Codelli et coll., 2008). Les quatre types de la chimie clic couramment utilisés sont présentés plus en détail dans les paragraphes suivants.

I.2.1.1. La cycloaddition d'azoture-alcyne de Huisgen

La cycloaddition d'azoture-alcyne de Huisgen appelé aussi cycloaddition d'azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) est une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture ($-N_3$) et alcyne terminale ou interne afin de former un stable 1,2,3-triazole à travers l'activation thermique. Les premières recherches sur cette réaction étaient réalisé par Rolf Huisgen tout en variant le 1,3-dipôles et vérifier son impact sur la synthèse du triazole. Mais cette méthode est limitée par la formation de deux régioisomères : 1,4 et 1,5-dipôles (Rostovtsev et al. 2002; Liang et al. 2011) (figure 5), ce qui révèle sa difficulté de séparation par les techniques séparatives (chromatographie) par conséquent son élimination dans les systèmes biologiques. Ensuite, le Cu(I) a été utilisé par Meldal et ses collaborateurs (Tornøe, C. W., 2002) comme catalyseur à température ambiante afin de former que le régioisomère 1,4 triazole, en son absence, la cycloaddition devient non régiosélective et assez lente. La vitesse de la réaction catalysée est 10^7 fois supérieur à celle non catalysée et elle peut se dérouler à température

ambiante (Cernat et al. 2015). Ce catalyseur peut être ajouté directement à la réaction car il peut être généré in situ.

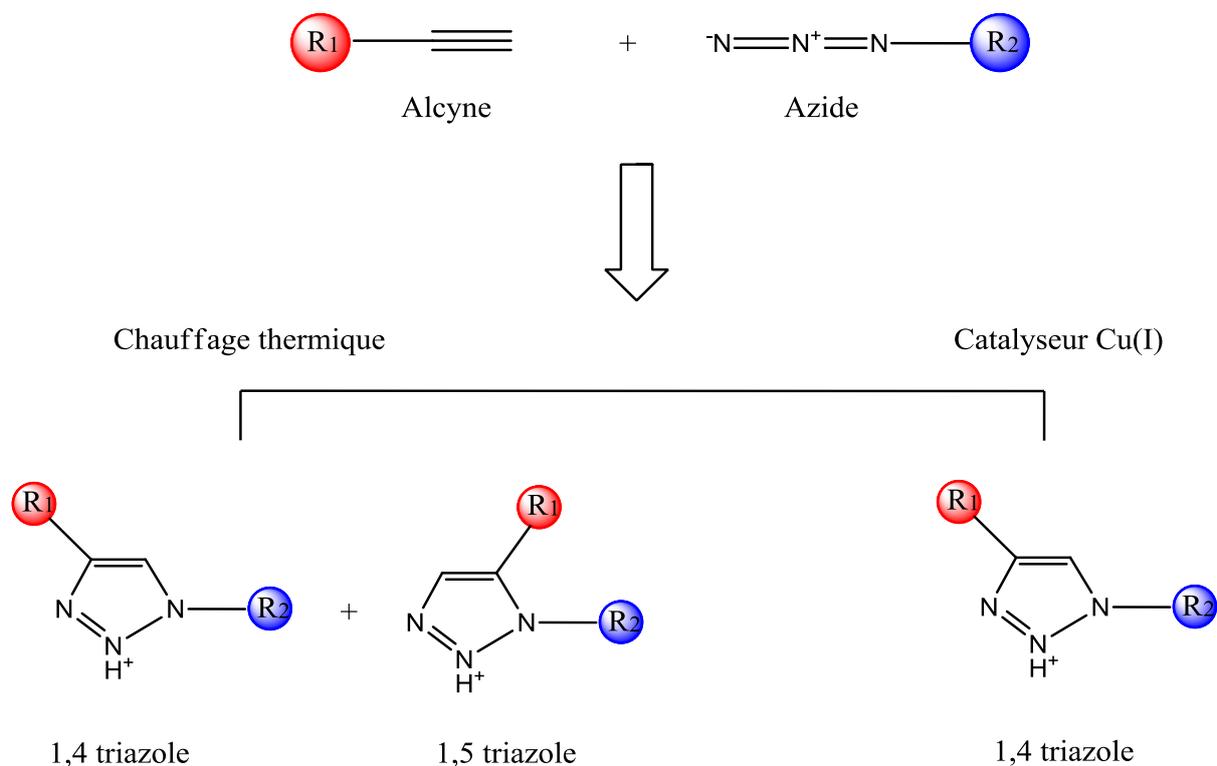


Figure 5. Réactions de cycloadditions entre l’alkyne et l’azoture par voie thermique et catalytique.

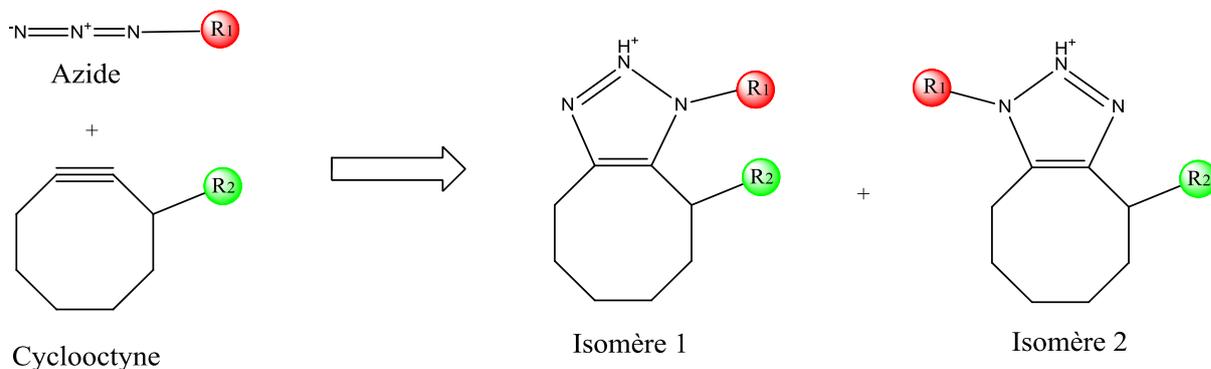
I.2.1.2. Cycloaddition D'alkyne-azide en absence du catalyseur du cuivre (SPAAC)

Les limitations de la CuAAC ont poussé les chercheurs de se tourner vers des catalyseurs biocompatibles ou même des réactions libres de cuivre. Pour cela, la cycloaddition d'alkyne-azide en absence du catalyseur du cuivre qui a été décrite pour la première fois par Wittig en 1961 a montré une efficacité de former un seul produit du triazole après la mise en contact de l'alkyne du petit cycle avec l'azoture de phényle à température ambiante. Par la suite l'équipe de Bertozzi (Jewett et al., 2010) ont l'utilisé pour une réaction de bioconjugaison pour la première fois. Leur application consiste en une ligation in vitro et in vivo de la cyclooctyne OCT fonctionnalisée par une biotine à un azoture fixé sur une surface de glycanes. Contrairement à la réaction de CuAAC en présence de Cu(I), le SPAAC amène à la formation d'un mélange de deux isomères (Figure 6.A) (Jewett et al., 2010).

Les avantages de cette méthodologie en absence du catalyseur du cuivre ont poussé les chercheurs à développer des nouvelles cyclooctynes afin d'améliorer la cinétique de la réaction click (Figure 6.B). Dans ce contexte, Prof Boons et son équipe (Ning et al., 2008) se sont

focalisé sur les dérivés des dibenzocyclooctynes dans le but de l'amélioration de la réactivité des cyclooctynes conduisant à l'augmentation de la constante de la vitesse de réaction.

A



B

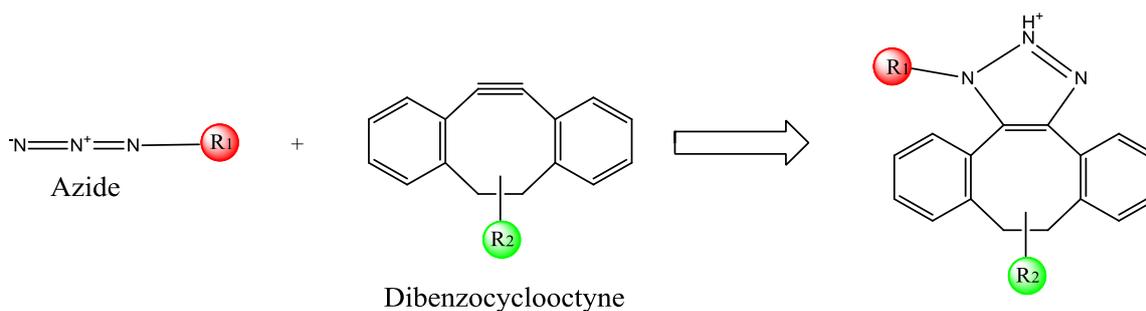


Figure 6. Schéma de la réaction SPAAC A) avec les deux isomères formés et B) entre le dibenzocyclooctyne et l'azide.

I.2.1.3. La chimie du clic thiol-ène (addition thiol-Michael)

La réaction de thiol-ène a été utilisée par plusieurs chercheurs pour l'élaboration des biocapteurs (Feidenhans et al. 2014 ; Banuls et al. 2019). Son principe se base sur l'interaction entre les thiols en tant que nucléophiles avec les acrylates et leurs dérivés (méthacrylates, maléimides, ester de fumarate, acrylonitrile, cinnamate, crotonate) comme des électrophiles.

La réaction de thiol-Michael est catalysée par une base permettant de générer le thiolate (Figure 7). Le thiolate réagit ensuite par addition nucléophile avec un système α,β -insaturé pour former un intermédiaire chargé négativement. Le carbone en α - du groupement électroattracteur de l'anion est aussi une base forte et récupère le proton de la base pour former le produit anti-Markovnikov (Roche. M., 2018).

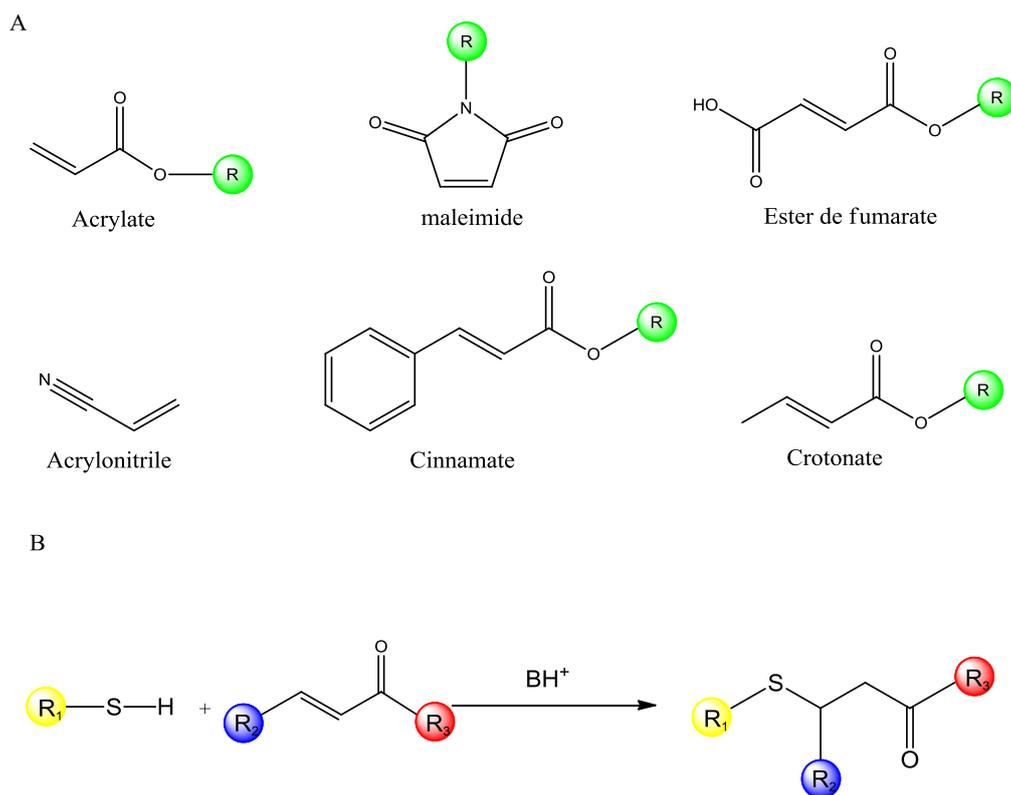


Figure 7. A) différents acrylates et leurs dérivés, et B) La réaction thiol-Michael

1.2.1.4. La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA)

C'est l'une des réactions clic qui se déroule entre un diénophile riche en électron comme le trans-cyclooctène (TCO) ou le norbornène et un diène pauvre en électron qui est le 1,2,4,5-tetrazine (Tz) conduisant à la formation de la pyridazine de façon très rapide et non réversible (figure 8). La réaction se déroule en deux étapes successives, il commence par la réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons suivie par un rétro-Diels-Alder.

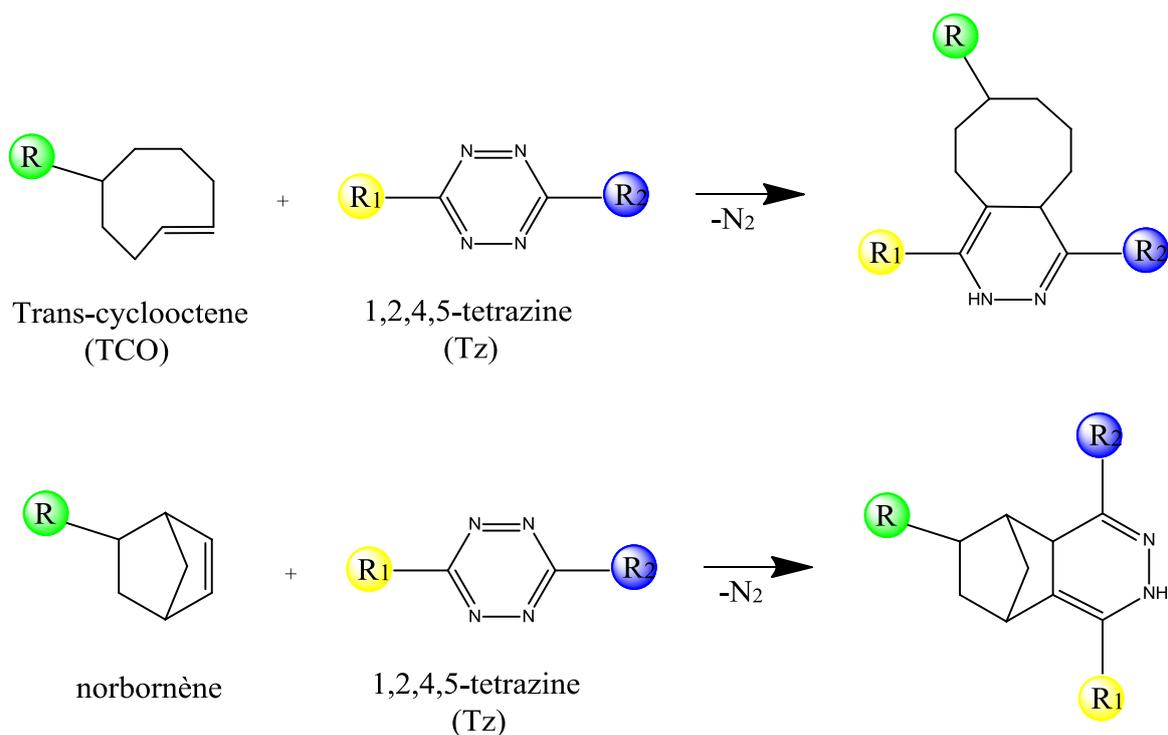


Figure 8. La réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA)

I.2.2. Biocapteurs à base de la chimie clic

La chimie du clic, en tant qu'une méthode de synthèse efficace (Gil et al. 2007 ; Arseneault et al. 2015) a attiré une attention croissante dans la biodétection électrochimique en tant que voie de modification de surface efficace, de bioconjugaison et de transformation ou d'amplification du signal. Dans ce domaine, des conditions de réaction douces, une sélectivité et des rendements élevés sont les avantages les plus importants de la chimie du clic qui permettent de fixer des protéines, des enzymes, des virus, des bactéries et des cellules à différents matériaux (Yáñez-Sedeño et al. 2019).

Les méthodes d'immobilisation des composés ou des marqueurs spécifiques comprennent l'adsorption, l'enrobage et la réticulation covalente (EDC-NHS, glutaraldéhyde...etc). Mais ces méthodes présentent des inconvénients tels qu'une mauvaise sélectivité ou des produits avec différentes orientations d'immobilisation. La simplicité et la sélectivité de la chimie clic pourrait constituer une bonne alternative pour la fabrication de capteurs électrochimiques. Il pourrait lier de manière covalente les molécules cibles aux composés ou marqueurs sensibles, et les capteurs fabriqués pourraient atteindre une meilleure sélectivité, stabilité et surtout la bio-orthogonalité par rapport aux méthodes traditionnelles (Ji et al. 2015).

Pionniers dans ce domaine, Collman et son équipe (Collman et al. 2004, 2006 ; Devaraj et al. 2006; Decréau et al. 2007, 2010) ont rapporté de nombreux exemples pour la première fois en se basant sur la chimie clic pour le développement de capteurs électrochimiques.

Wang et son équipe (Wang et al. 2010) ont proposé une stratégie d'une biofonctionnalisation covalente de la surface d'électrode d'or avec l'hémoglobine (Hb). Des monocouches à terminaison azide ont été auto-assemblées à la surface d'électrode à partir d'une solution de mélange d'azidoundecanethiol et de thiol dilué. Ensuite, l'acide 4-pentynoïque a été immobilisé à la surface via une réaction de clic en présence de Cu(I) pour immobiliser par la suite l'Hb par une réaction de carbodiimide.

La chimie du clic était appliquée pour la conception de biocapteurs enzymatiques afin d'avoir une immobilisation contrôlée de composés catalytiques sur un centre spécifique de la plate-forme de détection. Vu le niveau d'énergie élevé des groupes éthyne et azide, ils sont inertes vis-à-vis des biomolécules et assurent leur immobilisation à des sites spécifiques. Dans ce contexte, Qin Ran et son équipe ont développé une approche simple et polyvalente pour l'immobilisation covalente de la protéine redox sur une électrode d'or à travers l'autoassemblage et la chimie clic. De ce fait, les monocouches de 1, 4-dialcynyl benzène avec une terminaison alcynyle étaient auto-assemblées sur la surface d'électrode pour se lier après à l'azido-peroxydase de raifort par réaction de clic (Ran et al. 2011). Dans une configuration plus récente, un dérivé azoture-PEG3-biotine a été greffé sur une électrode en or modifiée avec un DTPA mixte à terminaison hexynyle (dithiol phosphoramidite) et une monocouche de mercaptopropanol. L'azide-PEG3-biotine a été greffé en présence de Cu(II), qui a été électrochimiquement réduit en Cu(I) à -0,3 V versus Ag/AgCl. La plate-forme préparée a été utilisée pour l'immobilisation de la streptavidine et le couplage de l'albumine sérique humaine biotinylée (HAS) par des interactions d'affinité (Meini et al. 2014).

Les génocapteurs électrochimiques sont parmi les méthodes d'analyse d'ADN les plus populaires grâce à leur grande sensibilité, leur rapidité et de leur rentabilité (Hu et al. 2016). La chimie clic a été largement appliquée pour la fonctionnalisation de surface et l'immobilisation ou la conjugaison des biomolécules comme les oligonucléotides, tirant parti de conditions de réaction douces et d'une excellente chimiosélectivité et orthogonalité pour fournir une grande variété de groupes fonctionnels. De ce fait, Levrie et son équipe (Levrie et al. 2016) ont préparé de plates-formes de détection d'ADN multianalyte à base de la chimie clic. Ils ont combiné l'électro-adressabilité de l'électrogreffage de sels de diazonium avec la chimiosélectivité de la chimie clic pour une fonctionnalisation spécifique de deux différentes sondes d'ADNss côte à

côte sur une seule puce (biocapteurs multicible). Deux sels d'aryldiazonium différents, 4 éthynylaniline et 4-azidoaniline, ont été greffés de manière adjacente sur une puce de réseau d'électrodes pour une spécificité de site supplémentaire, en couplant l'ADNs_b modifié par alcyne et azoture sur les électrodes fonctionnalisées (Levrie et al. 2016). Dans le même contexte, Iwona Grabowska et al ont développé un biocapteur pour une multi-détection des biomarqueurs cardiaques impliquant des électrodes à base d'aptamère. Des électrodes en or sérigraphiées ont été modifiées avec du rGO/polyéthylèneimine, suivi d'un greffage covalent d'acide propargylacétique pour intégrer des groupes propargyles sur l'électrode. Des aptamères à terminaison azide pour le peptide natriurétique cérébral (BNP) et la troponine cardiaque I (cTnI) ont ensuite été immobilisés par CuAAC (Grabowska et al. 2018). De plus, dans le but d'éviter la synthèse de catalyseur Cu(I) par réduction chimique de Cu(II), qui pourrait provoquer le clivage oxydatif de l'ADN par les radicaux hydroxyles hautement réactifs générés, la chimie clic en absence du cuivre comme catalyseur a été utilisée par Meiwen Wang et al. Ils ont développé un biocapteur électrochimique par le biais d'acides nucléiques cliquables en immobilisant le produit de l'assemblage catalytique en épingle à cheveux par SPAAC pour la détection de MXR7 qui est un marqueur précoce du cancer du foie. L'utilisation de la chimie clic a permis d'avoir une réponse rapide et un encombrement stérique inférieur par rapport à la conjugaison traditionnelle biotine-streptavidine ou même assistée par hybridation, ce qui permet une détection sensible avec la méthode du clic (Wang et al. 2019).

L'avantage de coupler spécifiquement et de manière covalente des biomolécules sur des sites précis grâce aux avantages de la chimie clic y compris la rapidité, la sélective et la résistance aux réactions secondaires rendent cette méthodologie attrayante pour le développement des immunocapteurs. Dans ce sens-là, Guerrero et son équipe ont construit des immunocapteurs électrochimiques à base de la chimie clic pour différentes applications (Guerrero, S. et al. 2019 et 2020). Ils ont développé pour la première fois un immunocapteur électrochimique à base de la chimie clic pour la détermination de CXCL7 (chimiokine (motif C-X-C) ligand 7, un biomarqueur auto-immun lié à la polyarthrite rhumatoïde) (figure 9). Après immobilisation des anticorps de capture sur des conjugués d'éthynyl-IgG et azide-MWCNT, l'antigène cible a été immunodosé en sandwich à l'aide d'anticorps détecteurs biotinylés avec un conjugué phosphatase alcaline (AP)-streptavidine (Guerrero, S. et al. 2019).

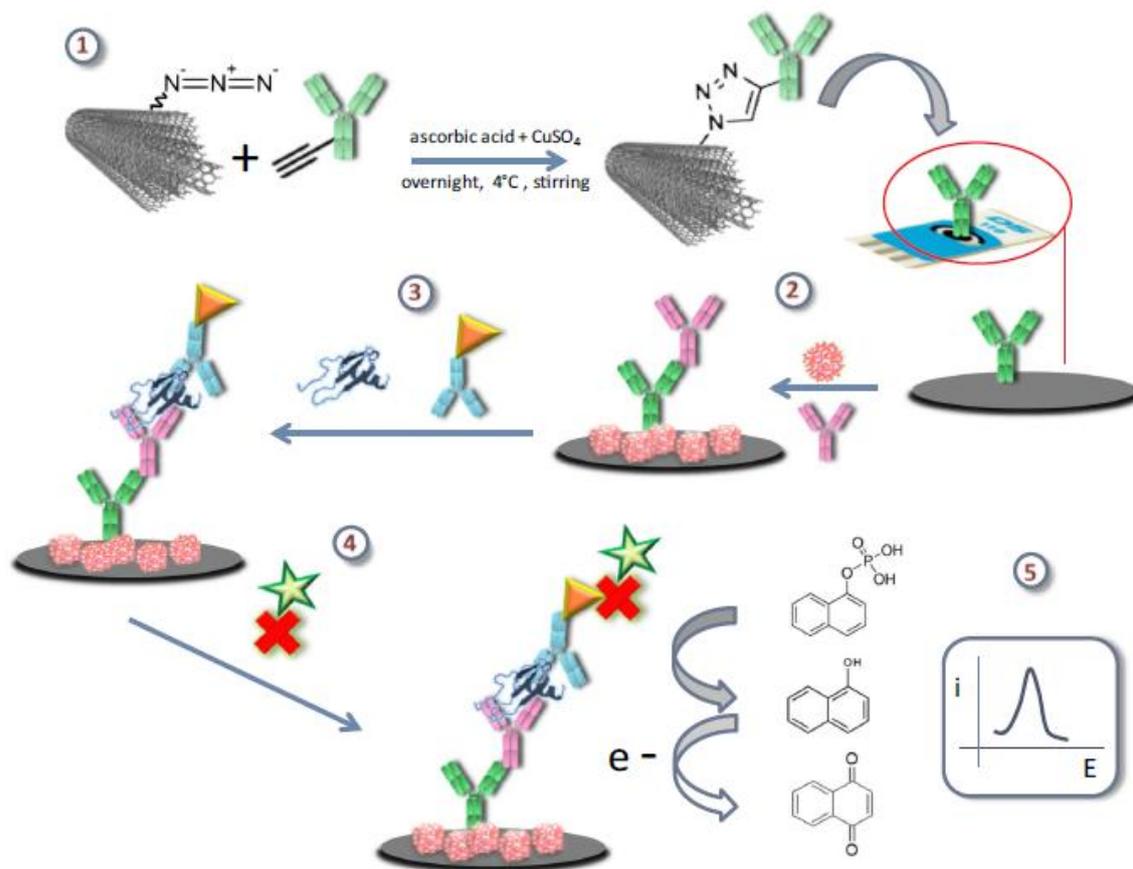


Figure 9. Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans la préparation de l'immunocapteur pour la détermination de CXCL7 : synthèse assistée par chimie click d'IgG-alcyne-azide-MWCNT et modification de SPCE (1) ; étape de blocage à la caséine et immobilisation de l'anti-CXCL7 (2) ; essai sandwich avec CXCL7 et Biotinanti-CXCL7 (3); incubation avec AP-Strept (4); ajout de 1 NPP et suivi voltamétrique DP de l'oxydation du 1-NP (5) (Guerrero, S. et al. 2019).

Récemment, la même équipe a développé un immunocapteur pour la détection de l'IL-1 β dans la salive (Guerrero, S. et al. 2020). La chimie électro-clic de la cycloaddition d'azoture-alcyne en présence d'un catalyseur Cu(I) a été utilisée pour l'immobilisation d'IgG anti-Ab1 éthylnylés sur des MWCNT fonctionnalisés par l'azide. L'immobilisation orientée de l'anticorps de capture (cAb) sur des conjugués IgG-MWCNT a permis la préparation d'un immunocapteur de type sandwich utilisant l'anti-IL-1 β biotinylé marqué à la phosphatase alcaline-streptavidine comme anticorps de détection (dAb) (figure 10). Ce capteur prétendait offrir une gamme de détection plus large ainsi qu'une durée de test plus courte par rapport à ELISA (Guerrero, S. et al. 2020).

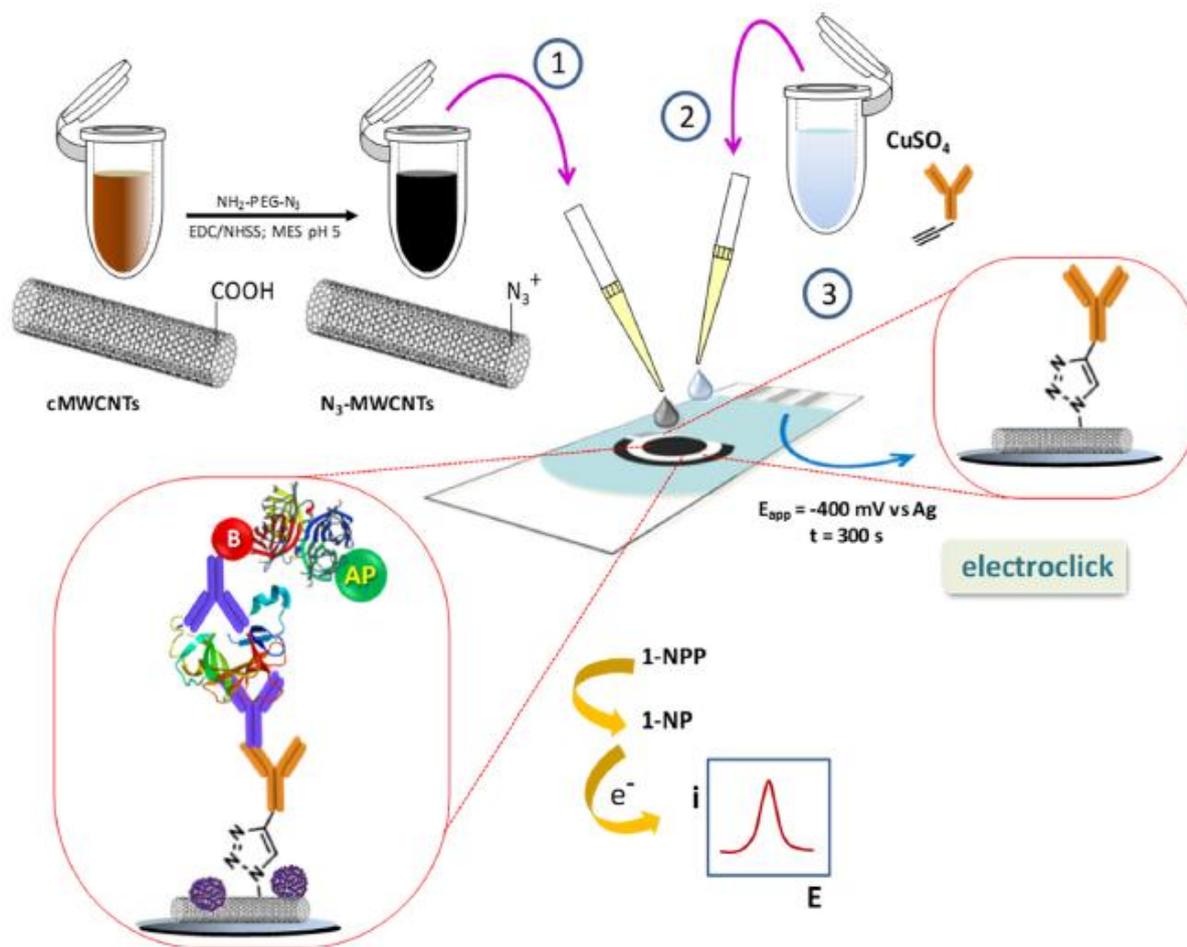


Figure 10. Schéma des différentes étapes impliquées dans la préparation de l'immunocapteur AP-strept-biotine-dAb-IL-1 β -cAb-IgG-MWCNTs/SPCE par chimie électro-clic (Guerrero, S. et al. 2020).

La CuAAC a été beaucoup utilisé pour l'élaboration des immunocapteurs (Ge, S et al. 2013 and 2014; Sánchez-Tirado et al. 2016), tandis que la présence du Cu(I) comme catalyseur présente un problème de cytotoxicité. Cette limitation nous a orienté vers l'utilisation de la chimie clic en absence du cuivre (SPAAC) pour l'élaboration de nos biocapteurs destinés à des applications biomédicales.

Partie III : Méthodes de mesure électrochimique

I.1. Voltamétrie cyclique (CV)

La Voltamétrie cyclique (CV) fait partie des méthodes électrochimiques les plus couramment utilisées afin d'acquérir des informations qualitatives sur les réactions électrochimiques. La CV fournit plusieurs informations sur le système étudié à partir d'une seule expérience. Ces informations ont une relation avec les processus redox, la cinétique des réactions de transfert de charge ou la réversibilité du système électrochimique étudié.

La Voltamétrie cyclique consiste en un balayage linéaire du potentiel de l'électrode du travail (régime de diffusion naturelle (sans agitation)), en utilisant une forme d'onde triangulaire (figure 11). Selon l'information recherchée, le potentiel est balayé de manière cyclique et plusieurs cycles peuvent être réalisés. Pendant ce balayage du potentiel, le potentiostat mesure le courant résultant du potentiel appliqué. Le tracé actuel de potentiel qui en résulte est appelé voltammogramme cyclique qui dépend au temps et d'autres paramètres physiques et chimiques

Le signal retour donne des informations sur la réversibilité du système.

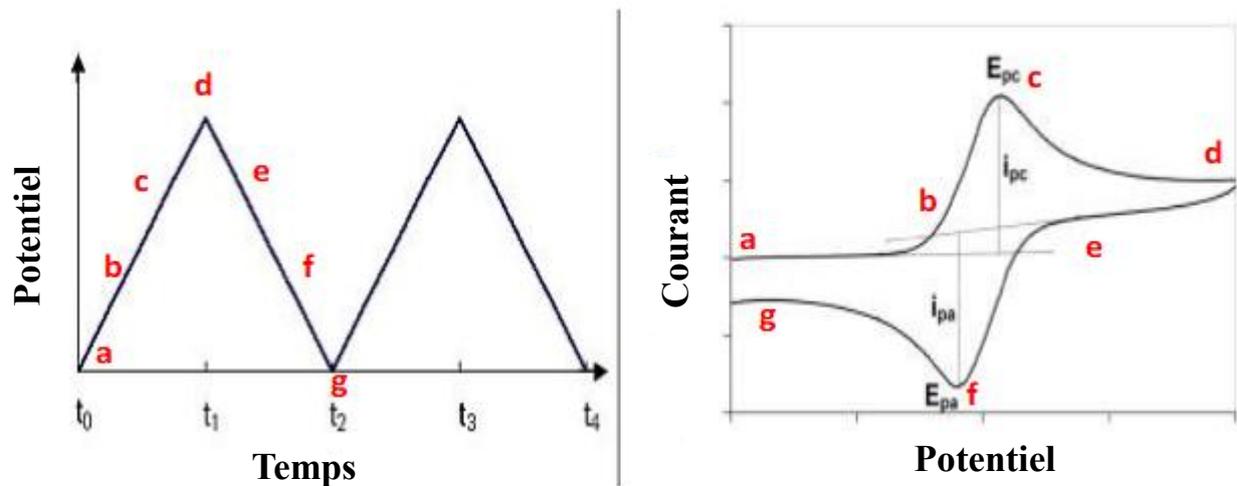


Figure 11. Séquence de balayage de potentiel utilisée en CV (gauche) et exemple de courbe courant potentiel obtenue (droite) (Suparna rudra, 2021).

Les paramètres les plus importants qui peuvent être déterminés à partir d'un voltammogramme cyclique sont les potentiels des pics (E_c : potentiel cathodique et E_a : potentiel anodique) et les intensités des courants des pics (I_c : intensité de courant cathodique et I_a : intensité de courant anodique). La différence ΔE ($E_a - E_c$) permet d'estimer le degré de la réversibilité du système rédox comme elle permet de déterminer le potentiel du couple redox impliqué dans la réaction à travers l'équation (5):

$$E^0 = (E_a + E_c) / 2 \quad (5)$$

Dans le cas d'un processus de transfert d'électrons réversibles, le courant du pic subit l'équation de Randles Sevcik à 25 °C.

$$I_p = 2.69 \times 10^{-5} n_e^{3/2} A D^{1/2} C * v^{1/2} \quad (6)$$

Où **n** est le nombre d'électrons, **A** est la surface de l'électrode (en cm²), **C** la concentration (en mol/cm³), **D** le coefficient de diffusion (en cm²/s), et **v** la vitesse de balayage de potentiel (en V/s). D'après l'équation (6), l'intensité du courant est directement proportionnelle à la concentration et à la racine carrée de la vitesse de balayage. Une telle fonction de la vitesse de balayage est indicative du transport de masse à la surface d'électrode (diffusion ou adsorption).

I.2. Voltamétrie à impulsion différentielle (DPV)

La voltamétrie à impulsions différentielle (en anglais differential pulse voltammetry) repose sur le principe de la superposition des impulsions d'amplitude constante à une tension continue qui varie linéairement avec le temps. Le courant résultant comporte deux composantes ; l'une faradique et l'autre capacitive qui diminue rapidement, ce qui permet d'augmenter le ratio signal / bruit et donc la sensibilité.

Le courant est échantillonné deux fois, juste avant l'application d'impulsions (en 1) et à la fin d'impulsion (après ~ 40 ms, au 2) comme le montre la Figure 12. Le premier courant est instrumentalement soustraite de la seconde, et cette différence de courant [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] est tracé en fonction du potentiel appliqué. Le voltammogramme différentielle impulsion résultant se compose de pointes de courant, dont la hauteur est directement proportionnelle à la concentration des analytes correspondants (Wang, J. 2006).

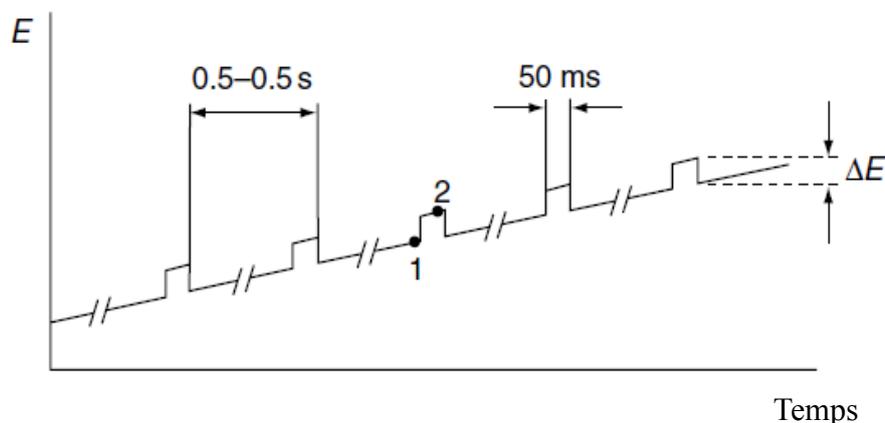


Figure 12. Signal d'excitation pour la voltamétrie à impulsion différentielle (Wang, J. 2006).

I.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

L'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) pendant les dernières années a considérablement augmentée. Initialement, était utilisée pour la détermination de la capacité de la double couche, elle est maintenant appliquée pour la caractérisation des électrodes et les interactions de l'interface. En ce qui concerne la détection électrochimique, la spectroscopie d'impédance permet de surveiller les changements électriques résultant d'événements de bio-reconnaissance à la surface des électrodes modifiées. Comme, des changements dans la conductivité de l'électrode qui peuvent être mesurés à la suite de l'immobilisation des protéines, des peptides, des interactions anticorps-antigènes sur la surface de l'électrode.

Le principe de mesure par impédance électrochimique se base sur l'application d'un potentiel sinusoïdale AC (courant alternatif) avec une faible amplitude entre 5 à 10 mV superposé à un potentiel DC (courant continu) au système électrochimique. Des circuits électriques peuvent être utilisés pour modéliser l'impédance mesurée du système. L'impédance se compose de la résistance de transfert d'électrons entre le composé redox et la surface de l'électrode, la capacité entre l'électrode et les ions chargés dans la solution, la résistance de la solution entre les électrodes et l'impédance due au taux de diffusion du composé redox à l'électrode qui sont tous rassemblés dans le circuit de Randles (Figure 13).

Élément à Phase Constante (CPE) : en électrochimie, les condensateurs sont remplacés par des éléments à phase constante (CPE). Cette composante remplace les capacités afin de prendre en considération la non idéalité du système lié à la rugosité de surface, la porosité, la présence d'impuretés...

Impédance de diffusion Warburg (W) : résultant de la diffusion des ions de la solution vers la surface de l'électrode. L'impédance de diffusion Warburg est faible dans la zone des hautes fréquences car les réactifs diffusants ne se déplacent pas très loin ce qui est le contraire aux basses fréquences.

Résistance de transfert de charge (R_{ct}) : Elle correspond au transfert d'électron à l'interface électrode-électrolyte surtout la résistance au transfert de charge électronique entre les espèces et la surface d'électrode.

Résistance de l'électrolyte (R_s) : c'est la résistance interne de la cellule qui dépend à plusieurs paramètres dont la nature de l'électrolyte, la force ionique, la surface de l'électrode et la température.

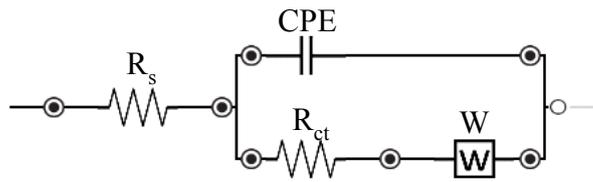


Figure 13. Représentation du circuit électrique équivalent de Randles.

L'impédance est souvent présentée sous format d'un nombre complexe. Le diagramme de Nyquist est l'un des formats les plus utilisés pour évaluer les données d'impédance électrochimique. Dans ce format, la composante d'impédance imaginaire (Z_{Im}) est tracée par rapport à la composante d'impédance réelle (Z_{Re}) à chaque fréquence d'excitation, et il contient des informations liées à l'interface et la réaction de transfert d'électrons (Wang, J. 2006). La figure 14 montre un spectre d'impédance sous la forme d'un tracé de Nyquist.

Le tracé diagramme de Nyquist comprend généralement une zone semi-circulaire située sur l'axe suivie d'une ligne droite. La partie semi-circulaire observée à des fréquences plus élevées correspond à des processus de transfert limité d'électrons, tandis que la ligne droite observée à des basses fréquences représente le processus à diffusion limité. Le tracé de Nyquist permet d'extraire la cinétique de transfert d'électrons et connaître les caractéristiques de diffusion. Pour un transfert d'électrons très rapide, le spectre d'impédance ne présente que la partie linéaire, tandis que dans le cas d'un transfert d'électrons très lent, le spectre présente un demi-cercle dont le diamètre est égal à la résistance de transfert d'électrons (R_{ct}). L'interception du demi-cercle avec l'axe Z_{re} correspond à l'interception de R_s (Karunakaran et al. 2015).

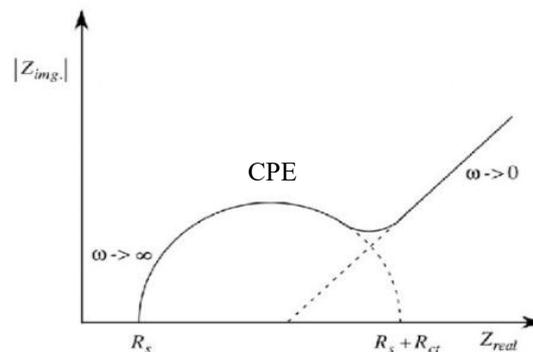


Figure 14. Représentation d'un diagramme typique de Nyquist

Références

- Achelhi, K. (2012). Organo-apatites et nanocomposites zircone-hydroxyapatite pour le piégeage des métaux.
- Achelhi, K. (2013). egeage des métaux Karima ACHELHI Organo-apatites et nanocomposites zircone- hydroxyapatite pour le piégeage des métaux Discipline : Chimie des Matériaux - Matériaux et Environnement.
- Agarwal, S., Zaman, T., Murat Tuzcu, E., & Kapadia, S. R. (2011). Heavy metals and cardiovascular disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2006. *Angiology*, 62(5), 422-429.
- Alissa, E. M., & Ferns, G. A. (2011). Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *Journal of toxicology*, 2011.
- American Public Health Association. American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; American Public Health Association: Michigan, MI, USA, 1915; Volume 2, pp. 420–426.
- Amine, A.; Mohammadi, H. Amperometry. Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng. **2018**.
- Arain, M.B.; Ali, I.; Yilmaz, E.; Soylak, M. Nanomaterial's based chromium speciation in environmental samples: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 103, 44–55.
- Aravind, A.; Mathew, B. Electrochemical sensor based on nanostructured ion imprinted polymer for the sensing and extraction of Cr (III) ions from industrial wastewater. *Polym. Int.* **2018**, 67, 1595–1604.
- Arduini, F.; Di Nardo, F.; Amine, A.; Micheli, L.; Palleschi, G.; Moscone, D. Carbon black-modified screen-printed electrodes as electroanalytical tools. *Electroanalysis* **2012**, 24, 743–751.
- Arseneault, M., Wafer, C., & Morin, J. F. (2015). Recent advances in click chemistry applied to dendrimer synthesis. *Molecules*, 20(5), 9263-9294.
- Bachan Upadhyay, L.S.; Verma, N. Enzyme inhibition based biosensors: A review. *Anal. Lett.* **2013**, 46, 225–241.
- Banuls, M. J., González-Martínez, M. Á., Sabek, J., García-Rupérez, J., & Maquieira, Á. (2019). Thiol-click photochemistry for surface functionalization applied to optical biosensing. *Analytica chimica acta*, 1060, 103-113.
- Bhanjana, G.; Rana, P.; Chaudhary, G.R.; Dilbaghi, N.; Kim, K.H.; Kumar, S. Manganese oxide nanochips as a novel electrocatalyst for direct redox sensing of hexavalent chromium. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1–10.
- Biswas, P.; Karn, A.K.; Balasubramanian, P.; Kale, P.G. Biosensor for detection of dissolved chromium in potable water: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 94, 589–604.
- Blazevic, A.; Rompel, A. The Anderson–Evans polyoxometalate: From inorganic building blocks via hybrid organic–inorganic structures to tomorrows “Bio-POM”. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 307, 42–64.
- Bobrowski, A., Królicka, A., & Zarębski, J. (2009). Characteristics of voltammetric determination and speciation of chromium - A review. *Electroanalysis*, 21(13), 1449–1458.
- Boussema, F.; Gross, A.J.; Hmida, F.; Ayed, B.; Majdoub, H.; Cosnier, S.; Holzinger, M. Dawson-type polyoxometalate nanoclusters confined in a carbon nanotube matrix as efficient redox mediators for enzymatic glucose biofuel cell anodes and glucose biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 109, 20–26.
- Breslin, C.B.; Branagan, D.; Garry, L.M. Electrochemical detection of Cr (VI) with carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. *J. Appl. Electrochem.* **2019**, 49, 195–205.
- Carrington, N.A.; Yong, L.; Xue, Z.L. Electrochemical deposition of sol–gel films for enhanced chromium (VI) determination in aqueous solutions. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 572, 17–24.

- Cernat, A., Tertis, M., Cristea, C., & Sandulescu, R. (2015). Applications of click chemistry in the development of electrochemical sensors. *Int. J. Electrochem. Sci*, *10*, 6324-6337.
- Chen, D.D.; Yi, X.H.; Zhao, C.; Fu, H.; Wang, P.; Wang, C.C. Polyaniline modified MIL-100 (Fe) for enhanced photocatalytic Cr (VI) reduction and tetracycline degradation under white light. *Chemosphere* **2020**, *245*, 125659.
- Chen, L.; Chen, W.L.; Wang, X.L.; Li, Y.G.; Su, Z.M.; Wang, E.B. Polyoxometalates in dye-sensitized solar cells. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 260–284.
- Chen, R.; Tang, R.; Chen, C. Photoelectrochemical detection of chromium (VI) using layered MoS₂ modified BiOI. *J. Chem. Sci.* **2020**, *132*, 1–9.
- Chen, S.; Yuan, R.; Chai, Y.; Hu, F. Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles: A review. *Microchim. Acta* **2013**, *180*, 15–32.
- Chen, Y.; Dong, Y.; Wu, H.; Chen, C.; Chi, Y.; Chen, G. Electrochemiluminescence sensor for hexavalent chromium based on the graphene quantum dots/peroxodisulfate system. *Electrochim. Acta* **2015**, *151*, 552–557.
- Chirea, M.; Pereira, C.M.; Silva, F. Catalytic effect of gold nanoparticles self-assembled in multilayered polyelectrolyte films. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 9255–9266.
- Chowdhury, R., Ramond, A., O’Keeffe, L. M., Shahzad, S., Kunutsor, S. K., Muka, T., ... & Chowdhury, S. (2018). Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *bmj*, *362*, k3310.
- Chromium in Drinking Water. Available online: <https://www.epa.gov/sdwa/chromium-drinking-water#:~:text=EPA%20has%20a%20drinking%20water,to%20test%20for%20total%20chromium> (accessed on 2 September 2020).
- Chung, H.; Ju, W.J.; Jho, E.H.; Nam, K. Applicability of a submersible microbial fuel cell for Cr (VI) detection in water. *Environ. Monit. Assess.* **2016**, *188*, 613.
- Cinti, S.; Arduini, F.; Carbone, M.; Sansone, L.; Cacciotti, I.; Moscone, D.; Palleschi, G. Screen-Printed Electrodes Modified with Carbon Nanomaterials: A Comparison among Carbon Black, Carbon Nanotubes and Graphene. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 2230–2238.
- Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J., & Bertozzi, C. R. (2008). Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(34), 11486–11493.
- Collman, J. P., Devaraj, N. K., & Chidsey, C. E. (2004). “Clicking” functionality onto electrode surfaces. *Langmuir*, *20*(4), 1051-1053.
- Collman, J. P., Devaraj, N. K., Eberspacher, T. P., & Chidsey, C. E. (2006). Mixed azide-terminated monolayers: a platform for modifying electrode surfaces. *Langmuir*, *22*(6), 2457-2464.
- Dashtian, K.; Ghaedi, M.; Hajati, S. Photo-Sensitive Pb5S2I6 crystal incorporated polydopamine biointerface coated on nanoporous TiO₂ as an efficient signal-on photoelectrochemical bioassay for ultrasensitive detection of Cr (VI) ions. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *132*, 105–114.
- Derache, R. Toxicologie et sécurité des aliments. Paris: Tech Doc-Lavoisier, 159-78. (1989).
- Decréau, R. A., Collman, J. P., & Hosseini, A. (2010). Electrochemical applications. How click chemistry brought biomimetic models to the next level: electrocatalysis under controlled rate of electron transfer. *Chemical Society Reviews*, *39*(4), 1291-1301.
- Decréau, R. A., Collman, J. P., Yang, Y., Yan, Y., & Devaraj, N. K. (2007). Syntheses of hemoprotein models that can be covalently attached onto electrode surfaces by click chemistry. *The Journal of organic chemistry*, *72*(8), 2794-2802.
- Devaraj, N. K. (2018). The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Central Science*, *4*(8), 952–959.

- Devaraj, N. K., Dinolfo, P. H., Chidsey, C. E., & Collman, J. P. (2006). Selective functionalization of independently addressed microelectrodes by electrochemical activation and deactivation of a coupling catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(6), 1794-1795.
- Dong, Y.; Dong, Z.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Cheng, W.; Miao, H.; Xu, Y. POM constructed from super-sodalite cage with extra-large 24-membered channels: Effective sorbent for uranium adsorption. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 22088–22092.
- Du, N.; Gong, L.; Fan, L.; Yu, K.; Luo, H.; Pang, S.; Zhou, B. Nanocomposites containing keggin anions anchored on pyrazine-based frameworks for use as supercapacitors and photocatalysts. *ACS Appl. NanoMater.* **2019**, *2*, 3039–3049.
- Du Nguyen, H.; Nguyen, T.T.L.; Nguyen, K.M.; Tran, T.A.T.; Nguyen, A.M.; Nguyen, Q.H. Determination of ppt level chromium (VI) using the gold nano-flakes electrodeposited on platinum rotating disk electrode and modified with 4-thiopyridinium. *Am. J. Anal. Chem.* **2015**, *6*, 457.
- Dutta, S.; Strack, G.; Kurup, P. Gold nanostar-based voltammetric sensor for chromium (VI). *Microchim. Acta* **2019**, 186, 734.
- El Rhazi, M.; Majid, S.; Elbasri, M.; Salih, F.E.; Oularbi, L.; Lafdi, K. Recent progress in nanocomposites based on conducting polymer: Application as electrochemical sensors. *Int. Nano Lett.* **2018**, *8*, 79–99.
- El-Sagheer, A. H., & Brown, T. (2012). Click nucleic acid ligation: Applications in biology and nanotechnology. *Accounts of Chemical Research*, *45*(8), 1258–1267.
- Ensafi, A.A.; Amini, M.; Rezaei, B. Detection of DNA damage induced by chromium/glutathione/H₂O₂ system at MWCNTs–poly (diallyldimethylammonium chloride) modified pencil graphite electrode using methylene blue as an electroactive probe. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *177*, 862–870.
- Eom, H.; Hwang, J.H.; Hassan, S.H.; Joo, J.H.; Hur, J.H.; Chon, K.; Oh, S.E. Rapid detection of heavy metal-induced toxicity in water using a fed-batch sulfur-oxidizing bacteria (SOB) bioreactor. *J. Microbiol. Methods* **2019**, *161*, 35–42.
- Fang, T.; Yang, X.; Zhang, L.; Gong, J. Ultrasensitive photoelectrochemical determination of chromium (VI) in water samples by ion-imprinted/formate anion-incorporated graphitic carbon nitride nanostructured hybrid. *J. Hazard. Mater.* **2016**, *312*, 106–113.
- Farzin, L., and Shamsipur, M. (2017). Recent advances in design of electrochemical affinity biosensors for low level detection of cancer protein biomarkers using nanomaterial-assisted signal enhancement strategies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*
- Feidenhans'l, N. A., Lafleur, J. P., Jensen, T. G., & Kutter, J. P. (2014). Surface functionalized thiol-ene waveguides for fluorescence biosensing in microfluidic devices. *Electrophoresis*, *35*(2-3), 282-288.
- Ferreira, T.A.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A.; Castrillejo, Y.; Barrado, E. Flow based determination of Cr(VI) by adsorptive cathodic stripping voltammetry on an immobilized magnetic poly (ionic liquid) modified electrode. *Talanta* **2018**, *183*, 172–176.
- Ferrigno, R.; Stroock, A.D.; Clark, T.D.; Mayer, M.; Whitesides, G.M. Membraneless vanadium redox fuel cell using laminar flow. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12930–12931.
- Fourou, H.; Zazoua, A.; Braiek, M.; Ja_rezic-Renault, N. An enzyme biosensor based on beta-galactosidase inhibition for electrochemical detection of cadmium (II) and chromium (VI). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2016**, *96*, 872–885.
- Fu, L.; Liu, Z.; Ge, J.; Guo, M.; Zhang, H.; Chen, F.; Yu, A. (001) plan manipulation of Fe₂O₃ nanostructures for enhanced electrochemical Cr (VI) sensing. *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *841*, 142–147.

- Galvez-Cloutier, R., & Lefrançois, P. J. (2005). Les sols contaminés par des métaux lourds: Distribution géochimique et techniques de restauration (Première partie). *Vecteur environnement*, 38(3), 30-38.
- Ge, S., Liu, W., Ge, L., Yan, M., Yan, J., Huang, J., & Yu, J. (2013). In situ assembly of porous Au-paper electrode and functionalization of magnetic silica nanoparticles with HRP via click chemistry for Microcystin-LR immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 111-117.
- Ge, S., Sun, M., Liu, W., Li, S., Wang, X., Chu, C., Yan, M., & Yu, J. (2014). Disposable electrochemical immunosensor based on peroxidase-like magnetic silica-graphene oxide composites for detection of cancer antigen 153. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 192, 317-326.
- Ghanam, A.; Lahcen, A.A.; Amine, A. Electroanalytical determination of Bisphenol A: Investigation of electrode surface fouling using various carbon materials. *J. Electroanal. Chem.* **2017**, 789, 58-66.
- Gheid, A., Dekhil, S., & Soltane, M. (2008). Mémoire de Magister Faculté des sciences et sciences de l'ingénierat Département des sciences fondamentales Spécialité : chimie Option : Pollution chimique et environnement Par BOULKRAH Hafida.
- Gil, M. V., Arévalo, M. J., & Lopez, O. (2007). Click chemistry-what's in a name? Triazole synthesis and beyond. *Synthesis*, 2007(11), 1589-1620.
- Grabowska, I., Sharma, N., Vasilescu, A., Iancu, M., Badea, G., Boukherroub, R., Ogale, S., & Szunerits, S. (2018). Electrochemical aptamer-based biosensors for the detection of cardiac biomarkers. *ACS omega*, 3(9), 12010-12018.
- Guerrero, S., Cadano, D., Agüí, L., Barderas, R., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2019). Click chemistry-assisted antibodies immobilization for immunosensing of CXCL7 chemokine in serum. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 837, 246-253.
- Han, H.; Pan, D.; Liu, D.; Hu, X.; Lin, M.; Li, F. Cathodic stripping voltammetric determination of chromium in coastal waters on cubic nano-titanium carbide loaded gold nanoparticles modified electrode. *Front. Mar. Sci.* **2015**, 2, 75.
- He, Y.; Zhao, M.; Yu, M.; Zhuang, Y.; Cheng, F.; Chen, S. Interfacial potential barrier driven electrochemical detection of Cr⁶⁺. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 1029, 8-14.
- Heidari, Z.; Masrournia, M. A novel modified carbon paste electrode for the determination of chromium (III) in water. *J. Anal. Chem.* **2018**, 73, 824-831.
- Heidari, Z.; Masrournia, M.; Khoshnood, R.S. Fabrication a composite electrode based on MWCNT/Zeolite for potentiometric determination of Cr³⁺. *Orient. J. Chem.* **2016**, 32, 627-635.
- Hilali, N.; Ghanam, A.; Mohammadi, H.; Amine, A.; García-Guzmán, J.J.; Cubillana-Aguilera, L.; Palacios-Santander, J.M. Comparison between modified and unmodified carbon paste electrodes for hexavalent chromium determination. *Electroanalysis* **2018**, 30, 2750-2759.
- Hu, J.; Liu, Y.; Gao, G.; Zou, X. One-step synthesis of AuPdNPs/ERGO nanocomposite for enhanced electrochemical sensing of Cr (VI) in water. *J. Electrochem. Soc.* **2018**, 165, B893.
- Hu, Q., Kong, J., Li, Y., & Zhang, X. (2016). A signal-on electrochemical DNA biosensor based on potential-assisted Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition mediated labeling of hairpin-like oligonucleotide with electroactive probe. *Talanta*, 147, 516-522.
- Hussein, M.A.; Ganash, A.A.; Alqarni, S.A. Electrochemical sensor-based gold nanoparticle/poly (aniline-co-o-toluidine)/graphene oxide nanocomposite modified electrode for hexavalent chromium detection: A real test sample. *Polym. Plast. Technol. Mater.* **2019**, 58, 1423-1436.
- Hussain, M.M.; Asiri, A.M.; Arshad, M.N.; Rahman, M.M. Synthesis, characterization, and crystal structure of (E)-N0-(4-Bromobenzylidene)-benzenesulfonohydrazide and its

- application as a sensor of chromium ion detection from environmental samples. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1207, 127810.
- Izadyar, A.; Al-Amoody, F.; Arachchige, D.R. Ion transfer stripping voltammetry to detect nanomolar concentrations of Cr (VI) in drinking water. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 782, 43–49.
- Jaihindh, D.P.; Thirumalraj, B.; Chen, S.M.; Balasubramanian, P.; Fu, Y.P. Facile synthesis of hierarchically nanostructured bismuth vanadate: An efficient photocatalyst for degradation and detection of hexavalent chromium. *J. Hazard. Mater.* **2019**, 367, 647–657.
- Jarczewska, M.; Ziółkowski, R.; Górski, Ł.; Malinowska, E. Electrochemical Detection of Chromium (VI): Induced DNA Damage. *J. Electrochem. Soc.* **2015**, 162, B326–B331.
- Jewett, J. C., & Bertozzi, C. R. (2010). Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chemical Society Reviews*, 39(4), 1272-1279.
- Ji, N. I. E., Jian-Ping, L. I., Huan, D. E. N. G., & Hong-Cheng, P. A. N. (2015). Progress on click chemistry and its application in chemical sensors. *Chinese Journal of analytical chemistry*, 43(4), 609-617.
- Jin, W.; Yan, K. Recent advances in electrochemical detection of toxic Cr(VI). *RSC Adv.* **2015**, 5, 37440–37450.
- Kaleli-Can, G.; Ozlu, B.; Özgüzar, H.F.; Onal-Ulusoy, B.; Kabay, G.; Eom, T.; Mutlu, M. Natural melanin nanoparticle-decorated screen-printed carbon electrode: Performance test for amperometric determination of hexavalent chromium as model trace. *Electroanalysis* **2020**.
- Karthika, A.; Nikhil, S.; Suganthi, A.; Rajarajan, M. A facile sonochemical approach based on graphene carbon nitride doped silver molybdate immobilized nafion for selective and sensitive electrochemical detection of chromium (VI) in real sample. *Adv. Powder Technol.* **2020**.
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to biosensors. In *Biosensors and bioelectronics* (pp. 1-68). Elsevier.
- Khan, A.; Khan, A.A.P.; Rahman, M.M.; Asiri, A.M.; Alamry, K.A. Preparation of polyaniline grafted graphene oxide–WO₃ nanocomposite and its application as a chromium (iii) chemi-sensor. *RSC Adv.* **2015**, 5, 105169–105178.
- Kochana, J.; Starzec, K.; Wieczorek, M.; Knihnicki, P.; Góra, M.; Rokicińska, A.; Kuśtrowski, P. Study on self-assembled monolayer of functionalized thiol on gold electrode forming capacitive sensor for chromium (VI) determination. *J. Solid State Electrochem.* **2019**, 23, 1463–1472.
- Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition*, 40(11), 2004–2021.
- Korshoj, L.E.; Zaitouna, A.J.; Lai, R.Y. Methylene blue-mediated electrocatalytic detection of hexavalent chromium. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 2560–2564.
- Kowsalya, B.; Thampi, V.A.; Sivakumar, V.; Subramanian, B. Electrochemical detection of Chromium (VI) using NiO nanoparticles. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2019**, 30, 14755–14761.
- Krim, M. (2014). *L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba).
- Kumaran Ramanathan, Bengt Danielsson, Review. Principles and applications of thermal biosensors, *Biosens. Bioelectron.* **16** (2001)417-423
- Leimbach, M.; Tscharr, C.; Schmidt, U.; Bund, A. Electrochemical characterization of chromium deposition from trivalent solutions for decorative applications byEQCMand near-surfacepHmeasurements. *Electrochim. Acta* **2018**, 270, 104–109.

- Lee, J., Dak, P., Lee, Y., Park, H., Choi, W., Alam, M. A., & Kim, S. (2014). Two-dimensional layered MoS₂ biosensors enable highly sensitive detection of biomolecules. *Scientific reports*, 4(1), 1-7.
- Levrie, K., Jans, K., Vos, R., Ardakanian, N., Verellen, N., Van Hoof, C., agae, L., & Stakenborg, T. (2016). Multiplexed site-specific electrode functionalization for multitarget biosensors. *Bioelectrochemistry*, 112, 61-66.
- Li, L.; Chen, X.; Wu, Y.; Wang, D.; Peng, Q.; Zhou, G.; Li, Y. Pd-Cu₂O and Ag-Cu₂O Hybrid Concave Nanomaterials for an E_{lective} Synergistic Catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11049–11053.
- Li, M.; He, R.; Wang, S.; Feng, C.; Wu, H.; Mei, H. Visible light driven photoelectrochemical sensor for chromium (VI) by using BiOI microspheres decorated with metallic bismuth. *Microchim. Acta* **2019**, 186, 345.
- Li, M.; Zhang, G.; Feng, C.; Wu, H.; Mei, H. Highly sensitive detection of chromium (VI) by photoelectrochemical sensor under visible light based on Bi SPR-promoted BiPO₄/BiOI heterojunction. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, 305, 127449.
- Li, Z.; Venkataraman, A.; Rosenbaum, M.A.; Angenent, L.T. A Laminar-Flow Microfluidic Device for Quantitative Analysis of Microbial Electrochemical Activity. *ChemSusChem* **2012**, 5, 1119–1123.
- Liang, L., & Astruc, D. (2011). The copper (I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC)“click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(23-24), 2933-2945.
- Liliane, J. (2007). Mobilisation du chrome et du nickel à partir de sols contaminés, en présence de complexants : Transfert et accumulation de ces métaux chez *Datura innoxia*, 240.
- Lin, M. C., Chu, C. J., Tsai, L. C., Lin, H. Y., Wu, C. S., Wu, Y. P., Wu, Y. N., Shieh, D. B., Su, Y. W., & Chen, C. D. (2007). Control and detection of organosilane polarization on nanowire field-effect transistors. *Nano Letters*, 7(12), 3656-3661.
- Liu, C.; He, C.; Xie, T.; Yang, J. Reduction of graphite oxide using ammonia solution and detection Cr(VI) with graphene-modified electrode. *Full-Nanotub. Carbon Nanostruct.* **2015**, 23, 125–130.
- Liu, D.; Ji, L.; Ding, Y.; Weng, X.; Yang, F.; Zhang, X. Mesoporous carbon black as a metal-free electrocatalyst for highly effective determination of chromium (VI). *J. Electroanal. Chem.* **2017**, 803, 58–64.
- Liu, J.; Ding, Y.; Ji, L.; Zhang, X.; Yang, F.; Wang, J.; Kang, W. Highly sensitive detection of Cr (VI) in groundwater by bimetallic NiFe nanoparticles. *Anal. Methods* **2017**, 9, 1031–1037.
- Liu, L.; Chen, C.; Chen, C.; Kang, X.; Zhang, H.; Tao, Y.; Yao, S. Poly (noradrenalin) based bi-enzyme biosensor for ultrasensitive multi-analyte determination. *Talanta* **2019**, 194, 343–349.
- Liu, Y.; Gao, G.; Hu, J.; Zou, X. Electrodeposited AuNPs/rGO nanocomposite as sensor for Cr (VI) determination in water. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, 13, 11853–11866.
- Liu, Y.; Ma, H.; Zhang, Y.; Pang, X.; Fan, D.; Wu, D.; Wei, Q. Visible light photoelectrochemical aptasensor for adenosine detection based on CdS/PPy/g-C₃N₄ nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 86, 439–445.
- Llobet, E. Gas sensors using carbon nanomaterials: A review. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, 179, 32–45.
- Low, J.; Jiang, C.; Cheng, B.; Wageh, S.; Al-Ghamdi, A.A.; Yu, J. A review of direct Z-scheme photocatalysts. *Small Methods* **2017**, 1, 1700080.

- Loyaux-Lawniczak, S. (1999). Mécanismes d'Immobilisation du Chrome dans les Sols : Diagnostic de la Depollution d'une Friche Industrielle et Réactivité des Ions Chromates vis à vis du Fer Divalent.
- Ma, H.; Li, X.; Yan, T.; Li, Y.; Liu, H.; Zhang, Y.; Wei, Q. Electrogenerated Chemiluminescence Behavior of Au nanoparticles-hybridized Pb(II) metal-organic framework and its application in selective sensing hexavalent chromium. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 22059.
- Maduraiveeran, G.; Jin, W. Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2017**, 13, 10–23.
- Maduraiveeran, G.; Sasidharan, M.; Ganesan, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 103, 113–129.
- Meini, N., Ripert, M., Chaix, C., Farre, C., De Crozals, G., Kherrat, R., & Jaffrezic-Renault, N. (2014). Label-free electrochemical monitoring of protein addressing through electroactivated “click” chemistry on gold electrodes. *Materials Science and Engineering: C*, 38, 286–291.
- Miquel, G. (2001). Rapport sur les effets des métaux sur lourds sur l'environnement et la santé, 265.
- Moakhar, R.S.; Goh, G.K.L.; Dolati, A.; Ghorbani, M. A novel screen-printed TiO₂ photoelectrochemical sensor for direct determination and reduction of hexavalent chromium. *Electrochem. Commun.* **2015**, 61, 110–113.
- Moakhar, R.S.; Goh, G.K.L.; Dolati, A.; Ghorbani, M. Sunlight-driven photoelectrochemical sensor for direct determination of hexavalent chromium based on Au decorated rutile TiO₂ nanorods. *Appl. Catal. B Environ.* **2017**, 201, 411–418.
- Moakhar, R.S.; Hariri, M.B.; Kushwaha, A.; Dolati, A.; Ghorbani, M.; Goh, G.K.L. Au-Pd bimetallic nanoparticle electrodes for direct electroreduction of hexavalent chromium complexes. *Aust. J. Chem.* **2016**, 69, 423–430.
- Mohan, D.; Pittman, C.U., Jr. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *J. Hazard. Mater.* **2006**, 137, 762–811.
- Muguruma, H. (2017). Biosensors: Enzyme Immobilization Chemistry. In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, (Elsevier), p.
- Nellaiappan, S.; Kumar, A.S. A bipotentiostat based separation-free method for simultaneous flow injection analysis of chromium (III) and (VI) species. *Electrochim. Acta.* **2018**, 273, 248–256.
- Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A., & Boons, G. J. (2008). Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angewandte Chemie*, 120(12), 2285–2287.
- Oularbi, L. Etude de Nanocomposites Polypyrrole/Nanoparticule de Carbone par Impédance Électrochimique et Ac-Électrogravimétrie: Application aux Capteurs Électrochimiques. Ph.D. Thesis, Sorbonne and Hassan II Casablanca Universities, Casablanca, Morocco, 29 June 2018.
- Piacenti da Silva, M.; Fernandes, J.C.; de Figueiredo, N.B.; Congiu, M.; Mulato, M.; de Oliveira Graeff, C.F. Melanin as an active layer in biosensors. *Aip Adv.* **2014**, 4, 037120.
- Prabhakaran, D.C.; Ramamurthy, P.C.; Sivry, Y.; Subramanian, S. Electrochemical detection of Cr (VI) and Cr (III) ions present in aqueous solutions using bio-modified carbon paste electrode: A voltammetric study. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2020**.
- Prabhakaran, D.C.; Riotte, J.; Sivry, Y.; Subramanian, S. Electroanalytical detection of Cr(VI) and Cr(III) ions using a novel microbial sensor. *Electroanalysis* **2017**, 29, 1222–1231.

- Prati, L.; Villa, A.; Porta, F.; Wang, D.; Su, D. Single-phase gold/palladium catalyst: The nature of synergistic effect. *Catal. Today* **2007**, *122*, 386–390.
- Punrat, E.; Maksuk, C.; Chuanuwatanakul, S.; Wonsawat, W.; Chailapakul, O. Polyaniline/graphene quantum dot-modified screen-printed carbon electrode for the rapid determination of Cr (VI) using stopped-flow analysis coupled with voltammetric technique. *Talanta* **2016**, *150*, 198–205.
- Qambrani, N.A.; Hwang, J.H.; Oh, S.E. Comparison of chromium III and VI toxicities in water using sulfur-oxidizing bacterial bioassays. *Chemosphere* **2016**, *160*, 342–348.
- Ran, Q., Peng, R., Liang, C., Ye, S., Xian, Y., Zhang, W., & Jin, L. (2011). Covalent immobilization of horseradish peroxidase via click chemistry and its direct electrochemistry. *Talanta*, *83*(5), 1381-1385.
- Ravishankar, T.N.; Muralikrishna, S.; Nagaraju, G.; Ramakrishnappa, T. Electrochemical detection and photochemical detoxification of hexavalent chromium (Cr(vi)) by Ag doped TiO₂ nanoparticles. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 3493–3499.
- Ravishankar, T.N.; Vaz, M.D.O.; Ramakrishnappa, T.; Teixeira, S.R.; Dupont, J. Ionic liquid assisted hydrothermal syntheses of Au doped TiO₂ NPs for efficient visible-light photocatalytic hydrogen production from water, electrochemical detection and photochemical detoxification of hexavalent chromium (Cr⁶⁺). *RSC Adv.* **2017**, *7*, 43233–43244.
- Roche, M. (2018). Stratégies innovantes pour le radiomarquage de macro-biomolécules au fluor-18 pour des applications en imagerie moléculaire in vivo (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay)
- Roony, CP, McLaren, RG and Cresswel, RJ. (1999). Distribution and phytoavailability of lead in soil contaminated with lead shot. *Water Air and Soil.* *116* : 535-48.
- Rosolina, S.M.; Bragg, S.A.; Ouyang, R.; Chambers, J.Q.; Xue, Z.L. Highly sensitive detection of hexavalent chromium utilizing a sol-gel/carbon nanotube modified electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *781*, 120–125.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie*, *114*(14), 2708-2711.
- Salimi, A.; Pourbahram, B.; Mansouri-Majid, S.; Hallaj, R. Manganese oxide nanoflakes/multi-walled carbon nanotubes/chitosan nanocomposite modified glassy carbon electrode as a novel electrochemical sensor for chromium (III) detection. *Electrochim. Acta* **2015**, *156*, 207–215.
- Saloua HELALI, (2005), thèse co-tutelle ; l'école Centrale de Lyon, conception et réalisation de matériaux bifonctionnels pour des dispositifs capteurs impedimétriques.
- Sánchez-Tirado, E., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2016). Carbon nanotubes functionalized by click chemistry as scaffolds for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of TGF-beta 1 cytokine. *Analyst*, *141*(20), 5730-5737.
- Sankararamakrishnan, N.; Jaiswal, M.; Verma, N. Composite nanofloral clusters of carbon nanotubes and activated alumina: An efficient sorbent for heavy metal removal. *Chem. Eng. J.* **2014**, *235*, 1–9.
- Sari, T.K.; Jin, J.; Zein, R.; Munaf, E. Anodic Stripping Voltammetry for the Determination of Trace Cr(VI) with Graphite/Styrene-Acrylonitrile Copolymer Composite Electrodes. *Anal. Sci.* **2017**, *33*, 801–806.
- Sari, T.K.; Takahashi, F.; Jin, J.; Zein, R.; Munaf, E. Electrochemical determination of chromium (VI) in river water with gold nanoparticles–graphene nanocomposites modified electrodes. *Anal. Sci.* **2018**, *34*, 155–160.

- Shahbakhsh, M.; Noroozifar, M. Ultra-trace determination of hexavalent chromium by novel two dimensional biphenol-biphenanthroquinone nanoribbons/silver nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, 281, 1023–1033.
- Shoaie, N.; Daneshpour, M.; Azimzadeh, M.; Mahshid, S.; Khoshfetrat, S.M.; Jahanpeyma, F.; Foruzandeh, M. Electrochemical sensors and biosensors based on the use of polyaniline and its nanocomposites: A review on recent advances. *Microchim. Acta* **2019**, 186, 465.
- Shrivastava, S.; Jadon, N.; Jain, R. Next-generation polymer nanocomposite-based electrochemical sensors and biosensors: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 82, 55–67.
- Solenkova, N. V., Newman, J. D., Berger, J. S., Thurston, G., Hochman, J. S., & Lamas, G. A. (2014). Metal pollutants and cardiovascular disease: mechanisms and consequences of exposure. *American heart journal*, 168(6), 812-822.
- Stojanović, Z.; Koudelkova, Z.; Sedlackova, E.; Hynek, D.; Richtera, L.; Adam, V. Determination of chromium (VI) by anodic stripping voltammetry using a silver-plated glassy carbon electrode. *Anal. Methods* **2018**, 10, 2917–2923.
- suparna rudra linear sweep voltammetry (LSV) and cyclic voltammetry (CV). 2021. Chemistry tutorials
- Syu, Y. C., Hsu, W. E., & Lin, C. T. (2018). Field-effect transistor biosensing: Devices and clinical applications. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 7(7), Q3196.
- Tan, F.; Cong, L.; Jiang, X.; Wang, Y.; Quan, X.; Chen, J.; Mulchandani, A. Highly sensitive detection of Cr (VI) by reduced graphene oxide chemiresistor and 1, 4-dithiothreitol functionalized Au nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, 247, 265–272.
- Taulan, M. (2004). *Conséquences moléculaires des expositions aiguë et chronique à l'uranium sur le transcriptome murin. Au LRTOX/IRSN, Pierrelatte* (Doctoral dissertation, Thèse de l'Université Montpellier I).
- Taylor, P., Saha, R., Nandi, R., & Saha, B. (2011). Sources and toxicity of hexavalent chromium, (July 2014), 37–41.
- Teixeira, P.R.S.; do Nascimento Marreiro, A.S.; de Oliveira Farias, E.A.; Dionisio, N.A.; Silva Filho, E.C.; Eiras, C. Layer-by-layer hybrid films of phosphate cellulose and electroactive polymer as chromium (VI) sensors. *J. Solid State Electrochem.* **2015**, 19, 2129–2139.
- Tellez-Plaza, M., Jones, M. R., Dominguez-Lucas, A., Guallar, E., & Navas-Acien, A. (2013). Cadmium exposure and clinical cardiovascular disease: a systematic review. *Current atherosclerosis reports*, 15(10), 356.
- Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., and Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosens. Bioelectron.* 16, 121–131.
- Tornøe, C. W., Christensen, C., & Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1, 2, 3]-triazoles by regioselective copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry*, 67(9), 3057-3064.
- Tu, J.; Gan, Y.; Liang, T.; Wan, H.; Wang, P. A miniaturized electrochemical system for high sensitive determination of chromium (VI) by screen-printed carbon electrode with gold nanoparticles modification. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, 272, 582–588.
- Tukur, S.A.; Yusof, N.A.; Hajian, R. Linear sweep anodic stripping voltammetry: Determination of Chromium (VI) using synthesized gold nanoparticles modified screen-printed electrode. *J. Chem. Sci.* **2015**, 127, 1075–1081.
- Tyszczyk-Rotko, K.; Madejska, K.; Domańska, K. Ultrasensitive hexavalent chromium determination at bismuth film electrode prepared with mediator. *Talanta* **2018**, 182, 62–68.

- Ure, A. M., Quevauviller, P., Muntau, H., & Griepink, B. (1993). Speciation of Heavy Metals in Soils and Sediments. An Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken Under the Auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51(1–4), 135–151.
- Wang, C.; Chan, C.K. Carbon nanotube-based electrodes for detection of low ppb-level hexavalent chromium using amperometry. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* **2016**, 5, M3026–M3031.
- Wang, D.; Villa, A.; Porta, F.; Prati, L.; Su, D. Bimetallic gold/palladium catalysts: Correlation between nanostructure and synergistic effects. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 8617–8622.
- Wang, G.H.; Cheng, C.Y.; Liu, M.H.; Chen, T.Y.; Hsieh, M.C.; Chung, Y.C. Utility of *Ochrobactrum anthropic* YC152 in a microbial fuel cell as an early warning device for hexavalent chromium determination. *Sensors* **2016**, 16, 1272.
- Wang, G.L.; Shu, J.X.; Dong, Y.M.; Wu, X.M.; Zhao, W.W.; Xu, J.J.; Chen, H.Y. Using G-quadruplex/hemin to “switch-on” the cathodic photocurrent of p-type PbS quantum dots: Toward a versatile platform for photoelectrochemical aptasensing. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 2892–2900.
- Wang, H.Y.; Su, J.Y. Membraneless microfluidic microbial fuel cell for rapid detection of electrochemical activity of microorganism. *Bioresour. Technol.* **2013**, 145, 271–274.
- Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry*. New York, USA: Wiley, 10, 0471790303.
- Wang, L., Ran, Q., Tian, Y., Xu, J., Xian, Y., Peng, R., & Jin, L. (2010). Covalent immobilization of redox protein via click chemistry and carbodiimide reaction: Direct electron transfer and biocatalysis. *Journal of colloid and interface science*, 350(2), 544–550.
- Wang, M., Tang, Y., Chen, Y., Cao, Y., & Chen, G. (2019). Catalytic hairpin assembly-programmed formation of clickable nucleic acids for electrochemical detection of liver cancer related short gene. *Analytica Chimica Acta*, 1045, 77–84.
- Wang, P.; Cao, L.; Wu, Y.; Di, J. A cathodic photoelectrochemical sensor for chromium (VI) based on the use of PbS quantum dot semiconductors on an ITO electrode. *Microchim. Acta* **2018**, 185, 356.
- Wang, Q.; Khungwa, J.; Li, L.; Liu, Y.; Wang, X.; Wang, S. Fabrication of polyoxometalate/GO/PDDA hybrid nanocomposite modified electrode and electrocatalysis for nitrite ion, ascorbic acid and dopamine. *J. Electroanal. Chem.* **2018**, 824, 91–98.
- Wang, S.S.; Yang, G.Y. Recent advances in polyoxometalate-catalyzed reactions. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 4893–4962.
- Wang, W.; Bai, H.; Li, H.; Lv, Q.; Wang, Z.; Zhang, Q. Disposable plastic electrode for electrochemical determination of total chromium and hexavalent chromium. *J. Electroanal. Chem.* **2017**, 794, 148–155.
- Wang, W.; Bai, H.; Li, H.; Lv, Q.; Zhang, Q.; Bao, N. Carbon tape coated with gold film as stickers for bulk fabrication of disposable gold electrodes to detect Cr (VI). *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, 236, 218–225.
- Wang, Y.; Ma, Y.; Zhao, Q.; Hou, L.; Han, Z. Polyoxometalate-based crystalline catalytic materials for efficient electrochemical detection of Cr (VI). *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, 305, 127469.
- Wei, J.; Guo, Z.; Chen, X.; Han, D.D.; Wang, X.K.; Huang, X.J. Ultrasensitive and ultrasensitive impedimetric detection of Cr (VI) using crown ethers as high-affinity targeting receptors. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 1991–1998.
- Wittig, G., & Krebs, A. (1961). Zur Existenz niedergliedriger cycloalkine, I. *Chemische Berichte*, 94(12), 3260–3275.
- World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality Third Edition Incorporating the First

- and Second Addenda Volume 1 Recommendations, 3rd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2008; pp. 334–335.
- Wu, L.C.; Tsai, T.H.; Liu, M.H.; Kuo, J.L.; Chang, Y.C.; Chung, Y.C. A green microbial fuel cell-based biosensor for in situ chromium (VI) measurement in electroplating wastewater. *Sensors* **2017**, *17*, 2461.
- Wu, S.; Dai, X.; Cheng, T.; Li, S. Highly sensitive and selective ion-imprinted polymers based on one-step electrodeposition of chitosan-graphene nanocomposites for the determination of Cr (VI). *Carbohydr. Polym.* **2018**, *195*, 199–206.
- Wu, S.; Sekar, N.C.; Tan, S.N.; Xie, H.; Ng, S.H. Determination of chromium (III) by differential pulse stripping voltammetry at a chitosan–gold nanocomposite modified screen printed electrode. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 962–967.
- Wyantuti, S.; Hartati, Y.W.; Firdaus, M.L.; Panatarani, C.; Tjokronegoro, R. Fabrication of gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode and its application for voltammetric detection of Cr(III). *Int. J. Sci. Technol. Res.* **2015**, *4*, 135–139.
- Wyantuti, S.; Hartati, Y.W.; Panatarani, C.; Tjokronegoro, R. Cyclic voltammetric study of Chromium (VI) and Chromium (III) on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Procedia Chem.* **2015**, *17*, 170–176.
- Wyantuti, S.; Ishmayana, S.; Hartati, Y.W. Voltammetric determination of Cr (VI) using gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Procedia Chem.* **2015**, *16*, 15–23.
- Xu, S.; Wang, X.; Zhou, C. A micro electrochemical sensor based on bismuth-modified mesoporous carbon for hexavalent chromium detection. In Proceedings of the 2015 IEEE SENSORS, Busan, Korea, 1–4 November 2015; pp. 1–4.
- Xin, X.; Hu, N.; Ma, Y.; Wang, Y.; Hou, L.; Zhang, H.; Han, Z. Polyoxometalate-based crystalline materials as a highly sensitive electrochemical sensor for detecting trace Cr(vi). *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 4570–4577.
- Xin, X.; Ma, Y.; Hou, L.; Wang, Y.; Xue, X.; Lin, J.; Han, Z. Krebs-Type $\{M_2(WO_2)_2[B-b-SbW_9O_{33}]_2\}_n$ (M = SbIII, (WO₃)) Tungstoantimonate Possessing Unique Pseudo-Seesaw Sb–O Structure. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 9567–9571.
- Xu, Y.; Zhang, W.; Huang, X.; Shi, J.; Zou, X.; Li, Z.; Cui, X. Adsorptive stripping voltammetry determination of hexavalent chromium by a pyridine functionalized gold nanoparticles/three-dimensional graphene electrode. *Microchem. J.* **2019**, *149*, 104022.
- Xu, Z.; Liu, B.; Dong, Q.; Lei, Y.; Li, Y.; Ren, J.; Li, B. Flat microliter membrane-based microbial fuel cell as “on-line sticker sensor” for self-supported in situ monitoring of wastewater shocks. *Bioresour. Technol.* **2015**, *197*, 244–251.
- Xu, Z.; Liu, Y.; Williams, I.; Li, Y.; Qian, F.; Zhang, H.; Li, B. Disposable self-support paper-based multi-anode microbial fuel cell (PMMFC) integrated with power management system (PMS) as the real time “shock” biosensor for wastewater. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 232–239.
- Yammouri, G.; Mandli, J.; Mohammadi, H.; Amine, A. Development of an electrochemical label-free biosensor for microRNA-125a detection using pencil graphite electrode modified with different carbon nanomaterials. *J. Electroanal. Chem.* **2017**, *806*, 75–81.
- Yáñez-Sedeño, P., González-Cortés, A., Campuzano, S., & Pingarrón, J. M. (2019). Copper (I)-catalyzed click chemistry as a tool for the functionalization of nanomaterials and the preparation of electrochemical (bio) sensors. *Sensors*, *19*(10), 2379.
- Ye, D.; Yang, Y.; Li, J.; Zhu, X.; Liao, Q.; Zhang, B. A laminar flow microfluidic fuel cell for detection of hexavalent chromium concentration. *Biomicrofluidics* **2015**, *9*, 064110.
- Zamora-Galvez, A.; Morales-Narváez, E.; Mayorga-Martinez, C.C.; Merkoçi, A. Nanomaterials connected to antibodies and molecularly imprinted polymers as bio/receptors for bio/sensor applications. *Appl. Mater. Today* **2017**, *9*, 387–401.

- Zang, D.; Huang, Y.; Li, Q.; Tang, Y.; Wei, Y. Cu dendrites induced by the Anderson-type polyoxometalate NiMo₆O₂₄ as a promising electrocatalyst for enhanced hydrogen evolution. *Appl. Catal. B Environ.* **2019**, 249, 163–171.
- Zhang, D., & Kilian, K. A. (2014). Peptide microarrays for the discovery of bioactive surfaces that guide cellular processes: a single step azide–alkyne “click” chemistry approach. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(27), 4280–4288.
- Zeleke, M.A.; Kuo, D.H. Synthesis of oxy-sulfide based nanocomposite catalyst for visible light-driven reduction of Cr (VI). *Environ. Res.* **2019**, 172, 279–288.
- Zhang, M., June, S. M., & Long, T. E. (2012). Principles of Step-Growth Polymerization (Polycondensation and Polyaddition). In *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set* (Vol. 5). Elsevier B.V.
- Zhang, X., & Zhang, Y. (2013). Applications of azide-based bioorthogonal click chemistry in glycobiology. *Molecules*, 18(6), 7145–7159.
- Zhang, Y.; Liu, J.; Li, S.L.; Su, Z.M.; Lan, Y.Q. Polyoxometalate-based materials for sustainable and clean energy conversion and storage. *EnergyChem* **2019**, 1, 100021.
- Zhang, Y.; Chen, P.; Wen, F.; Yuan, B.; Wang, H. Fe₃O₄ nanospheres on MoS₂ nanoflake: Electrocatalysis and detection of Cr (VI) and nitrite. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 761, 14–20.
- Zhao, S.; Liu, P.; Niu, Y.; Chen, Z.; Khan, A.; Zhang, P.; Li, X. A novel early warning system based on a sediment microbial fuel cell for in situ and real time hexavalent chromium detection in industrial wastewater. *Sensors* **2018**, 18, 642.
- Zheng, Q.; Vilà-Nadal, L.; Lang, Z.; Chen, J.J.; Long, D.L.; Mathieson, J.S.; Cronin, L. Self-sorting of heteroanions in the assembly of cross-shaped polyoxometalate clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 2595–2601.
- Zhu, D.; Bai, Z.; Ma, H.; Tan, L.; Pang, H.; Wang, X. High performance simultaneous detection of b-nicotinamide adenine dinucleotide and l-tryptophan in human serum based on a novel nanocomposite of ferroferric oxide-functionalized polyoxometalates. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, 309, 127787.
- Zhu, L.; Miao, M.; Shao, X.; Du, Z.; Huang, K.; Luo, Y.; Xu, W. A universal electrochemical biosensor using nick-HCR nanostructure as molecular gate of nanochannel for detecting Chromium (III) ions and microRNA. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14992–14999.

Chapitre II : Comparaison entre les électrodes en pâte de carbone modifiées et non modifiées pour la détermination du chrome hexavalent

Résumé

Ce travail consiste à développer une méthode électroanalytique simple permettant la spéciation du Cr(VI). Les électrodes en pâte de carbone modifiées à l'or (EPC) et les EPC non modifiés ont été testés pour la détermination du Cr(VI) en présence d'un excès de Cr(III) en utilisant la voltamétrie différentielle à impulsions (DPV), sans accumulation ni temps de préconcentration. Plusieurs paramètres affectant les performances analytiques des électrodes conçues ont été étudiés, notamment : la technique d'électrodéposition des AuNPs sur le EPC, la quantité d'AuNPs déposée sur la surface de l'électrode, l'électrolyte de support, la présence de Cr(III), la présence d'ions chlorure et la concentration de diphénylcarbazine (DPC). Dans les conditions optimales, l'utilisation de EPC non modifié dans un milieu acide contenant du DPC a montré une sélectivité élevée et une bonne limite de détection de $19 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, ce qui est bien inférieur à la concentration admissible fixée par l'Organisation mondiale de la santé ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Une gamme de linéarité de 50 à $260 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ a été obtenue avec un écart type relatif de $7,75\%$. En outre, contrairement au EPC modifié par les AuNPs, la réponse actuelle du Cr(VI) obtenue au EPC non modifié n'a pas été affectée par la présence d'ions chlorure et de chrome trivalent. Enfin, la méthode proposée a été appliquée avec succès pour la détermination du Cr(VI) dans de vrais échantillons d'eau du robinet avec des résultats satisfaisants.

II.1. Introduction

La toxicité extrême des métaux lourds et leurs effets néfastes sur l'environnement ont engendré une énorme nécessité de développer des méthodes sélectives, peu coûteuses, bon marché et rapides pour les détecter (Attar et al. 2014 ; Sun et al. 2016 ; Guo et al. 2017 ; Quiroa-Montalvan et al., 2017 ; Oularbi et al. 2017 and Simpson et al. 2018). Parmi ces métaux lourds on retrouve le chrome, d'une part, le chrome trivalent est un élément essentiel pour la santé humaine, et son insuffisance augmente les facteurs de risque associés au diabète et aux maladies cardiovasculaires (Sanchez-Moreno et al. 2011). D'autre part, le chrome hexavalent est l'un des éléments les plus toxiques et sa toxicité dépend fortement de son état d'oxydation. Il est également considéré comme cancérigène et peut causer le cancer du poumon, des allergies cutanées et d'autres maladies (Niewiara et al. 2007). De plus, la spéciation est un problème important pour la détection du chrome hexavalent. Plusieurs études se sont focalisées sur ce point, et pour y parvenir, une combinaison optimale entre préconcentration-séparation et méthodes de détection est nécessaire.

La méthode d'extraction biphasique a été utilisée pour la séparation des espèces de chrome suivie d'une spectroscopie de dégradation induite par laser pour la détection (Kumar et al. 2015). D'autres couplages ont été réalisés entre l'extraction du point de trouble et le spectromètre d'absorption atomique électrothermique (ETAAS) (Akhtar et al. 2017). Outre la spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) a été appliquée en phase liquide et dans des matériaux solides pour la spéciation du chrome (Delay et al. 2015) et l'échange d'ions pour la séparation et la préconcentration (Stasinakis et al. 2003 ; Li et al. 2017). En outre, la séparation par chromatographie ionique à haute performance (HPIC) a été rapportée (Sikovec et al. 1995), et l'extraction en phase solide a été effectuée en utilisant des nanotubes de carbone magnétiques à parois multiples (MWCNT) (Peng et al. 2017). Enfin, l'extraction en phase solide magnétique assistée par ultrasons couplée à l'ICP-OES comme méthode de détection a également été utilisée (Munonde et al. 2017). Les principaux inconvénients de ces techniques analytiques sont leur coût élevé, le besoin de personnel qualifié et la complexité des matériaux.

Les techniques électroanalytiques sont une bonne alternative à cet effet, en raison de leur simplicité, de leur sélectivité, de leur faible coût et de leur grande sensibilité. Les premiers capteurs développés étaient constitués de mercure modifié avec un agent complexant, tel que l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA), l'acide triéthylènetétraminehexaacétique (TTHA), la bipyridine ou le cupferron (Maria Pereira et al. 1997; Wang et al. 1997; Korolczuk

et al. 1999 ; Dominguez et al. 1999). En raison des problèmes de toxicité associés au mercure, un grand nombre d'autres types d'électrodes modifiées ont été appliquées, telles que l'électrode de carbone vitreux modifiée par des nanotubes de carbone à paroi unique enveloppée d'un film de bismuth (Bi/SWCNTs/GCE) (Ouyang et al. 2013). Des travaux récents ont porté sur des électrodes en or (Welch et al. 2005) ou sur des électrodes modifiées par des nanoparticules d'or (AuNPs), telles que AuNPs-indium tin oxide (ITO) (Tsai et al. 2008), électrode sérigraphiée modifiée AuNPs (SPE) (Liu et al. 2007), électrode sérigraphiée en carbone modifiée AuNPs (AuNPs-CSPE) (Dominguez-Renedo et al. 2008), film nanoporeux en or recouvert d'AgNPs (AgNPs-GNF) sur un substrat en or (Xu et al. 2011), ensemble de nanoélectrodes en or (Jena et al. 2008) en utilisant deux couches AuNPs ; la première est électrodéposée pour lier le 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTS) tandis que la deuxième couche d'AuNPs est ensuite auto-assemblée à la surface du MPTS, formant des nanoélectrodes d'or en forme de fleur, puis fonctionnalisée par un thiol pyridinium PET/AuNPs/MPTS/AuNPs/ CME (Ouyang et al. 2012). Selon les travaux précédents, l'interférence du chlorure n'a jamais été étudié (Welch et al. 2005 ; Tsai et al. 2008 ; Liu et al. 2007 ; Dominguez-Renedo et al. 2008 ; Xu et al. 2011 ; Jena et al. 2008 ; Ouyang et al. 2012 ; Sari et al. 2018). Dans ce travail, nous étudions l'effet des principales espèces interférentes telles que le chlorure et le Cr(III). L'objectif principal de ce travail est de faire une étude comparative entre les EPC modifiés à l'or et les EPC non modifiés afin de sélectionner un capteur sensible et spécifique à la détection du Cr(VI) et de surmonter le problème des interférences générées par les ions chlorure qui affectent la détection du Cr. (VI) en échantillon réel. De plus, à notre connaissance, il n'y a pas de rapport de recherche antérieur sur une étude comparative utilisant des EPC modifiés avec deux types d'AuNPs qui sont synthétisés par deux techniques différentes pour montrer leur effet sur la réduction électrocatalytique directe du Cr(VI) (sans tout temps d'accumulation ou de préconcentration). Les résultats obtenus sur les deux électrodes modifiées ont montré un résultat intéressant, cependant au cours de notre étude nous avons remarqué que les EPC modifiés à l'or sont confrontés à des limitations liées à l'interférence des ions chlorure et du Cr(III). Un EPC non modifié a été utilisé pour surmonter ces limitations.

L'idée d'utiliser le DPC comme agent complexant spécifique est venue d'une célèbre méthode colorimétrique standard pour la détermination du Cr(VI), qui s'est complexé avec le Cr(VI) en milieu acide. Cette méthode intéressante nous a amenés à concevoir une nouvelle méthode électroanalytique qui permet la détection indirecte du Cr(VI), en préparant une quantité appropriée de DPC sur la cellule électrochimique préparée en milieu acide. La réponse du DPC

sur le EPC a diminué avec l'augmentation de la concentration de Cr(VI). De plus, avoir une sensibilité élevée et une bonne spécificité de méthode qui peuvent être appliquées dans les vrais échantillons sans aucun problème.

Ici, des électrodes modifiées par rapport à celles non modifiées pour la détection du chrome hexavalent ont été étudiées. Par conséquent, une étude comparative a été effectuée en utilisant plusieurs électrodes : électrode en pâte de carbone (EPC) modifiée avec de l'or déposé électrochimiquement (AuNPsE/EPC), EPC modifiée par des nanoparticules d'or coulées en goutte (AuNPs/EPC). EPC non modifié en absence et en présence d'un complexant spécifique du Cr(VI) qui est le diphénylcarbazine (DPC) afin d'améliorer l'intensité du courant et d'augmenter la sélectivité vis-à-vis du Cr(VI).

II.2. Expérimentation

II.2.1. Produits chimiques et réactifs

Le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), l'acide sulfurique, l'acétate de sodium et l'hydroxyde de sodium ont été achetés chez LOBA Chemie (Casablanca, Maroc). Le nitrate de chrome (III) nonahydraté ($Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$), la taille de la poudre de graphite $<0,1$ mm a été acheté chez Fluka, le chlorure d'or (III) trihydraté ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) et le tétrachloroaurate de potassium (III) ($KAuCl_4$) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (USA). Ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] et ferrocyanure de potassium [$K_4Fe(CN)_6$] ont été achetés chez Surchem products (Ipswich, Royaume-Uni). La paraffine liquide, l'acide acétique et l'acide phosphorique ont été achetés chez SOLVACHIM (Casablanca, Maroc). Le diphénylcarbazine (DPC) et le citrate de sodium tribasique hydraté ont été achetés chez Riedel-de-Haën (Seelze, Allemagne). De l'eau distillée a été utilisée pour préparer toutes les solutions. Tous les réactifs utilisés dans ce travail étaient de qualité analytique.

II.2.2. Appareillage

Toutes les expériences électrochimiques ont été effectuées à température ambiante à l'aide d'un analyseur électrochimique PalmSens Potentiostat-Galvanostat fourni par PalmSens BV (Utrecht, Pays-Bas) connecté à un PC et contrôlé par le logiciel PSTrace 4.0. Trois électrodes ont été insérées dans la cellule électrochimique : électrode au calomel saturé (SCE) comme électrode de référence, acier inoxydable nu comme contre-électrode et électrode en pâte de carbone comme électrode de travail. Un instrument OHAUS (STARTER 2100) pH-mètre a été utilisé pour mesurer le pH des électrolytes de support.

Un analyseur de particules Microtrac Nanotrak Wave (Meerbusch, Allemagne) a été utilisé pour obtenir la distribution granulométrique des AuNP. L'analyseur est basé sur la technique de diffusion dynamique (DLS) et il est équipé d'une diode laser émettant à une longueur d'onde de 780 nm, avec une puissance nominale de 3 mW. Un bain à ultrasons (Elmasonic, Allemagne) a été utilisé pour nettoyer l'électrode de travail.

II.2.3. Solutions

II.2.3.1. Synthèse de la solution HAuCl₄

La solution d'or a été préparée selon la littérature (Renedo et al.2007). Une quantité appropriée de chlorure d'or (III) trihydraté ($170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) a été dissoute dans une solution 0,5 M H₂SO₄.

II.2.3.2. Synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs)

La synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs) a été effectuée en suivant la méthode Turkevich comme indiqué dans (Turkevich et al. 1951). Brièvement 20 mL de KAuCl₄ (1 mM) préparé en solution aqueuse ont été portés à ébullition sous agitation. Ensuite, la réduction du sel AuCl₄⁻ a été effectuée par l'ajout de 2 mL de citrate (38 mM) en une seule fois ; la couleur de la solution est passée immédiatement du jaune à la solution non colorée, puis au bleu foncé et après au rouge en 2 min. Après avoir terminé la synthèse, la suspension colloïdale a été refroidie à température ambiante. Ensuite, la solution obtenue a été conservée à l'abri de la lumière à 4°C.

II.2.3.3. Préparation de la solution acide

L'électrolyte support (ou milieu acide) destiné à la détection du Cr(VI) en présence de DPC a été préparé en ajoutant 0,25 mL de H₃PO₄ dans une fiole jaugée de 100 mL, puis en ajustant son pH à 1,14 par 0,2 N H₂SO₄, puis diluer la solution obtenue à 100 ml et mélanger (Federation, Water Environment. 1999).

II.2.3.4. Autres solutions

La solution mère de Cr(VI) a été préparée en dissolvant une quantité appropriée dans de l'eau distillée. Le tampon acétate (0,1 M) a été préparé à partir d'un mélange entre l'acétate de sodium et l'acide acétique. Le tampon Britton Robinson (0,04 M) a été préparé à partir d'un mélange d'acides acétique, borique et phosphorique, puis il a été ajusté à la valeur souhaitée avec du NaOH 0,2 M. Une solution fraîche de diphénylcarbazine a été préparée chaque jour dans de l'acétone suivie d'une dilution adéquate pour atteindre la concentration souhaitée.

II.2.4. Préparation des électrodes

II.2.4.1. Préparation des électrodes EPC

La même procédure décrite dans (Lahcen et al. 2016), pour la préparation des électrodes en pâte de carbone a été utilisée dans ce travail. Une homogénéisation de la poudre de graphite et de la paraffine liquide (75 % ; 25 %) a été effectuée à l'aide d'un pilon et d'un mortier afin d'obtenir une pâte homogène, qui a servi à remplir le trou de l'électrode de travail (à la fin du EPC corps d'une profondeur de 2 mm et d'un diamètre de 3 mm); puis l'électrode obtenue a été lissée sur un papier blanc, propre et doux afin d'éliminer l'excès de pâte de carbone.

II.2.4.2. Préparation des électrodes EPC modifiées électrochimiquement avec AuNPs (AuNPsE/EPC)

Les électrodes de travail, de référence et de contre-électrode ont été placées dans la cellule électrochimique contenant 10 ml de solution HAuCl_4 . Le dépôt électrochimique d'or sur la surface du EPC a été réalisé en appliquant un potentiel de +0,18 V pendant 200 s en utilisant la chronoampérométrie. Ensuite l'électrode de travail a été polarisée dans H_2SO_4 (0,05 M) entre 0 et +1,5 V, pendant cinq balayages successifs à la vitesse de $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Les résultats obtenus étaient comparables à ceux mentionnés dans la littérature (Rand et al. 1972 ; Hamelin et al. 1996 ; Wan et al. 2015).

II.2.4.3. Préparation des électrodes EPC modifiées avec des AuNPs synthétisés et coulés en goutte (AuNPs/EPC)

La modification de l'électrode de travail par les AuNPs a été réalisée en coulant deux fois 10 μL de la suspension colloïdale d'AuNPs sur la surface du EPC. Plus tard, les électrodes modifiées ont été utilisées après avoir été séchées à 40°C et polarisées dans H_2SO_4 0,05 M en suivant la même procédure rapportée ci-dessus.

II.2.4.4. Préparation du EPC non modifié en présence de DPC en solution

L'électrode de travail a été préparée comme mentionné ci-dessus en remplissant son trou par de la pâte de carbone, puis elle a été placée avec la référence et les contre-électrodes dans la cellule électrochimique, qui contient la solution acide comme électrolyte support avec une quantité appropriée de DPC.

II.2.5. Techniques d'analyse électrochimique

La détection du Cr(VI) a été effectuée en utilisant la voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV) sans aucun processus d'accumulation ou de préconcentration et cela en variant le potentiel de +0,6 V à -0,5 V au EPC non modifié ; de +0,6 V à 0,0 V à AuNPsE/EPC et AuNPs/EPC et de 0,0 V à +0,6 V à EPC non modifié en présence de DPC en solution. Ces mesures ont été effectuées dans les conditions suivantes : $E_{\text{step}} 0,005 \text{ V}$, $E_{\text{pulse}} 0,1 \text{ V}$, $t_{\text{pulse}} 0,025 \text{ s}$, scan rate $0,05 \text{ V s}^{-1}$

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Caractérisation des AuNPs synthétisés

La caractérisation des AuNPs synthétisés a été effectuée par DLS pour obtenir la taille hydrodynamique et par spectrophotométrie UV/vis pour enregistrer le spectre correspondant à la bande de résonance plasmonique de surface typique de ce type de nanoparticules. La figure 15.A montre l'histogramme de distribution de taille correspondant aux AuNPs synthétisés après application de la technique DLS. Selon l'histogramme, les AuNPs possèdent un diamètre moyen de $10,2 \pm 2,3 \text{ nm}$. Ces résultats sont complétés par la bande de résonance plasmon de surface apparaissant sur la figure 15.B. Le spectre montre un maximum de la bande d'absorption à 518 nm, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs (Segura et al. 2015 ; Ajaero et al. 2012).

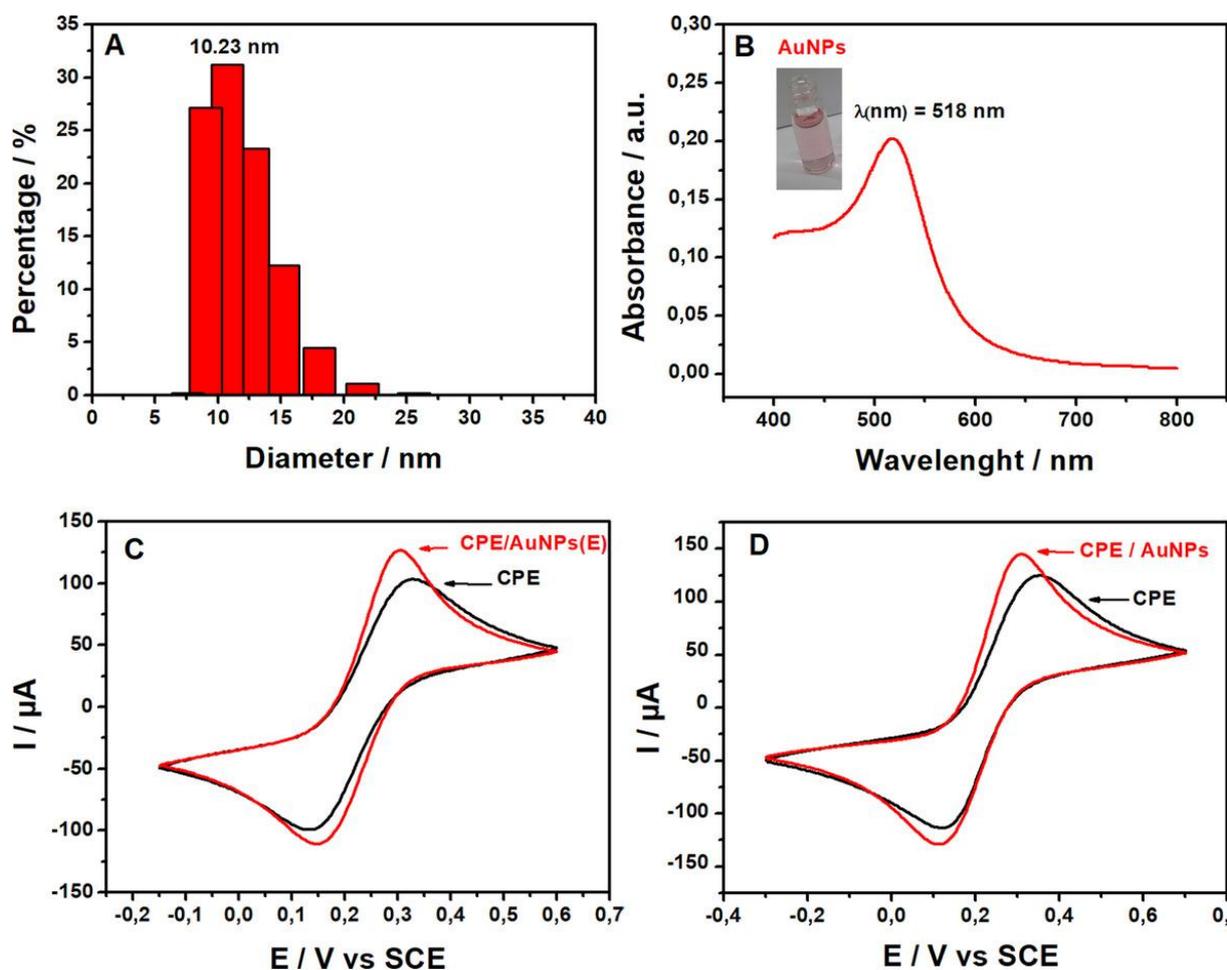


Figure 15. A) Histogramme de distribution de taille de DLS et B) Spectre d'absorption UV-Vis des AuNPs synthétisés. Voltammogrammes cycliques de EPC modifiés : C) avec AuNPsE (déposé électrochimiquement) et D) avec AuNPs coulés en goutte, dans une solution aqueuse de KCl 0,1 M contenant 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Vitesse de balayage $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

II.3.2. Caractérisation électrochimique des électrodes modifiées

La voltamétrie cyclique était la technique électroanalytique employée pour la caractérisation des électrodes de travail. (Figure 15.C, D) montre les voltammogrammes cycliques correspondant à la solution de ferro/ferricyanure (5 mM de ferro/ferricyanure dans une solution aqueuse de KCl 0,1 M) pour les EPC non modifiés et modifiés. Les deux types de nanoparticules d'or, déposées électrochimiquement (AuNPsE) (Figure 15.C) et formées et déposées chimiquement (AuNPs) (Figure 15.D) à la surface des électrodes, améliorent la cinétique de transfert d'électrons et les intensités de courant de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sur le EPC. Cette découverte pourrait être attribuée au caractère conducteur élevé des AuNP déposés (Mandli et al. 2017). De plus, un léger déplacement du maximum des pics anodiques et cathodiques vers des valeurs de potentiel moins positives et plus positives, respectivement, peut être observé, indiquant l'effet électrocatalytique des AuNPs.

II.3.3. Comportement électrochimique du chrome hexavalent (Cr(VI))

Après la préparation des électrodes, et la polarisation des électrodes modifiées dans H_2SO_4 0,05 M, leur comportement électrochimique a été vérifié en absence et en présence de Cr(VI) par voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV). Comme le montre la figure 16.A, le chrome hexavalent a été détecté à l'électrode non modifiée dans un tampon acétate (pH 4,0 ; 0,1 M), qui a été choisi pour ces études préliminaires basées sur la littérature sans aucune optimisation préalable. En variant le potentiel de +0,6 V à -0,5 V (vs. SCE), un pic clair et bien défini de Cr(VI) a été obtenu à -0,24 V. Cependant, les électrodes modifiées à l'or ont montré une intensité de courant élevée et un décalage du potentiel de crête vers des valeurs plus positives autour de +0,3 V (Figure 16.B, C) qui peut être due aux propriétés catalytiques des AuNPs (Guo et al. 2007 ; Sohn et al 2009).

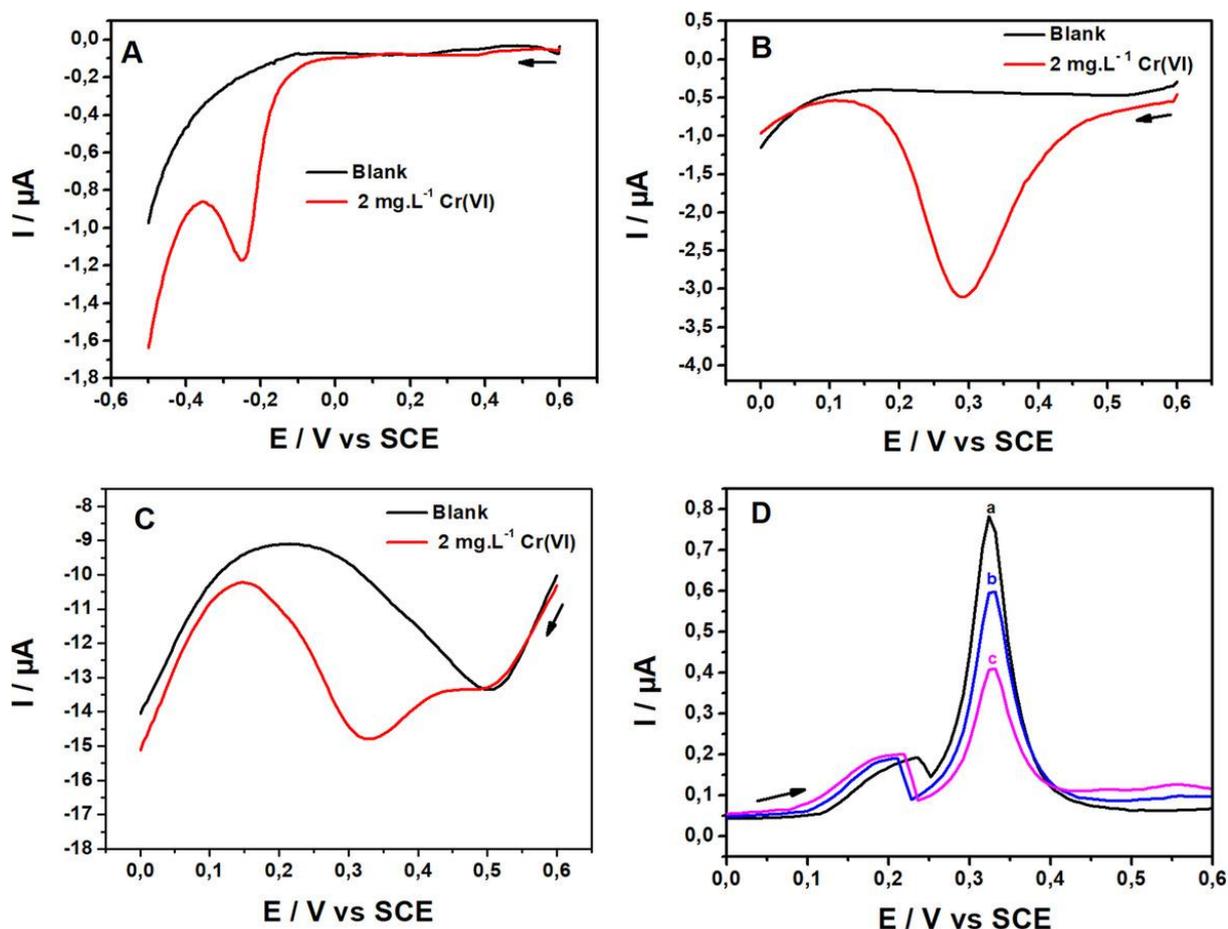


Figure 16. Voltammogrammes impulsionnels différentiels pour : A) EPC de +0,6 V à -0,5 V, B) AuNPsE/EPC et C) AuNPs/EPC de +0,6 V à +0,0 V, obtenus dans une solution tampon acétate 0,05 M (pH 4,0) contenant $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cr(VI). D) Voltammogrammes impulsionnels différentiels de +0,0 V à +0,6 V à EPC enregistrés en solution acide (pH 1,14) en présence de : a) $970 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPC et des concentrations ajoutées de Cr(VI) b) $104 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, c) $208 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

L'électrodéposition des AuNPs sur la surface du EPC en appliquant un potentiel constant à un temps fixe permet d'avoir une surface homogène avec une bonne répartition des AuNPs, alors que les AuNPs préparés chimiquement n'ont pas le même diamètre mais varient de 7,5 nm à 25 nm comme indiqué sur la figure 15.A, la différence entre la figure 16.B et la figure 16.C est probablement due à la différence entre l'homogénéité de chaque type de nanoparticules d'or. En outre,

Il convient de noter que le potentiel et le courant de signal du pic sont presque inchangés, mais le courant de fond est augmenté pour l'électrode basée sur la coulée de la suspension colloïdale d'AuNPs sur la surface du EPC (Figure 16.C).

Cette augmentation du courant de fond est probablement due à la quantité d'or coulé et à la possibilité d'agrégation d'AuNPs sur la surface du EPC (Segura et al. 2015).

La littérature fait référence à une méthode standard de détection du chrome hexavalent (Federation, Water Environment. 1999), qui consiste à faire une réaction de complexation entre Cr(VI) et DPC en milieu acide. Cette réaction donne une solution colorée qui peut être analysée par méthode colorimétrique. Ici, le EPC non modifié a été testé pour la détection de Cr(VI) en présence de DPC en solution. C'est pourquoi $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cr(VI) ont été ajoutés à la cellule électrochimique contenant 10 mL de solution acide et $970 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPC.

Le pic d'oxydation du DPC a été observé dans la plage de + 0, 0 V à + 0, 6 V (Figure 16.D (a)), l'intensité actuelle des pics de DPC (+ 0, 35 V) diminue proportionnellement à l'augmentation de la concentration de Cr (VI) (Figure 16.D (b, c)). Ainsi, la détection du Cr(VI) a été effectuée par la mesure de la quantité consommée de DPC.

II.3.4. Détermination du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC modifié et non modifié

II.3.4.1. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC modifié électrochimiquement avec des AuNPs (AuNPsE/EPC)

II.3.4.1.1. Effet des AuNPs électrodéposés sur la détection du chrome hexavalent

L'effet du temps d'électrodéposition des AuNPs a été étudié en utilisant la chronoampérométrie à un potentiel fixe de +0,18 V (vs SCE). Ainsi, trois valeurs différentes pour le temps de dépôt, 20, 200 et 400 s, ont été testées (voir la figure 17.A). Une fois l'électrodéposition réalisée, les électrodes modifiées ont été polarisées dans de l'acide sulfurique 0,05 M en utilisant la

voltamétrie cyclique à la vitesse de balayage de $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ (voir la figure 17.B). Les résultats montrent que l'intensité du courant des AuNPs dans les chronoampérommes et dans les scans CV augmentait avec le temps de dépôt.

La détection du Cr(VI) a été réalisée par DPV dans du tampon acétate $0,05 \text{ M}$ ($\text{pH } 4,0$). La différence entre les intensités de courant obtenues avec différents temps d'électrodéposition 200 s et 400 s n'était pas significative (Figure 18). Par conséquent, 200 s comme temps d'électrodéposition a été sélectionné pour le reste des expériences afin de minimiser le temps de préparation des capteurs.

Dans le même ordre d'idées, une optimisation de la concentration de HAuCl_4 a été effectuée pour une concentration fixe de Cr(VI) et son effet était négligeable sur l'intensité du courant de Cr(VI). Ainsi, $170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ont été sélectionnés pour les expériences ultérieures (résultats non présentés).

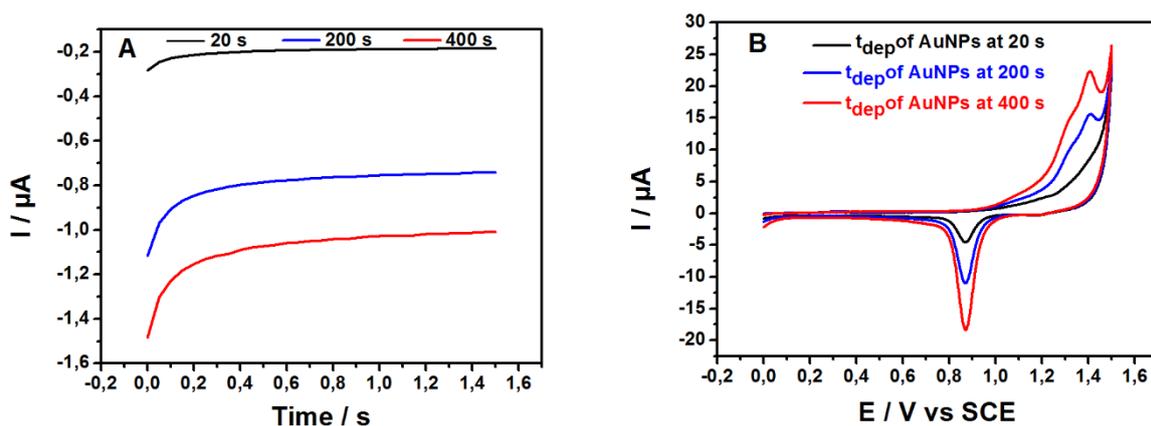


Figure 17. Effet du temps de dépôt. A) Chronoampérommes correspondant à l'électrodéposition des AuNPs ($0,1 \text{ mM HAuCl}_4$ dans $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, $E_{\text{dep}} = 0,18 \text{ V}$) à l'électrode en pâte de carbone. B) Le premier balayage de la polarisation de AuNPs/EPC enregistré dans $0,05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Valeurs de temps de dépôt testées : $20, 200$ et 400 s .

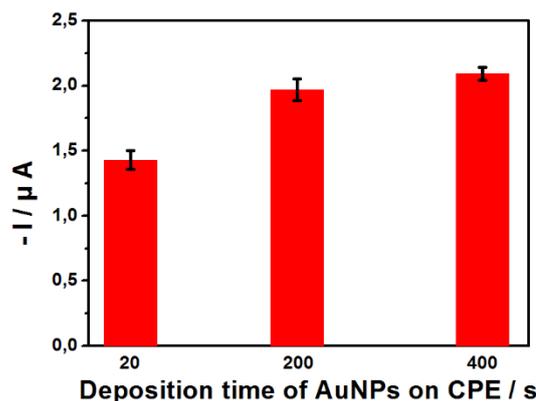


Figure 18. Effet du temps de dépôt (20, 200, 400 s) des AuNPs sur l'intensité du courant de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI) à AuNPsE/EPC dans une solution tampon acétate $0,05 \text{ M}$ (pH 4,0)

II.3.4.1.2. Effet de l'électrolyte support et du pH

Selon plusieurs études, la détection du Cr(VI) est généralement réalisée en utilisant des électrodes à base de nanomatériau d'or (Welch et al. 2005 ; Jena et al. 2008 ; Ouyang et al. 2012). Plusieurs électrolytes ont été étudiés afin de trouver le milieu optimal pour la détection du Cr(VI). L'intensité du courant Cr(VI) était similaire pour tous les électrolytes testés $\text{H}_2\text{SO}_4 \approx \text{HCl} \approx \text{HNO}_3$ (Welch et al. 2005). Cependant, en (Kachosangi et al. 2010) l'intensité du courant décroît dans l'ordre suivant $\text{HNO}_3 > \text{HClO}_4 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{HCl}$. Ainsi, dans ce travail, une comparaison de la réponse du Cr(VI) ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) au EPC modifié électrochimiquement avec des AuNPs électrodéposés (AuNPsE/EPC) a été réalisée, dans une large gamme de milieux acides, tels que : HCl ($0,3 \text{ M}$), H_2SO_4 ($0,3 \text{ M}$), HClO_4 ($0,3 \text{ M}$), Tampon HNO_3 ($0,3 \text{ M}$) et Britton-Robinson (B-R) ($0,04 \text{ M}$; pH 2) afin de mieux comprendre la relation entre les milieux acides avec divers électrolytes supportés et la réponse du Cr(VI). La figure 19.A montre les réponses d'intensité de courant de Cr(VI) à l'électrode AuNPsE/EPC, enregistrées dans les électrolytes cités ci-dessus. On note que l'intensité du courant Cr(VI) obtenu décroît dans l'ordre suivant : Tampon B-R > $\text{HNO}_3 > \text{HClO}_4 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{HCl}$. Cela est probablement dû à la forte diffusion du Cr(VI) dans le tampon Britton-Robinson ($0,04 \text{ M}$; pH 2). De plus, les intensités de courant obtenues dans les acides perchlorique et nitrique sont très proches. Ce fait pourrait probablement s'expliquer par les concentrations équimolaires de protons, ce qui est en accord avec (Welch et al. 2005). Les pics obtenus dans HCl et H_2SO_4 ont une valeur d'intensité très faible ; cela peut être dû à la formation possible de complexes de chromate, CrO_3Cl^- et CrSO_7^{2-} comme mentionné par (Welch et al. 2005 ; Korolczuk et al. 2000).

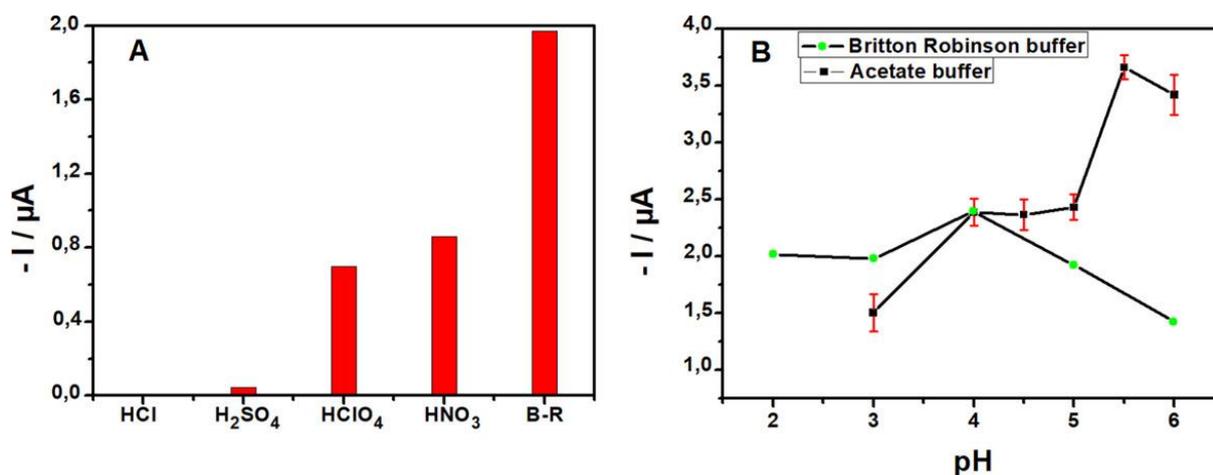


Figure 19. A) Valeurs d'intensité de courant obtenues avec AuNPsE/EPC pour une solution contenant $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cr(VI) dans diverses solutions acides (0,3 M) et dans une solution tampon Britton Robinson 0,04 M (pH 2,0). B) Valeurs d'intensité de courant obtenues à l'aide d'AuNPsE/EPC en fonction du pH pour une solution contenant $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cr(VI) dans des solutions de tampon acétate (0,05 M) et de tampon Britton Robinson (0,04 M).

Une étude plus approfondie de la réduction du Cr(VI) démontre qu'une réponse améliorée a été observée à $\text{pH} > 2$ avec le tampon Britton Robinson (0,04 M) (Figure 19.B) (HCrO_4^- l'espèce prédominante et est active électrochimiquement) et ce courant a diminué à $\text{pH} > 4$ jusqu'à sa disparition totale à $\text{pH} > 6$ et cela est probablement dû à la faible activité électrocatalytique de réduction du Cr(VI) dans cette région (Jin et al. 2015). Étant donné que la réponse maximale a été obtenue à pH 4,0, le tampon acétate ($\text{pK}_a = 4,7$) a été sélectionné pour une étude plus approfondie de l'effet du pH dans une gamme de 3,0 à 6,0.

Outre un effet pur du pH, il convient de noter que la force ionique n'a pas été maintenue égale pour les deux tampons étudiés (acétate et Britton Robinson) et a varié pour le même tampon en faisant varier son pH et peut donc influencer le changement de courant de crête (Figure 19.B).

La valeur d'intensité la plus élevée a été obtenue dans un tampon d'acétate (pH 5,5) comme le montre la (figure 19.B), c'est peut-être indiquer la facilité de diffusion de Cr(VI) sur la surface AuNPsE/EPC. Par conséquent, 5,5 a été choisi comme pH optimal pour le reste des expériences.

II.3.4.2. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'électrodes modifiées par AuNPs par coulage en goutte (AuNPs/EPC)

Sur la base des résultats précédents obtenus avec AuNPsE/EPC. Les électrodes en pâte de carbone modifiées avec différentes quantités d'AuNPs formées chimiquement et déposées par

coulée ont également été testées afin d'étudier leur effet sur l'intensité du courant de Cr(VI). Les mêmes paramètres optimisés pour AuNPsE/EPC (pH, polarisation de l'électrode modifiée) ont également été optimisés pour AuNPs/EPC. Les résultats obtenus concernant la valeur optimale pour chaque paramètre étaient identiques à ceux des nanoparticules déposées électrochimiquement. En bref, différentes quantités de nanoparticules d'or déposées sur la surface des EPC ont été réalisées dans un tampon acétate 0,05 M (pH 5,5) afin de montrer si le comportement électrochimique de l'électrode vers 1 mg L⁻¹ Le Cr(VI) serait modifié ou non. Les résultats obtenus montrent, comme indiqué dans les informations complémentaires (Figure 20), que la réponse de courant la plus élevée a été obtenue en utilisant une goutte de 4 µL de suspension d'or déposée deux fois. Au-delà de cette valeur, la variation de l'intensité du courant devient plus ou moins constante après cette valeur. Il a été remarqué que la surface de l'électrode n'était pas entièrement recouverte par deux couches de 4 µl de suspension d'or. Cependant, des volumes plus importants ont été testés (10 µL une fois et 10 µL deux fois) dans les mêmes conditions, et l'intensité de courant la plus élevée à des concentrations faibles et élevées de Cr(VI) a été obtenue en utilisant une goutte de 10 µL déposée deux fois (résultats non montrés). C'est pourquoi ce volume a été choisi comme valeur optimale pour le reste des travaux.

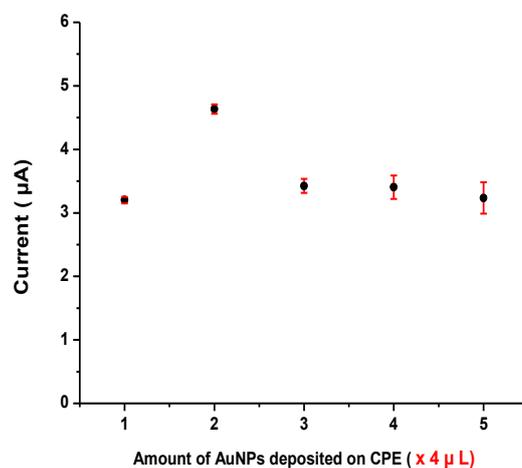


Figure 20. Effet de la quantité d'AuNPs sur l'intensité du courant au EPC dans un tampon acétate 0,05 M (pH 5,5) contenant 1 ppm de Cr (VI).

II.3.4.3. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC non modifié

Après la préparation des électrodes en pâte de carbone, différents paramètres ont été optimisés ; parmi eux le pH, qui a un effet énorme sur la détection du Cr(VI). Il a été observé que l'augmentation du pH entraînait une diminution de l'intensité du courant de Cr(VI).

Le EPC non modifié a été étudié en utilisant un tampon acétate dans une gamme de pH variant de 3,0 à 5,5. Contrairement au EPC modifié à l'or, l'intensité maximale est observée à pH 3,0, il n'y a pas non plus eu d'interférence du Cr(III). Il convient de noter qu'un pH inférieur (pH < 3 préparé avec différentes concentrations de H₂SO₄) montre un petit pic de Cr(VI) avec une faible intensité de courant (résultats non présentés).

II.3.4.4. Étude de détection du chrome hexavalent à l'aide d'un EPC non modifié en présence de DPC

La détection de Cr(VI) par l'utilisation de EPC non modifié en présence de DPC a été effectuée indirectement. Le mécanisme des mesures est basé sur une réaction redox accompagnée d'une complexation entre l'espèce réduite du Cr(VI) qui est le Cr(III) et la forme oxydée du DPC qui est la diphénylcarbazone DPCO (Sanchez-Moreno et al. 2010 ; Ali et al. 2012).



Le pic d'oxydation du DPC est proportionnel à la concentration de Cr(VI) ajoutée, d'où l'intérêt de développer une électrode basée sur la détection du DPC consommé par le Cr(VI). Les mesures ont été effectuées dans la gamme oxydative de +0,0 V à +0,6 V.

Une optimisation de la concentration en DPC a été réalisée en présence de différentes concentrations de chrome hexavalent allant de 52 à 832 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Comme le montre la figure 21, le pourcentage de signal correspondant au DPC a diminué de manière linéaire lors de l'augmentation de la concentration de Cr(VI) ; Par ailleurs on a remarqué que cette diminution était significative avec une concentration de 970 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, obtenant la sensibilité la plus élevée pour cette valeur. Pour cette raison, 970 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPC ont été choisis pour les expériences ultérieures.

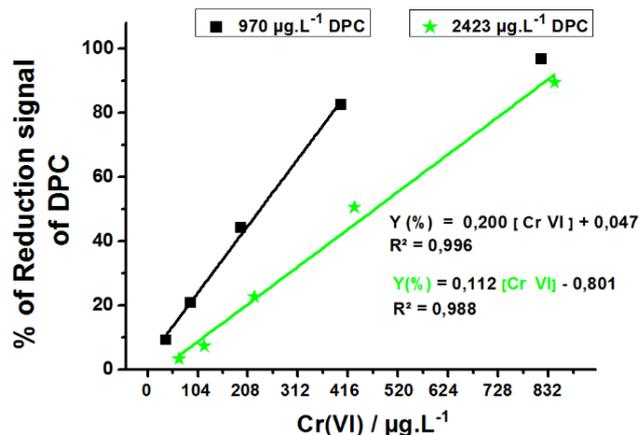


Figure 21. Effet de la concentration du DPC sur la réduction du signal à l'aide d'un EPC non modifié en milieu acide (pH 1,14) en présence de 52, 104, 208, 416 et 832 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI).

II.3.5. Étude des interférences

Afin d'évaluer la sélectivité et la spéciation du capteur développé vers 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI) une étude d'interférence a été réalisée. Par conséquent, la présence de plusieurs ions, tels que Ag^+ , Cd^{2+} , Cl^- , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} a été étudiée. La concentration de tous les cations a été fixée à 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, et les anions chlorure ont été testés dans une gamme variée entre 0 et 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Il convient de noter que les deux électrodes modifiées en or (AuNPsE/EPC et AuNPs/EPC) ont des limites pour la détection du chrome hexavalent en présence d'ions chlorure (Figure 22) et chrome trivalent (tableau 7). La figure 22 a montré que l'intensité du courant de Cr(VI) aux deux électrodes modifiées diminuait avec l'augmentation de la concentration d'ions chlorure. Comme mentionné ci-dessus dans la figure 19.A, la réponse actuelle de Cr(VI) à AuNPsE/EPC a été considérablement affectée dans le cas de H_2SO_4 et HCl , et cela pourrait être dû à la formation possible de complexes (CrO_3Cl^- et CrSO_7^{2-}) ce qui est en accord avec la littérature (Welch et al. 2005 ; Kachoosangi et al. 2010). De plus, la spéciation du Cr(VI) dépend fortement du pH du milieu. À pH 5,5, les électrodes modifiées à l'or (AuNPsE/EPC et AuNPs/EPC) ne sont pas spécifiques au Cr(VI). En effet, comme indiqué dans le tableau 7 une interférence du Cr(III) a été observée. Une étude plus approfondie a montré que la diminution du pH à 4,0 permet la disparition totale de la réponse du signal du Cr(III). Cependant, la sensibilité de la réponse du Cr(VI) diminue considérablement à ce pH. L'influence du Cr(III) sur la réponse du Cr(VI) a également été vérifiée en utilisant des EPC non modifiés sans aucun ajout de diphénylcarbazide (DPC). Même la présence de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(III) n'a pas modifié l'intensité du courant de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cr(VI), indiquant que l'électrode nue est très spécifique pour Cr(VI). Cependant, en raison de la très faible sensibilité au Cr(VI), l'utilisation d'une telle

électrode n'était pas recommandée pour le reste du travail. Afin d'améliorer à la fois la sélectivité et la sensibilité, le DPC a été ajouté.

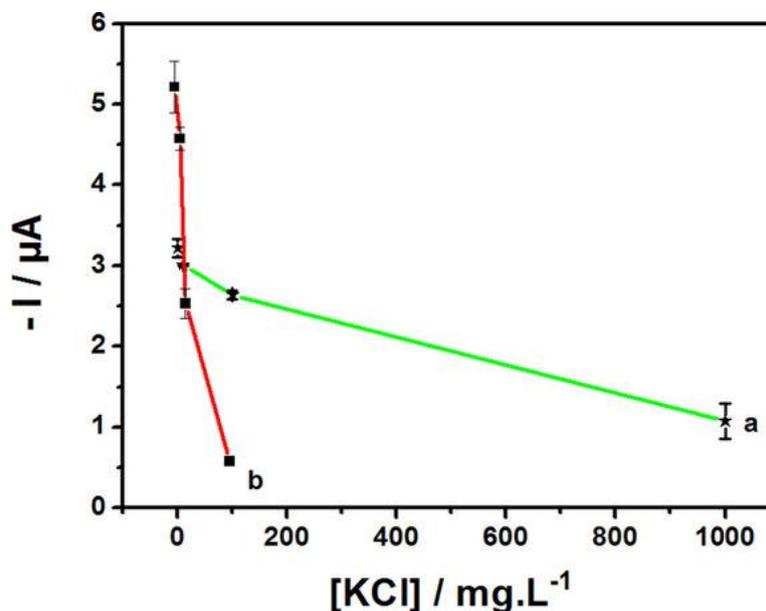


Figure 22. Effet de la concentration de chlorure sur 1 mg · L⁻¹ de signal Cr(VI) dans un tampon acétate 0,05 M (pH 5,5) à a) AuNPsE/EPC et b) AuNPs/EPC.

Tableau 7. Interférence de certains cations testés dans la détection de Cr(VI) à AuNPsE/EPC dans un tampon acétate (pH 5,5).

Espèces interférentes	I (µA) de 1 ppm d'espèces interférentes	I (µA) de 1 ppm de Cr(VI) en présence d'espèces interférentes	Recouvrement(%)
Ag (I)	–	–3,641	95,6
CD (II)	–	–3,588	94,2
Cr(III)	–1,105	–4,874	128,0
Fe(III)	–	–3,815	100,2
Hg (II)	–	–3,932	103,3
Pb (II)	–	–3,982	104,6

Comme mentionné ci-dessus, l'utilisation de DPC comme agent complexant spécifique pouvant se complexer spécifiquement avec le Cr(VI) en milieu acide, nous fournit alors une méthode spécifique vis-à-vis du Cr(VI), alors qu'une sélectivité élevée vis-à-vis du Cr(VI) a été obtenue par l'utilisation de EPC non modifié en présence de DPC même en présence de niveaux de concentration élevés d'ions chlorure (voir la figure 23) et de Cr (III) (voir la figure 24). De plus, comme les réponses actuelles n'ont pas été affectées aux EPC non modifiés en présence de DPC, cette découverte peut être due à leur forte affinité pour faire des complexes avec Cr (VI) par rapport à celle des ions chlorure.

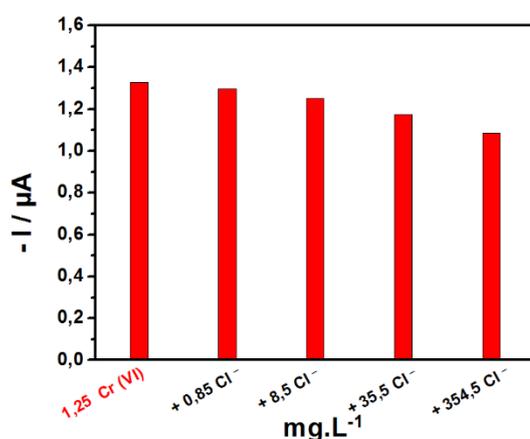


Figure 23. Effet de la concentration de chlorure sur 1,25 mg·L⁻¹ de détection de Cr(VI) en présence de 9,69 mg·L⁻¹ de DPC à un EPC non modifié en milieu acide (pH1,14).

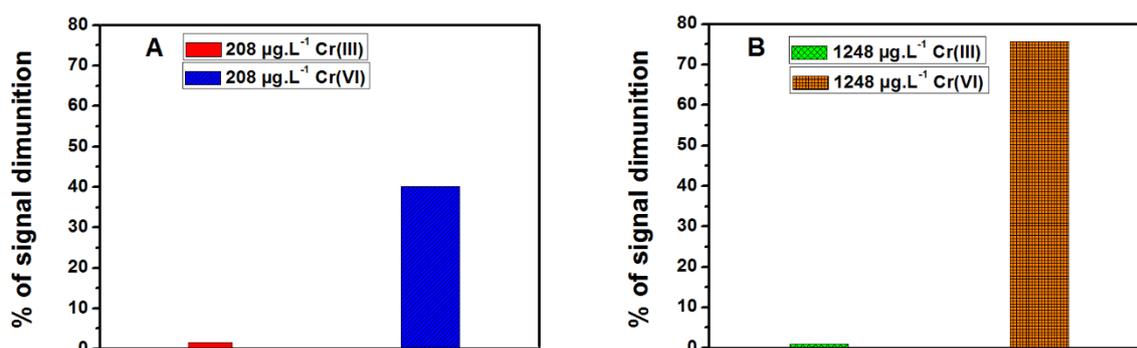


Figure 24. Effet de la concentration en chrome trivalent sur la détection du chrome hexavalent en présence de A) 0,97 mg·L⁻¹ de DPC et B) 9,69 mg·L⁻¹ de DPC à un EPC non modifié en milieu acide (pH1,14).

II.3.6. Performances analytiques des électrodes EPC modifiées et non modifiées

Dans les conditions optimales décrites ci-dessus, les performances analytiques des capteurs modifiés et non modifiés développés vis-à-vis de la détermination du chrome hexavalent ont été étudiées. Les mesures ont été évaluées par DPV. La comparaison entre les électrodes modifiées et non modifiées est résumée dans le tableau 8.

Tableau 8. Comparaison des performances analytiques du EPC modifié et non modifié pour la détermination du Cr(VI).

Électrode	Électrolyte support	Gamme de linéarité ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	R ²	LD ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Sensibilité ($\text{nA} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{L}$)	RSD %
AuNPsE/EPC [a]	Tampon acétate (0,05 M) pH 5,5	40–3000	0,982	7	4.18	6,74
AuNPs/EPC [b]	Tampon acétate (0,05 M) pH 5,5	100–3000	0,992	54	4.39	6.15
EPC	Tampon acétate (0,05 M) pH 3,0	250–1500	0,998	26	0,387	15.74
EPC	Milieu acide pH 1,14 en présence 970 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPC	50–260	0,996	19	2,00	7,75

- [a] AuNPs déposés électrochimiquement. [b] AuNPs coulés en goutte sur la surface de l'électrode.

L'utilisation de EPC en présence de DPC présente de nombreux avantages par rapport aux capteurs précités, comme une bonne limite de détection ($19 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), bien inférieure à la limite déclarée par l'Organisation Mondiale de la Santé ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Indépendamment du LOD le plus bas obtenu par l'utilisation du EPC modifié (AuNPsE/EPC), une interférence des ions chlorure a été observée comme le montre la figure 22 ; de plus, ces électrodes modifiées à l'or ne permettent pas la spéciation du Cr(VI) en présence de Cr(III).

Le EPC non modifié en présence de $970 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPC en solution est une bonne alternative pour pallier le problème des interférences, les voltammogrammes obtenus sont présentés sur la figure 25.A. Les mesures ont été faites en mesurant le pourcentage de diminution du signal de DPC, qui est proportionnelle à la concentration ajoutée de Cr(VI) dans la gamme entre 50 et $260 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, comme illustré à la Figure 25.B. D'après le Tableau 8 et la Figure 25, les résultats

montrent que l'électrode en pâte de carbone en présence de $970 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPC présente une bonne et acceptable limite de détection $19 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sans interférences. L'équation de régression obtenue était : $I(\mu\text{A})=0,275 \times C(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})-0,180$, avec un coefficient de corrélation : $R^2=0,997$, et un écart type relatif (RSD) de 3 courbes d'étalonnage consécutives était égal à 7,75 %.

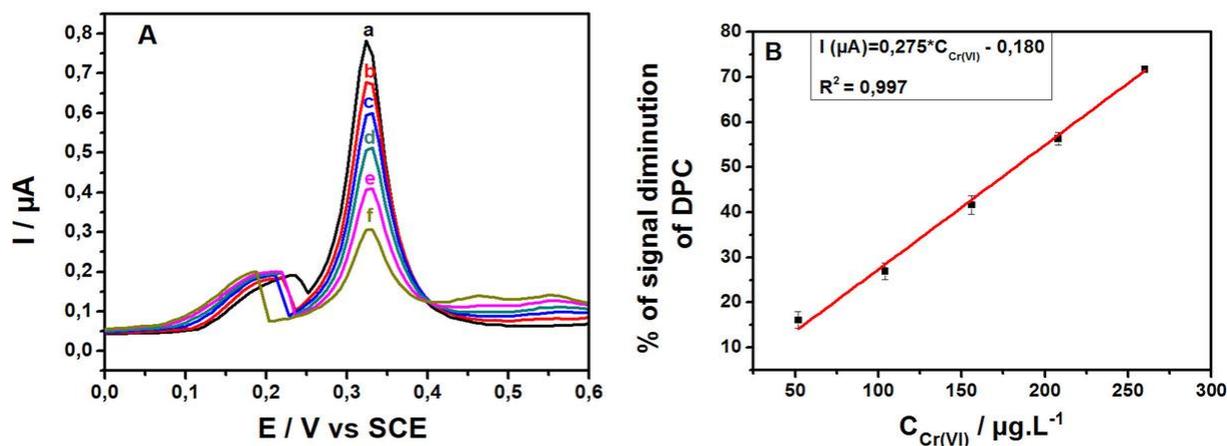


Figure 25. A) Voltammogrammes impulsifs différentiels pour la détermination du Cr(VI) en solution acide (pH 1,14) en présence de : (a) $970 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPC, et (b) 52, (c) 104, (d) 156, (e) 208 et (f) $260 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cr(VI) sur une électrode en pâte de carbone non modifiée. B) Courbe d'étalonnage correspondante du Cr(VI) dans les mêmes conditions expérimentales.

II.3.7. Échantillon réel

Un échantillon d'eau potable a été prélevé directement du laboratoire afin de déterminer le Cr(VI) et d'évaluer l'effet de sa matrice sur les performances analytiques de la méthode proposée. Ainsi, l'eau collectée a été enrichie en Cr(VI) dans une gamme de 52 à $208 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ et analysée à l'aide du EPC non modifié en présence de $970 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPC.

Les voltammogrammes obtenus sont présentés dans (Figure 26.A). La figure montre le pourcentage de diminution du signal pour DPC, i. e., la consommation de diphénylcarbazide par Cr(VI) en fonction des concentrations ajoutées, comme indiqué ci-dessus, a été rapportée dans (Figure 26.B). Les résultats trouvés pour l'eau du robinet sont très proches de ceux trouvés dans les solutions étalons (Figure 25.B) avec un recouvrement compris entre 85,9 % et 100,9 %. Le tableau 9 montre les valeurs de recouvrement considérées comme le rapport des quantités trouvées/ajoutées.

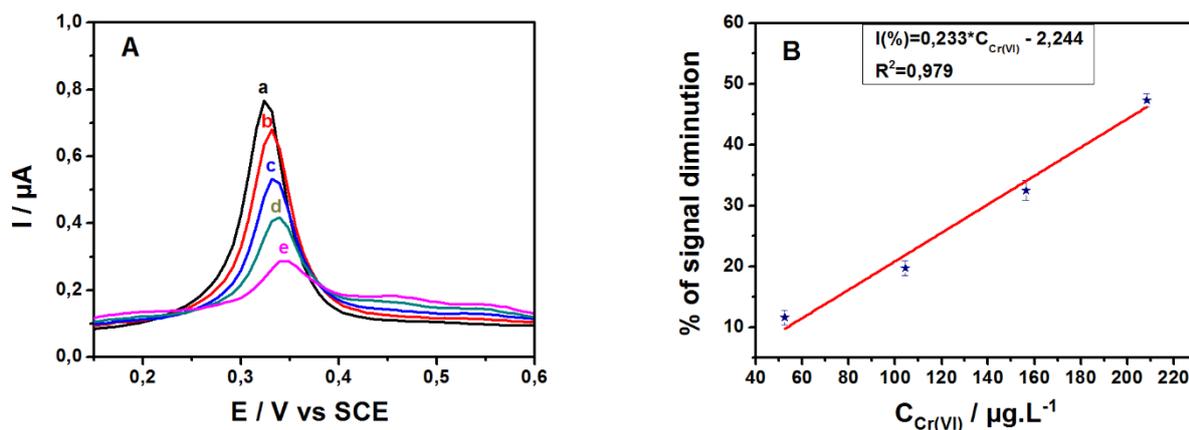


Figure 26. A) Voltammogrammes pulvés différentiels obtenus avec un EPC non modifié dans de l'eau du robinet en présence de a) 970 µg·L⁻¹ de DPC et b) 52 c) 104, d) 156 et e) 208 µg·L⁻¹ de Cr(VI). B) Le % de diminution du signal de DPC en présence de 52, 104, 156 et 208 µg·L⁻¹ de Cr(VI) dans l'eau du robinet.

Tableau 9. Détermination du Cr (VI) dans l'eau du robinet à l'aide d'une électrode à pâte de carbone non modifiée en présence de 970 µg · L⁻¹ DPC.

	Cr(VI) (µg · L ⁻¹)		Recouvrement (%)
	Ajouté	Trouvé	
Eau de robinet	52	44,7	85,9
	52	44,2	85,0
	52	52,5	100,9

II.4. Conclusions

Dans ce travail, une étude comparative entre les électrodes en pâte de carbone non modifiées et modifiées en or a été présentée. Tous les capteurs développés étaient capables de détecter le Cr(VI) à une concentration inférieure à 50 µg · L⁻¹ (déclarée par l'organisation mondiale de la santé), mais les électrodes modifiées en or présentaient des limitations concernant l'interférence du Cr(III) et des ions chlorure. L'électrode à pâte de carbone non modifiée pouvait surmonter ces problèmes et était capable de déterminer le Cr(VI) avec une bonne sélectivité et une sensibilité relativement élevée. Cependant, l'utilisation de EPC en présence de DPC améliore beaucoup plus la sensibilité et permet une limite de détection de 19 µg · L⁻¹ qui est inférieure à la valeur recommandée par l'OMS. De plus, le Cr(VI) a été déterminé avec succès dans l'échantillon d'eau du robinet par le capteur non modifié proposé.

Références

- Attar, A., Ghica, M. E., Amine, A., & Brett, C. M. (2014). Poly (neutral red) based hydrogen peroxide biosensor for chromium determination by inhibition measurements. *Journal of hazardous materials*, 279, 348-355.
- Sun, Y. F., Zhao, L. J., Jiang, T. J., Li, S. S., Yang, M., & Huang, X. J. (2016). Sensitive and selective electrochemical detection of heavy metal ions using amino-functionalized carbon microspheres. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 760, 143-150.
- Guo, Y., Zhao, H., Han, Y., Liu, X., Guan, S., Zhang, Q., & Bian, X. (2017). Simultaneous spectrophotometric determination of trace copper, nickel, and cobalt ions in water samples using solid phase extraction coupled with partial least squares approaches. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 532-536.
- Quiroa-Montalvan, C. M., Gomez-Pineda, L. E., Alvarez-Contreras, L., Valdez, R., Arjona, N., & Oropeza-Guzman, M. T. (2017). Ordered mesoporous carbon decorated with magnetite for the detection of heavy metals by square wave anodic stripping voltammetry. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(6), B304.
- Oularbi, L., Turmine, M., & El Rhazi, M. (2017). Electrochemical determination of traces lead ions using a new nanocomposite of polypyrrole/carbon nanofibers. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 21(11), 3289-3300.
- Simpson, A., Pandey, R. R., Chusuei, C. C., Ghosh, K., Patel, R., & Wanekaya, A. K. (2018). Fabrication characterization and potential applications of carbon nanoparticles in the detection of heavy metal ions in aqueous media. *Carbon*, 127, 122-130.
- Sánchez-Moreno, R. A., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., & Procopio, J. R. (2011). Potentiometric Screen-Printed Bisensor for Simultaneous Determination of Chromium (III) and Chromium (VI). *Electroanalysis*, 23(1), 287-294.
- Niewiara, E., Baś, B., & Kubiak, W. W. (2007). Elimination of SAS interferences in catalytic adsorptive stripping voltammetric determination of Cr (VI) by means of fumed silica. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 19(21), 2185-2193.
- Kumar, R., Devanathan, A., & Rai, A. K. (2015). Speciation of Cr (III) and Cr (VI) in Industrial Waste Water using Biphasic Extraction and Determination by LIBS. *Journal for Foundations and Applications of Physics*, 2(2), 61-70.
- Akhtar, A., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Khan, M., Bilal, M., & Khan, N. (2018). Application of modified cloud point extraction method for the chromium speciation in artificial saliva extracts of different snuff products. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 59, 320-327.
- Delay, M., Mangold, S., Sembritzki, R., & Frimmel, F. H. (2015). Chromium speciation in solid waste material and eluates by X-ray absorption spectroscopy and ion chromatography. *Aquatic geochemistry*, 21(2), 313-329.
- Stasinakis, A. S., Thomaidis, N. S., & Lekkas, T. D. (2003). Speciation of chromium in wastewater and sludge by extraction with liquid anion exchanger Amberlite LA-2 and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 478(1), 119-127.
- Li, L. L., Feng, X. Q., Han, R. P., Zang, S. Q., & Yang, G. (2017). Cr (VI) removal via anion exchange on a silver-triazolate MOF. *Journal of hazardous materials*, 321, 622-628.
- Šikovec, M., Novič, M., Hudnik, V., & Franko, M. (1995). On-line thermal lens spectrometric detection of Cr (III) and Cr (VI) after separation by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 706(1-2), 121-126.
- Peng, G., He, Q., Lu, Y., Huang, J., & Lin, J. M. (2017). Flow injection microfluidic device with on-line fluorescent derivatization for the determination of Cr (III) and Cr (VI) in water samples after solid phase extraction. *Analytica chimica acta*, 955, 58-66.

- Munonde, T. S., Maxakato, N. W., & Nomngongo, P. N. (2017). Preconcentration and speciation of chromium species using ICP-OES after ultrasound-assisted magnetic solid phase extraction with an amino-modified magnetic nanocomposite prepared from Fe₃O₄, MnO₂ and Al₂O₃. *Microchimica Acta*, 184(4), 1223-1232.
- Pereira, M. C., Pereira, M. L., & Sousa, J. P. (1997). Adsorptive stripping voltammetric measurements of chromium accumulation in mice organs using mercury film microelectrodes. *Electroanalysis*, 9(12), 941-944.
- Wang, J., Lu, J., Luo, D., Wang, J., & Tian, B. (1997). Simultaneous adsorptive stripping voltammetric measurements of trace chromium, uranium, and iron in the presence of cupferron. *Electroanalysis*, 9(16), 1247-1251.
- Korolczuk, M. (1999). Voltammetric determination of Cr (VI) in natural water in the presence of bipyridine following its deposition to the metallic state. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 11(16), 1218-1221.
- Domínguez, O., Sanlloriente, S., & Arcos, M. J. (1999). Application of an optimization procedure of adsorptive stripping voltammetry for the determination of chromium in wine. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 11(17), 1273-1279.
- Ouyang, R., Zhang, W., Zhou, S., Xue, Z. L., Xu, L., Gu, Y., & Miao, Y. (2013). Improved Bi film wrapped single walled carbon nanotubes for ultrasensitive electrochemical detection of trace Cr (VI). *Electrochimica acta*, 113, 686-693.
- Welch, C. M., Nekrassova, O., & Compton, R. G. (2005). Reduction of hexavalent chromium at solid electrodes in acidic media: reaction mechanism and analytical applications. *Talanta*, 65(1), 74-80.
- Tsai, M. C., & Chen, P. Y. (2008). Voltammetric study and electrochemical detection of hexavalent chromium at gold nanoparticle-electrodeposited indium tin oxide (ITO) electrodes in acidic media. *Talanta*, 76(3), 533-539.
- Liu, G., Lin, Y. Y., Wu, H., & Lin, Y. (2007). Voltammetric detection of Cr (VI) with disposable screen-printed electrode modified with gold nanoparticles. *Environmental science & technology*, 41(23), 8129-8134.
- Domínguez-Renedo, O., Ruiz-Espelt, L., García-Astorgano, N., & Arcos-Martínez, M. J. (2008). Electrochemical determination of chromium (VI) using metallic nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Talanta*, 76(4), 854-858.
- Xu, H., Zheng, Q., Yang, P., Liu, J., Xing, S., & Jin, L. (2011). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles-coated gold nanoporous film electrode and its application to amperometric detection for trace Cr (VI). *Science China Chemistry*, 54(6), 1004-1010.
- Jena, B. K., & Raj, C. R. (2008). Highly sensitive and selective electrochemical detection of sub-ppb level chromium (VI) using nano-sized gold particle. *Talanta*, 76(1), 161-165.
- Ouyang, R., Bragg, S. A., Chambers, J. Q., & Xue, Z. L. (2012). Flower-like self-assembly of gold nanoparticles for highly sensitive electrochemical detection of chromium (VI). *Analytica chimica acta*, 722, 1-7.
- Sari, T. K., Takahashi, F., Jin, J., Zein, R., & Munaf, E. (2018). Electrochemical determination of chromium (VI) in river water with gold nanoparticles–graphene nanocomposites modified electrodes. *Analytical Sciences*, 34(2), 155-160.
- Renedo, O. D., & Martínez, M. J. A. (2007). Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Analytica chimica acta*, 589(2), 255-260.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.

- Federation, Water Environment. 1999. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater."
- Ait Lahcen, A., Ait Errayess, S., & Amine, A. (2016). Voltammetric determination of sulfonamides using paste electrodes based on various carbon nanomaterials. *Microchimica Acta*, 183(7), 2169-2176.
- Rand, D. A. J., & Woods, R. (1972). A study of the dissolution of platinum, palladium, rhodium and gold electrodes in 1 M sulphuric acid by cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 35(1), 209-218.
- Hamelin, A. (1996). Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 407(1-2), 1-11.
- Wan, H., Sun, Q., Li, H., Sun, F., Hu, N., & Wang, P. (2015). Screen-printed gold electrode with gold nanoparticles modification for simultaneous electrochemical determination of lead and copper. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 336-342.
- Segura, R., Pizarro, J., Díaz, K., Placencio, A., Godoy, F., Pino, E., & Recio, F. (2015). Development of electrochemical sensors for the determination of selenium using gold nanoparticles modified electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 263-269.
- Ajaero, C., Abdelrahim, M. Y. M., Palacios-Santander, J. M., Gil, M. L. A., Naranjo-Rodríguez, I., de Cisneros, J. L. H. H., & Cubillana-Aguilera, L. M. (2012). Comparative study of the electrocatalytic activity of different types of gold nanoparticles using Sonogel-Carbon material as supporting electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171, 1244-1256.
- Mandli, J., Mohammadi, H., & Amine, A. (2017). Electrochemical DNA sandwich biosensor based on enzyme amplified microRNA-21 detection and gold nanoparticles. *Bioelectrochemistry*, 116, 17-23.
- Guo, S., & Wang, E. (2007). Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica chimica acta*, 598(2), 181-192.
- Sohn, K., Kim, F., Pradel, K. C., Wu, J., Peng, Y., Zhou, F., & Huang, J. (2009). Construction of evolutionary tree for morphological engineering of nanoparticles. *ACS nano*, 3(8), 2191-2198.
- Segura, R., Pizarro, J., Díaz, K., Placencio, A., Godoy, F., Pino, E., & Recio, F. (2015). Development of electrochemical sensors for the determination of selenium using gold nanoparticles modified electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 263-269.
- Kachoosangi, R. T., & Compton, R. G. (2013). Voltammetric determination of Chromium (VI) using a gold film modified carbon composite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 178, 555-562.
- Korolczuk, M. (2000). Application of pulsed potential accumulation for minimization of interferences from surfactants in voltammetric determination of traces of Cr (VI). *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 12(11), 837-840.
- Jin, W., & Yan, K. (2015). Recent advances in electrochemical detection of toxic Cr (VI). *Rsc Advances*, 5(47), 37440-37450.
- Ali, M. K., Ansari, R., Delavar, A. F., & Mosayebzadeh, Z. (2012). Nano structured potentiometric sensors based on polyaniline conducting polymer for determination of Cr (VI). *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(4), 1247-1252.
- Sánchez-Moreno, R. A., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., & Procopio, J. R. (2010). Evaluation of solid-state platforms for chromium (VI) potentiometric sensor development. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(2), 716-723.

Chapitre III : Immobilisation d'anticorps assistée par la chimie du clic sans cuivre pour l'immunodétection de la cytokine IL-10 dans la salive

Résumé

L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire qui est sécrétée en réponse aux niveaux aigus d'inflammation chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (IC). La chimie du clic en absence du cuivre a été utilisée avec succès pour la première fois dans ce travail pour la surveillance de la cytokine Interleukine 10 (IL-10) dans la salive (Figure 27). L'approche impliquait la liaison des groupements carboxyliques du dibenzocyclooctyne (DBCO-COOH) au thiol-azide assemblé sur la surface des microélectrodes d'or qui se liera plus tard avec l'anticorps monoclonal de l'IL-10 (mAb-IL-10). La stratégie de chimie de clic sans cuivre offre de nombreux avantages, notamment un temps de réaction rapide à 37° C ou même à température ambiante, aucune exigence de catalyseur Cu (I) cytotoxique et une haute spécificité des cyclooctynes envers les azotures, conduisant à des rendements quantitatifs élevés de stable triazoles. L'immobilisation orientée de mAb-IL-10 sur le DBCO-COOH a permis la détection directe de la cytokine Ag-IL-10. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et le nanoplotter associé à la microscopie de fluorescence ont été utilisés pour analyser et certifier la bio-fonctionnalisation des électrodes d'or. De plus, la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été utilisée pour suivre l'interaction de l'Ag-IL-10 avec son anticorps. L'immunocapteur développé a montré une gamme de linéarité semi-logarithmique allant de 0,1 pg/mL à 5 pg/mL avec $R^2 = 0,9815$, une limite de détection (LOD) de 0,1 pg/mL avec un écart type relatif (RSD) de 10,67 %. L'analyse de l'interleukine-10 dans la salive des volontaires sans COVID a été effectuée avec succès pour démontrer l'utilité de l'immunocapteur développé.

Mots clés

Interleukine-10; Chimie de clic sans cuivre ; Immunocapteur électrochimique ; analyse de la salive ; Surveillance de l'insuffisance cardiaque.

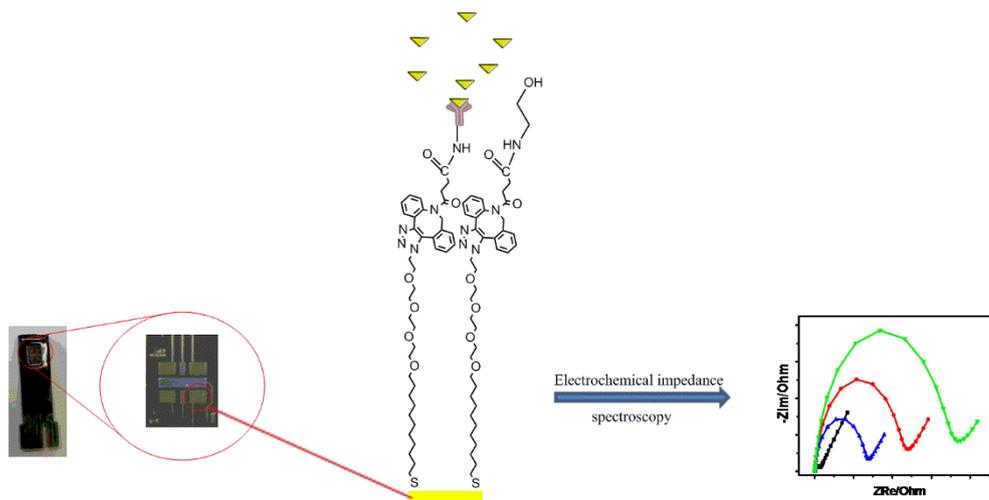


Figure 27. Résumé graphique de l'immunocapteur destiné à la détection de l'IL-10

III.1. Introduction

Les biomarqueurs sont par définition des caractéristiques quantifiables des processus biologiques. Ils ont acquis un rôle important dans la pratique médicale moderne au cours des cinquante dernières années, gagnant une importance croissante dans les applications cliniques car ils peuvent représenter des facteurs de risque pour une maladie, ainsi des indicateurs de la progression de la maladie ou des changements associés au traitement (Selleck et al 2017). Les biocapteurs offrent une excellente opportunité pour la surveillance continue de ces biomarqueurs et, ces dernières années, la demande d'outils de diagnostic avec des caractéristiques de fonctionnement améliorées a augmenté en termes de sensibilité et de sélectivité élevées, ainsi qu'un temps de réponse rapide. Cette demande croissante du développement des biocapteurs appliqués à la médecine les a rendus très attractifs pour l'évaluation des conditions physiologiques ou physiopathologiques des patients, le suivi de l'évolution des maladies et l'efficacité des thérapies post-traitement. En particulier, les biocapteurs à base d'anticorps (ou immunocapteurs) ont révolutionné le diagnostic au cours des dernières décennies en raison des avancées scientifiques qui les ont rendus capables de déterminer les biomarqueurs des maladies (Sharma et al. 2016).

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe causé par un large éventail de troubles cardiovasculaires, tels que des anomalies structurelles ou fonctionnelles du cœur, qui entraînent une altération de la capacité du cœur à se remplir ou à pomper le sang, ce qui entraîne une diminution de la délivrance d'oxygène à un taux correspondant aux besoins des tissus métabolisants. L'IC représente un problème clinique et de santé publique majeur (Roger 2021 ; Virani et al. 2021). Il s'est avéré qu'il entraînait des taux de mortalité élevés, en particulier chez

les patients âgés, et un lourd fardeau économique pour les services de santé (Groenewegen et al. 2020). En effet, l'IC est actuellement l'une des principales causes d'hospitalisation et est associée à une morbidité et une mortalité élevées après-diagnostic, avec une prévalence mondiale de 64,34 millions de cas (8,52 pour 1 000 habitants), représentant 9,91 millions d'années perdues en raison d'un handicap et 346,17 milliards de dollars de dépenses, représentant le fardeau le plus lourd après 60 ans (Lippi et Sanchis-Gomar 2020).

L'inflammation joue un rôle central dans le développement de l'IC (Riehle et Bauersachs 2019) et des taux circulants élevés de cytokines pro-inflammatoires (par exemple, facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), interleukine-1 (IL-1), IL-6 et IL-18), il a été prouvé qu'ils participent au développement et à la progression de l'IC, et leurs taux plasmatiques élevés sont associés à une mortalité accrue chez les patients (Hanna et Frangogiannis 2020). D'autre part, il est bien connu que les cytokines anti-inflammatoires peuvent neutraliser les cytokines pro-inflammatoires libérées dans l'IC et en particulier l'IL-10 qui est la principale cytokine anti-inflammatoire exprimée dans le cœur et connue par son effet de suppression de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Yamaoka et al. 1999 ; Jung et al. 2017 ; Shirazi et al. 2017). La combinaison des mesures des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires s'est avérée être une information pronostique importante chez les patients atteints d'IC (Kaur et al. 2009 ; Miettinen et al. 2008). De nos jours, l'Ag-IL-10 est généralement quantifiée dans le sang (échantillons de plasma ou de sérum) par des méthodes immuno-chimiques telles que les dosages immuno-enzymatiques (ELISA), qui ont été les méthodes de référence pour le diagnostic des protéines spécifiques à la maladie et d'autres protéines ou biomarqueurs depuis plus de quatre décennies (Patel et al. 2016). Par rapport aux biocapteurs, ces immunoessais nécessitent une formation spécialisée, des processus analytiques laborieux, tels que plusieurs étapes de rinçage, et ils prennent du temps (Katz 2021). Les biocapteurs représentent ainsi des outils de diagnostic alternatifs très prometteurs de par leur facilité d'utilisation, leur coût réduit, leur portabilité.

Le sang est la matrice idéale pour la plupart des produits chimiques en raison de son contact avec l'organisme entier et de son équilibre avec les organes et les tissus où les produits chimiques sont stockés. Cependant, même si le sang est généralement considéré comme le meilleur fluide corporel pour l'évaluation des processus systémiques par la détermination de biomarqueurs et que l'analyse sanguine est la procédure la plus courante pour obtenir des informations cliniques, cette approche comporte des inconvénients principalement dus à l'invasivité de la matrice. En effet, le prélèvement sanguin pourrait entraîner du stress pour les patients en raison de ses risques potentiels tels que des malaises passagers, des ecchymoses,

une infection au site de ponction veineuse ou une anémie (Simundic et al. 2018). De plus, la manipulation d'échantillons sanguins nécessite des traitements particuliers, c'est-à-dire tant au niveau de l'analyse des échantillons que de leur élimination. Au cours des dernières décennies, le développement d'une nouvelle méthodologie et de techniques analytiques modernes a permis de mettre l'accent sur l'analyse des fluides biologiques qui peuvent être échantillonnés de manière non invasive (par exemple, la salive/liquide buccal, l'haleine expirée, la sueur, l'urine, le méconium, les ongles, les cheveux et le sperme ou lait maternel). En particulier, l'analyse de la salive offre plusieurs avantages, tels que l'adéquation au dépistage d'une population plus large, une diminution du stress psychologique (surtout si des prélèvements répétés sont nécessaires) même chez des sujets critiques (par exemple, les enfants, les personnes âgées et les personnes handicapées), et moins de risques pour la santé des patients et des professionnels de la santé qui doivent gérer la collecte, l'analyse et l'élimination des échantillons (Bellagambi et al. 2020 ; Ghimenti et al. 2020 ; Vozgirdaite et al. 2021). Toutes ces raisons font de la salive un fluide biologique de diagnostic préférable au sang et à ses dérivés. En particulier, Le diagnostic salivaire par biomarqueurs représente actuellement un domaine dynamique et un outil puissant, parfaitement adapté au diagnostic moléculaire pour l'aide au diagnostic ou au suivi des maladies. Il devient extrêmement attractif dans le domaine des dispositifs Point-of-care (PoC) et Lab-on-Chip (LoC) (Bellagambi et al. 2020 ; Haji Mohammadi et al. 2021 ; Khurshid 2018 ; Ngamchuea et al. 2018 ; Rammos et al. 2021 ; Vozgirdaite et al. 2021).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs immunocapteurs basés sur la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été développés pour la quantification de différents biomarqueurs liés à l'IC, dont l'IL-10 (Bausells et al., 2021). Baraket et ses collègues ont proposé plusieurs biocapteurs pour la détection du biomarqueur Ag-IL-10. De ce fait, plusieurs méthodes ont été utilisées y compris l'électrogreffage de carboxyldiazonium sur une électrode en or-polyimide pour immobiliser l'anticorps anti-IL-10 (Baraket et al. 2013, 2014, 2016, 2017). Baraket et ses collègues ont utilisé un biocapteur électrochimique flexible comprenant des électrodes de référence, de travail et de contre-électrode complètement intégrées sur un substrat de polyimide par un processus de photolithographie douce. Ensuite, l'acide mercaptohexadécanoïque a été utilisé pour lier de manière covalente l'anticorps (anti-IL-10) (Baraket et al., 2016).

Un immunocapteur électrochimique rapide et spécifique a été développé par Dou et ses collègues. Des groupements carboxyliques activés de l'anti-IL-10 étaient liés à une électrode d'or modifiée par le polyaniline issue du sel de diazonium après sa réduction électrochimique (Dou et al. 2012). En 2015, Garcia-Cruz et al. ont déposé des microfils de polypyrrole

conducteur sur une surface thermoplastique flexible pour la biodétection d'Ag-IL-10. Les microfils déposés ont ensuite été combinés avec l'anticorps anti-IL-10 pour une détection d'affinité qui a été transduit avec la technique d'impédance (Garcia-Cruz et al. 2015). De plus, Lee et al. ont réussi à développer un biocapteur pour mesurer l'Ag-IL-10 à un stade précoce. Pour cela, une détection des produits redox-actifs générés à partir des immunoréactifs marqués à la phosphatase alcaline après son activité biocatalytique a été réalisée grâce à la combinaison d'un dosage immuno-enzymatique avec une voltamétrie de redissolution dans un système en flux. Cette méthode a permis la détection d'Ag-IL-10 à des niveaux de pg/mL (BengoecheaÁlvarez et al., 2001). Plus récemment, Nessark et al. ont développé un nouvel immunocapteur impédimétrique capacitif sans marquage pour détecter l'Ag-IL-10 dans lequel une couche conductrice de polypyrrole a été déposée chimiquement sur le substrat Si/SiO₂/Si₃O₄ pour immobiliser l'anticorps anti-IL-10 par la chimie de la carboxyméthylaniline et du carbodiimide (Nessark et al. 2020).

Les modifications de surface électrochimiques et chimiques sont les meilleures stratégies pour assurer une liaison covalente des molécules biologiques pour la détection de biomarqueurs. Cependant, les performances des immunocapteurs à base d'anticorps peuvent être affectées par des facteurs critiques tels que la capacité à immobiliser les éléments de reconnaissance tout en conservant leur activité, l'accessibilité de l'élément de reconnaissance à l'analyte en solution et une faible adsorption non spécifique sur le support solide. De plus, l'utilisation d'anticorps comme éléments de détection peut présenter des limitations supplémentaires. L'interaction entre l'anticorps et le biomarqueur ciblé dépend également de la force d'affinité et de l'orientation de l'élément sensible lorsqu'il est immobilisé à la surface (Mackey et al. 2018 ; Shen et al. 2017). A titre d'exemple, la fixation de molécules biologiques par réaction au carbodiimide présente des problèmes liés à la reproductibilité et ne permet pas la bio-orthogonalité (Devaraj, 2018). L'utilisation de la chimie du clic aide à optimiser la stratégie de biofonctionnalisation car elle est rapide, simple à utiliser, polyvalente, régiospécifique et donne des rendements de produits élevés, mais, plus important encore, la chimie du clic fournit des réactions bioorthogonales spécifiques qui se déroulent de manière irréversible dans l'eau à pH neutre et températures biocompatibles (25 à 37 °C) sans réactifs cytotoxiques ni sous-produits (Devaraj et Finn 2021 ; McKay et Finn 2014). Les monocouches de différents thiols auto-assemblées (SAM) sur des substrats d'or font partie des approches les plus utilisées. Certains articles (Guerrero et al. 2019, 2020) ont utilisé la chimie du clic catalysée par le cuivre (I) pour l'élaboration de nouveaux immunocapteurs. L'utilisation d'une telle stratégie permet la bio-orthogonalité des biomolécules conjuguées. Cependant, l'utilisation de Cu(I) comme catalyseur présente un effet toxique sur

les biomolécules, pour cela, la chimie du clic sans cuivre a été utilisée pour surmonter ces problèmes.

Notre travail visait à développer le premier immunocapteur basé sur l'adaptation de la chimie du clic sans cuivre à la surface de l'électrode pour la surveillance de l'Ag-IL-10 dans un échantillon de salive. Une stratégie de biofonctionnalisation innovante a fourni une monocouche auto-assemblée de 11-(2-{2-[2-(2-Azido-éthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-éthoxy)-undécane-1-thiol (appelé ici HS -C₁₁-EG₄-N₃) sur une plate-forme de biocapteurs contenant 4 microélectrodes de travail en or. Le SAM a permis la réaction de clic avec l'acide dibenzocyclooctyne pour une immobilisation efficace de l'anticorps monoclonal anti-IL-10 pour une détection sans marquage de l'Ag-IL-10. La voltamétrie cyclique (CV) a été utilisée pour caractériser et confirmer la fonctionnalisation à chaque étape. Enfin, la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été utilisée pour la caractérisation des biocapteurs. Les résultats satisfaisants obtenus en termes de sensibilité, sélectivité et spécificité ont prouvé que notre immunocapteur pouvait être un outil prometteur pour une détection fiable et sensible de l'Ag-IL-10 dans la salive et d'autres implémentations seront réalisées pour diminuer le temps d'incubation dans le thiol en utilisant des sels de diazonium et en utilisant également d'autres composés de dibenzocyclooctyne qui pourraient se lier directement aux anticorps sans étapes d'activation ni de désactivation.

III.2. Expérimentation

III.2.1. Produits chimiques et réactifs

Le 11-(2-{2-[2-(2-azido-éthoxy)-éthoxy]-éthoxy}-éthoxy)-undécane-1-thiol (HS-C₁₁-EG₄-N₃) a été acheté auprès de prochimia (Pologne), Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC, pureté ≥ 98 %) (Art. No. 2156.2) a été acheté chez Carl Roth, la résine époxy EPO TEK H70E2LC (Parties A et B) était chez Epoxy Technology Inc. (France). Acide dibenzocyclooctyne (DBCO-COOH, pureté 95 %), dibenzocyclooctyne-amine (DBCO-NH₂, pureté 95 %), N-hydroxysuccinimide (NHS, pureté 98 %), comprimés de solution tampon phosphate (PBS), hexacyanoferrate (II) de potassium trihydraté (K₄Fe(CN)₆·3H₂O, pureté ≥ 99,95 %), l'hexacyanoferrate de potassium (III) (K₃Fe(CN)₆, pureté ≥ 99%), l'éthanolamine (pureté ≥ 98%), l'octadécyl-mercaptan et l'éthanol pur (pureté 95,0%) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (France).

Anticorps monoclonal anti-IL-10 (n° de catalogue MAB2172), IL-10 humaine recombinante (n° de catalogue 1064-IL, lyophilisé), anticorps conjugué à l'IL-10 humain Alexa Fluor® 488

(n° de catalogue IC9210G- 025) et Ag-TNF- α humain recombinante (Cat. No. 210-TA) ont été achetés chez R&D Systems (BioTechne, France).

Tous les solvants et réactifs utilisés dans ce travail étaient de qualité analytique. L'eau ultra pure (résistivité > 18 M Ω cm) a été produite par le système Elga PURELAB Classic (Veolia, France). Le tampon PBS utilisé dans ce travail a été préparé en dissolvant des comprimés de PBS dans l'eau ultrapure comme indiqué par le fournisseur en produisant un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,4) contenant du chlorure de potassium 0,0027 M et du chlorure de sodium 0,137 M.

III.2.2. Appareillage

L'analyse FTIR a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre NEXUS (Nicolet-Thermo Fisher, Royaume-Uni) et les spectres ont été enregistrés en mode de réflectance totale atténuée avec un accessoire Thunder dome (Spectra-tech) contenant un cristal de germanium. Un système de micro-pipetage Nano-traceur modèle 2.1 2.1/E a été acheté auprès de GeSiM Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH, Allemagne. Les images de fluorescence ont été prises à l'aide d'un microscope à fluorescence confocale spectrale à haute résolution (EVOS M5000) de Thermo Fischer Scientific, qui est équipé d'une caméra monochrome et d'objectifs 20 \times et 60 \times et la détection a été effectuée par un GFP à lumière verte avec un excitation/émission de 470/525 nm. Data Physics Instruments digidrop (Allemagne) a été utilisé pour mesurer les mesures d'angle de contact (CAM). Pour le processus de sonication, un bain à ultrasons FB 15049 de Fischer Scientific a été utilisé. Toutes les manipulations ont été effectuées à la température du laboratoire sauf indication contraire.

Une puce en silicium contenant quatre microélectrodes de travail (ET) en or, deux microélectrodes de référence interne en Ag/AgCl et une contre microélectrode en platine (Figure 28) a été utilisée comme plate-forme de capteur pour les mesures électrochimiques. La surface de la puce est passivée par un bicouche diélectrique SiO₂/Si₃N₄, sauf au niveau des électrodes et des plots de contact électrique. Toutes les étapes de fonctionnalisation des ET d'or ont été caractérisées en utilisant la voltamétrie cyclique (CV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) à température ambiante (22 \pm 2 ° C) et dans une cage de Faraday en utilisant un potentiostat PalmSens 4 avec multiplexeur connecté à l'ordinateur et contrôlé par PSTrace 5.7 logiciel.

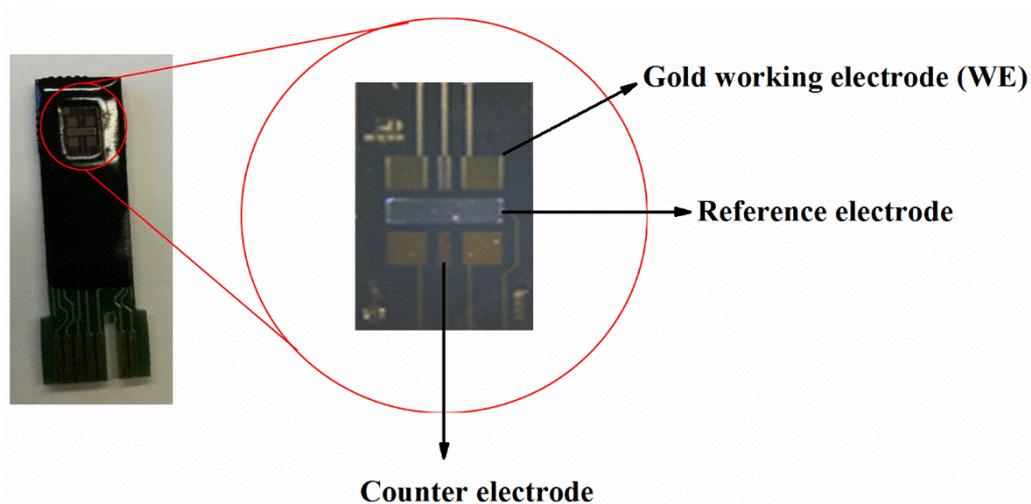


Figure 28. Image de la plate-forme de biocapteur passivée avec de la résine époxy, intégrant une contre-électrode, une électrode de référence et 4 électrodes de travail en or.

III.2.3. Préparation de solutions étalons et collecte de salive réelle

Selon la procédure fournie par le fournisseur, l'anticorps monoclonal mAb-IL-10, les antigènes Ag-IL-10 et Ag-TNF- α ont tous été reconstitués dans du PBS avant d'être aliquotés à une concentration finale de 0,5 mg/mL pour mAb-IL-10 et 10 μ g/mL pour les deux antigènes. Tous les aliquots ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation (mAb-IL-10 pour la biofonctionnalisation du capteur et les antigènes pour la préparation des échantillons avec différentes dilutions). Les solutions standard avec différentes concentrations d'Ag-IL-10 ou d'Ag-TNF- α (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 5 μ g/mL) ont été préparées en diluant la quantité appropriée de la solution à 10 μ g/mL à analyser.

Avant toute prélèvement, le volontaire s'est abstenus de fumer, d'exercice physique, de nourriture, de boissons alcoolisées et de boissons gazeuses pendant plus que 1 h avant le test comme il est décrit précédemment par Bellagambi et al. (2018). Les échantillons de salive ont été recueillie auprès d'un volontaire théoriquement en bonne santé (femme, 40 ans) déplaçant l'écouvillon synthétiques biocompatibles en forme de rouleau ((capuchon bleu Salivette® Cortisol) achetés à Sarstedt (Allemagne)) dans la cavité buccale pendant 2 minutes à un rythme auto-sélectionné. Les échantillons de salive ont été récupérés par centrifugation des écouvillons comme décrit par Bellagambi et al. (2018). L'échantillon de salive obtenu a ensuite été divisé en deux aliquotes où le premier n'a pas été dopé tandis que le second a été dopé avec 84 μ g/mL d'Ag-IL-10. Ces échantillons ont ensuite été stockées à -80°C jusqu'à l'analyse.

L'analyse de la salive a été réalisée en utilisant la méthode des ajouts dosées pour quantifier l'Ag-IL-10. Pour effectuer les analyses, un volume constant de 50 μ L de chaque échantillon a été placé dans 1,5 mL Eppendorf® Tubes à centrifuger Lo-bind (Eppendorf, France). Le premier

tube a été ensuite complété jusqu'à un volume final de 1 mL en ajoutant 950 μ L de PBS, tandis que des volumes croissants d'Ag-IL-10 ont été ajoutés aux tubes suivants pour obtenir des étalons contenant une concentration finale connue de 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 μ g/mL, respectivement. Enfin, des volumes appropriés de PBS ont été ajoutés aux différents flacons pour atteindre un volume final de 1 ml.

III.2.4. Mesures électrochimiques.

Toutes les caractérisations et mesures électrochimiques ont été effectuées dans 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ préparé dans PBS (pH 7,4) comme sonde redox. Pour les mesures de CV, le balayage du potentiel a été effectué à partir de $-0,2$ à $0,6$ V avec une vitesse de balayage de 50 mV/s, tandis que pour les mesures SIE, une gamme de fréquence de 100 mHz–100 kHz a été utilisé avec un potentiel AC de 10 mV et un potentiel DC de 100 mV.

III.2.5. Bio-fonctionnalisation des microélectrodes en or

Avant toute fonctionnalisation, la puce contenant 4 microélectrodes de travail en or, une microélectrode de référence et une contre microélectrode (Figure 28) a été nettoyée par sonication pendant 5 min dans l'éthanol et l'eau bidistillée respectivement. Ensuite, la puce a été incubé dans HS-C₁₁-EG₄-N₃ (1 mM, préparé dans l'éthanol absolue) pendant une nuit, par conséquent, des monocouches auto-assemblées étaient déposées sur les surfaces d'or de la puce (Figure 29.a). L'excès de thiol-azide est ensuite éliminé par rinçage à l'éthanol. Par la suite, les groupes azide terminaux de la monocouche assemblée ont été liés de manière covalente au dibenzocyclooctyne-acide (0,5 mM, préparé dans le PBS) à travers la formation d'un triazole stable (Figure 29.b). Une activation des groupements carboxyliques a été réalisée par l'incubation dans un mélange d'EDC (0,4 M, dans le PBS) /NHS (0,1 M, dans le PBS) pendant 1 h (Figure 29.c) pour permettre ainsi une liaison covalente avec l'anticorps anti-IL-10 (10 μ g/mL, dans le PBS) pendant 1 h à 4 °C (Figure 29.d). Ensuite, l'immunocapteur a été incubé dans l'éthanolamine à 0, 1% (préparé dans le PBS) pendant 30 min à 4 °C afin d'éviter toute liaison non spécifique en bloquant les groupes carboxyliques actifs restants (Figure 29.e).

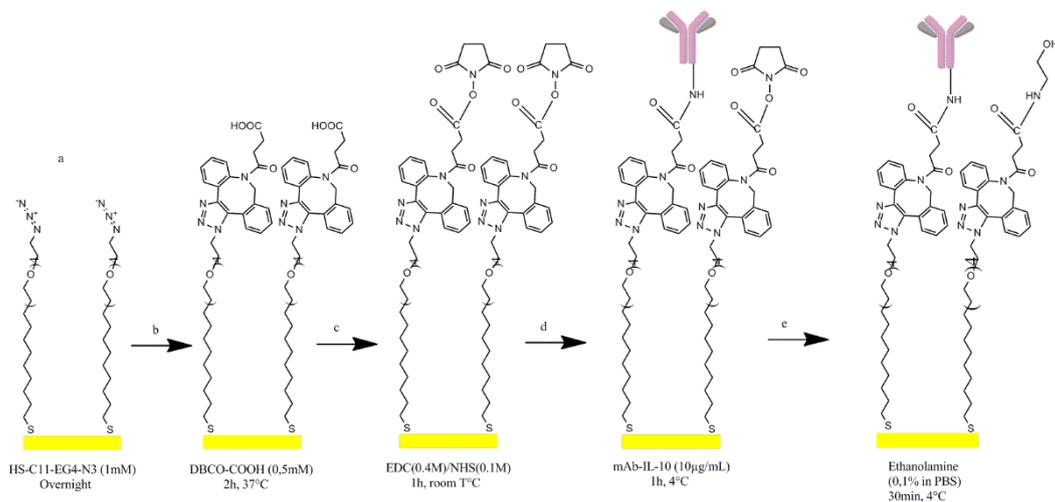


Figure 29. Illustrations schématiques des étapes utilisées pour la fonctionnalisation des électrodes d'or : (a) Thiol-azide (HS-C₁₁-EG₄-N₃), (b) DBCO-COOH, (c) activation avec EDC/NHS, (d) biofonctionnalisation avec mAb-IL-10 et (e) blocage avec de l'éthanolamine.

III.2.6. Impression par microcontact (Micro-tamponnage)

La technique de micro-tamponnage a été utilisée pour vérifier la bio-fonctionnalisation de la surface et pour confirmer la liaison des anticorps de l'IL-10 sur la surface d'or modifiée par le DBCO-NH₂. Pour cela, une technique de lithographie douce utilisant le moulage par réplique a été utilisée pour fabriquer le tampon élastomère de polydiméthylsiloxane comme il est mentionné dans des articles précédents (Garcia-Cruz et al. 2014 ; El Hassani et al. 2019). En bref, un mélange d'élastomère de silicone (pré-polymère) et d'agent de durcissement (10:1 w/w) a été préparé (Figure 30.a). Ensuite, un dégazage complet du mélange préparé a été effectué pour assurer l'élimination complète des bulles d'air, ce qui pourrait ensuite créer des problèmes de défaut sur le tampon du PDMS (Figure 30.b). Après cela, le mélange PDMS a été versé dans la station de moulage et polymérisé à 100 ° C pendant 90 minutes (Figures 30.c d e f et g). Enfin, le tampon PDMS a été décollé du poste de moulage portant les micro-motifs sur sa surface (Figure 30.h). Une amplification avec un ordre de grandeur de 60 fois a été appliqué en utilisant la lumière blanche afin d'assurer la fabrication des motifs sur le tampon fabriqué (Figure 31). Le tampon préparé a été encré à travers son immersion pendant 20 min dans l'octadécylmercaptan (Figure 32.a) suivi d'un séchage sous flux d'azote pendant 2 min. Les motifs d'octadécyl mercaptan ont été imprimés par microcontact pendant 10 min sur le substrat en or (Figures 32.b et 32.c). Par la suite, le thiol-azide (HS-C₁₁-EG₄-N₃) a été auto-assemblé sur le substrat d'or (Figure 32.d). L'excès de thiol-azide a ensuite été éliminé par un rinçage en éthanol et les groupes d'azide terminaux ont réagi avec la dibenzocyclooctyne-amine (chimie click sans cuivre) (Figure 32.e). Les groupements carboxyliques des anticorps ont été

simultanément activés dans un mélange EDC (0,4 M)/NHS (0,1 M) préparé en PBS pendant 1 h. Après cela, le biocapteur fonctionnalisé par le DBCO-NH₂ a été incubé dans la solution susmentionnée des anticorps anti-IL-10 (10 µg/mL) pendant 1 h à 4 °C (Figure 32.f). Après trois rinçages avec du PBS, le biocapteur élaboré a été incubé dans de l'éthanolamine à 0,1 % pendant (30-40 min) à 4 °C. Cette étape est importante pour bloquer les groupes carboxyliques actifs restants afin d'éviter toute liaison non spécifique. Par la suite, le substrat d'or modifié a été incubé dans l'Ag-IL-10 (2,5 µg / mL, préparé dans le PBS) pendant 1 h (Figure 32.g). Pour terminer, le substrat fonctionnalisé a été incubé dans la solution d'anticorps polyclonal conjugué à Alexa Fluor 488 (1 µg/mL, préparé dans le PBS) pendant 1 h à 4 °C (Figure 32.h). Un rinçage avec du PBS a été effectué suivi d'un séchage avec un flux d'azote pour être analysé par la microscopie à fluorescence.

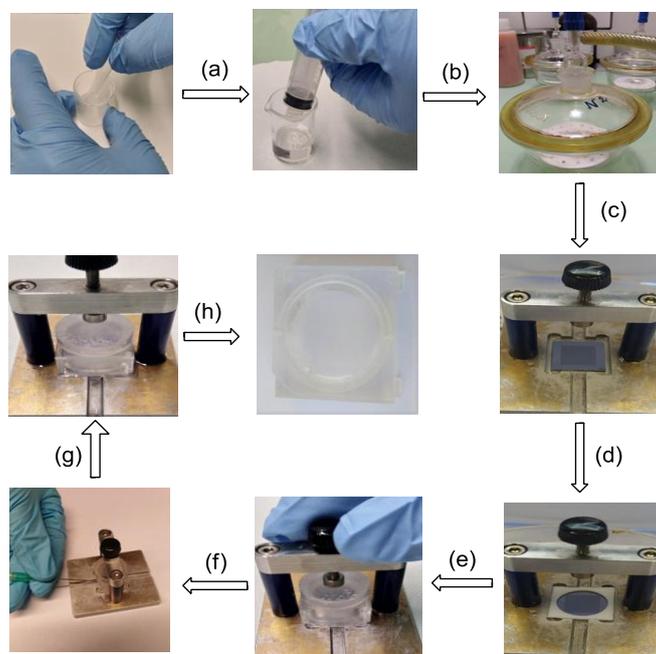


Figure 30. Montage pas à pas du poste de moulage : a) mélange du mélange PDMS et aspiration de la solution avant dégazage b) dégazage c) positionnement du support, d) positionnement du joint Téflon, e) fixation du tampon et de son bouchon, f) injection du mélange g) poste de moulage après polymérisation et h) tampon PDMS

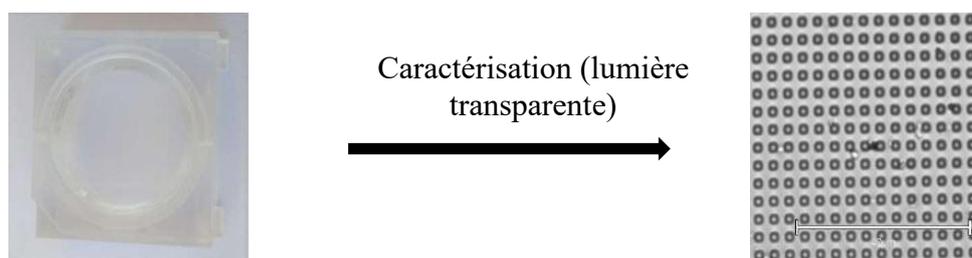


Figure 31. Tampon de PDMS et l'amplification de ses micro-motifs (grossissement ×60)

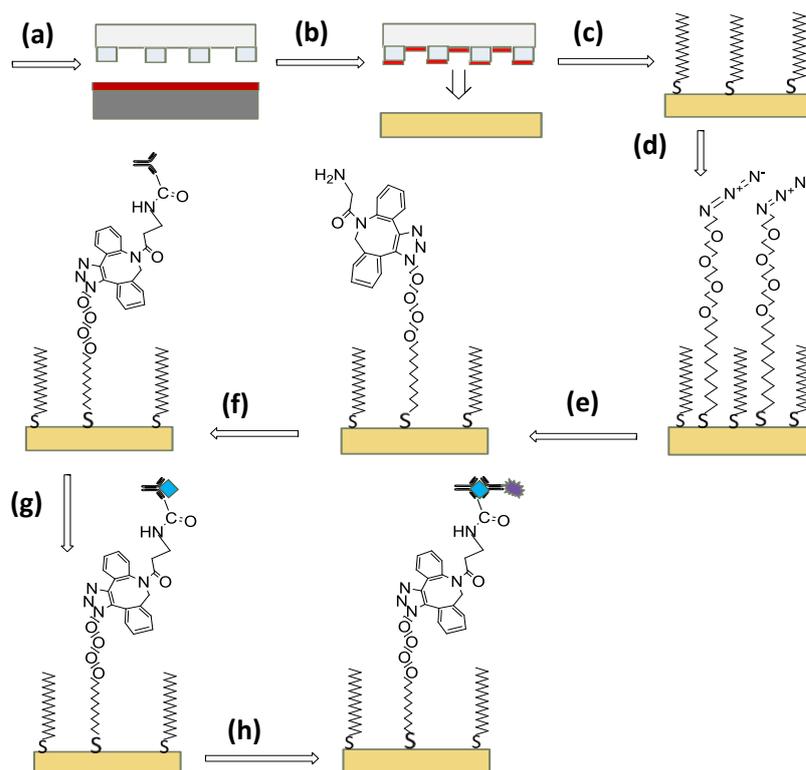


Figure 32. Principales étapes de la fonctionnalisation du substrat en or a) encrage du tampon PDMS b) estampage, c) thiol-CH₃ imprimé par microcontact, incubation dans d) thiol-azide e) DBCO-NH₂ f) mAb-IL-10 g) Antigène Ag- IL-10 et h) Anticorps fluorescent d'IL-10.

III.2.7. Nanoplotter

Le principe du nanoplotter se base sur l'aspiration de l'échantillon à partir d'une plaque de 96 puits à l'aide des pointes de pipettes piézoélectriques. Le volume d'aspiration dépend de l'application de spotting. Le logiciel du nanoplotter permet l'aspiration automatique des échantillons, le lavage intermédiaire et le rinçage final des micro-pipettes après sa programmation. La figure 33 montre les étapes d'alimentation et d'évacuation de liquide du système durant un cycle de dépôt d'une micro-goutte.

Pour le nanoplotter, la puce utilisée pour la caractérisation électrochimique décrite auparavant a été remplacée par un carré d'or de 1,2x1,2 cm² (Figure 34) qui a reçu le même traitement et fonctionnalisation qu'au paragraphe III.2.5 depuis l'étape de nettoyage jusqu'à l'activation par EDC /NHS. La solution des anticorps anti-IL-10 (10 µg/mL) a été préparée dans un tampon PBS et transférée dans une plaque de 96 puits.

Le nanoplotter a été utilisé pour déposer des pico-gouttelettes de mAb-IL-10 à des endroits précis sur le grand carré d'or. Les paramètres de la pointe piézoélectrique de la machine utilisés

sont 60 V et 100 Hz pour le courant et la largeur d'impulsion respectivement. Ces paramètres ont été choisis pour le dépôt des pico-gouttelettes. 12 spots d'une goutte d'environ 1000 pL ont été déposés comme indiqué sur la figure 34. Après le dépôt des anticorps, tout le carré d'or a été retiré du nanoplotter pour les étapes suivantes. Pour cela, le carré d'or entier a été incubé dans une solution d'éthanolamine (0,1% dans du PBS) pendant 30 min à 4 °C. Ensuite, il a été incubé dans une solution d'Ag-IL-10 à 2,5 µg/mL pendant 1 h à 4 °C. Enfin, l'anticorps polyclonal conjugué par Alexa Fluor 488 (1 µg/mL) a été déposé sur le substrat puis incubé pendant 1 h à 4 °C. La détection a été réalisée par une lumière verte GFP avec une excitation/émission de 470/525 nm.

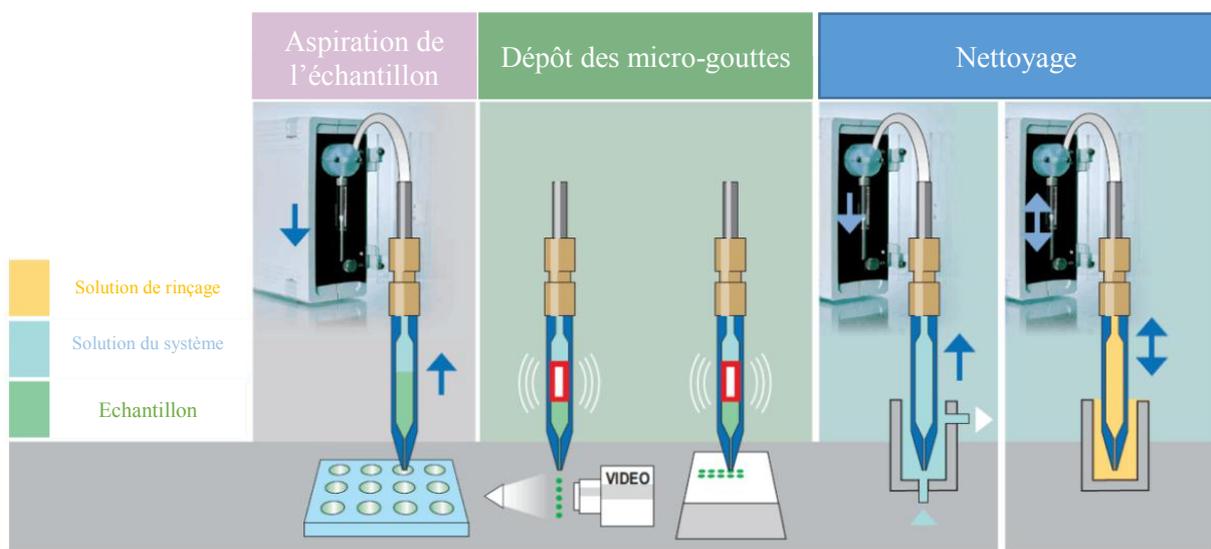


Figure 33. Schéma d'un cycle de dépôt d'une micro-goutte avec les étapes d'alimentation et d'évacuation de liquide du système (reproduit du site de Gesim bioInstruments).

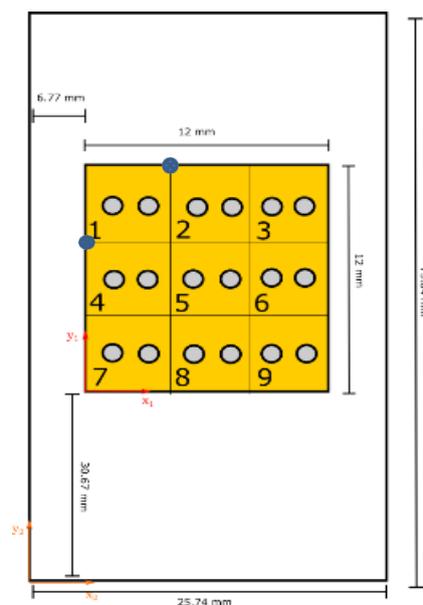


Figure 34. Image du nanoplottter à gauche. Paramètres du nanoplottter pour le dépôt de gouttes, avec axe configuré pour le dépôt de gouttes (axe sur la puce d'or) et axe défini pour la position du site (axe sur le rectangle en verre (support pour la puce d'or)) à droite.

III.2.8. Mesure de l'angle de contact (CAM)

Les mesures d'angle de contact ont été effectuées à l'aide d'un appareil *Digidrop de Dataphysics Instruments Gmb*. Une gouttelette de 5 μL d'eau désionisée a été déposée sur la surface de la puce d'or avec un débit de 0,1 $\mu\text{L/s}$ (très lent), les données ont été enregistrées par le logiciel SCA20. Le CAM a été mesuré trois fois après chaque étape de modification de surface.

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La technique FTIR a été utilisé pour surveiller et suivre la fonctionnalisation de l'immunocapteur développé à chaque étape. Comme le montre la figure 35, le spectre 35.a représente les vibrations de l'or non modifié. Dans le spectre 35.b un pic d'absorbance à 2115,27 cm^{-1} est observé, cela correspond à l'absorption d'azide, confirmant ainsi l'existence d'une monocouche assemblée et la présence de la liaison $-\text{N}=\text{N}+=\text{N}-$, la bande de vibration observé à 1152,85 cm^{-1} est peut-être due à l'étirement C-O du groupe glycol dans la chaîne thiol-azide (Gouget-Laemmel et al., 2013 ; Yaakov et al., 2017). Par conséquent, le thiol-azide s'est auto-assemblé sur le substrat d'or. Le spectre 35.c montre une légère déformation de 1152,85 cm^{-1} à 1134,20 cm^{-1} qui peut être due au cycle aromatique dans DBCO-COOH, aussi une diminution de l'intensité correspondant à l'étirement de l'azoture confirmant le couplage par clic. De plus, une augmentation a été remarquée à 3457,30 cm^{-1} sur le spectre 35.d, qui est liée à la région de

l'étirement O-H qui peut être due aux groupes carboxyliques activés de DBCO-COOH et un pic à $1668,3\text{ cm}^{-1}$ lié à l'NHS (Gouget-Laemmel et al., 2013). Enfin, après incubation dans mAb-IL-10 (Spectre. 35.e) il met en évidence les bandes d'amines secondaires s'étendant de l'anticorps ($\text{C}=\text{O}$ à 1681 cm^{-1} , N-H et CN à 1533 cm^{-1}). Par conséquent, nous avons confirmé la fonctionnalisation du substrat d'or.

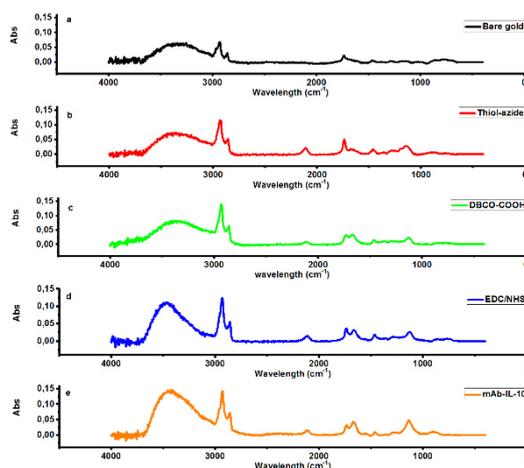


Figure 35. Spectres FTIR de (a) Au nu, (b) Au/thiol-azide (c) Au/thio-azide/DBCO-COOH (d) Au/thiol-azide/DBCO-COOH/EDC/NHS et (e) Au /thiol-azide/DBCO/mAb-IL-10 substrats.

III.3.2. Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence a été utilisée pour étudier l'interaction immunitaire entre l'anticorps marqué par fluorescence et l'antigène Ag-IL-10 (Ab^*-Ag). L'anticorps fluorescent spécifique à l'antigène IL-10 a été utilisé pour interagir avec les sites actifs de la surface où les anticorps ont été déposés en utilisant le nanoplotter d'une part (paragraphe III.2.7), ou d'interagir avec les endroits non bloqués dans le cas de micro-tamponnage (paragraphe III.2.6) d'un autre côté.

Pour le micro-tamponnage, l'anticorps fluorescent a été utilisé pour interagir avec des endroits non bloqués. Comme le montre la figure 36, les motifs en verts indiquent l'endroit où l'anticorps a été exactement immobilisé, mais les zones éteintes correspondaient aux zones bloquées par l'octadécyl mercaptan (Lee et al. 2012). Le raisonnement est le même pour le nanoplotter, et comme il est indiqué dans la figure 37, La tâche verte indique l'endroit où l'anticorps anti-IL-10 a été immobilisé, tandis que les zones éteintes en dehors de la tâche fluorescente correspondent à des zones non fonctionnalisées avec l'anti-IL-10, autrement dit, les zones où le reste des groupes carboxyliques activés ont été bloqués avec de l'éthanolamine.

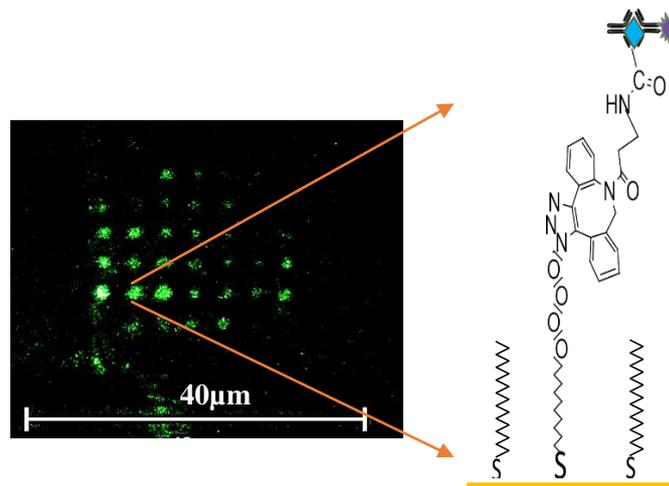


Figure 36. Image de fluorescence obtenue après incubation dans l'anticorps conjugué Alexa Fluor® 488 (1 µg/mL)

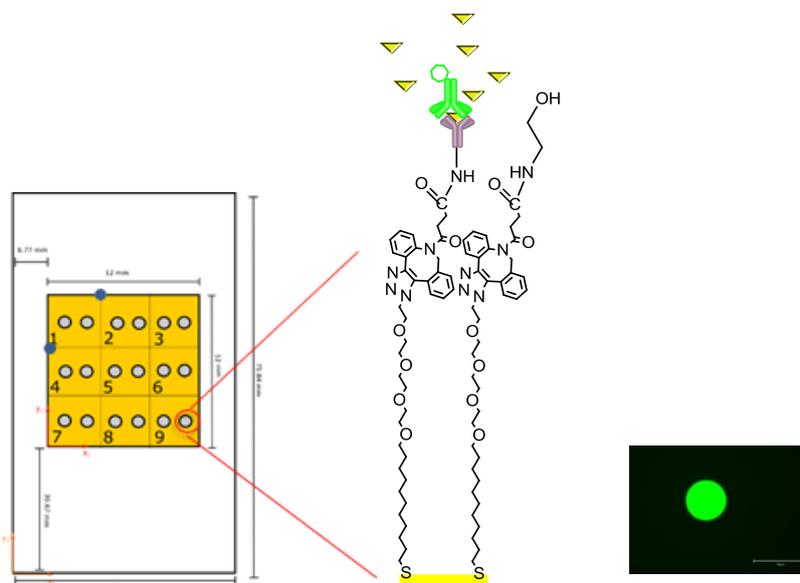


Figure 37. Les images fluorescentes correspondant à l'anticorps conjugué Alexa Fluor® 488 (1 µg/mL) se lie biologiquement à l'Ag-IL-10 qui est immobilisé sur le substrat en or.

III.3.3. Angle de contact

La figure 38 montre que la mesure d'angle de contact de l'or nu est de 78,73 °. Après nettoyage, l'angle de contact s'est avéré être de 64,17 °, ce qui indique une augmentation de l'hydrophilie de la surface comme prévu (Barhoumi et al. 2017). Alors qu'après l'incubation dans l'azoture de thiol, l'angle a modérément chuté à 62,30 °. De plus, après DBCO-COOH, l'angle a encore diminué à 54,63 ° ce qui est probablement dû à la présence du groupe -COOH et des cycles

benzéniques dans DBCO-COOH. L'angle de contact augmente à 58,90 ° après incubation dans EDC/NHS. Une augmentation supplémentaire de l'angle de contact jusqu'à 60,20° a été observée après l'incubation dans l'anticorps mAb-IL-10, qui peut être dû à la formation de liaison amide (Lee et al. 2012).

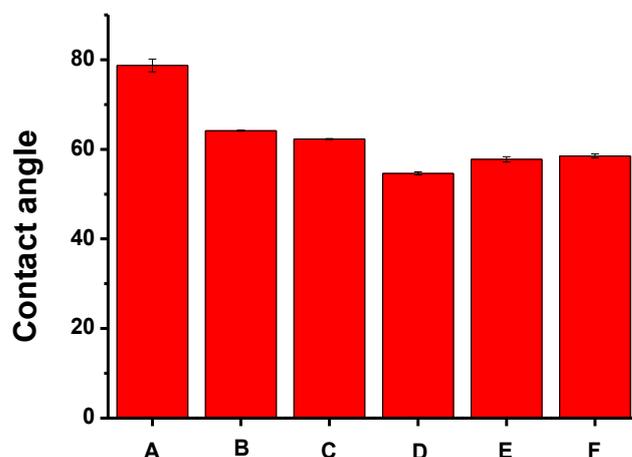


Figure 38. Image de A) Or nu avant nettoyage, B) Or nu après nettoyage, C) HS-C₁₁-EG₄-N₃, D) DBCO-COOH, E) EDC/NHS, F) mAb-IL-10

III.3.4. Mesures électrochimiques

III.3.4.1. Caractérisation électrochimique de la microélectrode de travail modifiée

Les techniques CV et l'SIE ont été utilisées pour la caractérisation et le suivi de la fonctionnalisation de l'électrode de travail en or étape par étape. Les mesures ont été réalisées dans une solution de 5 mM de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] préparée dans le tampon PBS à pH 7,4. Comme le montre la figure 39.A, des pics redox bien définis et réversibles du [Fe(CN)₆]^{3/4-} avec une intensité de courant maximale (7μA) ont été observés, dans le cas de l'électrode d'or non modifiée en raison de son excellent transfert d'électrons du couple redox utilisée sur la surface de l'électrode (courbe noire). Ensuite, l'intensité du courant a diminué après l'incubation de l'électrode dans la solution du thiol-azide, et le pic redox a radicalement changé de réversible à une forme capacitive confirmant le dépôt des monocouches auto-assemblées de thiol-azide sur la surface de l'électrode en or (courbe rouge), comme déjà décrit par (Diao et al., 1999). Le changement de résistance au transfert d'électrons lors du processus d'assemblage et de liaison a été confirmé par des mesures SIE (Figure 39.B, ligne rouge). Une nouvelle diminution de la résistance du transfert de charge a été observée avec l'ajout de DBCO-COOH, comme le montre la figure 39.B (ligne bleue). Cela est dû à l'augmentation du transfert

d'électrons interfacial par DBCO (Li et al., 2019) en raison de l'effet de conjugaison de la molécule puisque le transfert de charge est simplifié à travers la conjugaison pi (Hachmaoui et al., 2014). Cependant, le diamètre du demi-cercle a augmenté après une incubation supplémentaire dans mAb-IL-10 (Figure 39.B, ligne verte), ceci est lié à son effet d'inhibition sur le transfert d'électrons.

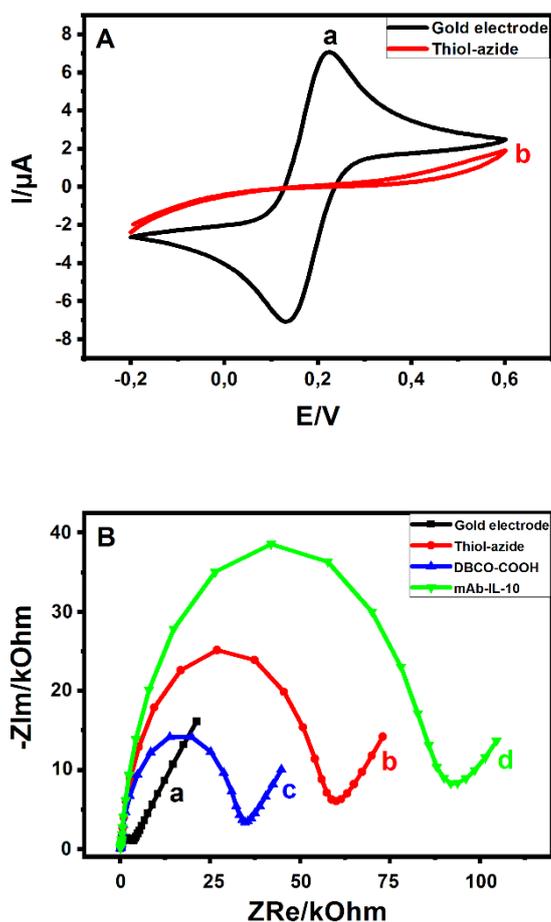


Figure 39. Voltammogrammes cycliques (A) et diagramme de Nyquist (B) obtenus pour différentes étapes de fonctionnalisation : (a) Électrode en or (ligne noire) ; (b) après incubation dans le thiol-azide; (c) acide dibenzocyclooctyne, et (d) après l'immobilisation de mAb-IL-10. Les mesures ont été effectuées à température ambiante (20 ± 2 °C) en utilisant 5 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (dans du PBS à pH 7,4) comme sonde rédox.

III.3.4.2. Optimisation de la concentration de DBCO-COOH

Le triazole formé lors de la réaction de chimie de clic en absence du cuivre est sensible au ratio de la réaction de clic (DBCO-COOH/azoture) qui pourrait influencer ultérieurement la sensibilité de détection. Afin d'obtenir un rendement élevé de cette réaction, différentes concentrations de DBCO-COOH (0,5 et 2 mM) avec 1 mM de $\text{HS-C}_{11}\text{-EG}_4\text{-N}_3$ ont été testées pour la détection d'Ag-IL-10 dans une gamme de concentration de 5–100 pg/mL. Les courbes

obtenues sont présentées à la figure 40.

Les données des demi-cercles du tracé de Nyquist ont été ajustées à l'aide du modèle de circuit équivalent de Randles ($R_1 + (Q_1 / (R_2 + W_1))$) (Barket et al. 2017), où : R_1 est la résistance de la solution, Q_1 est l'élément à phase constante, R_2 est la résistance de transfert de charge (R_{ct}) et W_1 est l'impédance de Warburg. Les données normalisées ont été présentées comme $\Delta R_{ct}/R_0$ (où $\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{Ag-IL-10}) - R_{ct}(\text{mAb-IL-10})$) et R_0 est la résistance de transfert de charge de l'électrode à son état initial) afin de comparer les mesures obtenues par SIE dans des conditions équivalentes. La figure 40.B montre une relation linéaire dans une gamme allant de 5 à 50 pg/mL avec les deux concentrations testées de DBCO-COOH avec un coefficient de corrélation de 0,9553 pour 0,5 mM et 0,9947 pour 2 mM. La concentration de DBCO-COOH de 0,5 mM s'est avérée la plus appropriée en raison d'une sensibilité plus élevée (une pente de 0,0076 contre 0.00116 obtenus en utilisant 0,5 et 2 mM de DBCO-COOH respectivement). Pour cela, la concentration de 0,5 mM de DBCO-COOH a été choisie pour la continuité de ce travail.

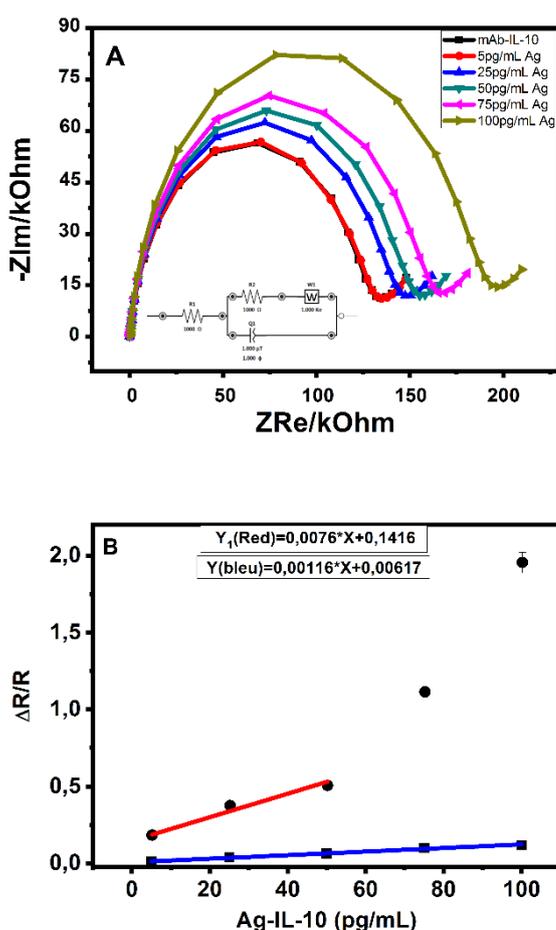


Figure 40. A) Tracé d'impédance de Nyquist dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pour la détection d'Ag-IL-10 à des concentrations de 5, 25, 50, 75 et 100pg/mL. B) Courbe de calibration avec 0.5mM de DBCO-COOH (ligne rouge) et 2mM of DBCO-COOH (ligne bleu)

III.3.4.3. Détection d'Ag-IL-10 sans marquage

Les performances analytiques de l'immunocapteur développée ont été étudiées à travers l'élaboration de la courbe d'étalonnage de l'Ag-IL-10 à différentes concentrations. Ainsi, après la liaison covalente de l'anticorps à la surface de l'électrode, le suivi de la détection d'Ag-IL-10 a été effectué via les tracés de Nyquist qui sont obtenus en utilisant la technique SIE (Figure 41.A).

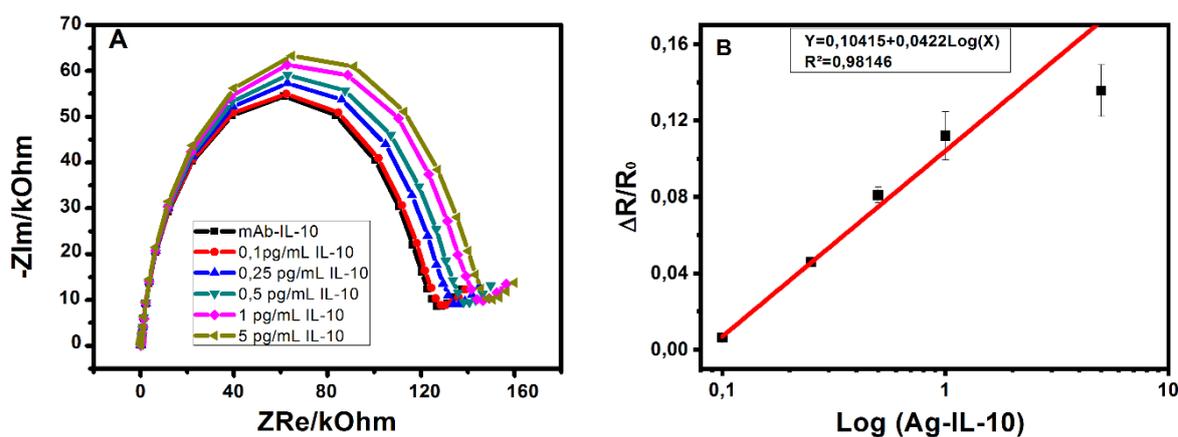


Figure 41. A) Diagrammes de Nyquist dans 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ pour la détection d'Ag-IL-10 à 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 pg/mL et B) Étalonage courbe des données normalisées de l'SIE après utilisation du modèle de circuit équivalent de Randles ($R_1+(Q_1/(R_2+W_1))$) pour la détection d'Ag-IL-10.

La figure montre une augmentation des semi-cercles de Nyquist après immobilisation de l'anticorps mAb-IL-10 sur l'électrode d'or, ainsi qu'après différentes incubations dans des concentrations croissantes d'Ag-IL-10. Ceci est dû à l'effet bloquant qui confirme la bio-reconnaissance de l'antigène Ag-IL-10 avec l'anticorps (mAb-IL-10) fixé à la surface de l'électrode.

Les demi-cercles du tracé de Nyquist ont été ajustés à l'aide du circuit équivalent de Randles décrit précédemment. La figure 41.B montre une variation linéaire de la résistance de transfert de charge $\Delta R/R_0$ en fonction de $\text{Log} [Ag-IL-10]$ dans une gamme de 0,1 pg/mL à 5 pg/mL avec un coefficient de corrélation de 0,9815 et une équation de régression de $Y = 0.10415 + 0.0422 * \text{Log}(X)$ avec un RSD de 10.67% (n=3) (Figure 41.B). La LOD a été estimée à 0.1pg/mL comme décrit par (Yammouri et al., 2017).

Par conséquent, l'immunocapteur proposé permet la détection d'Ag-IL-10 à des faibles

concentrations (0,1 pg/mL). De plus, le biocapteur développé permet une détection sans marquage sans étapes supplémentaires d'amplification ou de réactions enzymatiques évitant ainsi une analyse de longue durée.

Les performances analytiques du biocapteur développé sont comparées à ceux rapportées dans la littérature pour la détection de l'interleukine-10 comme le montre le Tableau 10.

Tableau 10. Comparaison du rendement analytique avec les données de la littérature

Capteur	Concentration de l'anticorps de capture	Méthode	Technique	Gamme de linéarité (pg/mL)	LOD (pg/mL)	référence
Si/Si ₃ N ₄ -(SPy-Ppy)/CMA/anti-IL-10 mAb	100 µg/mL	Sans marquage	SIE	1-10	0.347	Nessark et al., 2019
Microélectrode/CMA/mAb IL-10 interdéposé or	10 mg/mL	Sans marquage	SIE	-	-	(Baraket et al., 2012)
Microélectrode/CMA/mAb IL-10 interdéposé or	20 µg/mL	Sans marquage	SIE	1 - 15	1	(Baraket et al., 2013)
BioMEMS avec 8 électrodes d'or/CMA/mAb-IL-10	-	Sans marquage	SIE	1 - 15	1	(Baraket et al., 2014)
Gold microelectrode/CMA-mAb-IL-10	5 mg/mL	Sans marquage	SIE	1 - 15	0.1	(Baraket et al., 2016)
Gold microelectrode/MHDA/mAb-IL-10	10 mg/mL	Sans marquage	SIE	1 - 15	0.1	(Baraket et al., 2016)
PPy-µWs/ GA /rh Anti-IL-10 (mAb)	10 µg/mL	Sans marquage	SIE	1-50	0.122	Garcia-Cruz et al., 2015
HfO ₂ / TESUD/mAb-IL-10	10 µg/mL	Sans marquage	SIE	0.1–20	0.1	(Lee et coll., 2012)
Al ₂ O ₃ /APTES/MWCNTs-COOH-EDC-NHS/mAb-IL-10	10 µg/mL	Sans marquage	SIE	0.5– 200	0.5	(Lee et coll., 2014)
AuE/polyaniline/Ab-Fc	100 et 15 µg/mL	Indirect (mesure de l'oxydo-réduction)	CV-VNO	0,001 ng/mL - 50 ng/mL	0.78	Dou et coll., 2012

		du ferrocène)				
mAb-IL-10/Ag-IL-10/pAb-IL-10/phosphatase alcaline conjuguée streptavidine/+ 3-indoxylphosphate	6 µg/100 µL	enzymatique	ACAdSV	0.39-25	0.15	(Bengoechea Álvarez et al., 2001)
HS-C ₁₁ -EG ₄ -N ₃ /DBCO-COOH/mAb-IL-10	10 µg/mL	Sans marquage	SIE	0.1-5	0.1	Présent travail

Ab* : Anticorps conjugué IL-10 Alexa FluorMD 488; Ab-Fc : anticorps fonctionnalisé avec du ferrocène; ACAdSV : tension d'adsorption de courant alternatif; APTMS : aminopropyl triméthoxysilane; RMR : acide 4-aminophénylacétique; DCC : N,N'- dicyclohexylcarbodiimide; dmAb*-IL-10 : anticorps monoclonal de l'interleukine-10 marqué de rhodamine; GA : glutaraldehyde ; MHDA : acide mercaptohexadécanoïque; NHS : N-hydroxysuccinimide; pNPP : *p*-nitrophényl phosphate; PPy-µWs : microfils de polypyrrole; Ppy : polypyrrole; Ppy-NWs : nanofils de polypyrrole; SIE : spectroscopie d'impédance électrochimique; Si₃N₄ : silicium nitride; SiO₂-NW : nanofils de silice; SPy : pyrrole-silane; TESUD : aldehyde-silane ((11-(triéthoxysilyl) undecanal

III.3.4.4. Etude d'interférence

Pour étudier la sélectivité du biocapteur développé, des tests supplémentaires ont été effectués en analysant des solutions standard dopées par une autre cytokine (TNF- α), qui pourraient être sécrétées au stade aigu de l'inflammation et qui peuvent également être détectées dans la salive. Pour cela, les mêmes conditions de mesure employées pour la détection d'Ag-IL-10 ont été utilisées pour cette analyse. Par conséquent, et en utilisant la procédure décrite précédemment pour la bio-fonctionnalisation des immunocapteurs, de nouveaux dispositifs ont été préparés et fonctionnalisés avec mAb-IL-10 pour être utilisés dans cette étude d'interférence. Comme on peut le voir sur la figure 42, la courbe de sélectivité (points rouges) présente une pente beaucoup plus faible que celle de sensibilité indiquant ainsi la bonne sélectivité du capteur en présence d'autres cytokines avec une sensibilité de 0,0422.

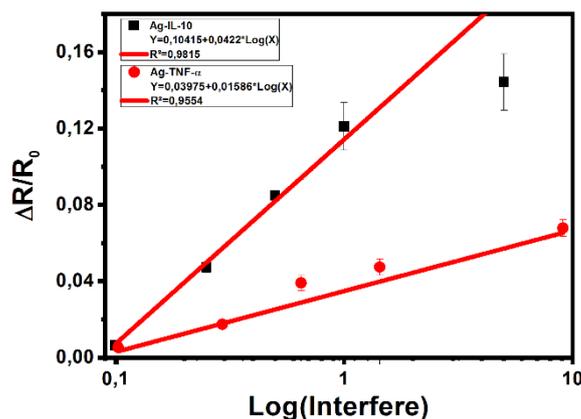


Figure 42. Présentation logarithmique des courbes de sensibilité du capteur à chimie clic en absence du cuivre fonctionnalisé avec mAb-IL-10 pour la détection du TNF- α (points rouges) et Ag-IL-10 (points noirs) à différentes concentrations (0.1; 0.25; 0.5; 1 et 5 $\mu\text{g/mL}$).

III.3.4.5. Analyse d'un échantillon de salive dopé

Une combinaison entre l'SIE et la méthode des ajouts dosés a été utilisée afin d'estimer la concentration d'Ag-IL-10 dans un échantillon inconnu de salive réelle.

Afin de déterminer la quantité d'Ag-IL-10 dans la salive réelle par la méthode des ajouts dosés, un volume constant de 50 μL de salive réelle (sans covid) a été ajouté à chacun des six Eppendorfs de 1,5 mL. Pour atteindre un volume final de 1 mL, 950 μL de PBS ont été ajoutés au premier Eppendorf contenant l'échantillon inconnu. Une solution étalon d'Ag-IL-10 a ensuite été ajoutée en volumes croissants correspondant à 0,1-0,25-0,5-1 et 5 $\mu\text{g/mL}$ respectivement aux cinq autres eppendorfs et chaque Eppendorf a été complété à 1 mL avec du PBS. Le même protocole a été répété avec une salive dopée à 84 $\mu\text{g/mL}$, ce qui correspond à 4,2 $\mu\text{g/mL}$ dans le volume final de 1 mL (facteur de dilution =20). L'immunocapteur préparé a été incubé dans chaque concentration pendant 30 minutes à 4 ° C, puis les mesures ont été effectuées par la méthode SIE comme cela a déjà été expliqué dans la section III.2.4.

Après l'ajustement linéaire des diagrammes de Nyquist (figure 43.A). Les équations de régression dans ces cas étaient $\Delta R_{ct}/R_0=4,15475+1,01844*\text{Log}[\text{Ag-IL-10}]$ (salive non dopée) et $\Delta R_{ct}/R_0=9,88312+1,02202*\text{Log}[\text{Ag-IL-10}]$ (salive dopée) comme le montre la figure 43.B. Les coefficients de corrélation correspondants sont respectivement de 0,9768 et 0,9515 pour la salive réelle non dopée et dopée. Ces équations ont été utilisées pour déterminer la concentration d'Ag-IL-10 dans la salive en calculant la valeur d'Ag-IL-10 lorsque $\Delta R_{ct}/R_0=0$ et après avoir pris en compte le facteur de dilution (20 fois), elles ont donné environ 0 $\mu\text{g/mL}$ (0,0016 $\mu\text{g/mL}$) pour la première équation et 4,27 $\mu\text{g/mL}$ pour la deuxième équation.

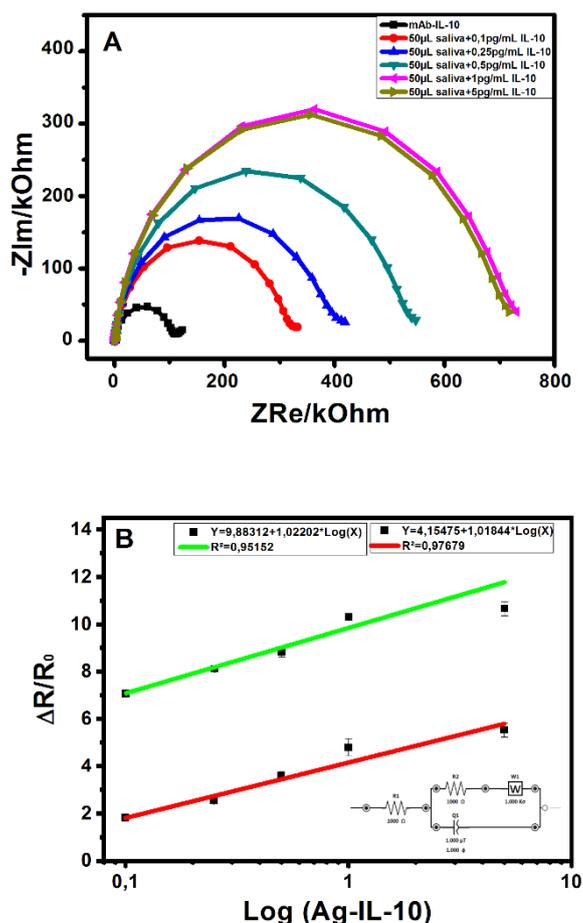


Figure 43. Tracés d'impédance de Nyquist dans 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ pour la détection d'Ag-IL-10 dans la salive réelle avec des concentrations supplémentaires d'Ag-IL-10 de 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 pg/mL et B) Courbe d'étalonnage des données normalisées de l'SIE après utilisation du modèle de circuit équivalent de Randles ($R_1 + (Q_1 / (R_2 + W_1))$) pour la détection d'Ag-IL-10 à 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 5 pg/mL dans de la salive réelle non dopée (ligne rouge) et de la salive dopée avec 84 pg/mL d'Ag-IL-10 (ce qui correspond à 4,2 pg/mL après dilution de la salive 20 fois) (ligne verte).

III.4. Conclusions

L'évaluation et le développement d'un nouveau immunocapteur sensible et sélectif basé sur la chimie du clic sans cuivre pour la surveillance de l'Ag-IL-10 dans la salive ont été présentés et discutés ici. La stratégie implique la liaison de DBCO-COOH sur un thiol-azide assemblé sur une électrode en or qui peut se lier ultérieurement à l'anticorps monoclonal (mAb-IL-10). De plus, cette approche permet une reproductibilité élevée, la spécificité du cyclooctyne vis-à-vis de l'azide, la stabilité du triazole formé et la bio-orthogonalité (Kluger et al., 2010). La détection a été réalisée par une méthode sans étiquette utilisant la technique SIE. Le niveau d'interférences liées à la liaison non spécifique était acceptable puisqu'une bonne sélectivité et spécificité étaient observés lors de la détection des autres cytokines (TNF- α).

Des mesures expérimentales ont été effectuées dans $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, confirmant la capacité de l'immunocapteur développé à détecter l'Ag-IL-10 dans la salive réelle, montrant une linéarité entre la résistance au transfert de charge et le logarithme des concentrations croissantes liées à Ag-IL-10. Ainsi, l'immunocapteur proposé représente un outil électro-analytique prometteur pour une détection précise de l'Ag-IL-10 dans la salive.

Références

- Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, Z., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Accrombessi, M. M. K., ... Murray, C. J. L., 2018. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858.
- Abe, K., Takiguchi, H., & Tamada, K. (2000). Dynamic Contact Angle Measurement of Au (111) - Thiol Self-Assembled Monolayers by the Wilhelmy Plate Method Self-assembled monolayers (SAMs) composed of thiol derivatives on gold have been an issue attracting animated research in advanced surface sci. 111, 2394–2397.
- Álvarez, M. J. B., Bobes, C. F., Abedul, M. T. F., Costa-García, A., 2001. Sensitive detection for enzyme-linked immunosorbent assays based on the adsorptive stripping voltammetry of indigo in a flow system. *Analytica chimica acta*, 442(1), 55-62.
- Asmatulu, R., Khan, W. S., 2019. Characterization of electrospun nanofibers. *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*, 257–281
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Sigaud, M., Bausells, J., Errachid, A., 2017. A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 93, 170-175.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Sigaud, M., Yaakoubi, N., Trivella, M. G., Zabala, M., Bausells, J., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., 2013. Diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates for impedimetric cytokine detection with an integrated Ag/AgCl reference electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 189, 165-172.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Trivella, M. G., Zabala, M., Bausells, J., Sigaud, M., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., 2014. A fully integrated electrochemical BioMEMS fabrication process for cytokine detection: Application for heart failure. *Proc. Eng*, 87, 377-379.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Yaakoubi, N., Bausells, J., Errachid, A., 2016. A flexible electrochemical micro lab-on-chip: application to the detection of interleukin-10. *Microchimica Acta*, 183(7), 2155-2162.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Yaakoubi, N., Trivella, M. G., Zabala, M., Bausells, J., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., 2012. Cytokine detection using diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates with integrated Ag/AgCl reference electrode. *Procedia Engineering*, 47, 1181-1184.
- Barhoumi, L., Baraket, A., Nooredeen, N. M., Ali, M. Ben, Abbas, M. N., Bausells, J., & Errachid, A. (2017). Silicon Nitride Capacitive Chemical Sensor for Phosphate Ion Detection Based on Copper Phthalocyanine – Acrylate-polymer. *Electroanalysis*, 29(6), 1586–1595.
- Bausells, J., Ben Halima, H., Bellagambi, F.G., Alcacer, A., Pfeiffer, N., Hangouët, M., Zine, N., Errachid, A., 2021. On the impedance spectroscopy of field-effect biosensors. *Electrochemical Science Advances*, e2100138.
- Bellagambi, F.G., Degano, I., Ghimenti, S., Lomonaco T, Dini, V., Romanelli, M., Mastorci, F., Gemignani, A., Fuoco, R., Di Francesco, F., 2018. Determination of salivary α -amylase

- and cortisol in psoriatic subjects undergoing the Trier Social Stress Test. *Microchemical Journal*, 136, 177-184.
- Bellagambi, F.G., Lomonaco, T., Salvo, P., Vivaldi, F., Hangouët, M., Ghimenti, S., Biagini, D., Di Francesco, F., Fuoco, R., Errachid, A., 2020. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115781.
- Bellagambi, F.G., Petersen, C., Salvo, P., Ghimenti, S., Biagini, D., Hangouët, M., Trivella, M.G., Di Francesco, F., Paolicchi, A., Erracid, A., Fuoco, R. & Lomonaco, T., 2021. Determination and stability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in saliva samples for monitoring heart failure. *Scientific Reports*, 11, 13088.
- Ben Halima, H., Bellagambi, F.G., Alcacer, A., Pfeiffer, N., Heuberger, A., Hangouët, A., Zine, N., Bausells, J., Elaissari, A., Errachid, A., 2021. A silicon nitride ISFET based immunosensor for tumor necrosis factor-alpha detection in saliva. A promising tool for heart failure monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 1161, 338468.
- Devaraj, N. K., & Finn, M. G., 2021. Introduction: Click Chemistry. *Chemical Reviews*, 121(12), 6697-6698.
- Devaraj, N. K., 2018. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Central Science*, 4(8), 952–959.
- Diao, P., Jiang, D., Cui, X., Gu, D., Tong, R., Zhong, B., 1999. Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and ac impedance. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464, 61-67.
- Dou, Y. H., Haswell, S. J., Greenman, J., Wadhawan, J., 2012. Voltammetric immunoassay for the detection of protein biomarkers. *Electroanalysis*, 24(2), 264-272.
- El Hassani, N. E. A., Baraket, A., Boudjaoui, S., Neto, E. T. T., Bausells, J., El Bari, N., Bouchikhi, B., Elaissari, A., Errachid, A., & Zine, N. (2019). Development and application of a novel electrochemical immunosensor for tetracycline screening in honey using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS. *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 330-337
- Garcia-Cruz, A., Lee, M., Zine, N., Sigaud, M., Bausells, J., & Errachid, A., 2015. Poly (pyrrole) microwires fabrication process on flexible thermoplastics polymers: Application as a biosensing material. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221, 940-950.
- Garcia-Cruz, A., Zine, N., Sigaud, M., Lee, M., Marote, P., Lanteri, P., Bausells, J., & Errachid, A. (2014). Controlled poly(pyrrole) patterning by microcontact printing on glass and poly(ethylene terephthalate) substrates. *Microelectronic Engineering*, 121, 167–174.
- Ghimenti, S., Lomonaco, T., Bellagambi, F. G., Biagini, D., Salvo, P., Trivella, M. G., Scali, M.C., Barletta, V., Marzilli, M., Di Francesco, F., Errachid, A., Fuoco, R., 2020. Salivary lactate and 8-isoprostaglandin F2 α as potential non-invasive biomarkers for monitoring heart failure: a pilot study. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Gouget-Laemmel, A. C., Yang, J., Lodhi, M. A., Siriwardena, A., Aureau, D., Boukherroub, R., Chazalviel, J. N., Ozanam, F., & Szunerits, S., 2013. Functionalization of azide-terminated silicon surfaces with glycans using click chemistry: XPS and FTIR study. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(1), 368–375.
- Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A., Hoes, A. W., 2020. Epidemiology of heart failure. *European journal of heart failure*, 22(8), 1342-1356.

- Guerrero, S., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M., 2020. Design of electrochemical immunosensors using electro-click chemistry. Application to the detection of IL-1 β cytokine in saliva. *Bioelectrochemistry*, 133, 107484.
- Guerrero, S., Cadano, D., Agüí, L., Barderas, R., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M., 2019. Click chemistry-assisted antibodies immobilization for immunosensing of CXCL7 chemokine in serum. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 837, 246-253.
- Hachmaoui, B., Dib, A., Berkani, W., 2014. Modélisation des spectres d'impédance électrochimique par circuits électriques équivalents. Application à la cémentation du cadmium sur électrode à disque tournant (Doctoral dissertation, University of bejaia).
- Hanna, A., Frangogiannis, N. G., 2020. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 34(6), 849-863.
- Jung, M., Ma, Y., Iyer, R. P., DeLeon-Pennell, K. Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M. R., & Lindsey, M. L., 2017. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic research in cardiology*, 112(3), 1-14.
- Katz, H. E., 2021. Antigen sensing via nanobody-coated transistors. *Nature Biomedical Engineering*, 5(7), 639-640.
- Kluger, R., 2010. Click chemistry for biotechnology and materials science.
- Kaur, K., Dhingra, S., Slezak, J., Sharma, A.K., Bajaj, A., Singal, P.K., 2009. Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart failure reviews*, 14(2), 113-123.
- Lee, M., Baraket, A., Zine, N., Zabala, M., Campabadal, F., Caruso, R., Trivella, M.G., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., 2014. A novel three- dimensional biosensor based on aluminum oxide: application for early-stage detection of human interleukin-10. In *Cytokine Bioassays* (pp. 49-64). Humana Press, New York, NY.
- Lee, M., Zine, N., Baraket, A., Zabala, M., Campabadal, F., Caruso, R., Trivella, M.G., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., 2012. A novel biosensor based on hafnium oxide: Application for early stage detection of human interleukin-10. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 175, 201-207.
- Li, J., Hu, K., Zhang, Z., Teng, X., Zhang, X., 2019. Click DNA cycling in combination with gold nanoparticles loaded with quadruplex DNA motifs enable sensitive electrochemical quantitation of the tuberculosis-associated biomarker CFP-10 in sputum. *Microchimica Acta* 186, 1-7.
- Lippi, G., & Sanchis-Gomar, F., 2020. Global epidemiology and future trends of heart failure. *AME Med J*, 5(15), 1-6.
- Meng, D., Han, S., Jeong, I. S., & Kim, S. W., 2019. Interleukin 10-secreting MSCs via TALEN-mediated gene editing attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*, 52(4), 728-741.
- Mackey, D., Kelly, E., Nooney, R., O'Kennedy, R., 2018. Direct immunoassays and their performance—theoretical modelling of the effects of antibody orientation and associated kinetics. *Integrative Biology*, 10(10), 598-604.
- McKay, C. S., & Finn, M. G., 2014. Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chemistry & biology*, 21(9), 1075-1101.

- Miettinen, K. H., Lassus, J., Harjola, V. P., Siirilä-Waris, K., Melin, J., Punnonen, K. R., Nieminen, M.S., Laakso, M., & Peuhkurinen, K. J., 2008. Prognostic role of pro-and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms in acute decompensated heart failure. *European journal of heart failure*, 10(4), 396-403.
- Nessark, F., Eissa, M., Baraket, A., Zine, N., Nessark, B., Zouaoui, A., Bausells, J., & Errachid, A., 2020. Capacitance Polypyrrole-based Impedimetric Immunosensor for Interleukin-10 Cytokine Detection. *Electroanalysis*, 32(8), 1795-1806.
- Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., Mohapatra, E., 2016. Biosensors in health care: the milestones achieved in their development towards lab-on-chip-analysis. *Biochemistry research international*, 2016.
- Selleck, M. J., Senthil, M., Wall, N. R., 2017. Making meaningful clinical use of biomarkers. *Biomarker insights*, 12, 1177271917715236.
- Sharma, S., Byrne, H., & O'Kennedy, R. J., 2016. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 9-18.
- Shen, M., Rusling, J. F., Dixit, C. K., 2017. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development. *Methods*, 116, 95-111.
- Shirazi, L. F., Bissett, J., Romeo, F., & Mehta, J. L., 2017. Role of inflammation in heart failure. *Current atherosclerosis reports*, 19(6), 1-9.
- Simundic, A.M., Bölenius, K., Cadamuro, J., Church, S., Cornes, M.P., van Dongen-Lases, E.C., Eker, P., Erdeljanovic, T., Grankvist, K., Guimaraes, J.T., Hoke, R., Ibarz, M., Ivanov, H., Kovalevskaya, S., Kristensen, G.B.B., Lima-Oliveira, G., Lippi, G., von Meyer, A., Nybo, M., De la Salle, B., Seipelt, C., Sumarac, Z., Vermeersch, P.; Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) and Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI). Joint EFLM-COLABIOCLI, 2018. *Clin. Chem. Lab. Med.* 56, 2015–2038.
- Virani, S.S., Alonso, A., Aparicio, H.J., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., Carson, A.P., Chamberlain, A.M., Cheng, S., Delling, F.N., Elkind, M.S.V., Evenson, K.R., Ferguson, J.F., Gupta, D.K., Khan, S.S., Kissela, B.M., Knutson, K.L., Lee, C.D., Lewis, T.T., Liu, J., Shane Loop, M., Lutsey, P.L., Ma, J., Mackey, J., Martin, S.S., Matchar, D.B., Mussolino, M.E., Navaneethan, S.D., Marma Perak, A., Roth, G.A., Samad, Z., Satou, G.M., Schroeder, E.B., Shah, S.H., Shay, C.M., Stokes, A., VanWagner, L.B., Wang, N.-Y., Tsao, C.W., and On behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, 2021. *Circulation*. 143, e254–e743.
- Vozgirdaite, D., Ben Halima, H., Bellagambi, F. G., Alcacer, A., Palacio, F., Jaffrezic-Renault, N., Zine, N., Bausells, J., Elaissari, A., Errachid, A., 2021. Development of an ImmunoFET for Analysis of Tumour Necrosis Factor- α in Artificial Saliva: Application for Heart Failure Monitoring. *Chemosensors*, 9(2), 26.
- Welker, R. W., 2012. Size analysis and identification of particles. In *Developments in Surface Contamination and Cleaning*, 4, 179-213. William Andrew Publishing.
- Yaakov, N., Chaikin, Y., Wexselblatt, E., Tor, Y., Vaskevich, A., Rubinstein, I., 2017. Application of Surface Click Reactions to Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensing. *Chemistry - A European Journal*, 23(42), 10148–10155.
- Yamaoka, M., Yamaguchi, S., Okuyama, M., Tomoike, H. (1999). Anti-inflammatory Cytokine Profile in Human Heart Failure Behavior of Interleukin-10 in Association with Tumor

Necrosis Factor-Alpha. *Japanese circulation journal*, 63(12), 951-956.

Yammouri, G., Mandli, J., Mohammadi, H., Amine, A., 2017. Development of an electrochemical label-free biosensor for microRNA-125a detection using pencil graphite electrode modified with different carbon nanomaterials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 806, 75-81.

Chapitre IV : Développement de nouveaux immunocapteurs basés sur la chimie clic en absence du cuivre pour la détection d'IgG spécifiques associées à des allergènes de cacahuètes et de noisettes dans le sérum.

Résumé

La consommation d'allergènes alimentaires peut déclencher une réponse immunologique négative qui se traduit par une variété de symptômes cliniques impliquant le système respiratoire, les troubles gastro-intestinaux et/ou la peau. En conséquence, le niveau des anticorps spécifiques des allergènes (IgG et/ou IgE) augmente. Le présent travail décrit le développement de deux nouveaux immunocapteurs électrochimiques pour la détection des IgG spécifiques aux allergènes des cacahuètes et des noisettes dans les sérums de lapin et de l'être humain. Sept peptides fonctionnalisés ont été testés en termes de sensibilité et de spécificité pour la détection des allergènes. La première stratégie a consisté à immobiliser la dibenzocyclo-octyne amine (DBCO-NH₂) par liaison covalente avec l'acide 4-aminophénylacétique déjà électrodéposé sur la surface d'une électrode en or. Ensuite, les peptides fonctionnalisés par des groupements azide étaient couplés au DBCO-NH₂ par une approche de chimie click en absence du cuivre comme catalyseur. La microscopie de fluorescence, la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS) ont été tous utilisées afin de valider la bonne fonctionnalisation de l'électrode en or. De plus, une caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été réalisée pour suivre l'interaction anticorps IgG de lapin anti-cacahouète et anti-noisette.

La deuxième stratégie est similaire à la première avec un remplacement de l'acide 4-aminophénylacétique par l'acide mercaptohexadécanoïque.

Mots clés : Allergènes alimentaires, immunocapteur, chimie click sans cuivre, sérum de lapin, sérum humain, IgG, spectroscopie d'impédance électrochimique.

IV.1. Introduction

Les allergènes peuvent être définis comme des éléments qui provoquent une réaction immunitaire. Seules des traces de ceux-ci peuvent entraîner une réaction immunitaire indésirable chez les patients allergiques aux IgE et/ou IgG provenant d'une hypersensibilité immunologique. Une réaction allergique immédiate peut être provoquée par les IgE, contrairement aux IgG qui prennent des heures, voire des jours (3 jours).

De nos jours, les allergies alimentaires touchent une grande partie de la population mondiale. L'organisation mondiale des allergies (WAO) a estimé en 2013 que jusqu'à 550 millions de personnes sont affectées par des allergies alimentaires (Ruby Pawankar Giorgio et al. 2013). Parmi elles, les allergies aux fruits à coque sont les plus fréquentes et sont considérées comme un problème de santé publique en raison de leurs conséquences graves. Leur nombre a augmenté de 21 % entre 2010 et 2017 (American College of Allergy). Seuls trente pour cent des pédiatres suivent pleinement les directives pour traiter les jeunes patients (Ann & Robert H. Lurie).

Le diagnostic des allergies alimentaires, notamment aux fruits à coque, est assez compliqué en raison des innombrables symptômes associés aux fruits à coque, qui touchent souvent le système respiratoire (rhinite, asthme), le tractus gastro-intestinal (vomissements et/ou diarrhée) et la peau (urticaire, dermatite atopique) (Alves, R. C. et al. 2015). En raison de la gravité des effets générés par cette maladie, la meilleure façon de la gérer est d'éviter les allergènes et de traiter les symptômes une fois diagnostiqués.

La consommation directe n'est pas le seul danger, la contamination croisée est également un risque d'ingérer des traces de noix et d'engager une réaction allergique. Il devient de plus en plus important de développer de nouvelles méthodes de détection des allergènes spécifiques aux immunoglobulines.

De nombreuses méthodes ont été développées pour la détection des allergènes alimentaires. Les immuno-essais présentent une sensibilité élevée basée sur l'interaction d'affinité entre les anticorps et les allergènes. L'ELISA fait partie des méthodes standard (Alpay, K et al. 2010) qui peuvent également être utilisées pour valider d'autres techniques de détection. Cependant, cette technique présente certaines restrictions liées à sa faible efficacité et spécificité. En revanche, les techniques de profilage multi-analyte (xMAP) et d'immuno-essai à flux latéral (LFIA) offrent un large potentiel d'application en raison de leur flexibilité et de leur rapidité de réaction (Chinnasamy, T et al. 2014 ; Liang, Z. Y et al.2020 ; Xu, J et al. 2021). Le LFIA permet

une détection sur site (portabilité, facilité d'utilisation), mais souffre d'un faible débit (Xu, J et al. 2021) ; à l'inverse du LFIA, le xMAP permet un débit élevé, mais il repose sur l'activité de l'anticorps (Harwanegg, C et al. 2004 ; Xu, J et al. 2021). La microbalance à cristaux de quartz (QCM) et la spectroscopie de résonance plasmonique de surface (SPR) ont été utilisées pour la quantification des IgE humaines liées à l'allergie (Su, X et al. 2004). La SPR induit une meilleure fiabilité et reproductibilité par rapport à la QCM puisque la fréquence de cette dernière technique peut être influencée par des fluctuations de température, des perturbations mécaniques ou même des changements de pression (Su, X et al. 2004).

Les biocapteurs électrochimiques, et en particulier les immunocapteurs basés sur l'affinité entre la sonde et la cible, où un anticorps immobilisé sur la surface de l'électrode se lie sélectivement avec l'analyte (cible), constituent une bonne alternative aux techniques mentionnées ci-dessus. La liaison peut être détectée par un changement de courant, de tension et/ou de résistance à la surface localisée. Les biocapteurs électrochimiques présentent de nombreux avantages tels que la rapidité, la simplicité, la sensibilité et la spécificité pour la détection d'immunoglobulines spécifiques aux allergènes (IgG ou IgE) (Morais, S et al. 2020 ; Mas et al., 2020). Récemment, Rusling et son équipe (Liu et al., 2010) ont eu l'intention de développer des réseaux de capteurs bioélectroniques basés sur des peptides pour mesurer les IgE multiples anti-petits pois. En bref, une électrode en graphite pyrolytique modifiée par un film dense d'AuNP a été fixée à une couche de peptide synthétique spécifique à l'épitope de liaison aux IgE provenant de Ara h2 (Liu et al., 2010).

La plupart des biocapteurs existants permettent la détection d'allergènes spécifiques des immunoglobulines par une approche simpleplex (Kreuzer, M. P et al. 2001 ; Park, M et al. 2020). Cependant, compte tenu des besoins des laboratoires cliniques, un diagnostic parallèle (multiplex) des maladies allergiques est fortement demandé (Mas et al., 2020). Pour cela, les technologies de réseaux sont considérées comme une approche utile pour l'identification de cibles multiples en une seule analyse. Plusieurs réseaux de protéines sont utilisés pour les tests sIgE parmi les puces planaires où les biopuces sont planaires avec les allergènes immobilisés sur la surface. La méthode conventionnelle consiste à nanodistribuer chaque allergène, qui peut être une protéine isolée ou recombinante, sur un tampon de nitrocellulose ou une lame de verre, puis à incuber l'échantillon sur la puce. Les mesures sont effectuées en enregistrant les intensités des spots provenant des fluorophores conjugués à l'anticorps secondaire, mais elles ne peuvent pas différencier les anticorps liant des épitopes différents [K. Deinhofer, H et al. 2004 ; King, E. M et al. 2007 ; Gaudin, J. C et al 2008 ; Morais, S et al. 2020]. L'immunodosage basé sur les

microréseaux de peptides a également été utilisé pour cartographier les épitopes des allergènes grâce à l'immobilisation d'un énorme ensemble de peptides qui se chevauchent (Shreffler, W. G et al. 2004).

Le développement d'une plateforme de détection incluant les avantages des biocapteurs (portabilité, simplicité) et des microréseaux (détection multiple) est hautement nécessaire. Pour cela, ce travail visait à détecter les IgG spécifiques des allergènes par différents peptides immobilisés sur les électrodes de travail intégrées sur la même plateforme. Pour autant que nous le sachions, la couche peptide-azide immobilisée par la chimie click sans cuivre n'a pas encore été utilisée pour la détection d'allergènes IgG spécifiques (cacahuètes et noisettes) dans ce contexte. Dans cette étude, quatre électrodes de travail (ET) intégrées dans une même puce ont été utilisées comme plateforme de détection afin de fixer dessus un sel de diazonium qui réagira à son tour avec sept peptides différents comportant le groupe azide et ayant une affinité spécifique pour les anticorps IgG. Les sérums de lapins immunisés avec des protéines de noisette et de cacahouète ont été choisis comme modèle car les sérums peuvent être facilement obtenus en grande quantité.

IV.2. Produits chimiques et réactifs

Acide 4-aminophénylacétique (carboxyméthylaniline (CMA, pureté 98%)), Acide mercaptohexadécanoïque (MHDA), N-hydroxysuccinimide (NHS, pureté 98%), sel hémisodique de MES (pureté 98%), dibenzocyclooctyne-amine (DBCO-NH₂), albumine de sérum bovin (BSA) (pureté ≥ 96%), chlorhydrate de doxorubicine (DXR, pureté : 98-102%), éthanolamine (pureté ≥ 98%), tween-20 pour la synthèse, comprimés de solution saline tampon phosphate (PBS) et éthanol pur (pureté 95. 0%) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (France). Le 1-Ethyl-3-(3- diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC, pureté ≥ 98%) (Art. No. 2156.2) a été acheté chez carlroth. L'hexacyanoferrate (II) de potassium trihydraté (K₄Fe(CN)₆-3H₂O, pour analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur), l'hexacyanoferrate (III) de potassium (K₃Fe(CN)₆, pour l'analyse EMSURE® ACS, Reag, Ph Eur) ont été achetés chez Merck (Allemagne). Le nitrite de sodium a été acheté chez fisher chemicals (UK). L'acide chlorhydrique (réactif ACS, 37%) a été acheté auprès de VWR Chemicals (France).

L'IgG de chèvre anti-lapin H&L (FITC) (Ab6717) (excitation=493nm, émission=528nm) a été acheté chez abcam. Les sérums pré-immuns et hyper-immuns de lapins auxquels on a injecté de cacahouète ont été étiquetés respectivement cacahouète1-t0 et cacahouète1-t2 ; les sérums pré-immunes et hyper-immunes de lapins auxquels on a injecté de la noisette ont été étiquetés respectivement noisette1-t0 et noisette1-t2 ; trois peptides-N₃ spécifiques aux

immunoglobulines libérés chez les sujets allergiques après la consommation de la cacahouète étaient présentés avec les ID suivants EO14, S4 et T12 ; quatre peptides-N₃ spécifiques aux immunoglobulines libérés chez les sujets allergiques après la consommation de la noisette étaient présentés avec les ID suivants S14, EO13, HL19 et GL4. Les échantillons de sérum ainsi que les peptides étaient reçus auprès de l'Institut de Fraunhofer de thérapie cellulaire et d'immunologie (leipzig, Allemagne). Tous les peptides ont été synthétisés comme suit : Acétyl-[séquence N-épitope-C]-Ebes-Lys(ϵ -N₃)-NH₂, où Ebes : Acide amino-3,6-dioxaocetyl-succinamique.

ID du peptide	Amino acid sequence
EO14	SDQNKVLQPH
S4	CTQVHDTVKAERCI
T12	CGEVSGYGNCR
S14	VCESWTEHKHQKRG
EO13	TQHEGEQPFY
HL19	VKVC PATDAAQC
GL4	VVPEEENIKYAN

IV.3. Appareillage

Un spectrophotomètre NEXUS (Nicolet-Thermo Fisher, UK) a été utilisé pour l'analyse FTIR, et les résultats (spectres) ont été enregistrés à l'aide d'un accessoire Thunder dome (Spectra-tech) qui contient un cristal de germanium en mode de réflectance totale atténuée (ATR). Un microscope à fluorescence (EVOS M5000, Thermo Fischer Scientific) a été utilisé pour capturer des images de fluorescence à haute résolution, équipé d'une caméra monochrome et de lentilles 20× et 60×. Une lumière fluorescente a été utilisée pour observer les échantillons qui ont été excités avec un filtre passe-bande de 470 nm et observés avec un filtre passe-bande de 525 nm. Un bain à ultrasons (FB 15049, Fischer Scientific) a été utilisé pour la sonication. La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS) (Bruker Nano GmbH) a été utilisée pour analyser la surface.

Une plateforme de capteurs qui intègre quatre microélectrodes de travail en or, une référence et une contre-microélectrodes (figure 44) a été utilisée pour les mesures électrochimiques.

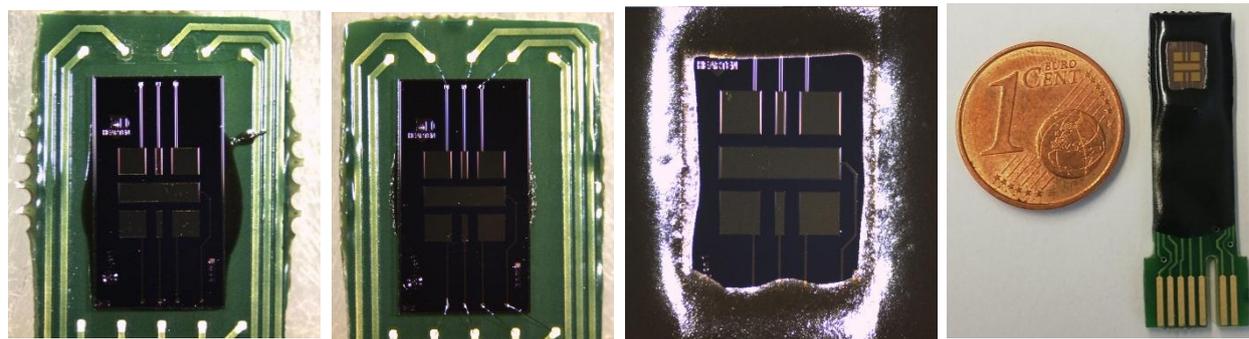


Figure 44. Image de la plate-forme de biodétection avec 4 ETs d'or, une électrode de référence interne et une contre-électrode, a) avant le câblage, b) après le câblage, c) protection des connexions et d) la plate-forme finale.

Les techniques de voltampérométrie cyclique (CV) et de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été utilisées pour les caractérisations après chaque étape de fonctionnalisation et également pour la détection. Les mesures ont été effectuées dans une cage faradique à température ambiante en utilisant le PalmSens 4 avec multiplexeur (8 canaux) connecté à l'ordinateur, les résultats sont enregistrés grâce au logiciel PStace 5.7.

Partie 1 : développement d'un nouvel immunocapteur basé sur la chimie du clic sans cuivre pour la détection d'IgG spécifiques associés aux allergènes des cacahuètes et des noisettes dans les sérums de lapin

IV.1. Bio-fonctionnalisation de l'électrode en or

Avant l'électrodéposition du sel d'aryl diazonium (CMA), la puce contenant les microélectrodes du travail (μ ETs) en or a été rincée deux fois avec de l'éthanol et de l'eau bi-distillée respectivement. Le greffage électrochimique du CMA sur les μ ETs d'or a été réalisé par réduction électrochimique des cations diazonium générés in situ. En bref, la solution de CMA (15mM) a été diazotée dans une solution aqueuse contenant un mélange HCl (20.83mM) et NaNO₂ (20.83mM) pendant 10min dans un bain de glace. Ensuite, une voltamétrie cyclique a été réalisée avec 15 cycles entre 0,0V et -1,2V avec une vitesse de balayage de 0,05V/s et un potentiel de pas de 0,005V. Les groupes carboxyliques formés sur la surface des μ ETs ont été activés en incubant la puce fonctionnalisée dans un mélange de EDC(0.1M)/NHS(0.2M) préparé dans le sel hémisodique MES (0.1M) pendant 1 heure. Ensuite, les groupes carboxylés activés ont été attachés de manière covalente au DBCO-NH₂ (15 μ M) pendant 1h, suivi d'une incubation dans de l'éthanolamine 0,1% dans un tampon PBS (0,01M, pH 7,4) pendant 30min

pour éviter toute liaison non spécifique. Plus tard, le peptide- N_3 ($5\mu\text{M}$; préparé dans 10% d'acétonitrile) a été attaché à la surface par formation d'un triazole stable entre l'azide et la triple liaison et cela à température ambiante pendant 1h. Le même peptide a été déposé sur toute la surface pour tester le comportement d'un seul peptide alors que pour une multi-détection, différents peptides ont été déposés sur la même plateforme de biodétection. Enfin, les μETs fonctionnalisées ont été stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Toutes les étapes de la fonctionnalisation sont résumées dans la figure 45.

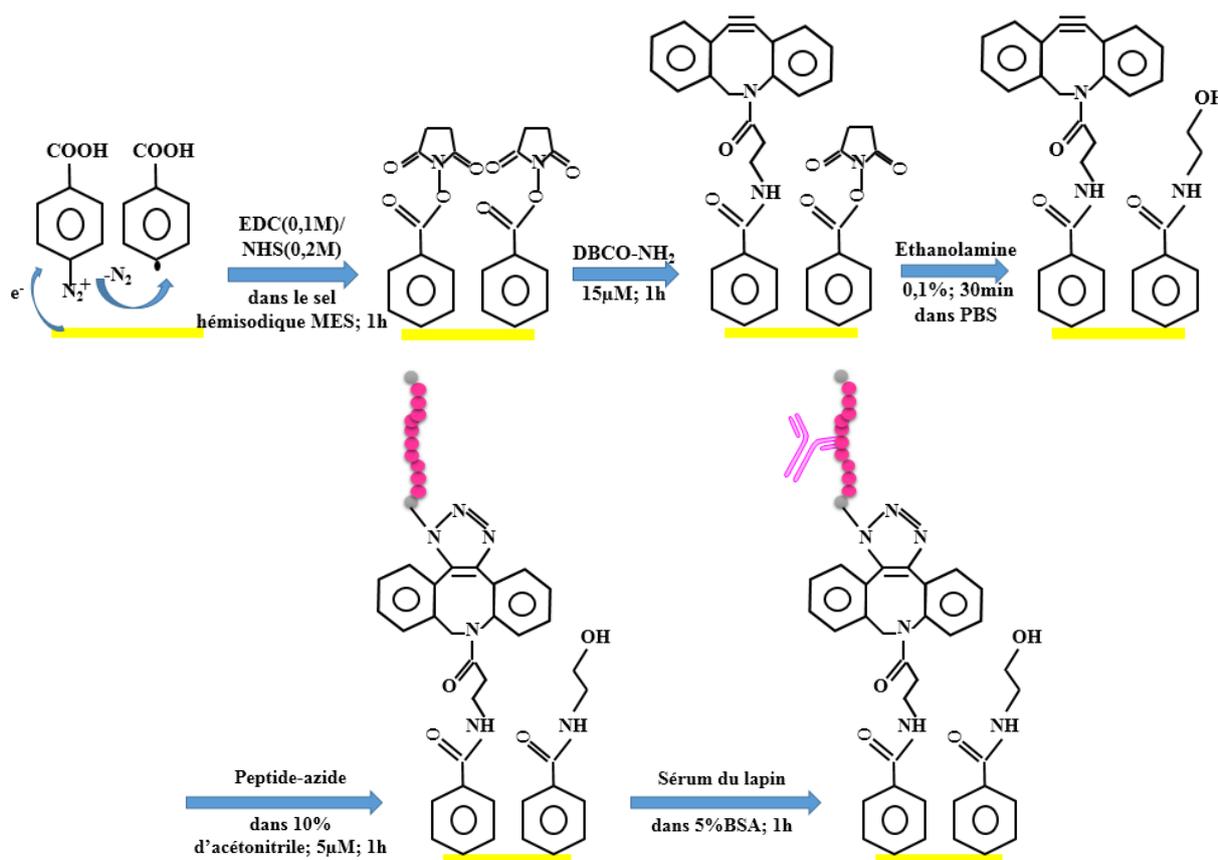


Figure 45. Schéma de la procédure de fonctionnalisation de l'électrode en or pour la détection des allergènes.

IV.2. Préparation des solutions standards

Les peptides- N_3 reçus ont tous été aliquotés avec une concentration massique finale de 1mg/mL qui équivaut à une concentration molaire x (M) qui diffère d'un peptide à l'autre en raison de leur poids molaire. Ensuite, les aliquotes préparés ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour la fonctionnalisation de la puce (la plateforme avec les 4 électrodes d'or).

Les sérums de lapin ont été aliquotés avec un volume final de 5 μ L et stockés à -20°C pour une utilisation future (échantillons pour analyse). Plusieurs dilutions de différents sérums de lapin (1:500000 ; 1:250000 ; 1:10000 ; 1:75000 ; 1:50000 ; 1:25000 ; 1:5000) ont été effectuées en diluant la quantité appropriée de l'aliquote dans du BSA-PBS à 5%. Après 1 heure d'incubation, la puce a été retirée, nettoyée trois fois avec du PBS pour être mesurée par l'SIE.

IV.3. Mesures électrochimiques

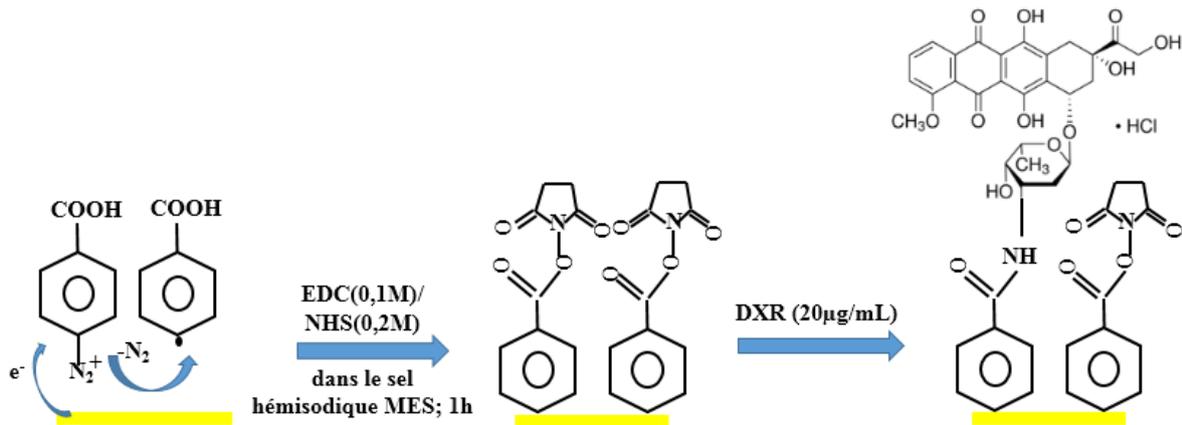
Les mesures électrochimiques ont été réalisées dans une sonde redox composée de 5 mM de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] dans du PBS (10mM ; pH 7.4). Les mesures CV ont été effectuées en balayant le potentiel de 0,2 à 0,6 V avec une vitesse de balayage de 50 mV/s, tandis que les mesures SIE ont été effectuées dans une gamme de fréquence de 100 mHz à 100kHz avec un potentiel DC de 100 mV et un potentiel AC de 10 mV.

IV.4. Résultats et discussion

IV.4.1. Analyse par fluorescence

Avant de commencer la détection des IgG dans le sérum du lapin, l'immobilisation du sel de diazonium doit d'abord être confirmée. Pour cela, le fluorophore de chlorhydrate de doxorubicine (DXR) (excitation=470nm ; émission=585nm) a été utilisé pour interagir avec la CMA déjà électrogreffée et activée, l'interaction s'est faite via la formation de carbodiimide entre l'amine primaire du DXR et les groupes carboxylés de la CMA (figure 46.A). L'interaction entre la CMA et le DXR a été étudiée par microscopie à fluorescence. Comme le montre la figure 46.B.a.b.c, les carrés fluorescents de couleur rouge confirment l'électro-greffage de la CMA sur les μ ETs d'or fonctionnalisées. Tandis que, le carré éteint dans la figure 46.B.d correspond à l'électrode non fonctionnalisée avec CMA.

A



B

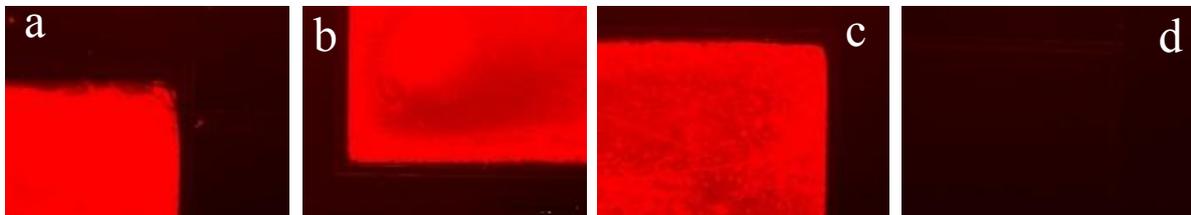


Figure 46. A) Principales étapes de la fonctionnalisation des ETs d'or par le DXR, B) Images fluorescentes liées au DXR (20µg/mL) chimiquement lié au CMA qui est électrographié sur les ETs d'or (a, b et c) et non sur d.

Ensuite, l'analyse de fluorescence a été réalisée pour vérifier l'interaction immunitaire entre l'anticorps fluorescent (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC)) et les allergènes spécifiques IgG libérés dans les sérums de lapin (Figure 47.b). Pour cela, la puce fonctionnalisée a été incubée dans des sérums de lapin (cacahouète 1-t2 ou noisette 1-t2) pendant 1 heure à 4°C et suivie d'une incubation dans un anticorps fluorescent (FITC) dilué 5000 fois dans du BSA à 5% avec 0,1% de tween dans du PBS pendant 1h à 4°C. Enfin, la plateforme de biodétection a été lavée 5 fois avec du PBS avant de prendre des images. Des carrés fluorescents aussi correspondant aux µETs d'or ont été vus avec les peptides ID EO14, T12 et S4 avec des sérums de cacahouète 1-t2 (figure 47.c ; 47.d et 47.e respectivement), et les peptides ID S14, EO13, HL19 et GL4 avec des sérums de noisette 1-t2 (figure 47.f ; 47.g ; 47.h et 47.i respectivement), confirmant la réactivité entre peptide-IgG-anticorps fluorescent. Une absence de fluorescence a été remarquée dans la figure 47.a en raison de la non-réactivité de l'anticorps fluorescent avec le peptide en l'absence d'IgG.

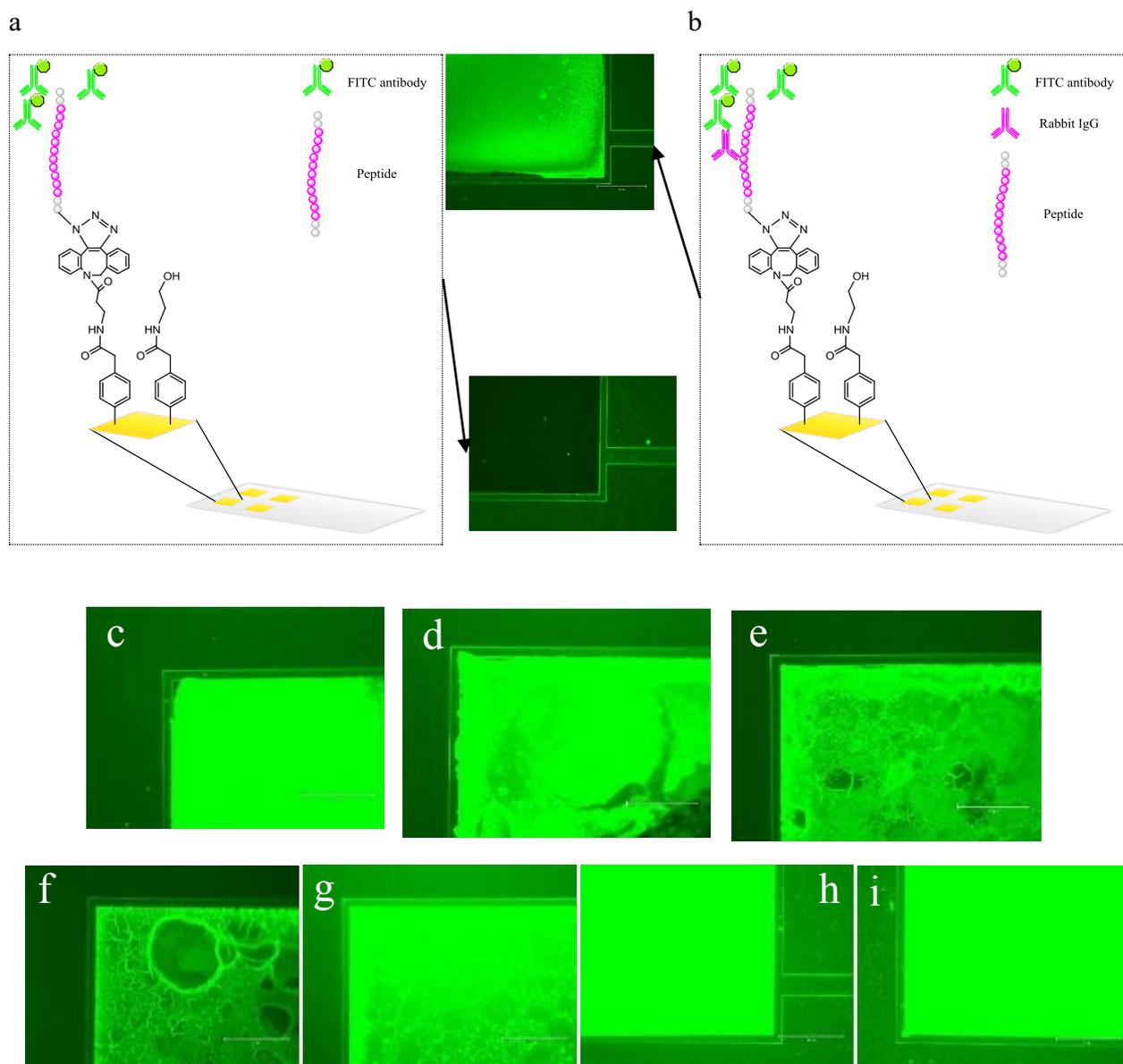


Figure 47. Grossissement de la μ ET d'or bio-fonctionnalisée avec le peptide en a) absence et b) présence d'IgG de lapin et d'anticorps marqués au FITC (Ab^* -IgG). Images fluorescentes liées à l'anticorps FITC biologiquement lié à l'IgG de lapin anti-cacahouète avec le peptide ID c) EO14 ; d) T12 et e) S4, et à l'IgG de lapin anti-noisette avec le peptide ID f) S14 ; g) EO13 ; h) HL19 et i) GL4.

IV.4.2. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS)

Les caractéristiques chimiques de la surface de l'électrode d'or avant et après l'électrodéposition du CMA ont été enregistrées à l'aide de la technique de spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie. La figure 48 montre une augmentation considérable du pourcentage de carbone et une légère augmentation de l'oxygène après l'électrodéposition du CMA sur la surface de l'électrode en or (graphique marron), cette augmentation confirme l'électrodéposition de CMA qui contient du carbone et de l'oxygène.

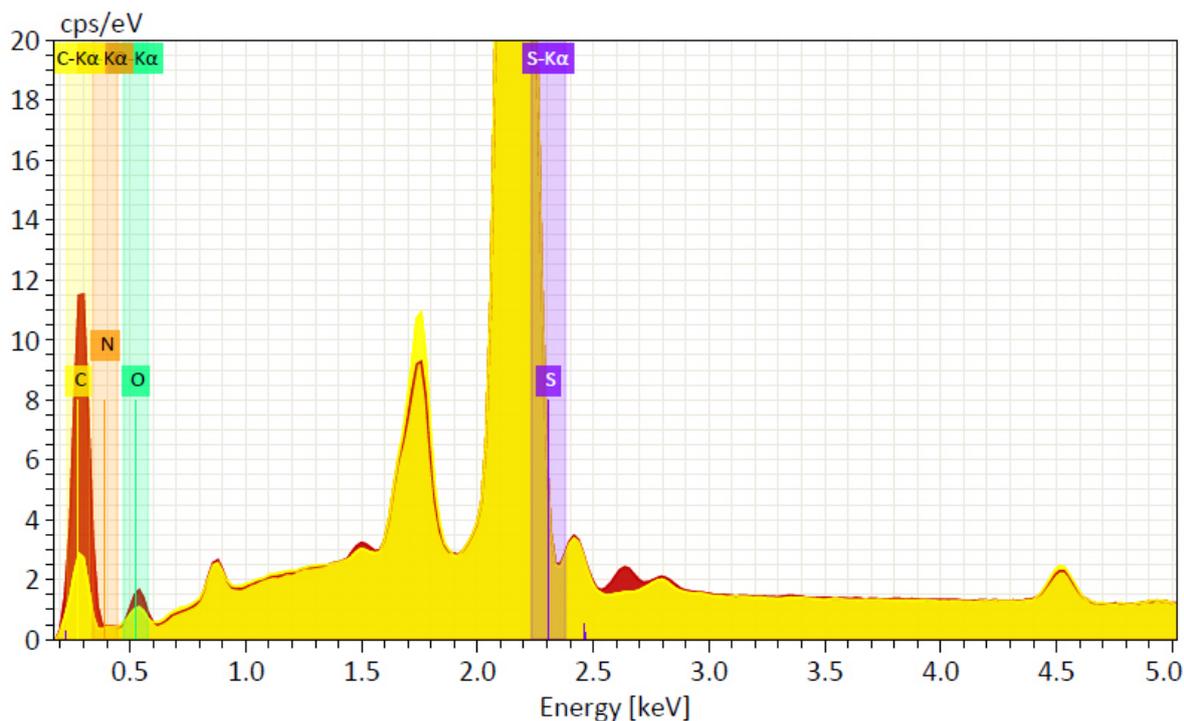


Figure 48. Spectrogramme de spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie de l'électrode d'or avant (spectrogramme jaune) et après électrodéposition de CMA (spectrogramme marron).

IV.4.3. Electrogreffage de la CMA

Le greffage électrochimique du sel de diazonium a été réalisé par voltamétrie cyclique comme présentés à la figure 49.A. Les voltammogrammes présentent un pic de réduction à environ -1,0 V qui diminue d'intensité au fur et à mesure qu'on dépose le sel de diazonium sur la surface de l'électrode. Aucun pic d'oxydation n'a pu être observé lors des balayages suivants, ce qui indique que le mécanisme de réduction électrochimique décrit ci-dessus est irréversible (Baraket et al., 2013 ; Nemeir et al., 2020 et Zouaoui et al., 2021).

La voltampérométrie cyclique a été aussi utilisée pour valider l'immobilisation du sel de diazonium en caractérisant l'électrode d'or avant et après l'électroadressage du CMA (Figure 49.B). Comme on peut voir, une diminution importante du pic à pic des voltammogrammes (voltammogramme rouge) a été observée par rapport à l'électrode nue (voltammogramme noir). Ceci est attribuable à la large zone de passivation de l'électrode en or (Baraket et al., 2013 ; Nemeir et al., 2020 et Zouaoui et al., 2021).

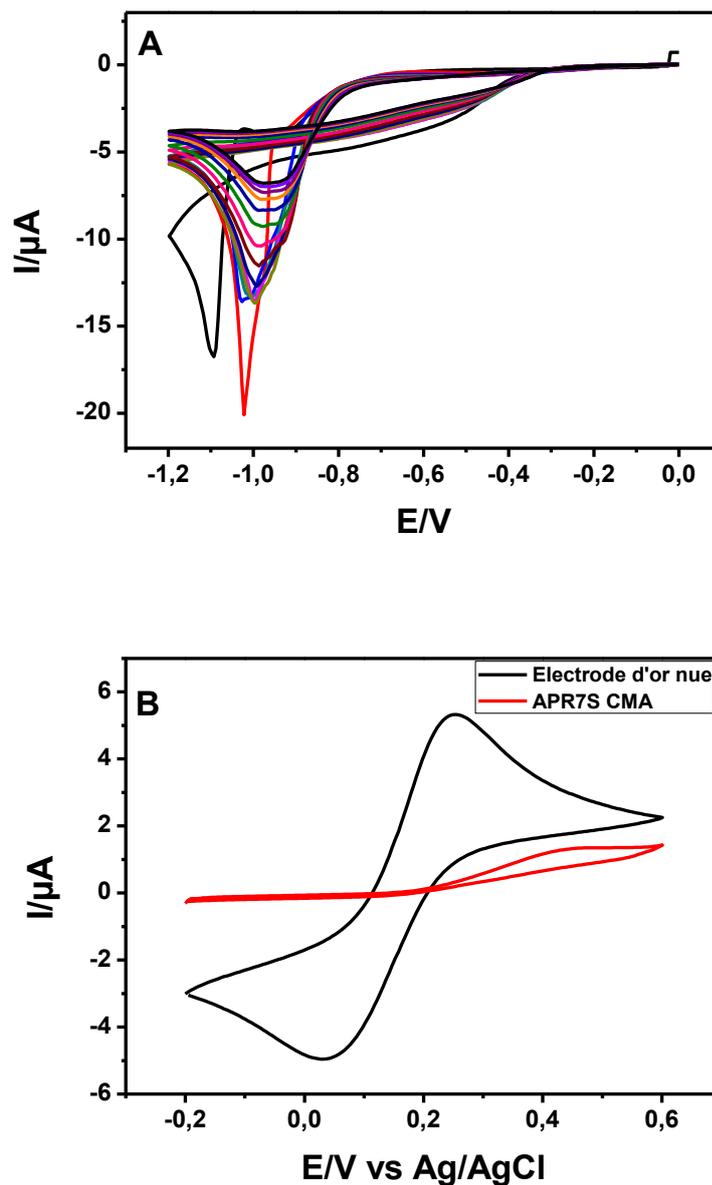


Figure 49. Voltammogrammes cycliques de A) électrogreffage de CMA sur ET d'or en variant le potentiel de 0.0 V à -1.2 V vs Ag/AgCl, avec un taux de balayage de 0.05V/s et 15cycles. B) caractérisation de l'électrode dans 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ dans PBS (10mM ; pH 7.4) avant (noir) et après son électrogreffage par CMA (rouge).

IV.4.4. Application du biocapteur pour la détection des IgG dans les sérums de cacahuète et de noisette en utilisant des peptides de cacahuète

Le biocapteur développé a été utilisé pour détecter les IgG anti-cacahuète et les IgG anti-noisette (étude d'interférence) dans les sérums de lapin. Le biocapteur proposé est basé sur l'immobilisation de peptides spécifiques par une chimie click sans cuivre. Les mesures ont été réalisées en utilisant la plateforme de biodétection dont la conception permet l'immobilisation de différents peptides de cacahuètes (S4, EO14, T12) sur la même plateforme. La détection

d'IgG de lapin anti-cacahuète et d'IgG de lapin anti-noisette (étude d'interférence) a été effectuée en mesurant la résistance de transfert de charge après incubation des ETs dans la dilution désirée de sérum (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 ; 1:5000) en utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) sur une plateforme contenant différents peptides. La figure 50.A montre les diagrammes de Nyquist correspondant aux différentes dilutions du sérum dans le cas du peptide S4. Comme on peut voir, le rayon du semi-cercle de Nyquist augmente avec l'augmentation du taux de sérum de lapin. Ensuite, les données obtenues du tracé de Nyquist ont été ajustées à l'aide du modèle de circuit équivalent de Randles ($R_1 + (Q_1 / (R_2 + W_1))$) (Figure 50.A). R_1 peut être défini comme la résistance de la solution, Q_1 comme l'élément à phase constante, R_2 comme la résistance de transfert de charge et W_1 comme l'impédance de Warburg. Les données ajustées ont ensuite été normalisées à l'aide de l'équation suivante : $\Delta R_{ct} / R_0$ (Figure 50. B et C), où $\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{Anti IgG}) - R_{ct}(\text{peptide})$ et R_0 correspond à la résistance de transfert de charge à l'état initial ($R_0 = R_{ct}(\text{peptide})$). Les figures 50.B et 50.C montrent des relations linéaires dans la gamme de 1:500000 à 1:5000 avec tous les peptides de cacahouète testés (S4, EO14, T12).

Les données normalisées présentent les équations suivantes : $Y_1 = 0,12 * X_1 - 0,009$ ($R^2=0,8764$; $RSD=12\%$) ; $Y_2 = 0,07787 * X_2 + 0,1133$ ($R^2=0,9411$; $RSD=31\%$) et $Y_3 = 0,0921 * X_3 + 0,0334$ ($R^2=0,9698$; $RSD=4\%$) pour S4, EO14 et T12 respectivement. La sensibilité pour les IgG dans le sérum de cacahouète 1-t2 peut être décrite comme $S4 > T12 > EO14$ (Figure 50. B). Cependant, pour l'étude d'interférence, les équations de régression sont : $Y_a = 0,19494 * X_a + 0,42294$ (S4, $R^2=0,9858$; $RSD=9\%$) ; $Y_b = 0,24308 * X_b + 0,41067$ (EO14, $R^2=0,9957$; $RSD=1\%$) et $Y_c = - 0,0182 * X_c + 0,0960$ (T12, $R^2=0,9194$; $RSD=28\%$) pour S4, EO14 et T12 respectivement (Figure 50. C). On peut en conclure que la sensibilité des peptides de cacahouète pour la détection du sérum de noisette 1-t2 peut être résumée comme $EO14 > S4 > T12$ (Figure 50.B)

A partir de ces études, le peptide ID T12 a été choisi pour de futures études liées au sérum de cacahouète.

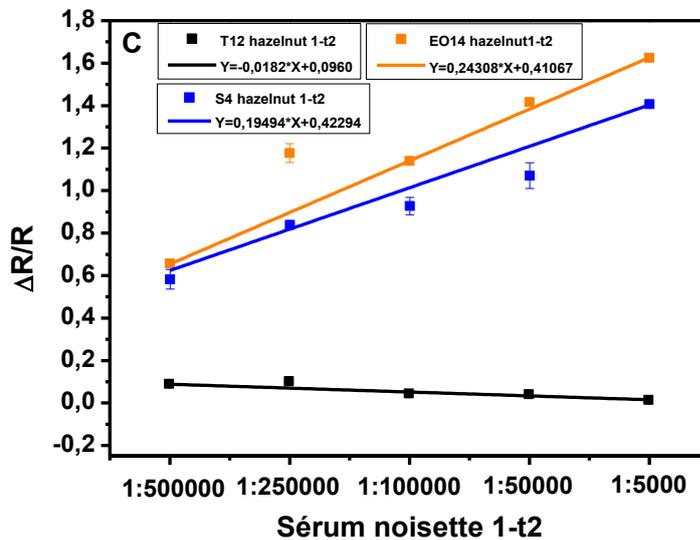
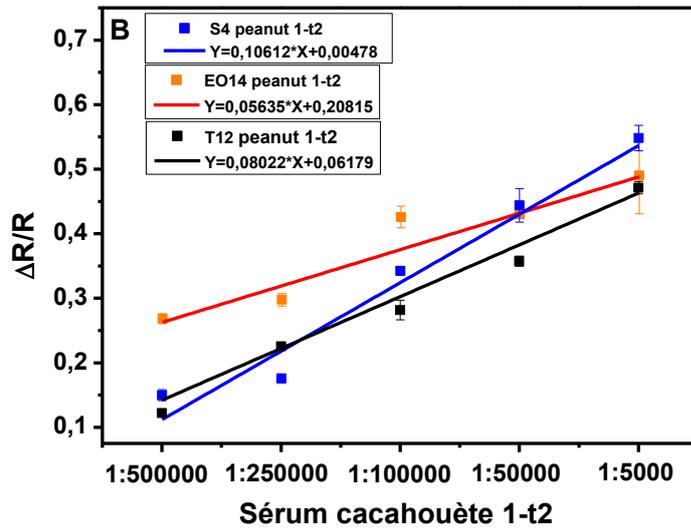
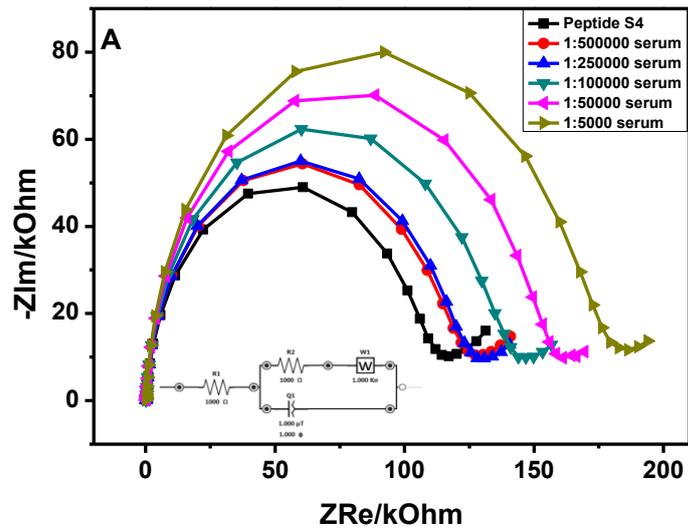


Figure 50. A) Diagramme de Nyquist dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ préparé dans le PBS (10mM ; pH 7.4) pour la détection d'IgG dans le sérum du lapin à des dilutions de 1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 et 1:5000. Courbes d'étalonnage relatives à la détection d'IgG avec des peptides de cacahouète (S4, EO14, T12) dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en PBS (10mM ; pH 7.4) dans B) le sérum de cacahouète 1-t2 et C) le sérum de noisette 1-t2 pour l'étude des interférences.

IV.4.5. Application du biocapteur pour la détection d'IgG dans le sérum de noisette et de cacahouète en utilisant des peptides de noisettes

Les mesures des anticorps libérés dans le sérum de noisette 1-t2 ont été effectuées en utilisant des électrodes d'or modifiées avec différents peptides de noisettes (S14, GL4, EO13, HL19) en mesurant la résistance de transfert de charge après incubation de l'électrode dans la dilution désirée de sérum (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 ; 1:5000) via l'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). L'ajustement des spectres expérimentaux obtenus a été effectué comme mentionné ci-dessus, et les données normalisées présentent les équations suivantes : $Y1' = 0.0434 * X1' + 0.0199$ ($R^2=0.8540$; $RSD=23\%$) ; $Y2' = 0.423 * X2' + 0.371$ ($R^2=0.9605$; $RSD=5\%$) ; $Y3' = 0.18442 * X3' + 0.11879$ ($R^2=0.8626$; $RSD=2\%$) et $Y4' = 0.1595 * X4' + 0.1379$ ($R^2=0.9658$; $RSD=7\%$) pour S14, GL4, EO13 et HL19 respectivement (figure 51.A). En conclusion, la sensibilité du sérum de noisette 1-t2 utilisant des peptides de noisette a diminué de GL4 à S14 en passant par EO13 et HL19 ($GL4 > EO13 > HL19 > S14$). Les mêmes mesures avec les mêmes peptides (S14, GL4, EO13, HL19) ont été effectuées dans le sérum cacahuète 1-t2 pour étudier l'interférence. Comme le montre la figure 51.B, différentes équations de régression ont été trouvées en utilisant différents peptides. $Ya' = 0.00873 * Xa' + 0.08792$ ($R^2=0.8792$; $RSD=34\%$) pour S14 ; $Yb' = 0.32142 * Xb' + 0.22495$ ($R^2=0.9951$; $RSD=2\%$) pour GL4 ; $Yc' = 0.40288 * Xc' + 0.7404$ ($R^2=0.9967$; $RSD=3\%$) pour EO13 et $Yd' = 0.13082 * Xd' + 0.25065$ ($R^2=0.9708$; $RSD=1\%$) pour HL19. Parmi les peptides étudiés, l'EO13, GL4 et HL19 montrent une interférence vers le sérum cacahuète 1-t2 ($EO13 > GL4 > HL19$), cependant le peptide S14 était négligeable pour les deux sérums en raison de sa faible sensibilité. A partir de ces études, nous avons choisi le peptide ID GL4 pour des études futures en raison de sa sensibilité envers les IgG dans le sérum noisette en comparaison avec HL19 et EO13.

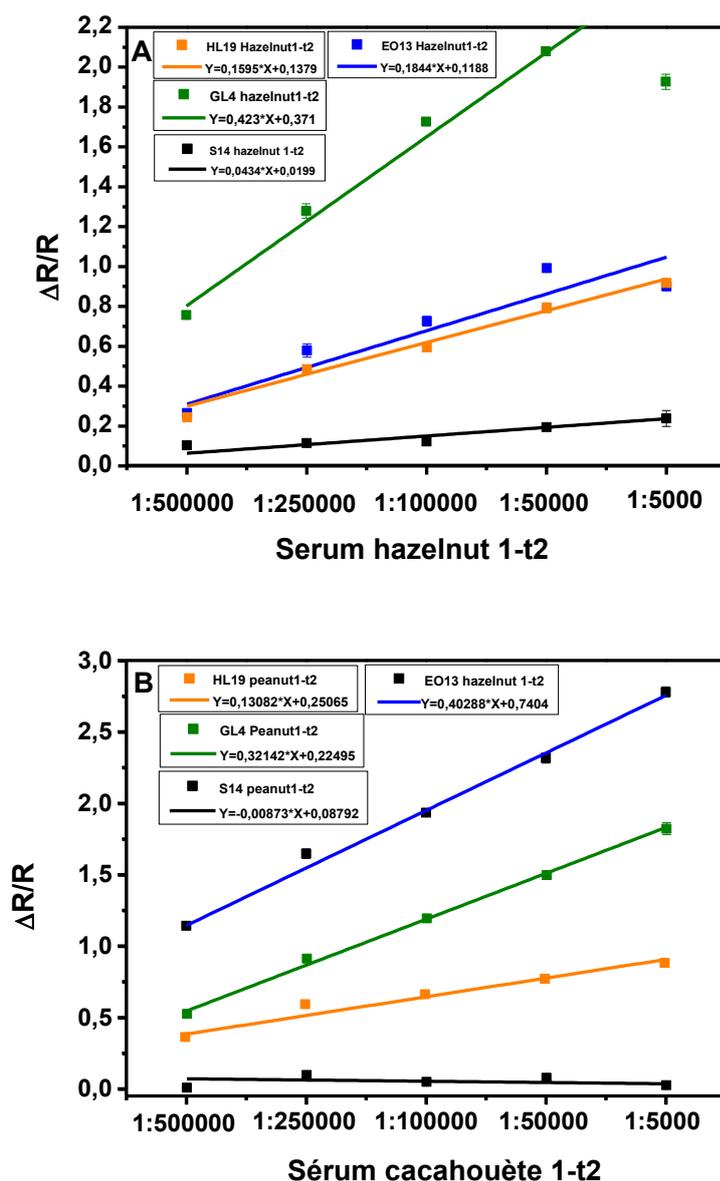


Figure 51. Courbes d'étalonnage relatives à la détection d'IgG à différentes dilutions de sérum du lapin (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 et 1:5000) avec des peptides de noisettes (S14, GL4, EO13, HL19) dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en PBS (10mM ; pH 7.4) dans A) le sérum de noisette 1-t2 et B) le sérum de cacahouète 1-t2 (étude des interférences).

Partie 2 : Un nouvel immunocapteur basé sur la chimie du clic sans cuivre pour la détection d'IgG spécifiques associés aux allergènes des cacahouètes et des noisettes dans les sérums de lapin et de l'être humain

Pour cette partie, une analyse électrochimique a été effectuée en utilisant l'SIE. Parallèlement à l'électrochimie, une fonctionnalisation localisée est réalisée à l'aide du nanoplotter pour l'analyse de fluorescence.

Pour la fonctionnalisation de l'électrode et la puce du nano-plotter, la même stratégie décrite auparavant a été réutilisée dans cette partie tout en remplaçant l'acide 4-aminophénylacétique par l'acide mercaptohexadécanoïque (MHDA) et le reste des étapes reste le même comme le montre la figure 52. Brièvement, les deux procédures commencent par l'immobilisation du MHDA sur la puce d'or ou les électrodes afin de créer une monocouche d'assemblage. Ensuite, l'activation du groupe carboxylique était réalisée tout en incubant les électrodes dans un mélange d'EDC/NHS pour qu'ils puissent ensuite se lier au DBCO-NH₂. Ce dernier sera le réactif pour la réaction de chimie clic avec les peptides-azide. Enfin, la détection était réalisée via des incubations dans le sérum à différentes concentrations. La puce du nanoplotter était immergée en plus dans l'anticorps fluorescent (Ab*).

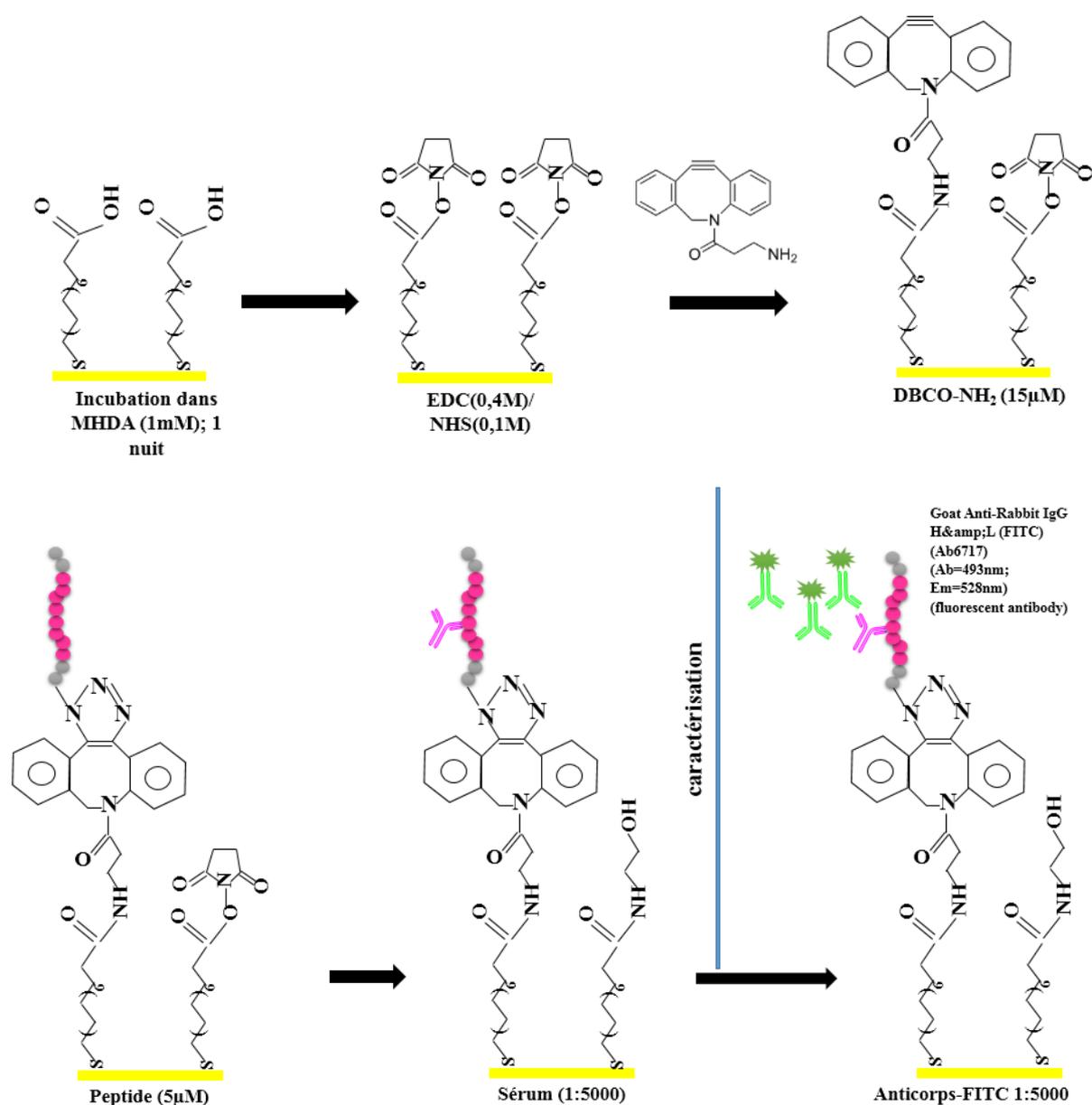


Figure 52. Schéma de la procédure de fonctionnalisation de l'électrode en or pour la détection des allergènes.

IV.1. Résultats et discussion

IV.1.1. Microscopie à fluorescence

Après la fonctionnalisation de la puce d'or par les peptides-azide tout en utilisant le nanoplottter pour les étapes antérieures, des microgouttes de sérum du lapin étaient déposés de la même façon. Finalement, la puce fonctionnalisée est retirée pour être rinçer avec du PBS (3 fois) avant son immersion dans l'anticorps fluorescent (Ab*). La microscopie à fluorescence a été utilisée pour étudier l'interaction entre l'anticorps marqué par fluorescence et l'IgG spécifiques aux allergènes. Cet anticorps a été utilisé pour interagir avec les sites spécifiques où toutes les étapes (du MHDA jusqu'au sérum) ont été déposés en utilisant le nanoplottter. La puce d'or a été divisé en 9 petits carrés de 4 mm², chacun d'entre eux peut de contenir 2 gouttelettes. De ce fait, plusieurs volumes de gouttelette (1 gouttelette ≈ 1000pL) étaient testés allant de 1 à 9 gouttelettes comme le montre la figure 53 (chaque carré avec numéro de gouttelette indiqué en noir) et la figure 54 (numéro de gouttelette indiqué en haut à droite de chaque image).

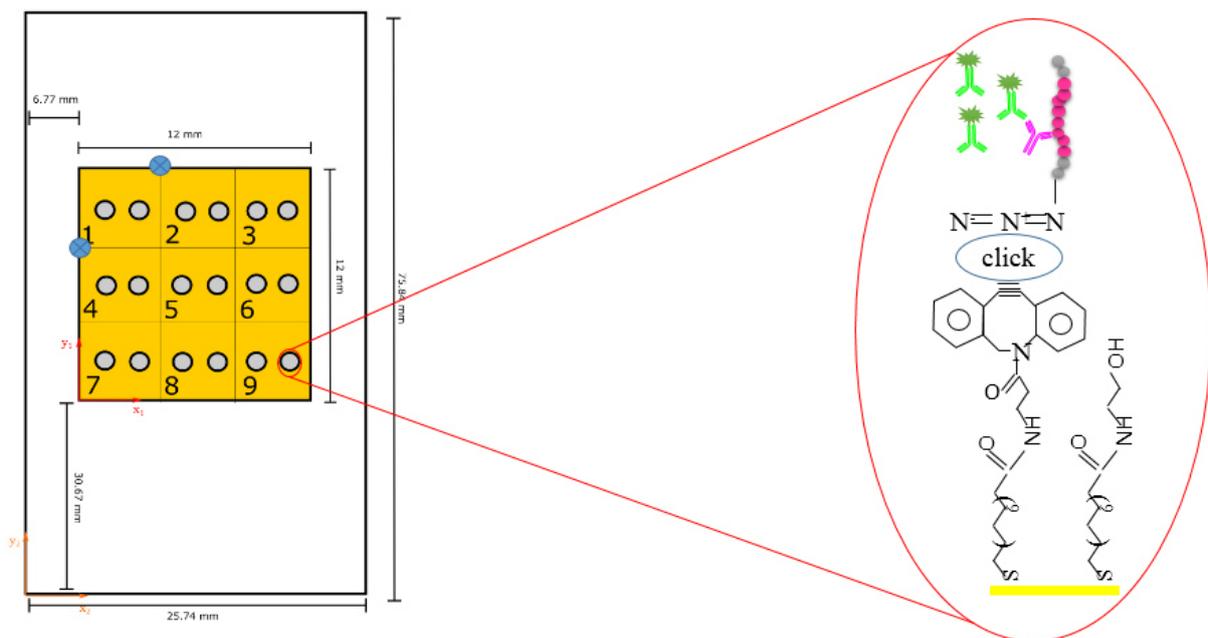


Figure 53. Paramètres du nano-plotter pour le dépôt de gouttelettes, avec l'axe réglé pour le dépôt de gouttes (1) et l'axe réglé pour la position du site (2).

Les premiers résultats du nanoplottter présentés dans la figure 54 ont effectivement montré une fluorescence et du coup la confirmation de la fonctionnalisation par le nanoplottter a fonctionné même pour les plus petits volumes de 1000 pL.

Comme le montre la figure 54, la fonctionnalisation a pris des formes circulaires. La première possibilité serait que, pendant la première étape du processus, lorsque la goutte de MHDA dans l'éthanol tombe sur la puce d'or, la compétition entre les forces d'inertie et la tension de surface donne à la goutte cette forme de "beignet". La goutte gardera cette forme pendant une courte période si l'énergie gagnée pendant la chute ne surmonte pas la tension de surface et ne brise pas la goutte sur elle-même ou sur le côté, ou les deux (Gerlach, G et al. 2012; Fragkopoulos, A. A et al. 2018) Mais comme nous utilisons de l'éthanol qui est très volatile et a une faible tension de surface. La goutte peut ne pas avoir le temps d'effectuer cette transition vers la forme sphérique et s'évapore, laissant nos molécules dans ce motif circulaire. Les images montrent que pour des volumes plus importants, le processus de rupture sur le côté semble plus avancé car il faut plus de temps pour que tout le solvant s'évapore. Mais tout ceci nécessiterait une évaporation rapide de notre gouttelette, ce qui est possible pour des volumes aussi petits que 9 nL, mais des analyses plus poussées doivent être poursuivies.

Sinon, il a été démontré que pour des particules dans un solvant, des motifs annulaires se forment toujours après le dépôt et le séchage de la solution sur une surface homogène. De nombreux facteurs sont en cause avec en premier lieu, l'hydrophilie de la puce. Elle a un impact sur la formation de ce motif car les surfaces ayant une plus grande mouillabilité et un petit angle de contact auront tendance à former des motifs plus annulaires en raison de la hauteur des gouttes. En effet, les gouttes avec un faible angle de contact auront un diamètre de base plus grand. (Lee, H. H et al. 2017; Parsa, M. 2017) Ce phénomène aura lui-même un effet significatif sur l'anneau car à l'intérieur d'une gouttelette séchée, le champ d'écoulement interne aura tendance à pousser les particules et les molécules du haut vers le bas au centre de la goutte et du centre vers les bords au bas, dans un mouvement circulaire comme le montre la figure 55 (Hu, H et al. 2005). Il est important de noter que ce phénomène se produit à température ambiante ou sur un substrat chauffant car le flux sera inversé sur un substrat refroidissant (Parsa, M. 2017; Kim, J. H et al. 2011)

La nature du solvant influence également ce phénomène. L'éthanol a une faible tension de surface et les surfaces métalliques ont une énergie de surface élevée ce qui facilite la propagation du liquide. L'éthanol évaporé engendre un mouvement des particules lent et une fixation facile des molécules en raison du faible angle de contact (Talbot, E. L et al. 2012). L'influence de la taille de la gouttelette sur le motif n'est pas pertinente dans notre cas comme l'ont montré X. Shen et ses collègues que le motif d'anneau est formé pour des gouttelettes inférieur à 10 μm de diamètre pour une ligne de contact forte (Shen, X et al. 2010). Mais il est

important de considérer que cela affectera la vitesse d'évaporation de notre goutte car le taux d'évaporation est inversement proportionnel au rayon de la goutte (Hu, H et al. 2005).

Enfin, sur les bords de la goutte où l'angle de contact est faible (surfaces hydrophiles), le solvant va sécher plus rapidement et déposer des molécules sur la surface de la puce qui sera le point de départ pour que d'autres molécules viennent s'adsorber (Uno, K et al. 1998). D'autres facteurs comme la dispersité, le pH du milieu et la taille des particules/molécules peuvent influencer des choses comme le diamètre intérieur de l'anneau et la forme du motif (Parsa, M. 2017).

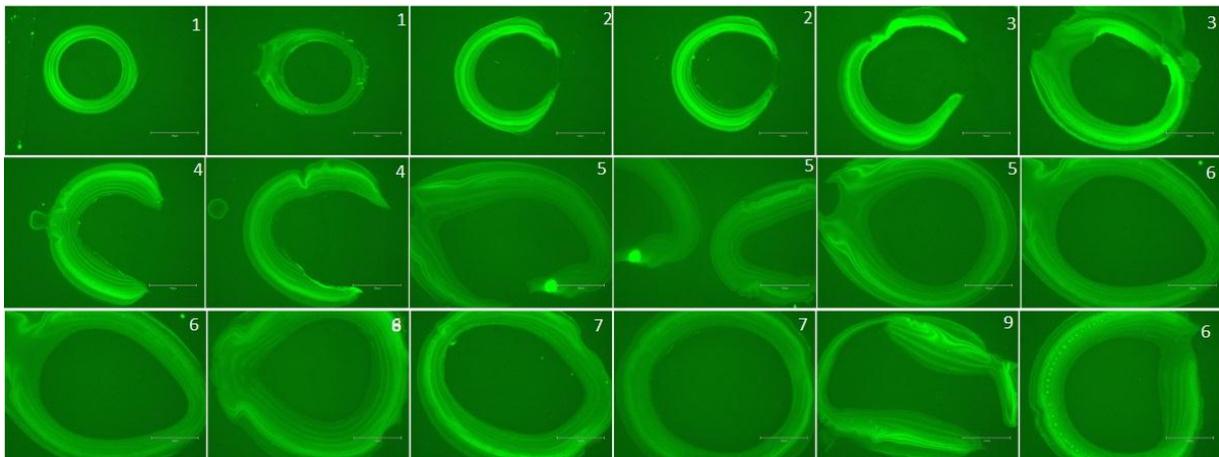


Figure 54. Gouttelettes de fonctionnalisation avec différents volumes dans l'ordre allant de 1 à 9. Peptide utilisé est le EO14 ($5\mu\text{M}$) avec le sérum cacahouète hyper-immunisé (1 :5000).

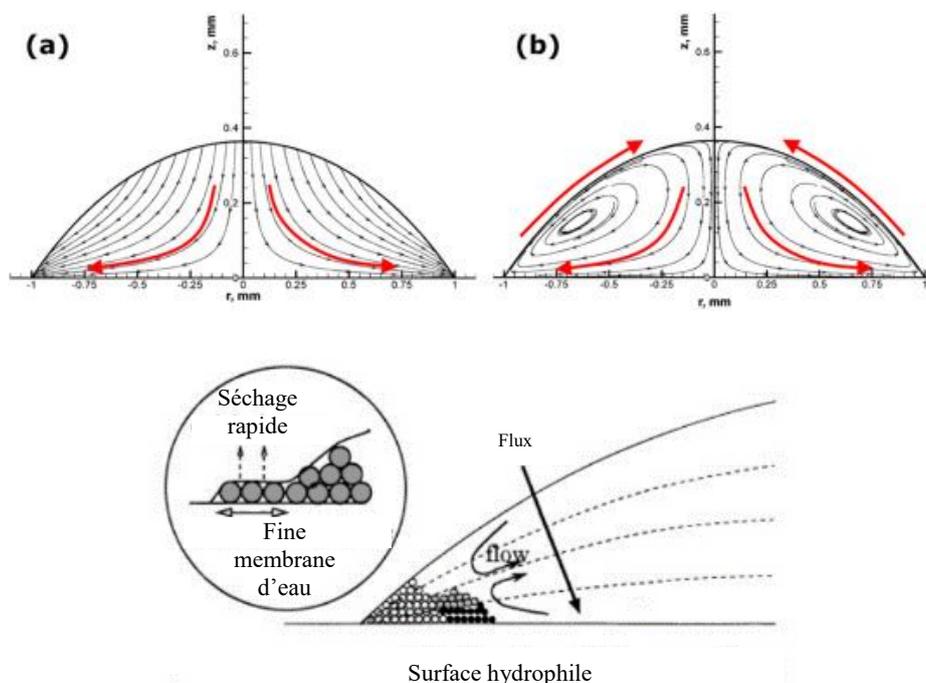
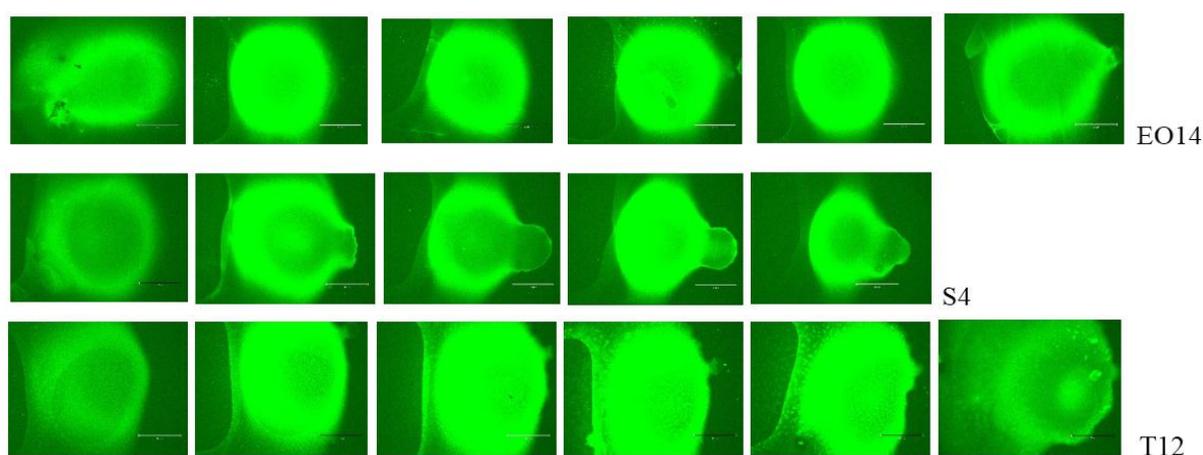


Figure 55. Schéma du mouvement dynamique des particules dispersées dans une gouttelette évaporée (Hu, H et al. 2005).

Les trois peptides de cacahouète (EO14 ; S4 et T12) étaient testés pour la détection des IgGs spécifiques aux cacahouètes dans le sérum pré et hyper immunisé afin de prouver leurs spécificité et sensibilité. Chaque peptide à été testé 6 fois à travers son immobilisation par le nanoplotter dans 6 endroits bien définis (les trois lignes des spots dans la figure 53, chaque ligne avec 6 spots). Toutes les gouttelettes avaient été déposés avec le même volume (1 gouttelette) pour être capté en entier avec la caméra du microscope de la fluorescence. Ce test a été effectué après le changement de la température lors de dépôt. Pour cela, un refroidissement à la fois du support de nanoplotter à 7°C, et de la solution du MHDA préparée dans l'éthanol a eu lieu. Par conséquent, le solvant s'évapore très lentement pour former des sphères en aidant à minimiser l'énergie d'interface.

L'imagerie fluorescente certifiée que le processus de détection immunitaire correspondant a bien lieu comme le montre la figure 56.A dans cas de sérum hyper-immunisé. Les spots fluorescents en vert indiquent les endroits qui sont spécifiquement fonctionnalisés par le nanoplotter, tandis que les zones éteintes sont celles non fonctionnalisés. Ce test immuno-fluorescent a indiqué la bonne réactivité de IgG-Ab*. La même procédure était appliquée pour le sérum pré-immune (figure 56.B), parmi les 6 spots fonctionnalisés pour chaque peptide, il y avait que 3 pour le EO14, 5 pour le S4 et 2 pour le T12 qui ont été observé et avec une faible intensité de la fluorescence par rapport aux spots observé dans le cas de sérum hyper-immunisé (figure 56.A), ce qui prouve l'effet négligeable des réactions non spécifiques.

A



B

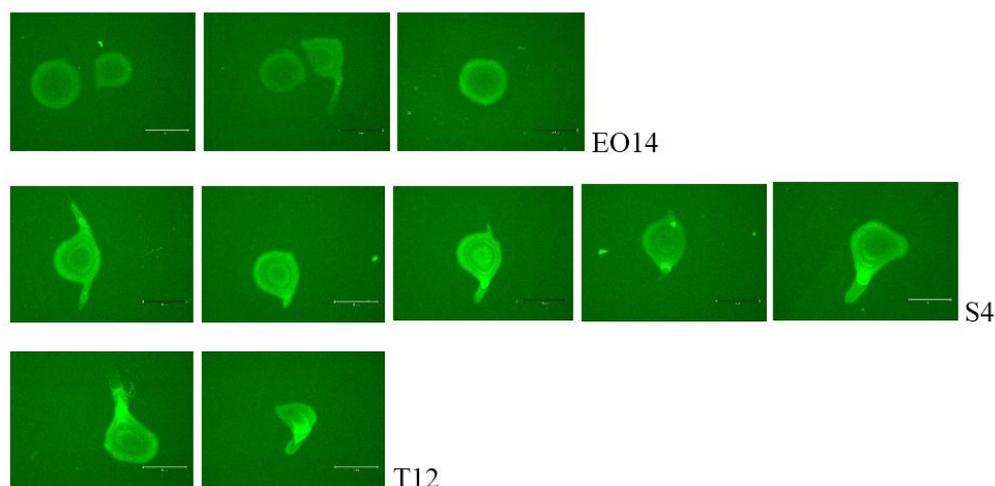


Figure 56. Gouttelettes de fonctionnalisation de volume 1000pL avec différents peptides (EO14 ; S4 et T12) (5 μ M) avec le sérum cacahouète (1 :5000) A) hyper-immunisé (cacahouète 1-t2) et B) pré-immunisé (cacahouète 1-t0).

IV.1.2. Caractérisation électrochimique par la voltammétrie cyclique

Après avoir développé la stratégie 1 décrite auparavant, nous nous sommes ensuite changés le carboxymethylaniline par le MHDA. Pour cela, l'électrode d'or été caractérisée par la voltammétrie cyclique avant et après son incubation dans la solution de MHDA. Cette caractérisation a été réalisée dans une solution aqueuse de 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ préparée dans le PBS (10mM ; pH 7.4). La figure 57 présente les voltammogrammes cycliques enregistrés pour la micro-électrode d'or avant et après sa fonctionnalisation par le MHDA à une vitesse de balayage de 50mV/s.

Des pics rédox réversibles et bien définis de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, avec une intensité de courant maximale de 7 μ A approximativement était observée pour l'électrode d'or non modifiée (voltammogramme noir) en raison de l'excellent transfert d'électrons de l'électrolyte à la surface d'électrode. Ensuite, l'intensité de courant cathodique et anodique de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ a diminué suite à son incubation dans le MHDA prenant une forme capacitive en raison de la formation des monocouches de MHDA auto-assemblées sur la surface d'électrode d'or (Baraket, A et al. 2014).

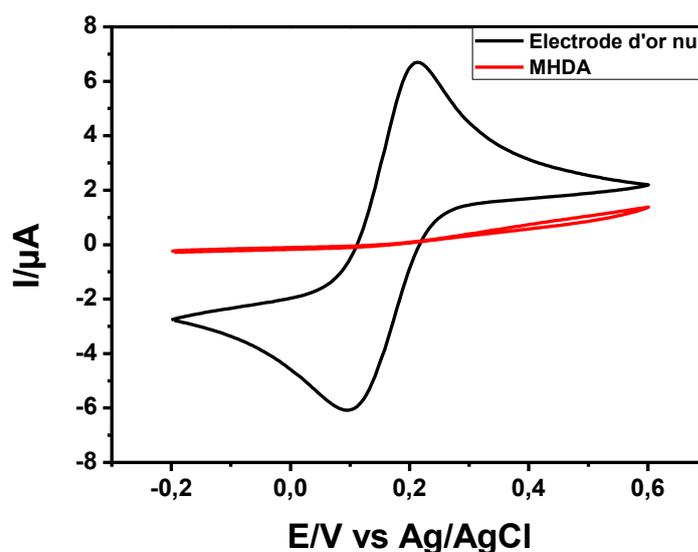


Figure 57. Voltammogrammes cycliques de la micro-électrode d'or dans 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ dans PBS (10mM ; pH 7.4) avant (noir) et après son incubation dans le MHDA (rouge).

IV.1.3. Application du biocapteur pour la détection des IgG dans les sérums du lapin

Après avoir étudié et confirmé la fonctionnalisation du capteur, les mesures des immunoglobulines (IgG) libérés dans les différents sérum ont été effectuées en utilisant des électrodes d'or modifiées avec les peptides choisis dans la première stratégie (T12 pour les cacahouètes et GL4 pour les noisettes) en mesurant la résistance de transfert de charge après incubation de l'électrode dans la dilution désirée de sérum (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 ; 1:5000) via l'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).

Les peptides ID T12 (cacahouète) et ID GL4 (noisette) étaient testés dans les différents sérums du lapin. Brièvement, le peptide ID T12 a été utilisé pour la détection des immunoglobulines dans les sérums de cacahouète pré-immunisé (cacahouète 1-t0) et celui du noisette hyper-immunisé (noisette 1-t2) afin d'étudier l'interférence de la matrice, aussi une détection a été élaboré dans le sérum auquel ce peptide a été destiné celui de la cacahouète hyper-immunisé (cacahouète 1-t2). La démarche était pareil pour le peptide ID GL4, une étude d'interférence était réalisée à travers la détection des immunoglobulines dans les sérums de la noisette pré-immunisé (noisette 1-t0) et la cacahouète hyper-immunisé (cacahouète 1-t2). Ensuite, la détection des immunoglobulines libérés à l'issu de la consommation des noisettes a été effectué tout réalisant la détection dans le sérum de noisettes hyper-immunisé (noisette 1-t2) en utilisant le peptide GL4.

Après l'ajustement des spectres expérimentaux du tracé de Nyquist obtenus tout en utilisant le même modèle de circuit équivalent de Randles ($R1+(Q1/(R2+W1))$). Les courbes d'étalonnage résultantes pour l'étude d'interférence et la détection des immunoglobulines tout en utilisant les peptides ID T12 et ID GL4 sont présentés respectivement sur les figures 58.A et 58.B. Comme le montre la figure 58, le $\Delta R/R$ varie linéairement avec les différentes dilutions du sérum, ce qui donne les équations linéaires (tableau 11). Les résultats obtenus sont en analogie avec ce qui a été montré pour la stratégie 1 concernant les 2 peptides (T12, GL4).

Tableau 11. Récapitulatif de tous les essais réalisés dans le sérum du lapin tout en utilisant les peptides ID T12 et GL4.

Peptide ID	Sérum	Equation linéaire	R ²	RSD (%)	Commentaire
T12	Cacahouète 1-t0	$Y=0.1092*X+0.3351$	0.9938	12	Le peptide ID T12 est plus sensible au sérum cacahouète hyper-immunisé comme il est prévu
	Noisette 1-t2	$Y=0.1273*X+0.3478$	0.9856	4	
	Cacahouète 1-t2	$Y=0.2061*X+0.4819$	0.9935	10	
GL4	Noisette 1-t0	$Y=0.3789*X+0.1638$	0.9951	1	La sensibilité est plus élevée pour le sérum du noisette hyper-immunisé.
	Cacahouète 1-t2	$Y=0.3008*X+0.6444$	0.9778	3	
	Noisette 1-t2	$Y=0.4899*X+1.4633$	0.9942	3	

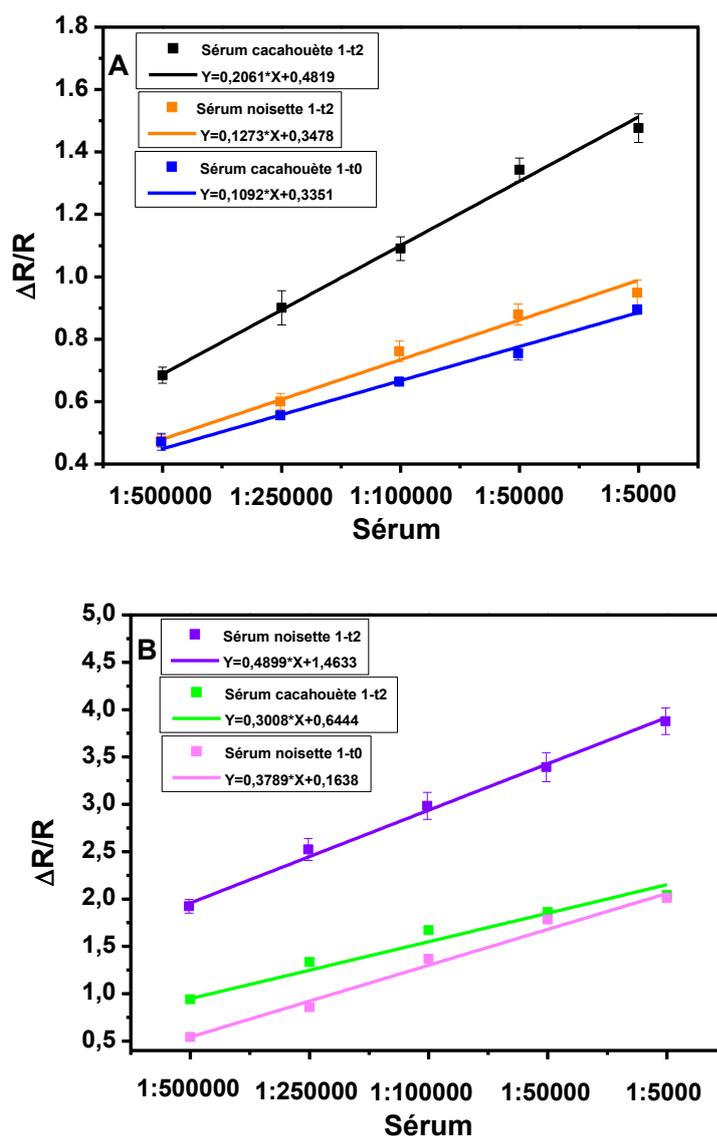


Figure 58. Courbes d'étalonnage relatives à la détection d'IgG dans les sérum du lapin à différentes dilutions (1:500000 ; 1:250000 ; 1:100000 ; 1:50000 et 1:5000) dans 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans le PBS (10mM ; pH 7.4) tout en utilisant A) peptide de cacahouète T12 et B) peptide de noisette GL4.

IV.1.4. Application du biocapteur pour la détection des IgE dans le sérum de l'être humain

Après la fonctionnalisation de l'électrode par le MHDA, l'EDC-NHS, le DBCO-NH₂, l'éthanolamine, le peptide ID T12 s'est attaché à la surface par la réaction du clic en absence du cuivre comme catalyseur (même condition que la stratégie 1). La spectroscopie d'impédance électrochimique a été utilisée pour décrire les propriétés d'interface de l'électrode à partir de l'étape de l'immobilisation du peptide ID T12 jusqu'à sa régénération par glycine tout en passant par l'incubation dans le sérum humain dilué 250 fois à cause de faible taux des

immunoglobulines par rapport à celui du lapin, suivi par une incubation dans des particules magnétiques fonctionnalisées par la protéine A afin de confirmer la présence des immunoglobulines à la surface de l'électrode.

En effet, l'augmentation de R_{ct} indique l'immobilisation de molécules isolantes à la surface de l'électrode. Le spectre d'impédance pour chaque étape de la modification de l'électrode de l'immunocapteur à partir de l'immobilisation du peptide a été enregistré sous forme de tracé de Nyquist typique (figure 59).

Comme le montre la figure 59, le peptide ID T12 (courbe a) a montré un processus de transfert d'électrons rapide avec une valeur de résistance de 338 kOhm. L'incubation dans le sérum humain dilué 250 fois (1 :250) (courbe b) sur l'électrode modifiée, a réduit l'accessibilité du couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, en conséquence, la valeur de la résistance (R_{ct}) a augmenté notablement à 573 kOhm, indiquant que les immunoglobulines liées aux allergènes ont été immobilisées avec succès sur l'électrode et ont bloqué le transfert d'électrons. Après avoir incubé l'électrode dans une solution des particules magnétiques fonctionnalisées par la protéine A qui réagit avec les anticorps (courbe c), la valeur de résistance a encore augmenté jusqu'à 656 kOhm, indiquant encore une fois l'interaction de la protéine A avec les immunoglobulines immobilisées. La résistance a repris sa valeur avant l'incubation dans les MNPs-protéine A et cela après une régénération par la glycine ($R_{ct}=590$ kOhm) (courbe d).

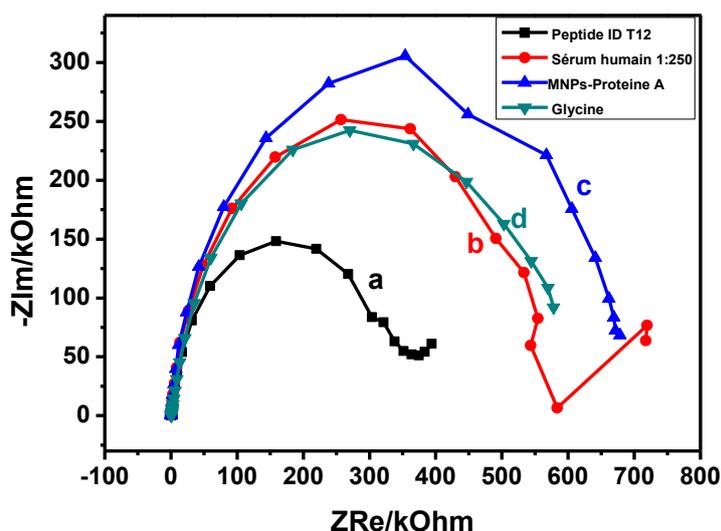


Figure 59. Spectres d'impédance électrochimique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du PBS (10mM ; pH 7.4) pour (a) Peptide ID T12, (b) Sérum humain 1 :250, (c) MNPs-protéine A et (d) Glycine.

IV.2. Conclusions

Le taux d'IgG et/ou d'IgE augmente dans le sang des personnes et des animaux allergiques après la consommation d'un aliment allergène qui provoque une réponse immunologique. Pour cela, deux nouveaux immunocapteurs combinant les avantages des biocapteurs et des microréseaux ont été développés pour la détection des anticorps IgG de lapin et des IgE de l'être humain (anti-cacahuète et anti-noisette) en utilisant une chimie clic sans cuivre permettant la détection en absence de cuivre Cu(I). Ainsi, plusieurs peptides marqués à l'azide ont été immobilisés sur les quatre ETs d'or fonctionnalisés par DBCO-NH₂ pour un diagnostic multiple de ces peptides en terme de spécificité et de sensibilité. Parmi les peptides étudiés, certains étaient spécifiques aux immunoglobulines anti-cacahuète (cas de peptide ID T12), d'autres aux immunoglobulines anti-noisette avec interférence des immunoglobulines anti-cacahuète (peptide ID GL4), et la troisième catégorie n'était spécifique ni aux anti-cacahuète ni aux anti-noisette (cas de S4, EO14, EO13 et HL19), ce qui ouvre la voie à l'essai de nouveaux peptides.

Références

- Alpay, K., Ertaş, M., Orhan, E. K., Üstay, D. K., Lieners, C., & Baykan, B. (2010). Diet restriction in migraine, based on IgG against foods: a clinical double-blind, randomised, cross-over trial. *Cephalalgia*, *30*(7), 829-837.
- Alves, R. C., Pimentel, F. B., Nouws, H. P., Marques, R. C., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P., & Delerue-Matos, C. (2015). Detection of Ara h 1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *64*, 19-24.
- American College of Allergy, Asthma, and Immunology, *ScienceDaily*.
- Ann & Robert H. Lurie, *ScienceDaily*.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Sigaud, M., Yaakoubi, N., Trivella, M. G., Zabala, M., Bausells, J., Jaffrezic-Renault, N. & Errachid, A. (2013). Diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates for impedimetric cytokine detection with an integrated Ag/AgCl reference electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *189*, 165-172.
- Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Yaakoubi, N., Trivella, M. G., Elaissari, A., SIGAUD, M., JAFFREZIC-RENAULT, N., Errachid, A. (2014). A Flexible Label-Free Biosensor Sensitive and Selective to TNF-[alpha]: Application for Chronic Heart Failure. *Sensors & Transducers*, *27*(5), 15.
- Chinnasamy, T., Segerink, L. I., Nystrand, M., Gantelius, J., & Svahn, H. A. (2014). A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics. *Analyst*, *139*(10), 2348-2354.
- Fragkopoulos, A. A., Paim, E., Berger, E., & Fernandez-Nieves, A. (2018). Toroidal droplets: Growth rates, dispersion relations, and behavior in the thick-torus limit. *Langmuir*, *34*(3), 1218-1224.
- Gaudin, J. C., Rabesona, H., Choiset, Y., Yeretssian, G., Chobert, J. M., Sakanyan, V., ... & Haertlé, T. (2008). Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clinical & Experimental Allergy*, *38*(4), 686-693.
- Gerlach, G., & Wolter, K. J. (2012). Bio and nano packaging techniques for electron devices. *Advances in Electronic Device Packaging*. Berlin: Springer-Verlag, 625.
- Harwanegg, C., & Hiller, R. (2004). Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert review of molecular diagnostics*, *4*(4), 539-548.
- Hu, H., & Larson, R. G. (2005). Analysis of the microfluid flow in an evaporating sessile droplet. *Langmuir*, *21*(9), 3963-3971.
- Kreuzer, M. P., O'Sullivan, C. K., Pravda, M., & Guilbault, G. G. (2001). Development of an immunosensor for the determination of allergy antibody (IgE) in blood samples. *Analytica chimica acta*, *442*(1), 45-53.
- K. Deinhofer, H. Sevcik, N. Balic, C. Harwanegg, R. Hiller, H. Rumpold, & Spitzauer, S. (2004). Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods*, *32*(3), 249-254.
- Kim, J. H., Park, S. B., Kim, J. H., & Zin, W. C. (2011). Polymer transports inside evaporating water droplets at various substrate temperatures. *The Journal of Physical Chemistry C*, *115*(31), 15375-15383.
- King, E. M., Vailes, L. D., Tsay, A., Satinover, S. M., & Chapman, M. D. (2007). Simultaneous detection of total and allergen-specific IgE by using purified allergens in a fluorescent multiplex array. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*(5), 1126-1131.
- Lee, H. H., Fu, S. C., Tso, C. Y., & Chao, C. Y. (2017). Study of residue patterns of aqueous nanofluid droplets with different particle sizes and concentrations on different substrates. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, *105*, 230-236.

- Liang, Z. Y., Deng, Y. Q., & Tao, Z. Z. (2020). A quantum dot-based lateral flow immunoassay for the rapid, quantitative, and sensitive detection of specific IgE for mite allergens in sera from patients with allergic rhinitis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(8), 1785-1794.
- Liu, H., Malhotra, R., Peczuh, M. W., & Rusling, J. F. (2010). Electrochemical immunosensors for antibodies to peanut allergen Ara h2 using gold nanoparticle-peptide films. *Analytical chemistry*, 82(13), 5865-5871.
- Mas, S., Badran, A. A., Juárez, M. J., de Rojas, D. H. F., Morais, S., & Maquieira, Á. (2020). Highly sensitive optoelectrical biosensor for multiplex allergy diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 166, 112438.
- Morais, S., Tortajada-Genaro, L. A., Maquieira, Á., & Martinez, M. Á. G. (2020). Biosensors for food allergy detection according to specific IgE levels in serum. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115904.
- Nemeir, I. A., Mouawad, L., Saab, J., Hleihel, W., Errachid, A., & Zine, N. (2020). Electrochemical Impedance Spectroscopy Characterization of Label-Free Biosensors for the Detection of HER2 in Saliva. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 60(1), 17.
- Park, M., Song, Y., Kim, K. J., Oh, S. J., Ahn, J. K., Park, H., ... & Kwon, S. J. (2020). Electrochemical Immunosensor for Human IgE Using Ferrocene Self-Assembled Monolayers Modified ITO Electrode. *Biosensors*, 10(4), 38.
- Parsa, M. (2017). *Wetting and evaporation of nanosuspension droplets* (Doctoral dissertation, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambresis).
- Ruby Pawankar Giorgio Walter Canonica Stephen T. Holgate Richard F. Lockey Michael S. Blaiss, Ed., *White book on allergy*, 2013.
- Shen, X., Ho, C. M., & Wong, T. S. (2010). Minimal size of coffee ring structure. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(16), 5269-5274.
- Shreffler, W. G., Beyer, K., Chu, T. H. T., Burks, A. W., & Sampson, H. A. (2004). Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *Journal of allergy and clinical immunology*, 113(4), 776-782.
- Su, X., & Zhang, J. (2004). Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance for human IgE quantification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 100(3), 309-314.
- Talbot, E. L., Berson, A., & Bain, C. D. (2012, January). Drying and deposition of picolitre droplets of colloidal suspensions in binary solvent mixtures. In *NIP & Digital Fabrication Conference* (Vol. 2012, No. 2, pp. 420-423). Society for Imaging Science and Technology.
- Uno, K., Hayashi, K., Hayashi, T., Ito, K., & Kitano, H. (1998). Particle adsorption in evaporating droplets of polymer latex dispersions on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Colloid and polymer science*, 276(9), 810-815.
- Xu, J., Ye, Y., Ji, J., Sun, J., & Sun, X. (2021). Advances on the rapid and multiplex detection methods of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-21.
- Zouaoui, F., Bourouina-Bacha, S., Bourouina, M., Alcacer, A., Bausells, J., Jaffrezic-Renault, N., Zine, N., & Errachid, A. (2021). Electrochemical impedance spectroscopy microsensor based on molecularly imprinted chitosan film grafted on a 4-aminophenylacetic acid (CMA) modified gold electrode, for the sensitive detection of glyphosate. *Frontiers in chemistry*, 9.

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail est réalisé pour répondre aux demandes croissantes liées au développement des capteurs et des biocapteurs électrochimiques portables, miniaturisés et faciles à manipuler pour des applications environnementales et cliniques. Dans un premier temps, une étude bibliographique générale a été présentée pour but de la contextualisation de notre problématique par rapport à ce qui est rapporté dans les travaux précédents.

Ensuite, la partie expérimentale a été subdivisée en trois chapitres à part celui de la bibliographie. Dans le deuxième chapitre nous avons développé et comparé des électrodes à pâte de carbone modifiées et non modifiées par l'or, la non modifiée en absence et en présence de diphénylcarbazine (DPC) pour la détection spécifique du chrome hexavalent. Parmi les électrodes testées, celle de la pâte de carbone non modifiée en présence du DPC a montré une bonne sélectivité avec une limite de détection de $19 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Par la suite, l'électrode développée a été appliquée avec succès pour la détermination du Cr(VI) dans des échantillons d'eau du robinet. L'originalité de ce travail s'est basée sur l'utilisation du complexe spécifique (DPC) pour la détection indirecte du Cr(VI).

En outre, des immunocapteurs à base de la chimie clic en absence de cuivre comme catalyseur ont été développés pour deux différentes applications cliniques. La première application avait pour but la détection de la cytokine Interleukine-10 (IL-10) dans la salive pour l'insuffisance cardiaque et nous l'avons bien détaillée dans le troisième chapitre. Ici, la nouveauté de notre capteur était basée sur l'introduction de la chimie clic sans cuivre pour la préparation d'un immunocapteur destiné à la détection de l'IL-10. L'analyse de l'interleukine-10 dans salive a été réalisée avec succès avec une limite de détection de $0,1 \text{ pg/mL}$. Dans le même contexte, dans le quatrième chapitre nous étions intéressés à développer deux immunocapteurs à base de la chimie clic sans cuivre en association avec des peptides-azide spécifiques pour la détection des immunoglobulines (IgG chez le lapin et IgG/IgE chez l'être humain) libérés après la consommation des noisettes ou des cacahouètes par un sujet allergique à l'issue d'une hypersensibilité immunologique. De ce fait, plusieurs peptides marqués à l'azide ont été immobilisés en utilisant la méthodologie de la chimie clic pour une multidétection dans le sérum.

En guise de conclusion, au cours de cette thèse nous avons développés de nouveaux capteurs et biocapteurs électrochimiques sensibles, sélectives, facile à préparer et à utiliser, stables, reproductibles, portables, permettent la bio-orthogonalité dans le cas de la chimie clic pour la surveillance de Cr(VI), IL-10 et des allergènes.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ouvrent bien évidemment la voie vers de nouveaux travaux que nous espérons réaliser afin de développer davantage l'utilisation de la chimie clic.

- Réalisation d'une multi-analyse des biomarqueurs lié à l'insuffisance cardiaque (cas de TNF- α , NT-proBNP, cortisol et notre analyte IL-10) et cela à travers l'immobilisation des anticorps spécifiques à ces antigènes à la surface de la puce contenant les quatre électrodes d'or.
- Elargir l'application à travers l'utilisation des oYo-Link qui permettent le marquage de plusieurs substance biologiques par des fonctions azide, DBCO ou même thiol.
- Réduire le temps de fonctionnalisation via l'utilisation du 4-azidoaniline hydrochloride au lieu du thiol-azide ou thiol-acide qui nécessite une activation par EDC/NHS ce qui permet de réduire le temps d'incubation. Ainsi, le remplacement des DBCO-COOH ou DBCO-NH₂ par le 5,6,11,12-Tetrahydrodibenzo[a,e]cyclooctene qui est un DBCO avec un double clic permettant l'interaction directe avec le thiol-azide ou sel de diazonium azide (4-azidoaniline hydrochloride) d'un côté et l'interaction avec l'azide des peptides ou bien des anticorps marqués par l'azide des oYo-Link, par conséquent la suppression des étapes d'activation et de désactivation.