

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
-ANNABA-



جامعة باجي مختار - عنابة

Année / 2021

Faculté des sciences
Département de chimie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Option : Chimie-physique des matériaux

THÈME

**Etude de la bioadhésion des champignons filamenteux sur
différents métaux. Applications aux biocapteurs**

Présentée Par : *Mme DALI Mounira*

Devant le jury suivant :

Président : Mr. Noureddine AOUF	Professeur	Université Badji Mokhtar Annaba
Directeur de thèse : Mme. Hayette SAIFI	Professeur	Université Badji Mokhtar Annaba
Examineurs : Mme Naouel HEZII	MCA	Université Abbes Laghrour de Khenchela
Mr. Nabil BOUGDAH	MCA	Université 20 Août 1955 Skikda
Mr. Abdelkader NOURI	Professeur	Université Larbi Ben M'Hidi d'Oum El Bouagui
Mr. Mokhtar GHERS	Professeur	Université Badji Mokhtar Annaba

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu tout puissant et tous les gens qui m'aiment et qui m'ont soutenu j'ai pu achever ce travail que je dédie à :

Mes chers parents,

En témoignage de gratitude, d'estime et d'attachement,

Mon mari ALI,

Pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse,

Mes frères et sœurs,

Ma belle-famille,

Toute ma famille.

*« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »
Marie Curie*

Remerciements

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.

Marcel Proust

Ce travail de recherche n'aurait pas pu aboutir sans la riche collaboration et l'aide précieuse et le soutien infaillible de nombreuses personnes. Je désire leur témoigner ma gratitude via ces quelques lignes.

*Je tiens tout d'abord à remercier ma Directrice de thèse Madame **Hayette SAIFI**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar-ANNABA, pour avoir accepté de poursuivre la direction de cette thèse, pour la confiance qu'elle m'a témoignée, pour sa disponibilité, pour ses qualités humaines et ses précieux conseils.*

*Je tiens également à exprimer mes plus hautes reconnaissances à Monsieur **Hafid BELKHIR**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar-ANNABA, pour sa rigueur scientifique et sa clairvoyance, pour sa gentillesse sans limites, pour son aide précieuse, pour ses encouragements, son soutien moral, ses précieux conseils et sa bonne humeur.*

*Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi à Monsieur **Nouredine AOUF**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar-ANNABA, pour son aide et ses conseils judicieux et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Mes plus sincères remerciements vont à Monsieur **Abdelkader NOUIRI**, Professeur à l'Université Larbi Ben M'Hidi d'Oum El Bouaghi pour avoir mobilisé son temps et ses compétences pour examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier Madame **Naouel HEZIL**, Maître de Conférences « A », à l'Université Abbes Laghrour de Khenchela, et Monsieur **Nabil BOUGDAH**, Maître de Conférences « A », à l'Université 20 Août 1955 Skikda, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Je leur exprime toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail et pour leurs appréciations.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **Mokhtar GHERS**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar-ANNABA, qui a accepté de juger ce travail. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux,*

*J'adresse mes remerciements à Madame **Nicole JAFFREZIC-RENAULT**, Directrice de Recherche Emérite CNRS, pour la collaboration fructueuse et d'avoir mis à ma disposition les « nanotubes de Carbone », pour réaliser une grande partie de ce travail.*

*Je n'oublierai pas de remercier aussi mes amis de la Faculté des Sciences de Monastir, **Amani CHROUDA** et **Mohamed BRAIEK**, pour leurs aides précieuses.*

Enfin, Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. Un grand merci à tous.

*A mes amis, collègues de la Faculté des Sciences de l'université Badji Mokhtar Annaba **Dr Dalila FEDAOUI ET Rafik DRICI**, j'aimerais vous offrir mon amicale reconnaissance pour votre présence, gentillesse et appui qui ont su égayer ces années de travail.*

أجهزة الاستشعار هي وسائل سريعة النمو، انتقائية وغير مكلفة قابلة للتطبيق على مجالات متنوعة للغاية (البيئة، الصحة، صناعة المواد الغذائية، إلخ). في هذا العمل، نحن مهتمون بتطوير مستشعر بيولوجي كيميائي للكشف عن آثار أيونات المعادن الثقيلة باستخدام سطح قطب كربون زجاجي معدّل كيميائياً بواسطة مزيج من الكتلة الحيوية. تم استخدام الفولتمتر الدوري، لإعادة تحليل انودي مع المسح المحتمل النبضي للكشف عن نوعين من المعادن الرصاص والكاديوم في ظروف مثالية. أجريت قياسات فردية للرصاص والكاديوم بتركيزات مختلفة في محلول خلاص 0.1 م في وسط حمضي 4.5، تم التحقق من الخطية بالنسبة للمعادن وحدة الكشف الذي تم الحصول عليه لهذين المعدنين بعد وقت تركيزه أولي قدره 20 دقيقة 10⁻⁸ م للرصاص و 10⁻⁷ م للكاديوم. أظهر القطب المعدل حساسية عالية جداً للأيونات. الحساسيات المحسوبة من منحنيات المعايرة هي على التوالي $17.889 = \text{Cd}$ ميكرو أمبير/ع [Cd (II)] و $21.983 = \text{Pb}$ ميكرو أمبير/ع [Pb (II)]

لقد طورنا أيضاً مستشعراً حيوياً مقاوماً استناداً إلى تثبيط أستيل كولينستريز بواسطة الأفلاتوكسين ب 1. يعتمد المستشعر الحيوي الكهروكيميائي المطور على بوليمر حيوي من ألجينات الصوديوم كمصفوفة جديدة لتجميد أستيل كولينستريز. تستخدم الفولتمتر الموجي المربع كوسيلة تحويل عملية لتقييم نشاط أستيل كولينستريز بواسطة أكسدة المنتج الأيضي، الثيوكولين. يتم الحصول على أداء تحليلي جيد من حيث الحساسية والتكاثر مع مجموعة ديناميكية خطية من 0.01 إلى 100 نانو غرام/مل. يوجد لدى جهاز الاستشعار البيولوجي لدينا حد كشف منخفض 0.01 نانو غرام/مل وهو أقل من المستوى الموصى به من الأفلاتوكسين ب 1 (5 ميكرو غرام/مل). يتم تقييم أهمية الطريقة من خلال تحديد الأفلاتوكسين في عينات حقيقية، كما يتم دراسة انتقائية جهاز الاستشعار البيولوجي مقارنة بمجموعات أخرى من المواد السامة الأوكراتوكسين والأفلاتوكسين ب 1

كلمات مفتاحية: الاستشعار البيولوجي، الكتلة الحيوية، معادن، أستيل كولينستراز، ألجينات الصوديوم، الأفلاتوكسين ب 1، (VC)، (EIS)، (SWV)، (DPASV)، (SWCNTs)

Résumé

Les biocapteurs sont des moyens d'analyse en plein essor à la fois rapides, sélectifs et peu coûteux applicables à des domaines extrêmement variés (environnement, santé, agroalimentaire,...). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection des traces d'ions de métaux lourds à l'aide d'une surface d'électrode en carbone vitreux chimiquement modifiée par un mélange de (SWCNTs-CO / Biomasse). La voltammétrie par redissolution anodique avec balayage de potentiel pulsé (PDASV) a été utilisée pour la détection de Cd (II) et Pb (II) dans des conditions optimisées. Les mesures individuelles de Cd (II) et Pb (II) ont été effectuées à diverses concentrations dans un tampon d'acétate 0,1 M et pH égal à 4,5. La linéarité a été validée pour les deux métaux, la limite de détection obtenue pour ces deux métaux après un temps de préconcentration de 20 min est de 10⁻⁷M pour le Cd et 10⁻⁸M pour le Pb. L'électrode modifiée a montré une très grande sensibilité à l'égard des ions. Les sensibilités calculées à partir des courbes d'étalonnage sont respectivement de l'ordre Cd = 17,889 µA/p [Cd (II)] et Pb = 21,983 µA/p [Pb (II)]. Nous avons également élaboré un biocapteur impédimétrique basé sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) par l'aflatoxine B1 (AFB1). Le biocapteur électrochimique développé est basé sur un biopolymère d'alginate de sodium en tant que nouvelle matrice pour l'immobilisation d'AChE. La voltampérométrie à ondes carrées (SWV) est utilisée comme méthode de transduction pratique pour évaluer l'activité de l'AChE par l'oxydation du produit métabolique, la thiocholine. De bonnes performances analytiques en termes de sensibilité et de reproductibilité sont obtenues avec une plage dynamique linéaire de 0,01 à 100 ng/mL. Notre biocapteur a une

limite de détection basse (0,01 ng/ml, ce qui est inférieur au niveau recommandé d'AFB1 [5 µg/mL]). La pertinence de la méthode est évaluée par la détermination de l'aflatoxine B1 dans des échantillons réels. La sélectivité du biocapteur (AChE) par rapport à d'autres groupes de substances toxiques (OTA, AFM 1) est également étudiée.

Mots-clés : Biocapteur, biomasse, métaux lourds, acétylcholinestérase, aflatoxineB1, Alginate de sodium, (VC), (EIS), (SWV), (DPASV), (SWCNTs).

Abstract

In last decade, biosensors are quite promising tools since they are rapid, selective and cost effective, with an increasing interest for their application in various fields (e.g. environment, food, health). In this work, we developed an electrochemical biosensor for the detection of trace ions of heavy metals using a vitreous carbon electrode surface chemically modified by a mixture of (SWCNTs-CO / Biomass). Differential pulse anodic stripping voltammetry analysis (DPASV) was used for the detection of Cd (II) and Pb (II) under optimized conditions. Individual Cd (II) and Pb (II) measurements were made at various concentrations in 0.1 M acetate buffer and pH 4.5. The linearity has been validated for the two metals, the detection limit obtained for these two metals after a preconcentration time of 20 min is 10^{-7} M for Cd and 10^{-8} M for Pb. The modified electrode showed a very high sensitivity to ions. The sensitivities calculated from the calibration curves are respectively of the order Cd = 17.889 mA/p [Cd (II)] and Pb = 21.983 mA/p [Pb (II)]. We also elaborated an impedimetric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by aflatoxin B1 (AFB1). The electrochemical biosensor developed is based on a biopolymer of sodium alginate as a novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase. Square Wave Voltammetry is used as a convenient transduction method to evaluate AChE activity by oxidation of the metabolic product, thiocholine. Good analytical performances in terms of sensitivity and reproducibility are obtained with a linear dynamic range of 0.01 to 100 ng/mL. Our biosensor has a low detection limit (0.01 ng / ml, which is below the recommended level of AFB1 [5 µg / mL]). The relevance of the method is evaluated by the determination of aflatoxin B1 in real samples. The selectivity of the acetylcholinesterase biosensor compared to other groups of toxic substances (OTA, AFM 1) is also studied.

Keywords: Biosensor, biomass, heavy metals, acetylcholinesterase, aflatoxineB1, Sodium alginate, (VC), (EIS), (SWV), (DPASV), (SWCNTs).

Liste des figures

Figure I.1.	Principe de fonctionnement d'un biocapteur	7
Figure I.2.	Electrode modifiée pour application électrochimique	8
Figure I.3.	Electrode d'or modifiée par SAM	11
Figure I.4.	Principe de dépôt couche par couche	12
Figure I.5.	Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone monofeuillet (SWCNT) (A) et multi-feuillets (MWCNT) (B)	16
Figure I.6.	Différents modes de fonctionnalisation des nanotubes de carbone	16
Figure I.7.	Représentation schématique des stratégies de fonctionnalisation des parois latérales SWCNTs : fonctionnalisation covalente	17
Figure I.8.	Représentation schématique des stratégies de fonctionnalisation des parois latérales SWCNTs : fonctionnalisation covalente	18
Figure I.9.	Représentation schématique des stratégies de fonctionnalisation des parois latérales SWCNTs : fonctionnalisation non-covalente	19
Figure I.10.	Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique	20
Figure I.11.	Hydrolyse de l'acétylcholine par AChE au niveau de la synapse cholinergique	22
Figure I.12.	Mécanisme catalytique de l'acétylcholinestérase	23
Figure I.13.	Représentation schématique de la structure 3D du AChE	24
Figure I.14.	Mécanisme d'inhibition de l'AChE par les organophosphorés	24
Figure I.15.	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme	26
Figure I.16.	Immobilisation des biomolécules par adsorption	27
Figure I.17.	Immobilisation des biomolécules par piégeage	27
Figure I.18.	Immobilisation des biomolécules par liaison covalente	28
Figure I.19.	Immobilisation des biomolécules par réticulation et Co-réticulation	29
Figure I.20.	Différents types d'algues selon leur pigmentation	33
Figure I.21.	Structure des polysaccharides	34
Figure I.22.	Modèle d'organisation de la paroi des algues brunes	37
Figure I.23.	Structure des alginates issus des algues brunes	38
Figure I.24.	Structure chimique de l'aflatoxine B1(AFB1)	40
Figure I.25.	Structures chimiques des différentes aflatoxines	40
Figure I.26.	Spéciation du Pb dans les eaux naturelles	49
Figure II.1.	Dispositif de mesure électrochimique	61
Figure II.2.	Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat	63
Figure II.3.	Allures des voltammogrammes cycliques :(a) système rapide (réversible), (b) système quasi-rapide (quasi-réversible), (c) système très lent (quasi-irréversible) et (d) système irréversible	65
Figure II.4.	Les étapes de voltammétrie à redissolution anodique	68
Figure II.5.	Principe d'une mesure par square wave voltammétrie (SWV)	69
Figure II.6.	Diagramme de phase pour une tension alternative	71
Figure II.7.	Différents processus électrochimiques à l'interface métal/électrolyte	72
Figure II.8.	Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle	73
Figure II.9.	Diagramme de Nyquist	73
Figure II.10.	Circuit électrique de Randles	74
Figure II.11.	Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution	76
Figure II.12.	MEB EVO MA 25	77

Figure II.13.	Schéma du montage du microscope électronique à balayage	78
Figure II.14.	Schéma simplifié d'un extracteur Soxhlet	83
Figure II.15.	Méthode d'extraction des polysaccharides à partir des algues brunes, Cystoseira sedoides, Cystoseira crinita et Cystoseira compressa	85
Figure II.16.	Différentes étapes d'élaboration d'un biocapteur pour la détection de l'AFB1	87
Figure III.1.	(A) Aspect macroscopique de Trichoderma asperellum cultivé dans un milieu PDA, (B) Aspect microscopique de Trichoderma sperellum	90
Figure III.2.	Spectre d'absorption IR caractéristique du champignon filamenteux (Trichoderma asperellum)	91
Figure III.3.	Optimisation de la quantité de SWCNTs déposée sur ECV en présence de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans 0,1M KCl	93
Figure III.4.	Microscope électronique à balayage (MEB) (A)- ECV/ (SWCNTs-COOH), (B)- ECV/SWCNTs-CO/Biomasse	94
Figure III.5.	Analyse EDS: (A) - ECV/ (SWCNTs-COOH), (B) - ECV/SWCNTs-CO/Biomasse	95
Figure III.6.	Voltammogrammes cycliques de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5mM) sur l'électrode nue ECV et modifié (ECV/SWCNTs-CO-Biomasse)	95
Figure III.7.	Diagrammes de Nyquist de l'électrode nue ECV et modifié ECV/SWCNTs-CO-Biomasse dans une solution de KCl (0,1 M) contenant du $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	96
Figure III.8.	Circuit électrique équivalent permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant	97
Figure III.9.	Effet du pH sur la détection du Cd (II) et Pb (II)	99
Figure III.10.	Effet du Potentiel de préconcentration sur la détection du Cd(II) et Pb(II)	100
Figure III.11.	Effet du temps d'accumulation sur la détection du Cd (II) et Pb (II)	101
Figure III.12.	Effet du temps de préconcentration sur la détection du Cd (II) et Pb(II)	102
Figure III.13.	Illustration schématique du principe de détection M^{2+}	103
Figure III.14.	Courbes DPASV de différents concentration des ions Cd(II) et Pb(II) accumulés sur l'électrode ECV/ SWCNTs-CO-Biomasse, temps d'accumulation 20 min dans un tampon d'acétate 0,1M, pH 4.5, temps de réduction 4 min, potentiel de réduction -0.9V	104
Figure III.15.	(A) et (B) Courbes d'étalonnage de ECV / SWCNTs-CO-Biomasse pour différentes concentrations d'ions Cd(II) et Pb(II)	105
Figure III.16.	(C) et (D) Variation linéaire de l'intensité du courant en fonction de la concentration de Cd(II) et Pb(II) sur ECV / SWCNTs-CO-Biomasse, DRS = 6,5% et 4,43% respectivement (n = 3)	105
Figure III.17.	Courbes de détection simultanée par DPASV de différentes concentrations des ions Cd(II) et Pb(II) accumulés sur l'électrode nue ECV et modifié ECV/SWCNTs-CO-Biomasse	107
Figure III.18.	Détection des ions Cd(II) et Pb(II) dans l'échantillon d'eau réelle par DPASV	108
Figure III.19.	Spectres IRTF des échantillons ACS, ACCr et ACCo	113
Figure III.20.	Image en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) d'une électrode d'or nue et modifiée par un biofilm d'alginate	114
Figure III.21.	Mesure par voltammétrie cyclique à $V = 100 \text{ mVs}^{-1}$, en présence de 5mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$: (a) or nue, (b) or modifié par 15 μL Alginate de sodium	115

Figure III.22.	Diagrammes de Nyquist obtenus dans une gamme de fréquence de 100 mHz – 100 kHz, en présence de 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, (a) or nue, (b) or modifié par 15 μL Alginate de sodium	116
Figure III.23.	Circuit électrique équivalent pour la modélisation de l'électrode fonctionnalisée	117
Figure III.24.	Mécanisme de dégradation du substrat TCh par AChE	118
Figure III.25.	(A) Voltammogrammes obtenus dans une solution de PBS (0.1M), (B) Diagramme de Nyquist obtenu après addition d'une concentration de 4 mM d'AFB1 dans la solution de PBS (0,1M)	119
Figure III.26.	(A) Diagrammes (SWV) de l'électrode modifiée Or/AS/AChE dans différentes concentrations d'ATCh (0 à 4,8 mM) dans PBS (0,1 M, pH 7,0) ; (B) Courbe d'étalonnage de l'électrode modifiée Or /AS/AChE (dans PBS 0,1 M, pH 7,0)	121
Figure III.27.	Voltampérométrie à signaux carrés de potentiel (SWV) a différentes ajouts de concentrations d'AFB1 (0-100 ng/mL)	122
Figure III.28.	Courbe de calibration de [AFB1]	123
Figure III.29.	Sélectivité du biocapteur en présence de l'aflatoxine M1 et Ochratoxine A	125

Liste des tableaux

Tableau I.1.	Classification des polysaccharides selon leurs origines	35
Tableau I.2.	Propriétés chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2	41
Tableau I.3.	Flux des métaux lourds dans l'environnement (en tonnes)	43
Tableau III.1.	Fréquences d'absorption observées dans les spectres infrarouges des microorganismes et leur attribution biomoléculaire	91
Tableau III.2.	Effet de la quantité des SWCNTs déposés sur la réponse de l'électrode	93
Tableau III.3.	Paramètres électrochimiques de l'électrodes nue et modifiée ECV (SWCNTs-CO/Biomasse obtenus à partir des données d'impédance d'analyse avec le circuit de randles [R(C[RW])])	98
Tableau III.4.	Comparaison des performances analytiques des méthodes électrochimiques pour la détermination de Cd (II) et Pb (II)	106
Tableau III.5.	Stabilité de la réponse du capteur pendant quatre semaines	108
Tableau III.6.	Résultats de l'expérience de récupération	109
Tableau III.7.	Rendements de l'extraction des fucoïdes et des alginates pour les algues brunes <i>Cystoseira compressa</i> , <i>Cystoseira sedoides</i> et <i>Cystoseira crinita</i>	112
Tableau III.8.	Etude Comparative de différentes méthodes de détection de l'aflatoxine B1	124
Tableau III.9.	Détection de l'aflatoxine B1 dans trois échantillons de lait : écrémé, demi écrémé et entier	126

Liste Des Principaux Sigles Et Abréviations

A : Surface active de l'électrode

ACCr : Alginate de sodium extrait à partir de l'algue brune *Cystoseira Crinita*

ACCo : Alginate de sodium extrait à partir de l'algue brune *Cystoseira Compressa*

ACS : Alginate de sodium extrait à partir de l'algue brune *Cystoseira Sedoides*

AChE: Acétylcholinestérase

ATCh: Acéthylthiocholine

TCh: Thiocholine

ACh : Acétylcholine

AFB1 : Aflatoxine B1

AS : Alginate de Sodium

CCM : Chromatographie en Couche Mince

C_{ac} : Capacité de la double couche

C.Compressa : Algue brune *Cystoseira Compressa*

C.Crinita : Algue brune *Cystoseira Sedoides*

C.Sedoides : Algue brune *Cystoseira Sedoides*

CE : Electrophorèse Capillaire

CE : Contre-électrode

CEE : Circuit Electrique Equivalent

ChOx : Choline oxydase

CME : Electrodes chimiquement modifiées

CNTs : Nanotubes de carbone

C_f : Capacité du film

DA : Degré d'Acétylation

DD : Degré de Désacétylation

DP : Degré de Polymérisation

DPASV : Voltammétrie en redissolution anodique à impulsions différentielle

DRS : Déviation relative standard

ECV : Electrode de carbone vitreux modifiée

EDS : Abréviations de l'anglais « *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* » Spectroscopie de dispersion d'énergie de rayons X

ELISA : abréviations de l'anglais « *Enzyme-linked immunosorbent assay* ». Dosage immunosorbant lié aux enzymes.

E₀ : Potentiel d'équilibre

E : potentiel de l'électrode indicatrice

E_i : potentiel initial appliqué à l'électrode

E_{pa} : Potentiel du pic anodique

E_{pc} : Potentiel du pic cathodique

EPC : Electrodes à Pâte de Carbone

ESI : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique

GA : Glutaraldéhyde

GC/MS : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

GNP: Nanoparticules d'or

HGNPs/SPEd: screen-printed electrode

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

IRTF : Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier

LbL : Layer-by-Layer

MEB : Caractérisation par microscopie électronique à balayage

MWCNTs : Nanotubes de carbone à multiple parois

OTA : Ochratoxine

PAN : Poly acrylonitrile

PEH : Plan Externe d'Helmholtz

PIH : Plan interne d'Helmholtz

PVD : Dépôt en phase vapeur (Physical Vapor Deposition)

RE : Electrode de référence

R_f : Résistance du film

R_{tc} : Résistance de transfert de charge (Ω/cm^2)

R_s : Résistance de la solution (Ω/cm^2)

SPE : Substances polymériques extracellulaires

SWCNTs : Nanotubes de carbone à paroi simple

SWV : Voltampérométrie à ondes carrées (Square wave voltammetry)

TCNQ : Tétracyanoquinodiméthane

TLC: Thin-layer Chromatography, « Chromatographie sur Couche mince

TTF: Tétrathiafulvalène

VC : Voltammétrie cyclique

D : Coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

F : Constante de Faraday

KDa : Kilo Dalton

n : Nombre d'électrons transférés

ρ : Résistivité de la solution
 C_0 : Concentration initiale
 R : Constante de gaz parfait
 S : Surface électro-active de l'électrode (cm^2)
 T : Température
 t : Temps (s)

ε : Permittivité relative du diélectrique
 ε_0 : Permittivité diélectrique du vide
 e : Epaisseur diélectrique
 σ : Coefficient de Warburg
 V : Vitesse de balayage (V/s)
 $\omega = 2\pi f$: Pulsation où f (Hz)
 Z : Module de l'impédance

Z_w : Impédance de Warburg (Ω/cm^2)
 F : Fréquence (Hz)

Θ : Recouvrement (%)

φ : Angle de déphasage

Ψ : Paramètre de transfert de charge

Sommaire

Introduction Générale	01
Chapitre I : Etude bibliographique	
I.1. Généralités sur les capteurs	05
I.1.1. Historique	05
I.1.2. Définition	05
I.1.3. Les capteurs chimiques	06
I.1.4. Les biocapteurs (ou capteurs biologiques)	06
I.2. Les électrodes modifiées	08
I.2.1. Les différentes méthodes de modification des électrodes	10
I.2.2.1. Méthodes physiques	10
I.2.2.2. Méthodes chimiques	10
I.2.2.2.1. Modification par adsorption chimique	10
I.2.2.2.2. Modification par des monocouches auto-assemblées	11
I.2.2.2.3. Modification par la technique sol-gel	11
I.2.2.2.4. Modification par la technique couche par couche (LBL)	11
I.2.2.3. Méthodes électrochimiques	12
I.3. Matériaux utilisés pour la modification des électrodes	13
I.3.1. Les nanomatériaux	13
I.3.1.1. Les nanoparticules	13
I.3.1.2. Les nanoparticules d'or	14
I.3.1.3. Les nanotubes de carbone	15
I.3.1.3.1. Fonctionnalisation covalente	17
I.3.1.3.2. Fonctionnalisation non covalente	18
I.4. Les enzymes	19
I.4.1. Site actif	20
I.4.2. Les biocapteurs enzymatiques	20
I.4.2.1. Biocapteurs Potentiométriques	20
I.4.2.2. Biocapteurs Ampérométriques	21
I.4.3. Biocapteur à base d'acétylcholinestérase (AChE)	21
I.4.3.1. Rôle de l'AChE	22
I.4.3.2. Description structurale de l'Acétylcholinestérase	23
I.4.3.3. Mécanisme d'inhibition	24
I.4.4. Les différentes techniques d'immobilisation d'enzyme sur la surface du transducteur	25
I.4.4.1. Les méthodes physiques d'immobilisation	26
I.4.4.1.1. L'adsorption	26
I.4.4.1.2. Le piégeage	27
I.4.4.2. Les méthodes chimiques d'immobilisation	28
I.4.4.2.1. Liaison covalente	28
I.4.4.2.2. Réticulation et Co-réticulation	28
I.5. Les champignons filamenteux	30
I.5.1. Réponse extracellulaire de la cellule fongique	30
I.6. Identification des polysaccharides issus des algues brunes	31
I.6.1. Généralités sur les algues	31
❖ Classification des algues	32

I.6.2.	Généralités sur les polysaccharides	34
I.6.2.1.	Classification des polysaccharides	35
I.6.2.2.	Les polysaccharides d'origine algale	36
❖	Les Alginates	37
a).	Définition et structure	37
b).	Propriétés physico-chimiques	38
c).	Les applications des alginates	38
I.7.	L'Aflatoxine B1 : molécule cible étudiée	39
I.7.1.	Définition et structure chimique	39
I.7.2.	Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines	41
I.7.3.	Contamination des aliments	41
I.8.	Généralités sur les métaux lourds et leurs effets sur l'environnement	42
I.8.1.	Origine des métaux lourds	42
I.8.1.1.	Origine naturelle	42
I.8.1.2.	Origine anthropique	43
I.8.2.	Procèdes d'élimination des métaux Lourds	44
I.8.2.1.	Adsorption	44
I.8.2.2.	Filtration par membrane	44
I.8.2.3.	Les résines d'échanges	44
I.8.2.4.	Electrocoagulation- floculation	44
I.8.2.5.	Fixation biologique	45
I.8.2.6.	Précipitation chimique	45
I.8.3.	Eléments traces étudiés	46
I.8.3.1.	Cadmium	46
I.8.3.1.1.	Propriétés	47
I.8.3.1.2.	Toxicité et Persistance	47
I.8.3.1.3.	L'utilisation du Cd par l'homme dans les cycles biologiques	48
I.8.3.2.	Plomb	48
I.8.3.2.1.	Propriétés	48
I.8.3.2.2.	Toxicité et Persistance	49
I.8.3.2.3.	L'utilisation du Pb par l'homme dans les cycles biologiques	51
	Références bibliographiques	52

Chapitre II : Méthodes et matériels

II.1.	Introduction	61
II.2	Dispositifs expérimentaux	61
II.2.1.	Appareillage et montage électrochimique	61
II.2.2.	Cellule électrochimique	62
II.3.	Méthodes électrochimiques utilisées	63
II.3.1.	Voltammétrie	63
II.3.1.1.	Voltammétrie cyclique	64
II.3.1.1.1.	Système réversible (Système rapide)	66
II.3.1.1.2.	Système quasi-réversible (système quasi-rapide)	66
II.3.1.1.3.	Système irréversible (système lent)	67
II.3.1.2.	Voltammétrie en redissolution anodique à impulsions différentielle (DPASV)	67
II.3.1.2.1.	Étape de préparation des électrodes à film métalliques	67
II.3.1.2.2.	Étape de Préconcentration du métal à déterminer	67
II.3.1.2.3.	Étape de redissolution	68
II.3.1.3.	Voltampérométrie à ondes carrées (SWV)	69

II.3.2.	Spectroscopie d'impédance	70
II.3.2.1.	Principe de la spectroscopie d'impédance	70
II.3.2.2.	Représentation graphique de l'impédance	71
II.3.2.2.1.	Diagramme de Bode	72
II.3.2.2.2.	Diagramme de Nyquist	73
II.3.2.2.3.	Circuit électrique équivalent : Circuit de Randles	74
II.3.2.3.	Impédance de différents phénomènes électrochimiques	74
II.3.2.3.1.	Résistance de transfert de charge	75
II.3.2.3.2.	Résistance de la solution R_s	75
II.3.2.3.3.	Capacité de la double couche	75
II.3.2.3.4.	Impédance de Warburg	77
II.4.	Techniques d'analyse de surface	77
II.4.1.	Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)	77
II.4.1.1.	Principe de fonctionnement	78
II.4.2.	Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX)	79
II.4.3.	Spectroscopie infrarouge	79
II.5.	Méthodes et conditions expérimentales	80
II.5.1.	Produits chimiques et réactifs	80
II.5.2.	Elaboration D'un Biocapteur ECV/SWCNTs-CO/Biomasse	81
II.5.2.1.	Protocole de préparation de la biomasse	81
II.5.2.2.	Nettoyage de la surface de l'électrode de carbone vitreux	81
II.5.2.3.	Dépôt de (SWCNTs-CO/Biomasse) sur l'électrode de carbone vitreux	82
II.5.3.	Elaboration d'un biocapteur Or/ AS /AChE	82
II.5.3.1.	Extraction et identification des polysaccharides issus des algues brunes	82
II.5.3.1.1.	Récolte de la matière algale	82
II.5.3.1.2.	Extracteur Soxhlet	83
II.5.3.1.3.	Préparation de la matière algale	83
II.5.3.1.4.	Extraction des polysaccharides à partir des algues brunes	84
II.5.3.2.	Développement d'un biocapteur à électrode modifié par Alginate de sodium	86
II.5.3.3.	Immobilisation de l'Achée par réticulation Glutaraldéhyde	86
II.6.	Conclusion	87
	Références bibliographiques	88

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie A


Biocapteur chimique à base de biomasse pour la détection des métaux lourds

III.A.1.	Introduction	89
III.A.2.	Caractérisations des champignons filamenteux	90
III.A.2.1.	Observations macro et microscopiques	90
III.A.2.2.	Analyse des spectres FTIR	90
III.A.3.	Caractérisations électrochimiques des électrodes modifiées	92
III.A.3.1.	Procédure et test électrochimique sur des électrodes modifiées	92
III.A.3.2.	Choix de la quantité de SWCNTs déposée sur une électrode de carbone vitreux	92
III.A.3.3.	Aspects morphologiques des électrodes modifiées -Caractérisation par MEB	94
III.A.3.4.	Caractérisation par voltammétrie cyclique	95

III.A.3.5.	Caractérisation par spectroscopie d'impédance	96
III.A.3.6.	Calcul du taux de recouvrement	98
III.A.4.	Application d'électrode modifiée (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) pour l'analyse des cations métalliques	98
III.A.4.1.	Optimisation des conditions de détection	98
III.A.4.1.1.	Effet de pH	99
III.A.4.1.2.	Potentiel de préconcentration	100
III.A.4.1.3.	Temps d'accumulation	100
III.A.4.1.4.	Temps de réduction	101
III.A.4.2.	Principe de détection	102
III.A.4.3.	Détection des métaux lourds par (DPASV)	103
III.A.4.4.	Étude d'interférence	106
III.A.4.5.	Répétabilité de l'électrode	107
III.A.4.6.	Analyse d'un échantillon réel	108
III.A.5.	Conclusion	109

Partie B

Biocapteur ampérométrique à acétylcholinestérase pour la détermination d'aflatoxine B1

III.B.1.	Introduction	110
III.B.2.	Choix de bio récepteur et de transducteur	111
III.B.3.	Caractérisation des algues brunes étudiées	111
III.B.3.1.	Rendements de l'extraction des fucoïdes et des alginates	112
III.B.3.2.	Analyse des échantillons extraits par IRTF	112
III.B.4.	Caractérisations électrochimiques des électrodes modifiées	114
III.B.4.1.	Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	114
III.B.4.2.	Caractérisation électrochimique des interfaces électrodes / électrolytes modifiées	114
III.B.4.2.1.	Caractérisation par voltammétrie cyclique	115
III.B.4.2.2.	Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	116
III.B.5.	Réponse du biocapteur en présence de l'Aflatoxine	118
III.B.5.1.	Détection du Thiocholine par l'enzyme acétylcholinestérase	118
III.B.5.2.	Principe d'inhibition de l'aflatoxine B1 par l'enzyme acétylcholinestérase	118
III.B.5.3.	Réponse du Biocapteur en présence du substrat Thiocholine	119
	Détection d'AFB1 par la voltampérométrie à ondes carrées (SWV)	122
III.B.5.4.	Calibrage du biocapteur AFB1	123
III.B.5.5.	Comparaison des performances de notre biocapteur a des travaux antérieurs	123
III.B.5.6.	Sensibilité et reproductibilité du biocapteur	124
III.B.5.7.	Sélectivité du biocapteur pour l'aflatoxine B1	125
III.B.5.8.	Détection de l'Aflatoxine B1 dans un échantillon de lait	125
III.B.6.	Conclusion	126
	Références bibliographiques	127
	Conclusion générale	130
	Annexe	132

Introduction Générale

Introduction Générale

La modification de surfaces constitue un domaine de recherche important en termes de publications et d'activités industrielles. Elle permet la fonctionnalisation de surfaces et ouvre des perspectives intéressantes pour de nouvelles applications dans différents domaines médical [1-5], environnement [6-9] et agro-alimentaire [10-13], Plusieurs chercheurs s'intéressent à la modification de surface pour la préparation de biocapteurs. Ce domaine a connu un développement remarquable, différentes stratégies ont été suivies afin d'obtenir un dispositif fiable, performant et spécifique à la cible [14]. La préoccupation croissante dans le monde entier pour limiter les contaminants des produits alimentaires et l'accumulation de métaux lourds dans les sols et des eaux de mer, a créé un besoin pour le développement des méthodes rapides, sensibles permettant de détecter des composés biologiques et chimiques. À cet effet, les techniques électrochimiques peuvent fournir un outil peu coûteux et sensible basé sur des dispositifs portables capables de détecter rapidement un ensemble d'analytes avec une sensibilité et une spécificité élevées, permettant la transformation d'un signal biochimique en un signal électrique facilement exploitable. L'élaboration et les applications de nouveaux biocapteurs électrochimiques, particulièrement ceux à détection ampérométrique, ont fait l'objet d'une intense activité de recherche, la quête d'améliorer leurs performances analytiques, en maîtrisant les propriétés physiques et chimiques de l'interface électrode/solution, est toujours d'actualité. Dans ce contexte, les travaux de thèse présentés, visent le développement des biocapteurs électrochimiques utilisant différents récepteurs (les champignons filamenteux sous forme de biomasse et l'enzyme cholinestérase). Ce manuscrit de thèse s'articule autour de trois chapitres :

L'étude bibliographique menée dans le premier chapitre présente, des généralités sur les capteurs et particulièrement sur les biocapteurs, ainsi que les électrodes modifiées et leur principe de fonctionnement, suivis par les différentes méthodes d'immobilisation de composés moléculaires à la surface d'une électrode, et les caractéristiques des matériaux utilisés pour la modification d'un solide. Ensuite, nous décrivons des matériaux utilisés récemment pour le développement des biocapteurs dans le domaine de la nanotechnologie tout en précisant leur intérêt pour l'amélioration de tels dispositifs. Nous donnerons par la suite une vue d'ensemble sur les différentes techniques de l'immobilisation des enzymes telles que l'adsorption, le piégeage au moyen de sol-gels et la réticulation. On termine ce chapitre par un aperçu générale sur les champignons filamenteux, les algues et leurs polysaccharides, ainsi que des généralités

sur les propriétés physico-chimiques des aflatoxines (AFB1) et les métaux lourds (plomb et cadmium) en tant que polluants et leur impact sur l'alimentation et l'environnement.

Le deuxième chapitre présente une description des méthodes électrochimiques utilisées au cours de notre travail de thèse, telles que la voltamétrie cyclique (VC), la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), la voltamétrie en redissolution anodique à impulsion différentiel (DPASV) et la voltampérométrie à ondes carrées (SWV). Nous présentons également les techniques d'étude des surfaces telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), Spectroscopie de dispersion d'énergie de rayons X (EDX) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), ainsi que les différentes stratégies de préparation et d'activation de la surface des électrodes employées au cours de cette étude. Cette présentation se focalise sur l'explication des principes de ces méthodes, nécessaires à la compréhension. Nous allons également mettre l'accent sur les champignons filamenteux et leurs identifications ainsi que les polysaccharides d'algues brunes, leurs méthodes d'extraction et leurs caractéristiques physico-chimiques. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'extraction des alginates de sodium.

Dans le troisième chapitre, l'ensemble des résultats sera présenté et discuté. Ce chapitre est scindé en deux grandes parties.

Pour détecter les ions métalliques, on a mis au point des biocapteurs électrochimiques à base de nanomatériaux comme les nanotubes de carbone à simple paroi (SWCNTs), qui sont d'excellents candidats pour la réalisation d'électrodes modifiées, ils sont considérés comme les plus prometteurs, en raison de leurs propriétés mécaniques, électriques, thermiques et chimiques hors du commun [15-17] qui permettent d'envisager plusieurs applications. La première partie du chapitre est consacrée à la modification d'une surface d'électrode de carbone vitreux par un mélange de nanotubes de carbone fonctionnalisés (SWCNTs-COOH) et les champignons filamenteux sous forme de biomasse (SWCNTs-CO/Biomasse) pour la détection des traces de métaux lourds. Cette partie consiste à évaluer les performances du biocapteur élaboré et à étudier l'effet des principaux paramètres opératoires. D'autre part, une étude de l'interférence des métaux lourds est réalisée.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes orientés vers la modification d'électrode d'or par un biopolymère d'alginate de sodium qui permet un meilleur contrôle de la surface réelle active. Nous explorons l'effet d'un polymère hydrophile d'alginate de sodium sur l'immobilisation et la fonctionnalité d'AChE. Dans ce travail, nous développons un

biocapteur impédimétrique à base d'acétylcholinestérase (AChE) innovant et spécifique, pour l'analyse de l'aflatoxine B1 (AFB1) qui appartient à la classe des mycotoxines et qui est l'un des produits naturels les plus toxiques, puisqu'elle contamine fortement la nourriture humaine et les animaux [18]. La toxicité sévère de l'AFB1 rend indispensable la mise au point de méthodes d'analyse rapides, sensibles et spécifiques.

Enfin, une conclusion générale montrant l'originalité et les intérêts des électrodes modifiées élaborées, clôturera ce manuscrit. Elle proposera aussi des perspectives à ce travail, pour poursuivre le développement des méthodes de modification, chimiques et électrochimiques, des électrodes visant de nouvelles applications, ou visant d'autres domaines.

Références Bibliographiques

- [1] A.D'Amico, C.Di Natale, R.Paolesse, A.macagnano, E.Martnelli, G.Pennazza, M. Santonico, M.Bernabei, C.Roscioni, G.Galluccio, R.Bono, E. Finazzi Agro, S. Rullo, *Sensors and Actuators B*, 130, 458-465, **2008**.
- [2] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde and Breitzkreutz, *Int. J. Pharm*, 417, 256-271, **2011**.
- [3] Rama, E.C.; Costa-García, A. Screen-printed electrochemical Immunosensors for the detection of cancer and cardiovascular biomarkers. *J. Electroanal. Chem.*, 28, 1700–1715, **2016** doi:10.1002/elan.201600126.
- [4] Smith, S.; Korvink, J.G.; Mager, D.; Land, K. The potential of paper-based diagnostics to meet the ASSURED criteria. *RSC Adv.* 8, 34012–34034, **2018**, doi: 10.1039/C8RA06132G.
- [5] Gong, M.M.; Sinton, D. Turning the page: Advancing paper-based microfluidics for broad diagnostic application. *Chem. Rev.*, 117, 8447–8480, **2017**, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00024.
- [6] M. Castro, B. Kumar, J. F Feller, Z. Haddi, A. Amari, B. Bouchikhi, *Sens. Actuators B Chem*, 159, 213-219, **2011**.
- [7] L. Bueno, T.R.L.C.Paixao, *Talanta*, 87, 210-215, **2011**.
- [8]. Li, M.; Li, D.; Xiu, G.; Long, Y. Applications of screen-printed electrodes in current environmental analysis. *Curr. Opin. Electrochem.* 3, 137–143, **2017**, doi:10.1016/j.coelec.2017.08.016.
- [9] Economou, A. Screen-printed electrodes modified with “Green” metals for electrochemical stripping analysis of toxic elements. *Sensors*, 18, 1032, **2018**, doi: 10.3390/s18041032.
- [10] N. El Barbri, A. Amari, M. Vinaixa, B. Bouchikhi, X. Correig, E. Llobet, *Sensors and Actuators B*, 128, 235-244, **2007**.
- [11] K. Sghaier, H. Barhoumi, A. Maaref, M. Siadat, N. Jaffrezic-Renault, *Sens. Lett*, 7, 683-688, **2009**.
- [12] Pérez-Fernández, B.; Martín-Yerga, D.; Costa-García, A. Electrodeposition of nickel nanoflowers on screenprinted electrodes and their application to non-enzymatic determination of sugars. *RSC Adv.* 6, 83748–83757, **2016**, doi: 10.1039/C6RA15578B.
- [13] Pérez-Fernández, B.; Martín-Yerga, D.; Costa-García, A. Galvanostatic electrodeposition of copper nanoparticles on screen-printed carbon electrodes and their application for reducing sugars determination. *Talanta*, 175, 108–113, **2017**, doi:10.1016/j.Talanta.2017.07.026.
- [14] E.W.L. Chan, M.N. yousaf, *J.A.C.S*, 128, 15542-15546, **2006**.
- [15] S.N. Bondi, W.J. Lackey, R.W. Johnson. X. Wang, Z.L. Wang, *Carbon*, 44, 1393, **2006**.
- [16] R.S. Ruo, D. Qian, and W.K. Liu. *C R Phys*, 4, 993, **2003**.
- [17] H. Ra_i-Tabar, *Phys. Rep.* 390, 235, **2004**.
- [18] M. Puiu, O.Istrate, L. Rotariu, C.Bala, *Anal. Biochem*, 421, 587, **2012**.

Chapitre I

Etude bibliographique

I.1. Généralités sur les capteurs

I.1.1 Historique

Depuis l'invention du premier biocapteur adapté à la mesure de la concentration de glucose dans le sang par *Clark et Lyons* en 1962 [1], des efforts considérables ont été faits pour mettre au point d'autres biocapteurs dans l'objectif de réaliser des dosages rapides, sensibles et spécifiques de molécules présentant un intérêt dans le domaine médical, agroalimentaire, ou environnemental. Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce premier biocapteur à glucose ou dans le but d'appliquer son principe au développement d'autres biocapteurs enzymatiques. Cinq années plus tard, *Updike et Hickson* ont élaboré une électrode enzymatique permettant de doser le glucose dans des solutions biologiques [2]. A la fin des années 70 (1969), *George Guilbault et Montalvo* ont créé un biocapteur potentiométrique pour doser l'urée dans le sang et l'urine [3]. Mais ce n'est qu'en 1975 que le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fut commercialisé par la société Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique). Plus récemment, *Di Gleria et al.* (1986) ont décrit un biocapteur électrochimique utilisant le ferrocène au lieu du dioxygène pour alléger les interférences des espèces électro actives telles que les acides urique et ascorbique [4]. Ce développement a été à l'origine du succès de la commercialisation d'un stylo à glucose par Medisense. En 1987, *Vo-Dinh et al* ont montré que les anticorps pourraient être utilisés in situ pour la détection d'un agent cancérigène chimique par un immunocapteur à fibre optique [5]. Depuis, l'engouement pour ce type d'outil n'a cessé de croître, et des biocapteurs se basant sur d'autres types d'éléments de reconnaissance (les bactéries, les anti-corps, ADN) ou de transducteurs sont destinés à des applications dans le domaine de la santé, de l'environnement ou encore de l'agroalimentaire ont vu le jour.

I.1.2. Définition

Un capteur est défini comme un outil analytique associant un composant chimique ou biochimique à une électrode qui transforme la reconnaissance moléculaire en un signal électrique mesurable. Les capteurs constituent une nouvelle classe de dispositifs analytiques plus spécifiques, rapides et sensibles que les méthodes traditionnelles. Le champ d'application de ces dispositifs n'a cessé de s'étendre, ce succès vient probablement du caractère interdisciplinaire de ce domaine de recherche, situé entre biologie, chimie et physique. En effet,

les réactions de détection en utilisant des électrodes conventionnelles sont limitées par un certain nombre de facteurs, les plus importants d'entre eux sont d'une part, la dégradation de la surface de l'électrode consécutive à des processus de précipitation ou d'adsorption non désirés et d'autre part, l'extrême lenteur de certaines transformations électrochimiques pour lesquelles une forte surtension doit être appliquée.

I.1.3. Les capteurs chimiques

C'est un système qui utilise des interactions chimiques pour détecter un composé à analyser. Il est constitué d'une couche sensible chimiosélective chargée de reconnaître sélectivement l'espèce chimique qu'on désire analyser (analyte) et un transducteur représentant le mode de détection en convertissant les interactions ou les reconnaissances physico-chimiques en un signal exploitable [6]. Un capteur chimique repose sur les propriétés d'une couche sensible qui fait preuve de sélectivité, sensibilité et réversibilité. La sélectivité consiste à retenir un seul composé par rapport aux autres composés présents dans le milieu. La sensibilité se traduit par la capacité de la couche à modifier une de ses propriétés en présence de l'analyte [7]. Le principe de fonctionnement de la plupart des capteurs chimiques repose sur une interaction physique et/ou chimique entre un matériau sensible et l'espèce chimique cible. Ces matériaux sont choisis pour l'interaction spécifique avec une espèce chimique afin d'assurer ainsi une bonne sélectivité.

I.1.4. Les biocapteurs (ou capteurs biologiques)

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biocapteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification très localisée de l'espèce, se fait généralement par l'intermédiaire d'une molécule active (Enzyme, anticorps, ADN...) immobilisée (**Figure I.1**). En fonction du mode de transduction utilisé, on distingue ainsi quatre grandes classes de biocapteurs : optiques, gravimétriques, calorimétriques et électrochimiques. C'est à ce dernier type de capteur que nous nous sommes intéressés particulièrement.

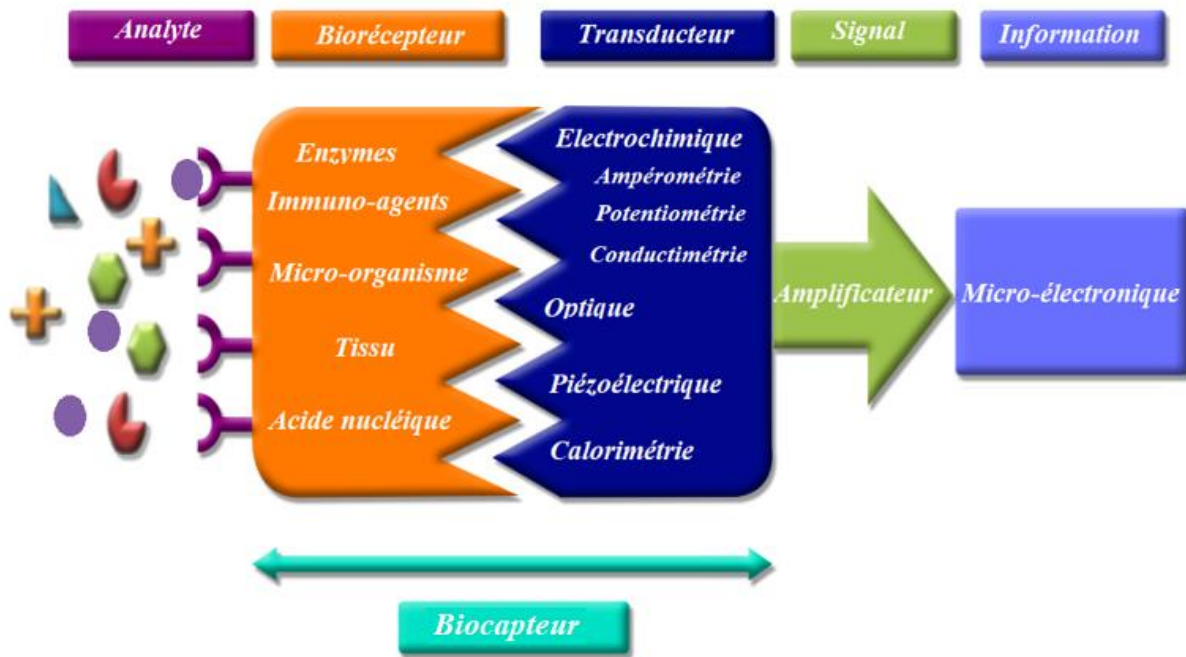


Figure I.1. Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Les transducteurs électrochimiques peuvent être divisés en trois catégories selon la mesure effectuée :

- ❖ Les biocapteurs potentiométriques reposent sur la mesure de la différence de potentiel entre le transducteur et une électrode de référence. Ces transducteurs sont soit des électrodes sélectives à ions (ISE) ou des transistors à effet de champ (FET-Field-Effect Transistor). En milieu aqueux, les électrodes de références les plus utilisées sont l'électrode au calomel saturé (ECS) ou l'électrode argent/chlorure argent (Ag/AgCl).
- ❖ Les biocapteurs conductimétriques sont basés sur la mesure de variation de concentration en espèces chargées générées au cours des bio-réactions.
- ❖ Les biocapteurs ampérométriques reposent sur la mesure de l'intensité de courant obtenu lors d'une réaction d'oxydoréduction se produisant à un potentiel donné. Le courant enregistré est proportionnel à la concentration de l'espèce électro-active générée au cours d'une réaction enzymatique, comme exemple.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux types de biocapteurs ampérométriques qui seront utilisés dans le cadre de mes travaux de thèse, les biocapteurs à acétylcholinestérase (AChE) et à biomasse (SWCNTS-CO/Biomasse).

I.2. Les électrodes modifiées

La modification de surfaces conductrices ou isolantes constitue un domaine de recherche qui suscite un intérêt grandissant depuis plusieurs décennies. Elle permet la fonctionnalisation des surfaces et ouvre des perspectives intéressantes. Elle permet aussi de créer à la surface du support des fonctions chimiques réactives, c'est-à-dire des fonctions utilisables pour la fixation par liaison covalente d'une autre molécule (**Figure I.2**). Les surfaces modifiées trouvent de nombreuses applications dans le domaine des sciences de la vie, et dans le développement de nouveaux matériaux composites [8]. Le contrôle de la fonctionnalisation d'un substrat permet ainsi d'ajuster les propriétés de l'interface solide/liquide pour induire une réactivité spécifique selon les applications (stockage de l'énergie, anticorrosion [9], adhérence [10], capteur [11], biomédical [12] ou catalyse [13]).

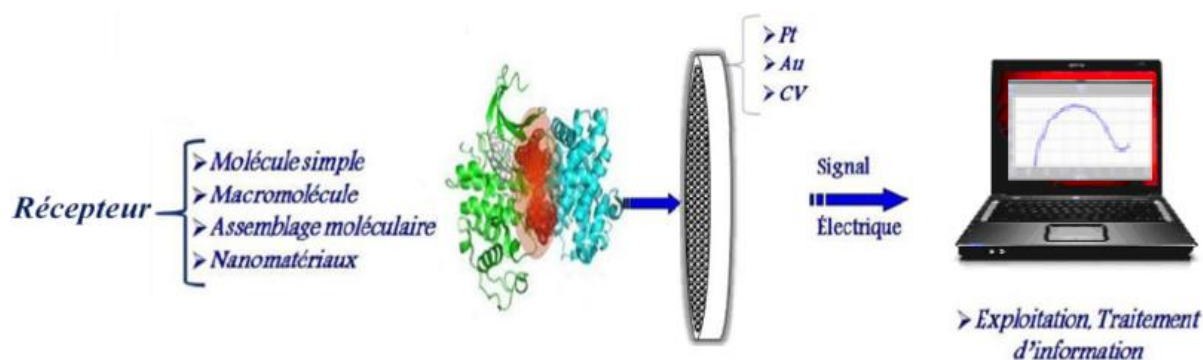


Figure I.2. Electrode modifiée pour application électrochimique

Le concept d'électrodes modifiées est apparu il y a une vingtaine d'années par Lane et Hubbard [14], en vue d'améliorer la réactivité et surtout la sélectivité des réactions électrochimiques à la surface d'une électrode de platine modifiée par adsorption de dérivés éthyléniques. En 1975, *R.W.Murray et al* [15] ont permis de réaliser des modifications de surface métallique par la création des liaisons chimiques entre un réactif et les atomes de surface de l'électrode. L'immobilisation d'une monocouche de réactif a pu être obtenue à l'aide d'un

greffage entre des organosilanes et des groupements hydroxyles générés de l'électrode. A la suite de ces premiers travaux, les méthodes qui ont d'abord été développées pour préparer des électrodes chimiquement modifiées (CME) ont concerné essentiellement la modification de la surface d'électrodes par une monocouche de réactif, en particulier par formation de liaisons covalentes entre le réactif et les oxydes de surface [15]. Cependant, la technique de modification d'électrodes la plus développée depuis la fin des années 70 est celle basée sur le dépôt de multicouches d'un réactif. Cette opération est généralement réalisée par l'adsorption d'un film de polymère à la surface de l'électrode et permet d'obtenir de véritables matériaux moléculaires d'électrode de structure tridimensionnelle. En se restreignant aux exemples mettant en jeu l'électrochimie comme outil de caractérisation, on trouve plusieurs applications possibles pour les électrodes modifiées en tant que dispositifs de détection et de reconnaissance, connu comme capteurs [16-20] et biocapteurs [21], donc une bonne électrode modifiée doit répondre aux critères suivants :

- La stabilité physique : une électrode modifiée doit avoir une résistance mécanique adéquate et doit résister à l'érosion causée par l'électrolyte support, les réactifs et les produits.
- La stabilité chimique : c'est une propriété essentielle d'un nanomatériau immobilisé sur la surface de l'électrode, la corrosion du nanomatériau en régime de travail et/ ou en circuit ouvert reste un problème répandu. Le nanomatériau doit également résister à la formation de produits indésirables (oxydes ou hydrures,..) ainsi qu'au dépôt de couches minces de films organiques inhibiteurs, dans toutes les conditions de travail (potentiel, température,...).
- Une grande efficacité et une bonne sélectivité : la vitesse de réaction est fondamentale en électrochimie, tout l'effort de cette science est d'accélérer la réaction qui est mise en jeu ; la sélectivité d'une réaction est l'obtention d'un produit préférentiellement à d'autres susceptibles de se former dans la même réaction. C'est un facteur de premier intérêt dans les applications industrielles.

I.2.1. Les différentes méthodes de modification des électrodes

De nombreuses techniques et méthodes de modification ont été développées [22-23], on peut citer comme exemples : traitement chimique, greffage de fonctions moléculaires, procédé sol-gel, modification physico-chimique des surfaces. Ces différentes voies de modification peuvent être regroupées dans trois catégories : physique, électrochimique, chimique.

I.2.2.1. Méthodes physiques

Ces méthodes reposent sur des principes mécaniques et thermodynamiques pour produire une couche mince solide, comme le spin-coating (application par la force centrifuge d'une couche mince uniforme sur un substrat plat) et le dip-coating (immersion du substrat dans la solution à déposer puis séchage). Une autre méthode largement utilisée est le dépôt en phase vapeur PVD (Physical Vapor Deposition), le dépôt se fait dans un environnement à basse pression ce qui permet de manipuler le précurseur sous forme de vapeur.

I.2.2.2. Méthodes chimiques

Cette méthode reste le moyen le plus simple pour fixer des substances électro actives sur divers matériaux conducteurs comme le platine [14], le carbone [24] et l'or [25], par adsorption ou greffage chimique, ce qui conduit à la formation d'une monocouche à la surface de l'électrode. On retrouve dans cette catégorie de fonctionnalisation les techniques suivantes.

I.2.2.2.1. Modification par adsorption chimique

L'adsorption chimique consiste la mise en commun d'électrons entre la partie polaire de la molécule et la surface métallique, ce qui engendre la formation de liaisons chimiques plus stables, car elle est basée sur des énergies de liaison plus importantes. Les électrons proviennent en grande majorité des doublés non appariés des molécules inhibitrices tels que l'oxygène, l'azote, le soufre et le phosphate (tous ces atomes se distinguant des autres de par leur grande électronégativité). L'adsorption chimique s'accompagne d'une profonde modification de la répartition des charges électroniques des molécules adsorbées.

I.2.2.2.2. Modification par des monocouches auto-assemblées

La modification d'une surface d'or par des monocouches auto-assemblées a suscité beaucoup d'intérêt depuis la première publication en 1983 [26]. La formation de monocouches auto-assemblées est réalisée spontanément par simple trempage d'une électrode d'or dans une solution contenant un dérivé thiol ou disulfure (**Figure I.3**). Cette technique permet d'obtenir un recouvrement maximal d'une fine monocouche. De nombreuses revues traitent l'application de ce type d'électrode chimiquement modifiée en électrochimie analytique [27-29].

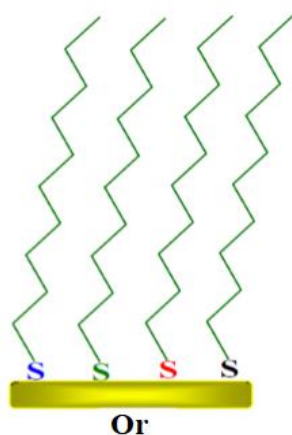


Figure I.3. Electrode d'or modifiée par SAM

I.2.2.2.3. Modification par la technique sol-gel

Cette technique est basée sur l'inclusion ou l'encapsulation de molécules dans une matrice semi-perméable en surface du substrat. Toutefois, cette méthode se révèle complexe dans sa mise en œuvre et pour sa reproductibilité. La réticulation sur une surface solide est une méthode chimique reposant sur des pontages covalents intermoléculaires. Elle donne un dépôt stable physisorbé avec l'inconvénient d'une densité moléculaire trop importante pour une bonne accessibilité des sites réactifs.

I.2.2.2.4. Modification par la technique couche par couche (LBL)

Cette méthode est basée, entre autres, sur des adsorptions alternées d'espèces de charges opposées préalablement dissoutes dans des solutions diluées. Les polyélectrolytes sont les plus fréquemment utilisés pour la réalisation de ce type d'architecture. Le principe de la méthode de dépôt couche par couche, est décrit schématiquement sur la **Figure I.4**. Il s'agit donc d'une

succession de polyélectrolytes cationiques et anioniques adsorbés sur une surface chargée. Les polyélectrolytes mis en contact avec une surface, vont subir une attraction qui peut conduire à la formation d'une liaison entre les polyélectrolytes et la surface : ce phénomène constitue l'adsorption. En outre, les interactions électrostatiques sont la force motrice de cette technique d'assemblage mais aussi la clé de la structure finale de ces films minces polychargés.

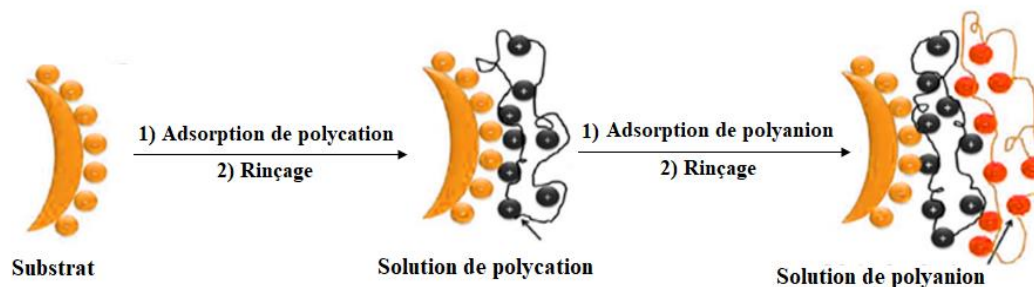


Figure I.4. Principe de dépôt couche par couche

I.2.2.3. Méthodes électrochimiques

La fonctionnalisation par voie électrochimique ou électro-greffage est une technique qui va permettre la création contrôlée de liaisons fortes entre un substrat et un film ou une molécule organique. Cette méthode peut se diviser en deux étapes, d'abord une étape de greffage puis une étape de croissance de la couche. Ce processus est initié électriquement et nécessite que l'électrode soit polarisée pour la première étape mais pas pour la seconde. Sa mise en œuvre se fait selon deux modes distincts (le mode direct ou indirect) selon que le substrat soit connecté électriquement ou pas. Cette technique permet de réaliser un greffage localisé sur diverses surfaces et ce à diverses échelles. De plus, elle est assez simple à mettre en œuvre, rapide et économique. Une grande variété de groupements chimiques peut ainsi être greffée, permettant ainsi d'obtenir un large éventail de propriétés de surface [30].

I.3. Matériaux utilisés pour la modification des électrodes

I.3.1. Les nanomatériaux

Les structures à l'échelle nanométrique confèrent aux métaux, aux semi-conducteurs et aux oxydes métalliques des propriétés chimiques et physiques remarquables, différentes de celles des éléments sous forme massive. L'immobilisation des nanomatériaux tels que les

nanoparticules métalliques, les nanoparticules d'oxydes et les nanotubes de carbones, fournissent une surface active plus grande, ce qui améliore le transfert d'électron entre la molécule et l'électrode, et permet d'améliorer la sensibilité et la limite de détection dans des applications électro-analytiques.

I.3.1.1. Les nanoparticules

Les nanoparticules sont généralement des objets dont la taille varie de 1 à 200 nm, ils occupent une position intermédiaire entre les molécules et les microparticules. Il en existe de toute sorte : sphérique ou plane, organique ou inorganique. L'avantage d'intégrer des nanoparticules, est qu'il est possible d'élargir le champ d'applications des auto-assemblages électrostatiques, grâce aux propriétés inhérentes de ces nanoparticules (NP), dans le domaine des électrodes modifiées. Les nanoparticules présentent des propriétés qui sont fonction de leur composition, de leur structure cristalline, de la surface exposée ainsi que de leur procédé de synthèse. Cependant, quelle que soit leur origine, les nanoparticules possèdent des propriétés physiques communes qui découlent notamment de leur dimension. Lorsque la taille diminue, la surface spécifique augmente, ainsi, le nombre d'atomes localisés en surface, c'est-à-dire en contact avec le milieu environnant augmente. Cela a pour conséquence une modification des propriétés optiques, électriques, magnétiques, physiques (abaissement de la température de fusion), catalytiques (réactivité accrue) du matériau sous forme nano-particulaire par comparaison au même matériau à l'échelle microscopique [31-32]. On peut classer les nanoparticules par catégorie, suivant la matière première utilisée, qui peut être très variée. Il existe une grande variété de nanoparticules, allant des liposomes aux nanoparticules inorganiques en passant par les nanoparticules polymériques. Leurs propriétés intrinsèques conditionneront leur devenir après administration.

La fonctionnalisation de surface des nanoparticules permet d'apporter de nouvelles propriétés aux nano-objets tout en conservant ses propriétés intrinsèques, c'est un processus essentiel en vue de l'utilisation de ces particules aux applications biologiques. En effet ces nanoparticules ont des dimensions similaires à celles des biomolécules (ADN, protéines, anticorps). Ainsi l'association de ces deux types d'objets sur la surface d'une électrode permet d'envisager la réalisation d'un système de détection qui combine, une propriété physique ou chimique donnée et les propriétés spécifiques de molécules biologiques. Il est connu que les biomolécules possèdent à leur surface différentes fonctions chimiques de type amine (NH_2), acide (COOH) ou encore thiol (SH), ainsi ces molécules biologiques peuvent être liées aux

nanoparticules de différentes façons, ce qui permet d'élaborer des biocapteurs électrochimiques caractérisés par des propriétés catalytiques intéressantes. Dans ce système la molécule biologique est utilisée comme élément de reconnaissance de l'espèce à détecter, tandis que les nanoparticules permettent d'amplifier le signal qui reflète cette interaction. Plusieurs travaux de recherche ont été consacrés pour l'élaboration de nouveaux types d'électrodes modifiées utilisées comme biocapteurs [33]. *Willner et al* ont immobilisé sur une électrode des nanoparticules d'or greffées de glucose oxydase par le biais de leur site actif [34-36]. Dans cette structure le site actif est directement régénéré par l'apport d'électron via les nanoparticules avec une vitesse très supérieure à celle observée lors de la régénération naturelle de l'enzyme par l'oxygène. Un deuxième exemple est fourni par des électrodes modifiées par une nouvelle structure incorporant des nanoparticules de platine stabilisées par des glucoses oxydases, la modification de l'électrode est effectuée par électrodéposition de nanoparticules de platine fonctionnalisées et de glucose oxydase chimiquement modifiée [37].

I.3.1.2. Les nanoparticules d'or

Les nombreuses méthodes de synthèse développées pour l'élaboration de nanoparticules d'or permettent de produire des particules stables et de taille adaptable en fonction de l'application sur une gamme de 2 à 200 nm. Dans le domaine des applications biologiques, les nanoparticules d'or représentent en effet des objets parfaitement adaptés non seulement par leurs propriétés intrinsèques (non toxicité, gamme de taille et cœur métallique) mais aussi par leurs énormes capacités de fonctionnalisation (et de multi-fonctionnalisation) en surface par greffage de molécules biologiques. *X. Qin et al* ont réussi en 2010 à réaliser un biocapteur pour la détection de choline, à la surface d'une électrode de platine, en utilisant des nanotubes de carbone (MWCNTs) fonctionnalisés par des nanoparticules d'or (GNp). Les nanoparticules d'or sont greffées à la surface des nanotubes de carbone (MWCNTs), en utilisant l'interaction spécifique entre les fonctions thiol et l'or. La choline oxydase (ChOx) a été immobilisée par liaison électrostatique des (MWCNTs-GNp) et l'enzyme chargée négativement, par l'intermédiaire du polydiallyldiméthylammonium chloride (PDDA) [38]. En 2013, *X. Cai et al* ont repris la technique d'immobilisation « couche par couche » afin d'immobiliser la peroxydase (HRP) et la choline oxydase (ChOx), en utilisant un mélange contenant des nanoparticules d'or (GNp), des nanotubes de carbones (MCNTs) et un polyélectrolyte cationique le (PAH). La surface de l'électrode d'or est fonctionnalisée par des charges négatives suite à un traitement à l'acide 3-mercaptopropionique (MPS), puis incubée dans une solution

PAH-MCNTs-GNPs chargée positivement. La fixation des enzymes (HRP) et (ChOx) est effectuée par attraction électrostatiques sur la surface de l'électrode modifiée [39]. Gong *et al.* ont également développé en 2015, une méthode originale de fonctionnalisation des nanoparticules d'or par des dipeptides. Ceci permet par addition de biomolécules, en particulier la peroxydase (HRP), pour une élaboration simple et rapide de biocapteurs du peroxyde d'hydrogène [40].

I.3.1.3. Les nanotubes de carbone

Au regard de leur forme ainsi que de leurs propriétés électriques, les nanotubes de carbone (CNTs) représentent d'excellents candidats pour la réalisation d'électrodes modifiées. Observés pour la première fois en 1991, les nanotubes de carbone (CNTs) se présentent comme des tubes creux concentriques séparés de 0,34 nanomètre (parfois il n'y a qu'un seul tube). Ces nanotubes ont une géométrie quasi-unidimensionnelle remarquable, avec un diamètre de l'ordre du nanomètre et une longueur pouvant atteindre facilement plusieurs micromètres. La structure d'un CNT consiste en un enroulement d'une feuille de graphène autour d'elle-même. Il existe deux grandes familles de nanotubes de carbone (**Figure I.5**) :

- Les monofeuillets (SWNTs), qui consistent en l'enroulement d'un seul plan de Graphène :
- Les multifeuillets (MWNTs), qui sont formés de plusieurs tubes concentriques.

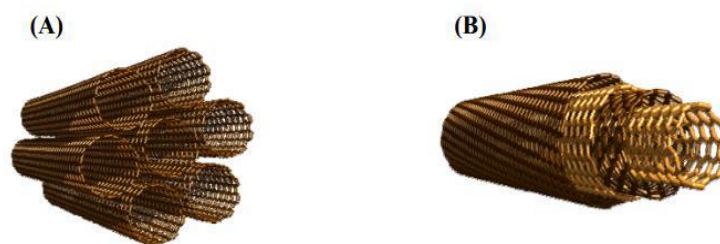


Figure I.5. Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone monofeuillet (SWCNT) (A) et multi-feuillets (MWCNT) (B)

Les nanotubes de carbone ont suscité un immense intérêt dans le monde de la recherche, car leurs propriétés sont exceptionnelles. En effet, ce matériau présente des propriétés mécaniques, électriques, thermiques et chimiques hors du commun [41-43] qui permettent d'envisager plusieurs applications telles que des dispositifs électroniques, des dispositifs à émission à effet de champ, le renforcement de matériaux composites et des capteurs.

Les nanotubes possèdent déjà des groupements chimiques à leur surface, liés de manière covalente. Ces groupements fonctionnels sont principalement des fonctions oxygénées telles que des groupements carboxyliques, lactones, alcools, éther-oxydes. Ces groupements sont présents sur tout le long des nanotubes. Plusieurs stratégies de fonctionnalisation peuvent être développées (**Figure I.6**).

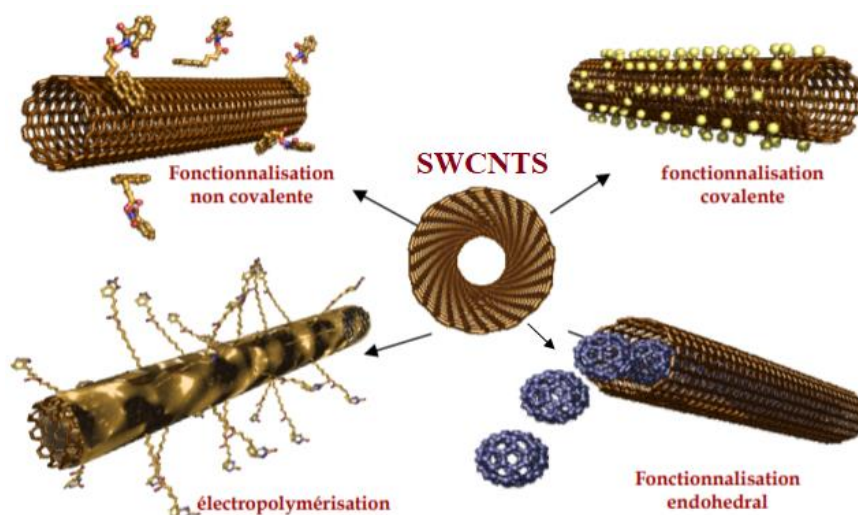


Figure I.6. Différents modes de fonctionnalisation des nanotubes de carbone [44]

Les types de fonctionnalisation peuvent être classés en deux grands ensembles, la fonctionnalisation covalente et la fonctionnalisation non-covalente.

I.3.1.3.1. Fonctionnalisation covalente

La fonctionnalisation covalente implique la création d'une liaison chimique entre les nanotubes de carbone et le groupement greffé. En jouant sur la réactivité chimique des atomes de carbones, cette fonctionnalisation peut mettre en jeu des réactions de chimie organique classique ou des réactions utilisant les défauts structurels des nanotubes trous, groupements

chimiques déjà présents. L'oxydation est également une des premières méthodes de fonctionnalisation des nanotubes développées par l'équipe de *Smalley*. Cette méthode consiste à traiter les nanotubes de carbone par un mélange d'acide nitrique et sulfurique pour augmenter la quantité de défauts oxygénés à la surface des nanotubes [45]. D'autres voies d'oxydation ont également été testées en utilisant d'autres oxydants. Ces modifications peuvent être assurées avec un éventail d'entités organiques par le moyen de liaison ester/amide, ou interaction ionique des sels de carboxylate d'ammonium [46-47]. Après le traitement par oxydation, les nanotubes présentent ainsi de nombreuses fonctions oxygénées principalement carboxyliques mais aussi alcooliques et cétoniques [48]. Ces fonctions impliquent la présence de trous plus ou moins importants à la surface des nanotubes créés par le traitement acide (**Figure I.7**).

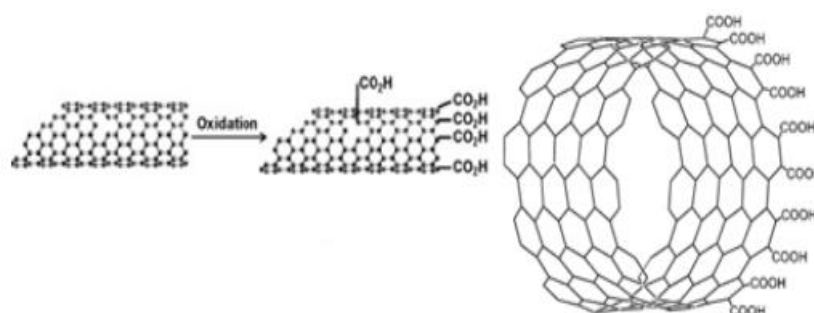


Figure I.7. Représentation schématique des stratégies de fonctionnalisation des parois latérales SWCNTs : fonctionnalisation covalente

Une fonction carboxylique se présente tous les 15 à 25 atomes de carbones principalement aux extrémités des nanotubes qui sont désormais ouvertes [49-50]. Cette ouverture des nanotubes permet d'éliminer les nanoparticules métalliques du catalyseur à l'intérieur des nanotubes. Les nanotubes oxydés sont indispensables en solution aqueuse basique.

Chen et al ont eu l'idée d'utiliser ces sites carboxyliques comme sites réactionnels pour greffer de nouvelles fonctions chimiques soit par estérification soit par amidation. Cette stratégie a permis de solubiliser pour la première fois les nanotubes de carbone et de caractériser leurs propriétés en solution [51]. Le taux de greffage atteint une fonction pour 25 à 100 atomes de carbone suivant le type de fonctions utilisées et les conditions de réaction [48, 52-53]. Cette méthode de fonctionnalisation, même si elle est connue pour dégrader la structure des nanotubes, est toujours l'une des plus utilisées aujourd'hui.

Une autre méthode de fonctionnalisation covalente des SWCNTs est la fluoration des nanotubes de carbone vu que les parois latérales des SWCNTs sont inertes [54]. Ainsi, les

atomes de fluor dans les SWCNTs fluorées, peuvent être substitués par des groupes alkyles selon un traitement avec des anions de carbone, tels que le lithium alkyle (**Figure I.8**).

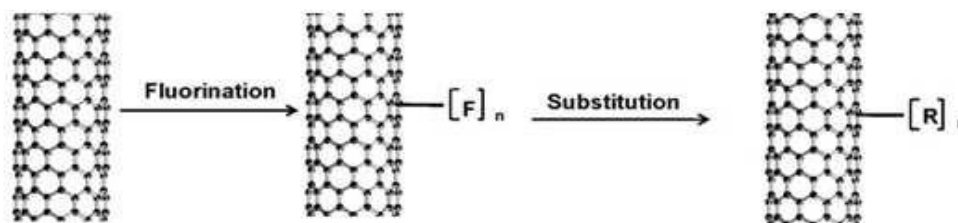


Figure I.8. Représentation schématique des stratégies de fonctionnalisation des parois latérales SWCNTs : fonctionnalisation covalente

I.3.1.3.2. Fonctionnalisation non covalente

La fonctionnalisation non-covalente implique uniquement une liaison physique entre les nanotubes et le groupement fonctionnel. Il existe deux types d'approche : la fonctionnalisation interne et la fonctionnalisation externe (**Figure I.9**). La fonctionnalisation interne consiste à introduire des molécules [55] des particules métalliques [56] ou des fullerènes à l'intérieur des nanotubes de carbones [57]. La taille des nanotubes joue directement un rôle sur le choix et la taille des objets incorporés. La fonctionnalisation interne ne modifie pas l'état de la surface des nanotubes et la solubilité n'est pas améliorée.

Quant à la fonctionnalisation externe non covalente repose sur les forces de Van Der Waals entre les nanotubes et les molécules. Il est donc nécessaire de choisir des molécules dont les électrons/orbitales puissent interagir avec ceux/celles des nanotubes. La fonctionnalisation non covalente des SWCNTs permet non seulement d'améliorer leur solubilité dans des solvants mais aussi à préserver les structures primaires de SWCNT avec leurs propriétés électriques et mécaniques [58]. C'est à cause de ces raisons que la fonctionnalisation non covalente des flancs SWCNTs est largement utilisée. La première approche emploie des composés aromatiques qui présentent une liaison π - π sur les flancs des SWCNTs comme le pyrène [59]. Ce dernier est couramment utilisé pour la fonctionnalisation du graphite qui est typiquement utilisé comme point d'ancrage pour la modification non covalente. La deuxième approche est d'utiliser les longues chaînes d'alkyles, tensioactifs bio macromolécules et des polymères par des

interactions hydrophobes [60]. Dans la plupart des cas le mode d'interaction entre les SWCNTs et ces molécules est une simple adsorption [61].

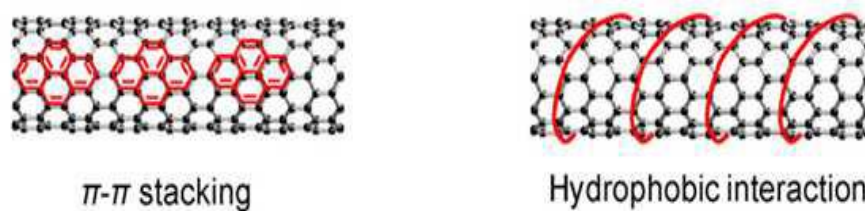


Figure I.9. Représentation schématique des stratégies de fonctionnalisation des parois latérales SWCNTs : fonctionnalisation non-covalente

I.4. Les enzymes

Parmi les biorécepteurs, les enzymes sont très largement utilisées dans le domaine des biocapteurs. Elles sont des biocatalyseurs très spécifiques. Les réactions qu'elles catalysent sont relativement simples : l'hydrolyse, l'oxydation, la décarboxylation des liaisons peptides par exemple. Les enzymes, jusqu'à maintenant, ont été employées dans les biocapteurs pour la détermination d'environ 80 substrats. En effet, l'enzyme est une molécule protéinique de structure très complexe constituée d'acides aminés formant des chaînes reliées par des liaisons peptidiques. Elles jouent le rôle de biocatalyseur et assure le déroulement de toutes les réactions métaboliques. Les enzymes accélèrent 10^3 à 10^6 fois la réaction correspondante qui se déroulerait spontanément. En abaissant l'énergie d'activation de la réaction qu'elle catalyse, une enzyme abaisse le niveau énergétique de l'état de transition et accélère ainsi la réaction. Elles peuvent être extrêmement spécifiques d'ailleurs, grâce aux interactions avec les substrats (formes, géométrie, nature chimique) elles peuvent discriminer des formes chimiques très proche.

I.4.1. Site actif

L'enzyme possède une partie importante qu'on appelle site actif, celui-ci représente la région restreinte de l'enzyme. Il prend souvent la forme d'une cavité, au niveau de laquelle le substrat se fixe et pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit (**Figure I.10**). Le site actif est en général enfoui dans la protéine [62].

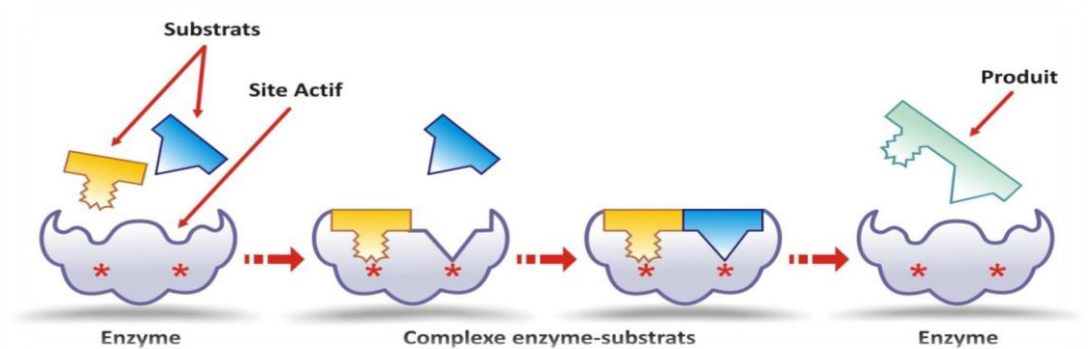


Figure I.10. Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique

I.4.2. Les biocapteurs enzymatiques

La majorité des biocapteurs utilisent les enzymes comme système de reconnaissance biologique (système de réponse) lié à un appareillage électrochimique capable de répondre à des protons, des ions, des gaz ou des électrons générés durant le cycle catalytique [63]. Les électrodes à enzymes résultent de la combinaison de quelques types de capteurs électrochimiques avec une couche d'enzyme de 10 à 200 μm accolée à la surface active du transducteur. Le composé à doser est le plus souvent un substrat ou un produit issu de la réaction enzymatique [64].

Deux catégories de capteurs électrochimiques sont essentiellement rencontrées : les capteurs de type potentiométrique et ceux de type ampérométrique.

I.4.2.1. Biocapteurs Potentiométriques

Les électrodes enzymatiques les plus courantes sont les biocapteurs potentiométriques, où une enzyme appropriée est immobilisée sur une électrode ionique sélective. Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel Proportionnel au logarithme de l'activité de l'échantillon (loi de Nernst).

I.4.2.2. Biocapteurs Ampérométriques

En général, le système ampérométrique exploite l'échange d'électrons entre le système enzymatique et l'électrode. Il donne une réponse qui est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon. Les électrodes peuvent être chimiquement modifiées afin de

résoudre les problèmes d'interférences des espèces électro actives. Leur intérêt provient d'un contrôle plus direct des caractéristiques de la surface de l'électrode ampérométrique [65].

La première génération de systèmes ampérométriques utilisait la consommation d'oxygène et la production d'eau oxygénée issues de l'oxydation de substrats par un nombre d'oxydases. De tels systèmes souffraient d'une dépendance de la concentration d'oxygène ambiant et d'interférences d'espèces électro actives présentes dans des échantillons bruts, aux potentiels de l'électrode requis pour l'échange d'électrons. La seconde génération d'électrodes a apporté une solution à ces problèmes par l'utilisation de sels organiques conducteurs (métaux organiques en raison de leur comportement métallique et non semi-conducteur) dans le but de faciliter le transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode. Des médiateurs tels que quinones, hexacyanoferrate, phénazine-méthosulfate, ferrocène, tétrathiafulvalène (TTF) et tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) ont été utilisés pour coupler l'enzyme redox le glucose oxydase- à des électrodes appropriées. Malgré la commercialisation de capteurs à médiateurs enzymatiques, la technologie des biocapteurs a rapidement évolué vers le domaine des systèmes de troisième génération dans, lesquels les enzymes réduites réagissent "directement" avec l'électrode elle-même. A ce niveau, les sels organiques conducteurs tels que N-méthyl phénazine- tétracyanoquinodiméthane (NMP+rCNQ-) et tétracyanoquinodiméthane-tétrathiafulvalène (TCNQ-TTF+) permettent l'échange direct d'électrons avec les enzymes réduites. Cependant, le mécanisme d'action des sels organiques conducteurs est encore un sujet controversé [63].

I.4.3. Biocapteur à base d'acétylcholinestérase (AChE)

Le développement rapide des biocapteurs dans le monde entier a permis de mettre en évidence une étape clé qui concerne l'immobilisation des biomolécules sur la surface du transducteur. Le biorécepteur est l'élément du biocapteur qui doit assurer la reconnaissance moléculaire du composé à détecter. Il doit présenter, par rapport à cette substance cible, des avantages en raison de leur spécificité inhérente, simplicité, coût relativement faible, une bonne affinité, une bonne sélectivité, ainsi qu'une réponse rapide, permettant une surveillance continue [66].

Au moins trois types de molécules biospécifiques peuvent jouer le rôle de biorécepteur : les immunoespèces (anticorps, antigène), les enzymes et les acides nucléiques (ADN, ARN),

qui servent à concevoir respectivement des capteurs immunologiques, des capteurs enzymatiques, et des biopuces. Il est également possible de concevoir des biocapteurs à base de cellules entières. Des électrodes enzymatiques basées sur l'urée [67] et les cholinestérases [68-73] ont été conçues pour l'analyse d'une gamme de substances comme F, Ag^+ , Co^{2+} , Hg^{2+} , les pesticides (organophosphorés et carbamates) et autres composés organiques toxiques [74]. Dans notre étude, le biorécepteur utilisé est une enzyme qui appartient à la famille des hydrolases l'acétylcholinestérase dont les caractéristiques sont présentées ci-dessous.

I.4.3.1. Rôle de l'AChE

L'acétylcholinestérase (AChE) a été identifiée pour la première fois en 1867 à partir du poison torpille (*Torpedo californica*). C'est une enzyme clé pour la neurotransmission qui permet aux neurones cholinergiques de retrouver leur état de repos en hydrolysant l'acétylcholine (ACh) (Figure I.11) [75]. Elle est principalement associée aux nerfs et aux muscles et se trouve au niveau des synapses dans les neurones et les cellules gliales du cerveau [76].

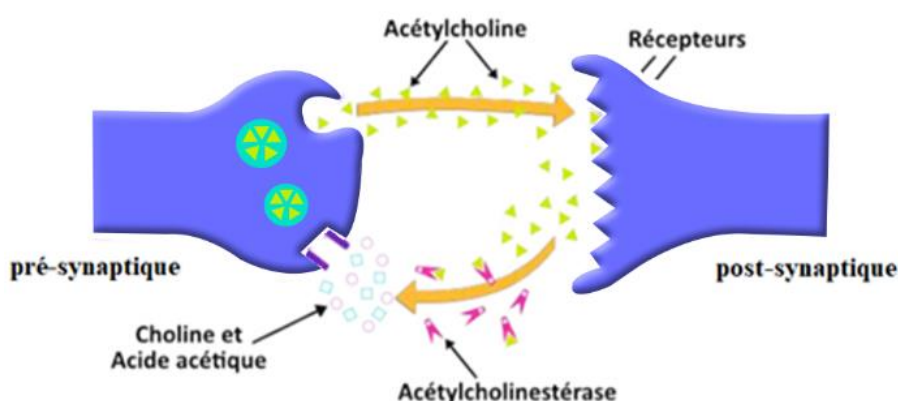


Figure I.11. Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique

Les principales fonctions physiologiques de l'acétylcholinestérase sont bien connues. Elle intervient dans les systèmes nerveux périphérique et central et joue ainsi un rôle majeur au niveau de la transmission de l'influx nerveux en éliminant l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur cationique [77]. L'ACh est libéré par le neurone présynaptique sous l'effet d'un potentiel d'action et diffuse dans la synapse pour se fixer à un récepteur cholinergique. Le potentiel d'action est ainsi transmis au neurone postsynaptique. A ce moment, l'AChE hydrolyse rapidement l'ACh, interrompant la transmission de l'influx nerveux (Figure I.12)

[78]. Dans le système nerveux périphérique, lorsque l'ACh se lie à l'un de ses récepteurs sur les fibres musculaires notamment, des canaux à calcium s'ouvrent dans la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée d'ions calcium dans la cellule. S'ensuit alors une série d'étapes qui mènent à la contraction musculaire. Dans le système nerveux central, l'acétylcholine intervient notamment dans l'apprentissage et la mémoire à court terme.

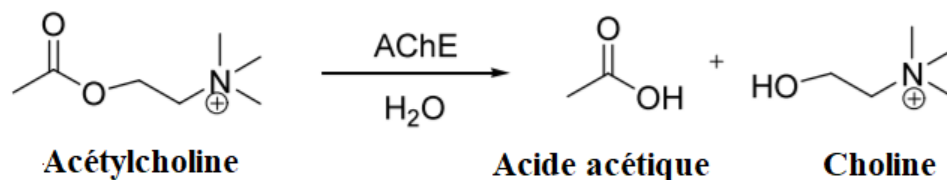


Figure I.12. Mécanisme catalytique de l'acétylcholinestérase

I.4.3.2. Description structurale de l'Acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une protéase à sérine, regroupant 537 acides aminés (75 kDa), exprimée dans les systèmes nerveux et sanguins des eucaryotes supérieurs. Elle se trouve notamment au niveau des synapses dites cholinergiques utilisant le neurotransmetteur acétylcholine (ACh). De telles synapses sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans les zones du cortex en charge des fonctions cognitives (mémoire, orientation, jugement...etc.) [79]. L'hydrolyse de l'ACh se fait très rapidement puisque le turnover de l'AChE varie de 10000 à 20000 molécules hydrolysées par seconde, et son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) est d'environ $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. L'étape cinétiquement déterminante de l'hydrolyse est la diffusion de l'acétylcholine vers le site actif [80]. En fait l'AChE est l'une des enzymes les plus performantes que l'on connaisse. La structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase a été déterminée en 1991 par *Joel Sussman* [81] (**Figure I.13**).

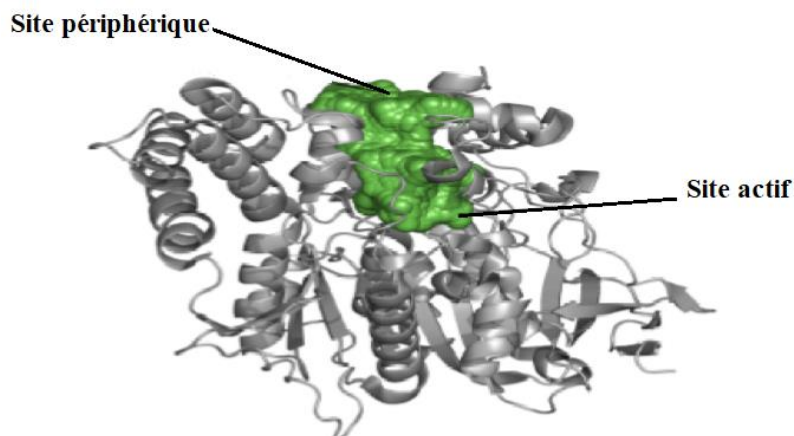


Figure I.13. Représentation schématique de la structure 3D du AChE

I.4.3.3. Mécanisme d'inhibition

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase peuvent être classés selon leurs modes d'action, on cite les inhibiteurs pseudo-irréversibles, irréversibles, analogue d'état de transition et les inhibiteurs réversibles. L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques tels que les métaux lourds et les organophosphorés provoque une transmission permanente de l'influx nerveux, causant de nombreuses anomalies telles que la paralysie et même la mort [82]. Parmi les inhibiteurs de l'AChE, les plus connus sont certains gaz de combat et les insecticides organophosphorés et carbamates. Le mécanisme d'inhibition par ces derniers est basé sur la formation d'un complexe carbamylé ou phosphorylé qui est plus stable que la forme acétylée. Cependant la forme carbamylée s'hydrolyse rapidement (inhibition réversible) alors que la réactivation de la forme phosphorylée est beaucoup plus lente (inhibition quasi-irréversible) voire impossible (inhibition irréversible) selon la nature de l'organophosphoré [83]. Le mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés est représenté ci-dessous (Figure I.14).

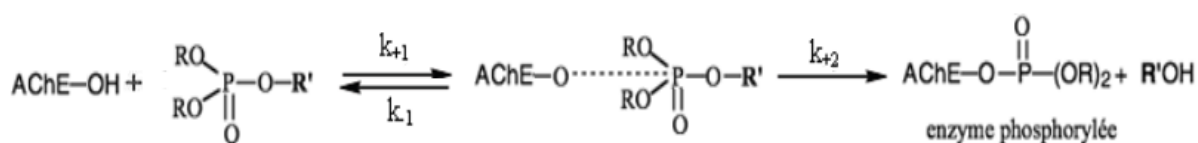
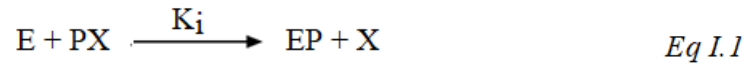


Figure I.14. Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés

L'inhibition commence par la formation du complexe enzyme-inhibiteur (complexe de Michaelis), suivie par la phosphorylation qui rend l'enzyme inactive de manière irréversible.

La réaction est caractérisée par la constante de dissociation : $K_d (=k_{-1}/k_{+1})$ et par la constante d'inactivation k_{+2} (Aldridge, 1950). Ce schéma peut être simplifié en utilisant la constante biomoléculaire $k_i = k_{+2}/K_d$:



Ou (E = enzyme, PX = organophosphate et X = groupement partant).

L'inhibition peut être suivie en faisant varier le temps d'incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur et en déterminant l'activité enzymatique résiduelle en présence de substrat. La disparition de l'enzyme active E obéit à une cinétique du pseudo-premier ordre [84].

$$v = -d[E]/dt = -d[EP]/dt = k_i [E] [PX] \quad \text{Eq I.2}$$

L'enzyme phosphorylée peut ensuite subir une désalkylation spontanée provoquant une inhibition irréversible de l'enzyme, ce processus est généralement qualifié de vieillissement ou « aging » [85]

I.4.4. Les différentes techniques d'immobilisation d'enzyme sur la surface du transducteur

Le point critique en technologie de fabrication des biocapteurs demeure dans l'immobilisation des biomolécules actives (enzymes, anticorps, cellules ou tissus...) à la surface du transducteur. Plusieurs techniques d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur peuvent être adoptées selon les biomolécules utilisées et l'application désirée, ces techniques peuvent être subdivisées en procédés physiques et en procédés chimiques (**Figure I.15**). Plusieurs critères de sélection tels que le type de matériel biologique, le substrat à analyser ainsi que la configuration du transducteur doivent être pris en compte pour le choix de la technique d'immobilisation, l'objectif étant de garantir une accessibilité et une réactivité maximales du biorécepteur.

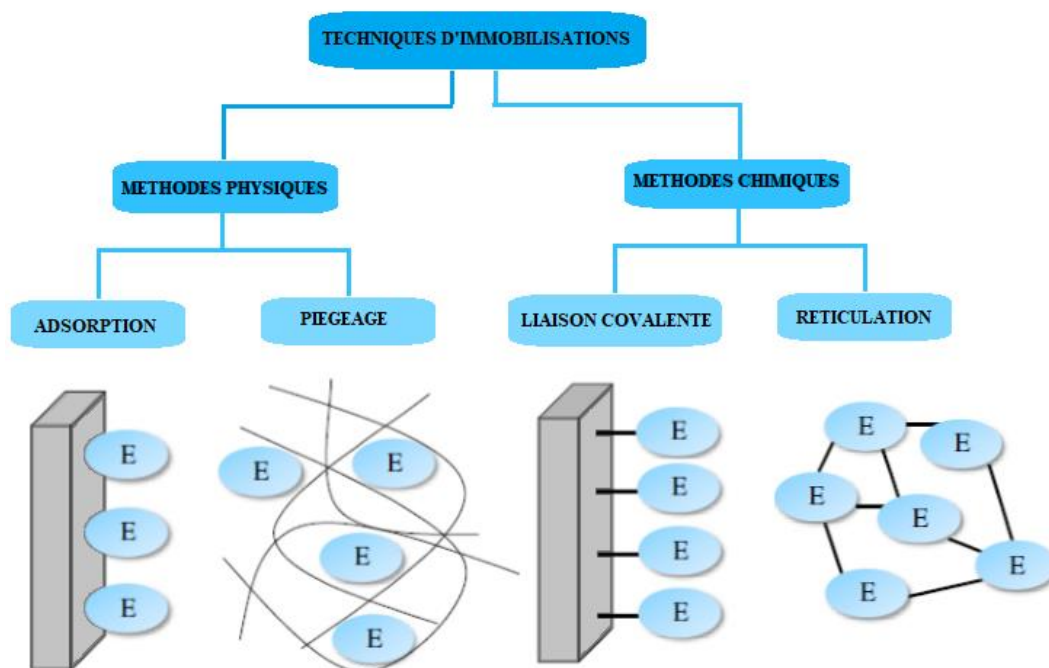


Figure I.15. Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme

I.4.4.1. Les méthodes physiques d'immobilisation

I.4.4.1.1. L'adsorption

L'adsorption est l'une des méthodes les plus simples qui permet l'immobilisation de l'élément biologique sur le transducteur (**Figure I.16**). Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant minéral ou organique, par l'établissement d'interactions de faible énergie de type ionique, polaire ou hydrophobe, ou encore de liaisons hydrogènes entre le biorécepteur et un support non soluble, par l'intermédiaire d'un matériau actif tel qu'une résine échangeuse d'ions anionique ou cationique [86], du charbon actif, de l'argile, de l'oxyde de l'aluminium, du verre poreux, des céramiques [87] ou des nanoparticules [88]. Malgré sa simplicité de mise en œuvre, elle demeure peu utilisée pour la conception des biocapteurs parce que les enzymes immobilisées peuvent facilement se désorber sous l'action des variations de pH, de la température, de la concentration en substrat ou de la force ionique [89]. La stabilité et la durée de vie des biocapteurs sont donc diminuées [90].

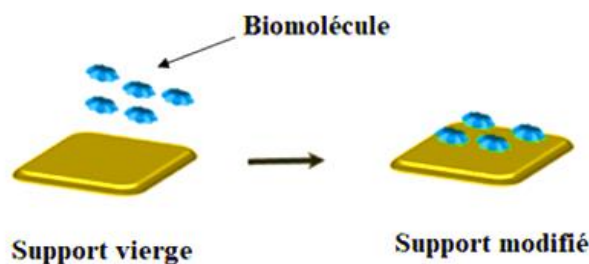


Figure I.16. Immobilisation des biomolécules par adsorption

I.4.4.1.2. Le piégeage

La méthode d'inclusion physique consiste à incorporer le biorécepteur dans une matrice organique (polymère) [91], ou inorganique (le chitosane, la gélatine, l'agarose) [92-93]. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention d'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat (**Figure I.17**). L'inconvénient majeur de ce type de technique réside dans l'établissement d'une résistance diffusionnelle supplémentaire qui se traduit par une baisse de la sélectivité et une augmentation des limites de détection [89]. Le relargage du biorécepteur dans le milieu réactionnel suite à la modification des conditions expérimentales telles que le pH, la force ionique, la température ou encore la présence de solvant peut également constituer, dans certains cas, une limitation à cette technique.

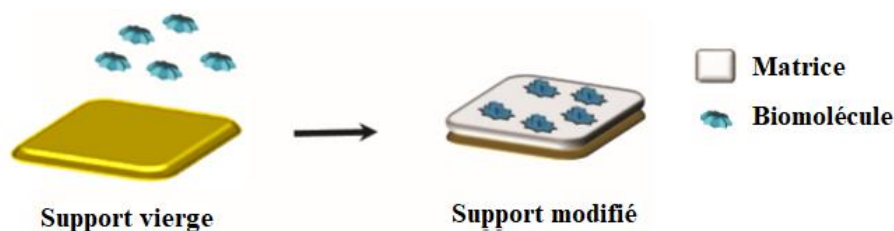


Figure I.17. Immobilisation des biomolécules par piégeage

I.4.4.2. Les méthodes chimiques d'immobilisation

I.4.4.2.1. Liaison covalente

Cette technique est basée sur la réaction entre un groupement fonctionnel de l'enzyme et un groupement fonctionnel du support préalablement activé. Les groupements fonctionnels disponibles pour les enzymes ou les protéines proviennent des chaînes latérales des acides aminés, des groupements carboxyliques ou sulfhydriles et des transducteurs porteurs de groupement amine, époxy ou tosyle [94-95]. Une activation du support portant soit des groupements amines soit des groupements carboxyliques permet par exemple la formation de liaisons amides, respectivement, avec les fonctions carboxyliques ou amines de l'enzyme (**Figure I.18**) [94]. Néanmoins, l'exposition à des conditions chimiques agressives affecte la viabilité et l'activité cellulaire et peut entraîner la perte en enzymes intracellulaires [89].

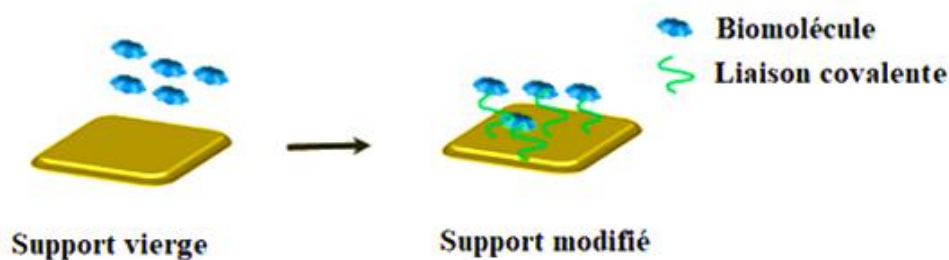


Figure I.18. Immobilisation des biomolécules par liaison covalente

I.4.4.2.2. Réticulation et Co-réticulation

Il s'agit dans ce cas d'immobiliser les éléments biologiques, essentiellement les enzymes, en utilisant un réticulant. Celui-ci est un agent bifonctionnel possède à ces extrémités deux groupements aldéhyde qui permet de lier les biomolécules entre elles par des liaisons chimiques, donnant ainsi des composés de hautes masses moléculaires insolubles dans l'eau. En présence d'une autre protéine inactive telle que l'albumine de sérum bovin (BSA) [95], on parle de Co-réticulation. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. L'agent de réticulation le plus utilisé est le glutaraldéhyde (GA) [95-96]. Le (GA) est largement utilisé pour le développement de biocapteurs, il possède une place importante dans le classement des agents de réticulation du fait de sa fiabilité, son faible coût

et sa facilité d'utilisation. C'est le réactif de choix dans les cas nécessitant une immobilisation rapide et sûre de protéine (**Figure I.19**) [95].

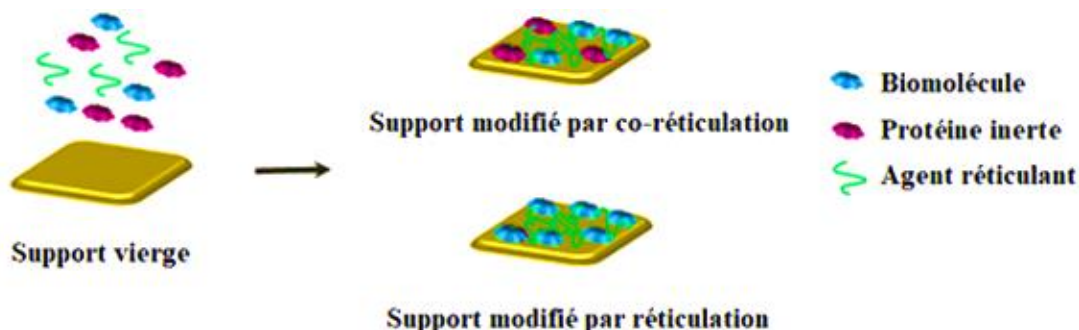


Figure I.19. Immobilisation des biomolécules par réticulation et Co-réticulation

Le GA est un liquide incolore très odorant à l'aspect huileux, soluble dans l'eau, dans l'alcool et dans le benzène. Généralement vendu sous forme de solution aqueuse contenant entre 1 et 50% de glutaraldéhyde et 0,05 à 0,5% d'un agent stabilisant comme le méthanol, il est souvent utilisé comme désinfectant ou agent de stérilisation à froid. En biologie, il est employé comme fixateur cellulaire ou agent de réticulation de protéines et particulièrement les enzymes. Sous ses différentes formes (libre, linéaire monohydrate et dihydrate, hémiacétal cyclique et oligomérique...), le GA réagit essentiellement avec les groupements amines des protéines créant des ponts intra et intermoléculaires, ce qui immobilise les molécules tout en préservant leur activité et leur conformation [97]. Il est primordial, lors de l'étape d'immobilisation par le GA, de contrôler certains paramètres tels que le temps de réticulation. En effet, pour de faibles temps de réaction, les connexions formées sont insuffisantes pour obtenir une membrane assez dense et un relargage de l'enzyme est possible. A l'inverse, pour des temps trop longs, la forte réticulation peut entraîner un changement de conformation, en particulier une déformation de la structure du site actif, affectant ainsi l'activité biologique de l'enzyme.

Pour l'immobilisation des enzymes, le GA est souvent employé sous sa forme liquide mélangé directement avec les biomolécules [98-100]. Toutefois, il est possible également d'utiliser ce réactif sous forme de vapeur saturée [101-102]. Dans des études précédemment effectuées comparant différents modes d'immobilisation d'enzyme pour le développement de biocapteurs, ils ont montré que les vapeurs de GA conduisaient à de meilleurs résultats que la forme liquide [103-104]. Ces résultats peuvent être attribués au fait que les conditions

expérimentales sont plus douces en présence de vapeur (effet de dilution). Alternativement, la nature polymérique du GA forme une longue chaîne, attachant la protéine à la matrice, qui permet une plus grande flexibilité pour les changements conformationnels de la protéine nécessaire à son activité [105].

I.5. Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux font preuve de potentialités intéressantes pour la dépollution des sols par des polluants organiques. Ils sont des microorganismes qui développent des mécanismes de tolérance aux métaux. L'accumulation de métaux lourds dans les sols est une préoccupation en production agricole en raison de leurs effets néfastes sur la croissance des cultures, la qualité des produits alimentaires et la santé de l'environnement [106]. Cette partie du travail consiste à sélectionner et identifier des souches fongiques présentes dans différents sols pollués par des métaux en vue de tester leur capacité de biosorption. Les littératures disponibles jusqu'à ce jour marquent la capacité potentielle des microbes vers l'élimination substantielle des métaux lourds et d'autres xénobiotiques des solutions aqueuses [107-108]. La capacité de fixation des métaux par les champignons filamenteux a été réalisée sur plusieurs souches dont certaines ont été sélectionnées à partir de sols contaminés par des métaux [109] parmi ces souches, on a sélectionné *Trichoderma asperellum*. Depuis une vingtaine d'années, de nombreux biocapteurs destinés au contrôle environnemental ont été développés, et dans certains cas commercialisés, pour détecter les grandes familles de substances susceptibles de polluer les écosystèmes aquatiques.

Les champignons présents dans les sols étudiés ont été isolés par une approche classique de mise en culture sur milieux nutritifs gélosés. Ils ont ensuite été identifiés au niveau du genre par des observations macro et microscopiques.

I.5.1. Réponse extracellulaire de la cellule fongique

Les champignons filamenteux excrètent des acides organiques qui peuvent fixer des métaux lourds. Cette réponse extracellulaire conduit à l'immobilisation de l'ion métallique soluble à l'extérieur de la cellule et permet ainsi aux champignons d'assurer leur survie dans des environnements contenant des concentrations potentiellement toxiques en métal [110-111]. Certains organismes (algues et champignons) produisent et secrètent des substances polymériques extracellulaires (SPE), parmi lesquelles figurent des polysaccharides, des glycoprotéines, des lipopolysaccharides et des peptides solubles. Ces substances possèdent un nombre de groupements anioniques fonctionnels capables d'adsorber des ions métalliques.

Dans la littérature, les travaux sur la biosorption des métaux avec des (SPE) sont décrits pour des bactéries, comme *Enterobacter cloacae* AK-I-MB-71a [112], *Paenibacillus jamilae* CECT 5266 [113], *pseudomanos aeruginosa* [114] et des cyanobactéries, tandis que l'étude des (SPE) chez les champignons et les algues reste encore très limitée [115-116]. Les parois cellulaires comptent un grand nombre de groupements chimiques tels que les groupements carboxyle, sulfonate, amine, hydroxyle, sulfhydryle, carbonyle, imidazole avec lesquels les éléments peuvent interagir [117]. La paroi est la première structure cellulaire fongique qui entre en contact avec les métaux et au niveau de laquelle la fixation des ions peut avoir lieu. Elle est composée principalement de polysaccharides (80%-90%) dont certains sont associés à des protéines, des lipides ou de la mélanine. Tous les champignons filamenteux contiennent de la chitine polymère des résidus N-acétylglucosamine. La chitine représente 1-20% de la paroi chez la levure, et en proportion beaucoup plus importante chez les champignons filamenteux puisque chez *Neurospora* et *Aspergillus*, elle constitue plus de 20% du poids sec de la paroi [118]. Le glucane est le composant majoritaire de la structure de la paroi fongique, il constitue environ 50-60% [118-120]. L'analyse de la structure de la paroi montre qu'elle peut également contenir des mannanes, des galactanes ainsi que des polysaccharides phosphatés selon le groupe taxonomique étudié [121-124]. Les groupements fonctionnels de la paroi (phosphates, carboxyles, amines et phosphodiester) interviennent, dans la fixation des ions métalliques [125]. Brady et Duncan [126] ont montré que le blocage des fonctions amines, carboxyles et hydroxyles de parois cellulaires isolées de *S.cerevisiae* réduit la capacité d'adsorption du Cu(II). Les travaux de Wang [127] confirment que les fonctions amines et carboxyles de la paroi cellulaire, jouent un rôle important dans l'adsorption du Cu(II) par les cellules de *S.Cerevisiae* traitées par le méthanol et le formaldéhyde.

I.6. Identification des polysaccharides issus des algues brunes

I.6.1 Généralités sur les algues

La valorisation des algues est une thématique qui prend de l'ampleur depuis quelques années. En effet, la diversité des espèces d'algues et leur richesse en métabolites permettent un vaste panel d'applications et peut s'adresser à de nombreux secteurs industriels [128]. Il est possible de valoriser la biomasse brute, ou bien de l'utiliser comme vecteur pour la production des molécules d'intérêt (les lipides, les vitamines, les polysaccharides, les protéines, les pigments, les antioxydants et d'autres composants cellulaires...). Ces dernières sont

commercialisées pour les secteurs alimentaires (colorant, complément et additif), cosmétique (huile et crème hydratante) ou bien pharmaceutique (anti-inflammatoire, antivirale...) [128]. L'Algérie, avec 1622 km de côtes comporte une biodiversité marine et côtière particulièrement intéressante [129]. Toutefois, faute d'inventaires actualisés, l'étude de la biodiversité marine reste toujours subjective étant donné qu'elle fluctue au cours du temps.

Les algues sont des organismes photosynthétiques occupant en majeure partie les milieux aquatiques, d'eau douce ou marine ainsi que les milieux terrestres humides. Elles se distinguent par leur appareil végétatif (ou thalle) qui est extrêmement variable, aussi bien en forme qu'en dimension. En effet, les algues constituent un ensemble hétérogène qui comprend des végétaux unicellulaires, coloniaux, et pluricellulaires qui se distinguent par l'absence des racines, des tiges et des feuilles. Ainsi, en raison de leur diversité méconnue et leur distribution géographique très étendue il est impossible de préciser le nombre exact des espèces d'algues ou de les présenter d'une manière univoque. Cependant la base de données internationale sur les algues « Algae Base » recense environ 127 000 noms d'espèces, dont la majorité est des micro-algues qui varient selon les estimations de 100 000 à plusieurs millions ; le nombre total de macro-algues, quant à lui, est d'environ 9000 espèces [130].

❖ **Classification des algues**

Les algues peuvent être classées en une dizaine d'embranchements selon des critères écologiques, physiologiques ou biochimiques tels que leurs modes de reproductions, leurs caractéristiques structurales, leurs polysaccharides de réserve ou leurs compositions pigmentaires. Dès le début du 19^{ème} siècle les pigments ont constitué le critère le plus répandu dans le recensement des algues. Selon la nature de ces molécules surnuméraires associées à la chlorophylle on peut définir quatre grands groupes d'algues (**Figure I.20**), les algues bleues (cyanophyceae), les algues vertes (Chlorophyceae), les algues rouges (Rhodophyceae) et les algues brunes (Pheophyceae) [128].



Figure I.20. Différents types d'algues selon leur pigmentation

Parmi ces quatre types d'algues, les brunes sont les plus répandues et les plus cultivées. Selon la FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations), la production mondiale a augmenté de presque 100% dans les années 90, passant à plus de millions de tonnes (poids à l'état frais) par an [131]. Plus de 1000 espèces d'algues brunes ont été dénombrées. Plusieurs espèces ont une valeur commerciale importante tels les genres : *Laminaria*, *Undaria*, *Macrocystis*, *Sargassum* et *Fucus*. Dans cette étude, nous allons nous intéresser à deux familles d'algues brunes ; les Cystoseiraceae et les Dictyotaceae.

Les algues brunes représentent une source importante de principes bioactifs ayant des propriétés thérapeutiques. Parmi ces principes actifs, les polysaccharides revêtent un intérêt particulier. Dans cet travail, nous allons caractériser les polysaccharides issus de trois espèces d'algues brunes du genre *Cystoseira* pour étudier leurs différences structurales et biologiques.

I.6.2. Généralités sur les polysaccharides

Les polysaccharides sont de la famille des glucides appelés aussi glycanes ou hydrates de carbone de formule brute $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Ils constituent la troisième classe des biopolymères, après les acides nucléiques et les protéines[132]. Les polysaccharides sont constitués d'enchaînements linéaires ou ramifiés d'unités saccharides, connectées entre eux par des liaisons dites glycosidiques. Ils sont formés par la condensation d'un grand nombre d'oses, soit toutes identiques dans le cas des homopolysaccharides comme l'amidon, le glycogène, la cellulose et la chitine, soit de nature différente dans le cas des hétéropolysaccharides comme les gommages, les hémicelluloses et les pectines [133] (**Figure I.21**). Ainsi, les polysaccharides présentent une diversité structurale énorme concernant l'isomérisation, l'ordre et le nombre de monosaccharides reliés dans la macromolécule, l'anomérisation en carbone 1 (α ou β) de chaque monosaccharide, la configuration absolue des monosaccharides (D ou L), le type de liaisons glycosidiques à des chaînes ramifiées ou non ramifiées, ainsi que les groupes fonctionnels adaptés aux différents rôles biologiques [134].

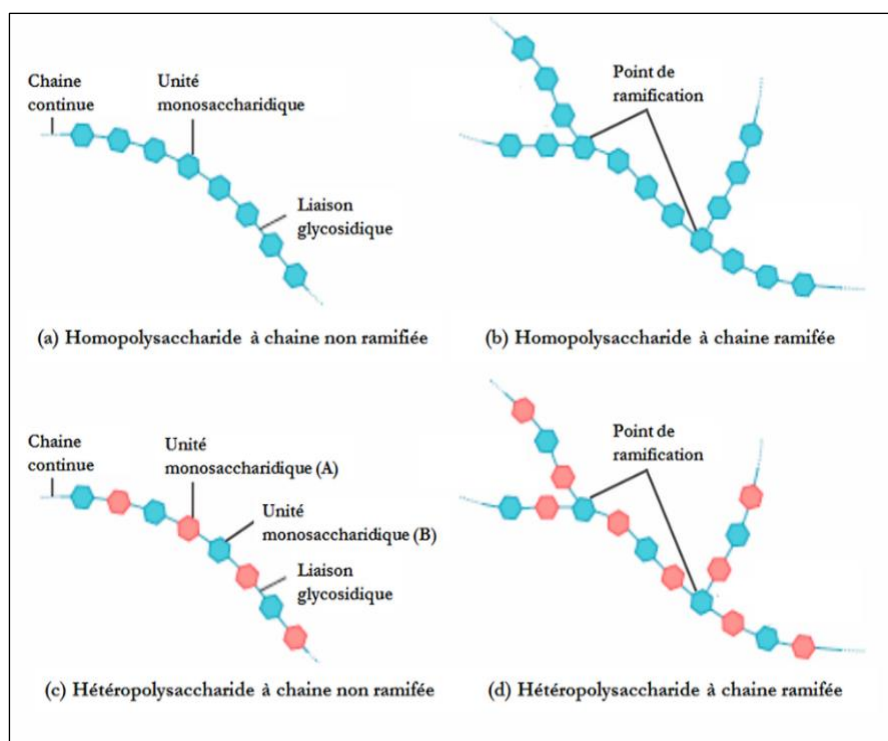


Figure I.21. Structure des polysaccharides

I.6.2.1. Classification des polysaccharides

Il existe dans la nature de nombreuses variétés de polysaccharides répertoriées, auxquelles l'intérêt porté est proportionnel aux applications potentielles. On les classe généralement selon leur fonction naturelle qui peut être soit une fonction de réserve, de structure ou bien exocellulaire.

❖ Les polysaccharides de réserve sont ceux qui servent au stockage des sucres riches en énergie. Le glycogène est la substance de réserve en glucide chez les animaux. La principale substance de réserve des végétaux est l'amidon qui est présent dans tous les organes végétaux.

❖ Les polysaccharides de structure sont les responsables de la stabilité mécanique des cellules, des organes ou des organismes. C'est la fonction de la chitine pour les formes animales inférieures (insectes, crustacés) et la cellulose dans le monde végétal.

❖ Les exopolysaccharides sont des polymères de haut poids moléculaire sécrétés par les micro-organismes au-delà de la paroi cellulaire ayant principalement pour vocation d'assurer le maintien de l'eau autour des micro-organismes (Les dextrans et les Xanthanes). Ce rôle de protection contre la dessiccation est attribué à des polysaccharides scléogucane [135]. Les polysaccharides exocellulaires les plus connues dans le commerce sont les Dextrans et les Xanthanes. Il est possible également de les classer en fonction de leur origine, on distingue ainsi des polysaccharides d'origine animale, végétale, microbienne ou algale (**Tableau I.1**).

Tableau I.1 : Classification des polysaccharides selon leurs origines

Origine	Polysaccharides
végétale	Amidon, Cellulose, Pectine, Gomme
Animale	Héparine, Chondroïtine
Microbienne	Dextrane, Xanthane
Algale	Agars, Carraghénane, Alginate, Fucoidan

I.6.2.2. Les polysaccharides d'origine algale

Les algues synthétisent une grande diversité de polysaccharides originaux dont l'utilisation est largement répandue en industrie (agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique, l'agriculture et les biotechnologies). Ils sont généralement exploités pour leurs propriétés texturantes en tant que gélifiant, épaississant et stabilisant. Bien qu'ils peuvent présenter également des activités pharmaceutiques et biologiques intéressantes.

Plusieurs facteurs environnementaux, biologiques et physiques tel que la période de récolte, l'espèce d'algue et le protocole d'extraction influencent non seulement sur les rendements en polysaccharide mais aussi sur la structure (le poids moléculaire, la nature des unités de base, le contenu en sulfates et leurs positions, le type de liaison glycosidique)[136-137] ce qui influence en retour sur leur activité biologique. Les polysaccharides algaux les plus connus et les plus exploités sont essentiellement les ulvanes issus des algues vertes, les agars et les carraghénanes issus des algues rouges en plus des polysaccharides des algues brunes qui sont les laminaranes, les alginates et les fucoïdanes.

La paroi des algues brunes diffère significativement de celles des autres organismes végétaux par son organisation et sa composition. Elle peut être interprétée comme étant une structure biphasique composée d'une phase fibrillaire cristalline squelettique et d'une phase matricielle hydrosoluble de nature mucilagineuse très complexe (**Figure I.22**).

L'analyse et le fractionnement chimique de cette paroi indiquent que leurs principaux constituants sont les ascophyllanes, les alginates et les fucoïdanes. Ces derniers ne sont pas répartis uniformément dans l'épaisseur de la paroi cellulaire. Globalement, les ascophyllanes cimentent les associations paracrystallines des alginates avec les microfibrilles de cellulose dans la paroi proprement dite. Tandis que les fucoïdanes sont sécrétés dans la partie externe de la paroi cellulaire et dans les espaces intercellulaires [138].

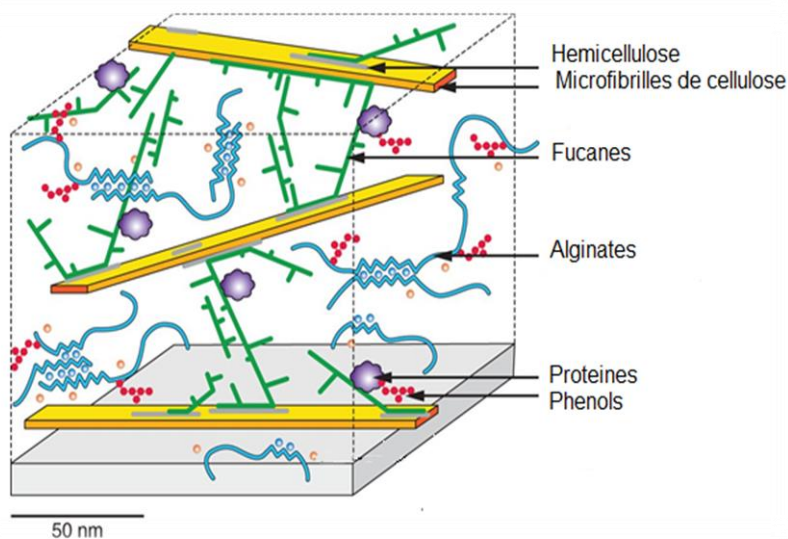


Figure I.22. Modèle d'organisation de la paroi des algues brunes

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux alginate de sodium afin d'élaborer un biocapteur impédimétrique à base d'acétylcholinestérase (AChE) pour l'analyse inhibitrice d'aflatoxine B1 (AFB1) qui utilise des électrodes en or modifiées avec un biopolymère d'alginate de sodium.

❖ Les Alginates

a). Définition et structure

Découverts pour la première fois par le chimiste anglais *Stanford* en 1881 [139], les alginate représentent le mucilage matriciel majeur des algues brunes, ils jouent un rôle structural et interviennent dans le maintien et la résistance mécanique, l'adhésion cellulaire et tissulaire ainsi que dans le maintien de l'hydratation et la protection.

Leur structure chimique est voisine de celle de l'acide pectique des végétaux supérieurs. Ce sont des polysaccharides complexes, de structure linéaire, composés de deux unités dérivées du mannose, l'acide mannuronique (M) et l'acide Guluronique (G), liées entre eux par des liaisons glycosidiques de type (1,4) (Figure I.23) [140].

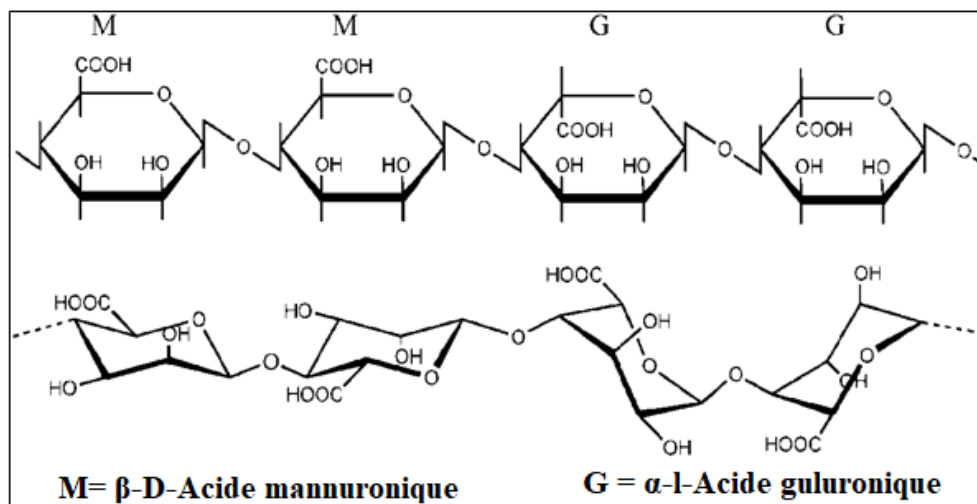


Figure I.23. Structure des alginates issus des algues brunes

b). Propriétés physico-chimiques

Le poids moléculaire des alginates est généralement compris entre 500 et 1000 kDa. Sa solubilité en solution aqueuse est influencée par des facteurs tels que le pH, la concentration, la présence d'ions divalents et de la force ionique [141]. Ainsi, les alginates monovalents sont parfaitement solubles dans l'eau si on leur associe des cations alcalins monovalents car les groupements carboxyliques présents dans les molécules d'alginate sont ionisés. Cependant, l'acide alginique est insoluble dans les solutions aqueuses. Il se précipite quand le pH est inférieur à 3,5. L'acide mannuronique a un pKa de 3,38 et l'acide guluronique un pKa de 3,65. Le pKa apparent de l'acide alginique varie de 3,7 à 4,2 en fonction de sa composition [142].

De plus, une des particularités la plus intéressante des alginates est qu'ils sont capables de se lier aux cations divalents afin de former des hydrogels. Les alginates présentent une affinité sélective, ils se lient plus ou moins facilement aux cations divalents en fonction de la nature de ceux-ci [143-144]. Ils fixent également très fortement les ions calcium [145]. Cette affinité est due à la capacité des dimères de séquence polyguluronate à chélater les ions calcium [146].

c). Les applications des alginates

La première utilisation connue de l'acide alginique date de 1923 pour agglutiner sous forme de briques la poussière de charbon. Depuis, plus de 300 utilisations sont répertoriées dans

des domaines industriels très divers notamment pour leurs propriétés colloïdales uniques ; En effet suivant les sels utilisés, ces phycocolloïdes permettent d'épaissir fortement les solutions aqueuses, de former des gels durs ou souples [145] ou encore des films protecteurs [147-148]. La majorité des alginates produits chaque année sont utilisés principalement à des fins agro-alimentaires comme stabilisants des émulsions et des suspensions, épaississants ou bien comme émulsifiants [149]. Ils sont également utilisés dans la production de peinture, de certains matériaux de construction, de la colle et du papier, de l'huile, de photos et dans l'industrie textile. Leur capacité à pouvoir se lier aux cations lourds les rend aussi utilisables comme dépolluants et détoxifiants. D'autres applications dans le domaine pharmaceutique ont été trouvées pour les alginates, soit en tant qu'excipient dans les comprimés, facilitant ainsi la dispersion du médicament en contact avec l'eau, soit en tant que principe actif comme pansement gastrique [142,150]. Une des applications les plus intéressantes dans ce domaine est la préparation des capsules d'alginate qui jouent le rôle de pancréas de substitution en diffusant dans l'organisme du malade des cellules productrices d'insuline dans le traitement du diabète [151]. Il existe bien d'autres applications, telles que les matériaux d'empreintes dentaires, la préservation des racines d'arbre avant plantation, la protection des fruits frais, etc...

I.7. L'Aflatoxine B1 : molécule cible étudiée

I.7.1. Définition et structure chimique

À la suite d'une maladie « *Turkey X disease* » qui a affecté la volaille en Angleterre, et plus particulièrement les dindons, *Sargeant et al.* [152] ont isolé de la nourriture des volailles à base d'arachide, une substance capable d'induire expérimentalement la même maladie. Après une série de recherches, *Asao et al.* ont abouti en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des aflatoxines [153-154]. Ces derniers constituent un groupe de 18 composés structurellement proches dont quatre constituent les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments (B1, B2, G1, G2) et M1 et M2 dans le lait. L'aflatoxine B1 (AFB1) dont le nom chimique est le suivant : 6-Méthoxy-difurocoumarone 2, 3,6 α , 9 α -tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta-[c]furo [3',2' :4,5] furo [2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione (**Figure I.24**) une des plus célèbres mycotoxines qui possède le profil toxicologique le plus sérieux.

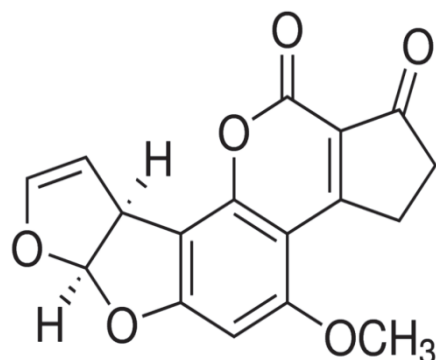


Figure I.24. Structure chimique de l'aflatoxine B1 (AFB1)

En raison de leur présence fréquente et de leurs toxicités, de nombreux pays ont mis en place des réglementations pour régir le niveau maximal admissible des aflatoxines dans les denrées alimentaires. Des dérivés secondaires de l'AFB1 (AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2) ont été identifiés. Ils sont caractérisés au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactoses hexatomiques (AFG). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau. Les structures chimiques de ces différents dérivés sont représentées dans la **Figure I.25**.

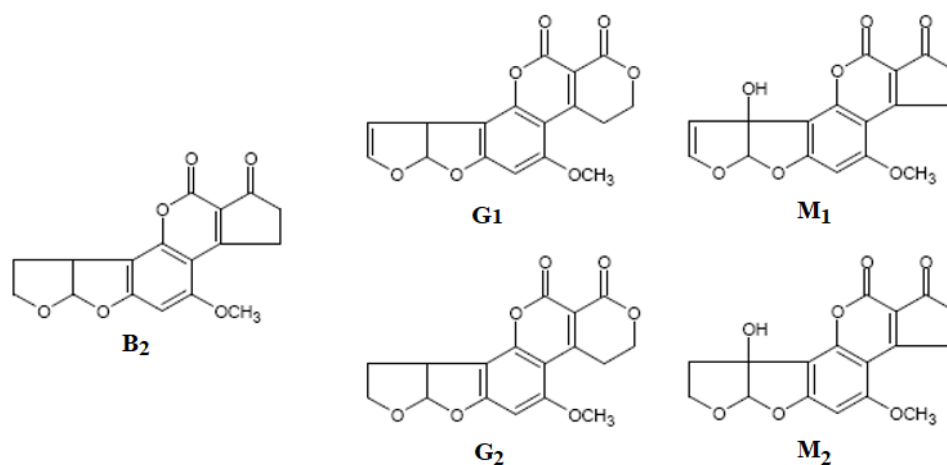


Figure I.25. Structures chimiques des différentes aflatoxines

I.7.2. Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B₁ et B₂ émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G₁, G₂, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour Blue et G pour Green). L'aflatoxine M₁ présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de (Milk), car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait [155]. La masse moléculaire, la formule brute, et le point de fusion de ces différents dérivés sont résumés dans le **tableau I.2**.

Tableau I.2. Propriétés chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2

Aflatoxine	Formule brute	Masse molaire en g/mole	Point de fusion en °C
AFB1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.3	268-269
AFB2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.3	286-289
AFG1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	244-246
AFG2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.3	237-240
AFM1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.3	299
AFM2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.3	293

I.7.3. Contamination des aliments

Compte tenu de leurs conditions de synthèse, les aflatoxines sont généralement retrouvées dans des aliments en provenance des régions chaudes et humides (Amérique de Sud, Afrique, Asie). Elles sont détectées dans les légumes (pommes de terre et lentilles) [156], les fruits secs (figues, raisins secs) et les noisettes [157], les céréales (maïs, blé, orge, avoine, seigle, riz) et produits à base de céréales [158]. L'aflatoxine B₁ présente dans les aliments ingérés par des vaches laitières est partiellement métabolisée au niveau hépatique et transformée en son dérivé 4-hydroxy, connu sous le nom d'aflatoxine M₁ qui est excrétée dans le lait. Cette molécule est stable et peut ensuite être retrouvée dans les produits à base de lait destinés à la consommation humaine (yaourts, fromages).

Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration et la composition de l'alimentation. L'AFB1 est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité des aflatoxines G1, B2 et G2 sont respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB1 [159]. Toutefois, la propriété toxique majeure de l'AFB1 est son pouvoir cancérogène. En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux. Elle est répertoriée dans le groupe I « cancérogène pour l'homme » par le Centre International de recherche sur le Cancer de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [160-161].

I.8. Généralités sur les métaux lourds et leurs effets sur l'environnement

Les activités humaines et les différentes industries sont à l'origine des principaux types de pollution. Ils conduisent à une importante accumulation des métaux dans l'environnement menaçant la santé humaine, l'écosystème, la faune et la flore. Diverses industries, telles que les exploitations minières [162], l'industrie de traitements de surface, la métallurgie ou les installations d'énergie atomique, produisent et rejettent dans l'environnement des eaux usées contenant différents métaux [163-164]. Ils peuvent entrer facilement dans la chaîne alimentaire à travers diverses voies [165]. Leur présence dans l'atmosphère, le sol et l'eau, même sous forme de traces [164] peut causer de graves problèmes à tous les organismes [166]. Ces éléments métalliques ont un poids atomique élevé et des densités supérieures à 5,0 g/cm³ [167]. Ils sont considérés comme étant parmi les polluants les plus importants en raison de leur large diffusion, la persistance, la bioaccumulation et leur degré élevé de toxicité [168].

I.8.1. Origine des métaux lourds

Les métaux lourds peuvent provenir de plusieurs sources d'origine naturelles ou anthropiques. La dernière phase de la circulation d'un polluant dans la biosphère est constituée par la contamination des êtres vivants et parfois par la bioaccumulation dans l'organisme de ces derniers.

I.8.1.1. Origine naturelle

La présence de métaux dans le milieu est d'origine naturelle, du fait de la nature géochimique des terrains drainés par les cours d'eau [169-170]. On peut souligner des teneurs moyennes très faibles dans la croûte terrestre, qui sont souvent inférieures à celles du fond géochimique observé dans certaines formations. Elle dépend en premier lieu de la teneur dans

la roche qui est à l'origine du sol, mais également des processus qui sont intervenus lors de la formation du sol, qui ont pu lessiver ou plus généralement concentrer l'élément en question [171].

I.8.1.2. Origine anthropique

Les métaux lourds sont issus des activités variées : l'industrie, le transport, l'agriculture, les exploitations minières, les décharges et les boues urbaines. Les activités anthropiques peuvent conduire à une augmentation des concentrations naturelles [172]. Les origines anthropiques des métaux lourds sont diverses, le **tableau I.3** nous renseigne sur les flux naturels (altération des roches,...) et anthropogénique (lié aux activités humaines) [169-170, 173].

Tableau.I.3. Flux des métaux lourds dans l'environnement (en tonnes) [174]

Eléments	Flux Anthropogénique (1)	Flux naturel (2)	Rapport (1)/(2)
Cd	43	4,5	9.6
Pb	3665	180	20.4
As	150	90	1.7
Cr	7810	810	9.6
Cu	9162	375	24.4
Ni	1134	255	4.4
Zn	7467	540	13.8
Hg	17,8	0.9	19.8

On constate que les rapports (flux anthropogénique/ flux naturel) sont tous supérieurs à 1 c'est à dire que le risque de contamination métallique des cycles biogéochimiques est régie surtout par les activités humaines. L'influence de celles-ci est marquée par une augmentation de la concentration en métaux dans les sédiments des rivières et des lacs (liée à leur faible solubilité aux pH habituels des eaux (5 à 9). Dans le sol, la pollution est plus sournoise puisque ce compartiment à la propriété de fixer les métaux. On risque donc d'observer des effets de bioaccumulation.

I.8.2. Procèdes d'élimination des métaux Lourds

Le problème de l'élimination des métaux lourds est rendu délicat par le fait de leur activité à des doses souvent très basse. Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'élimination de ces métaux, les plus utilisées sont :

I.8.2.1. Adsorption

Le procédé de séparation par adsorption constitue aujourd'hui une des technologies les plus importantes, elle est largement utilisée pour la dépollution et la purification dans des domaines très variés, par exemple les industries pétrolières, pétrochimiques et chimiques, aux applications environnementales et pharmaceutiques [175].

I.8.2.2. Filtration par membrane

Parmi les méthodes développées au cours de ces dernières années, on peut citer les procédés à membranes. Ces derniers ont connu un essor important passant du stade laboratoire au stade industriel. Ainsi l'osmose inverse, l'ultrafiltration et plus récemment la nano filtration a été appliquées à l'épuration d'effluents contenant des polluants organiques ou minéraux. En plus le procédé de complexation des cations par un polymère hydrosoluble a fait l'objet de nombreuses recherches sur des effluents contenant Cd^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} et Pb^{2+} [1176]. Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de ce procédé en dépollution des eaux industrielles, mais l'utilisation de ce procédé en dépollution des eaux naturelles est limitée par la présence des ions calcium qui entrent en compétition avec les cations présents [177].

I.8.2.3. Les résines d'échanges

Les résines d'échanges sont très populaires, notamment pour épurer les eaux de rinçage en galvanisation. Elles sont relativement peu sélectives et fixent aussi Ca, Mg, Na ; elles sont facilement empoisonnées par les matières organiques. Leur principal inconvénient est que leur régénération produit des saumures qui à leur tour nécessitent un traitement (par exemple une précipitation).

I.8.2.4. Electrocoagulation- floculation

L'électrocoagulation est l'une des techniques utilisant l'énergie électrique [178]. En électrocoagulation, on utilise des anodes de fer dont la solubilisation électrolytique entraîne la coagulation. Les particules colloïdales sont mises en mouvement sous l'action du champ électrique, ce qui augmente et favorise la floculation. En plus de l'effet de la coagulation

floculation, l'électrocoagulation peut avoir une action sur les composés oxydables (CN ; NO²⁻ ; SO₃²⁻ ; etc.) ou réductibles de certains polluants tels que les métaux lourds. Le principal inconvénient de cette méthode c'est qu'elle coûte actuellement plus chère que la méthode classique.

I.8.2.5. Fixation biologique

Les méthodes biologique de récupération des métaux, appelées biosorption [177], ont été suggérées comme étant une alternative efficace et économique de traitement des effluents. Des travaux intensifs ont été réalisés en Afrique du sud et notamment en Belgique. En fait des résultats forts variables ont été enregistrés avec des bactéries, des levures, des moisissures et des algues pour la rétention de plusieurs métaux lourds (Ag ; Cd ; Co ; Cr ; Hg ; Pb ; Zn ; Ni).le pouvoir de rétention est à peu près le même que la biomasse soit qu'elle est vivante ou morte.

I.8.2.6. Précipitation chimique

La précipitation est une méthode largement utilisée pour éliminer les composés polluants solubles, le plus souvent minéraux présent dans les eaux. On convertira les impuretés en un composé insoluble par ajout d'un précipitant en veillant à satisfaire les conditions physico- chimique conduisant à une précipitation optimale. On peut alors aboutir à une séparation quasi parfaite de l'eau et des imputés en précipitant un composé possédant un très faible produit de solubilité. De nombreux précipités métalliques sont peu solubles, en particulier les hydroxydes, les carbonates, les sulfures et les phosphates. Le traitement par précipitation chimique devrait s'adresser surtout aux phosphates et aux sulfures, ces derniers sont même capables d'extraire les métaux de leurs complexes [179].

L'utilisation de ces précipitants dépend de quelques facteurs dont on doit tenir compte. Ces facteurs sont :

- Le coût du réactif : sur ce plan les carbonates et les hydroxydes sont imbattables.
- La toxicité du réactif dont un excès se retrouvera inmanquablement dans les eaux ici les sulfures sont défavorisés.
- La séparation du précipité : elle est généralement médiocre pour tous les procédés et ne peut s'effectuer qu'avec l'aide de polyélectrolytes ; les boues d'hydroxydes sont légères, très hydratées et flocculants ; les boues de sulfure et de phosphate sont très fines ou même colloïdales.

La connaissance de la valeur du pH est essentielle pour savoir si les métaux restent en solution dans l'eau ou s'ils sont précipités sous forme d'hydroxyde. Le pH intervient dans la plupart de ces réactions de précipitation de sorte que le minimum de solubilité n'est pas atteint au même pH pour tous les métaux ce qui complique l'épuration des eaux contenant plusieurs métaux [180].

I.8.3. Eléments traces étudiés

Parmi les métaux lourds, nous avons choisi d'étudier deux entre eux ; le plomb et le cadmium, d'une part, une raison historique. Les premiers biochimistes ont distingué ces deux métaux à cause de leur affinité avec le soufre qui permettait d'identifier les protéines « qui précipitent lourdement » ou donnent facilement des sels (sels de plomb). D'autre part, les deux métaux ont aussi quelques caractéristiques physicochimiques communes :

- Ils se transportent, changent de forme chimique, mais ne se détruisent pas.
- Ils ont une conductivité électrique élevée, qui explique leur utilisation dans de nombreuses industries. Pourtant, ils présentent une certaine toxicité pour l'homme, entraînant notamment des lésions neurologiques plus ou moins graves. Tandis que tous les autres ont une utilité dans le processus biologique, certains d'autres comme les oligoéléments sont même indispensables à la vie (le fer, le cuivre, le nickel, le chrome...),
- Ils sont les plus redoutables, susceptibles d'être métabolisés et concentrés au niveau des organismes marins. Ils peuvent causer des problèmes sérieux de santé.

I.8.3.1. Cadmium

Le cadmium est un métal blanc argent, légèrement bleuté. Cet élément, appartenant à la famille des métaux de transition, découvert en 1817 par le pharmacien *Friedrich Stromeyer*. Le cadmium stable est un élément relativement rare présent dans l'écorce terrestre à des concentrations faibles. Il se trouve fréquemment associé au minerai de Zinc [181-183], la teneur en cadmium varie de 0.01 à 0.05%. Il est également présent dans des minerais de plomb et de cuivre, ainsi que dans des phosphates naturels [184]. La source de dispersion naturelle du cadmium dans l'atmosphère est principalement liée à l'activité volcanique, l'enrichissement en cadmium des sols et des systèmes aquatiques résulte de l'altération des matériaux de la croûte terrestre et des retombés atmosphériques [181, 185-187].

I.8.3.1.1. Propriétés

Le cadmium élémentaire a un numéro atomique de 48, une masse atomique de 112,4 g/mol, son point de fusion et d'ébullition sont respectivement 321 °C et 765 °C, de configuration électronique [Kr] 4d¹⁰5S². Il possède 8 isotopes stables 106Cd (1.22%), 108Cd (0.88%), 110Cd (12.39%), 111Cd (12.75%), 112Cd (24.07%), 113Cd (12.26%), 114Cd (28.86%) et 116Cd (7.58%). Dans la nature le cadmium se trouve sous la forme oxydée (+II) de manière stable. Le cadmium a des propriétés physiques proches de celle du zinc, lors de son ébullition, il dégage des vapeurs jaunes toxiques. Le cadmium est un métal mou, malléable plus volatil que le zinc, résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux [171]. Il est stable à température ordinaire et à sec, mais s'oxyde très peu en présence d'humidité et brûle dans l'air en donnant l'oxyde d'anhydre. Insoluble dans un excès d'hydroxyde de sodium, soluble dans l'acide nitrique dilué et dans les acides chlorhydrique et sulfurique concentrés et chauds. Il se combine directement avec les halogènes, l'oxygène et le soufre avec dégagement de chaleur [188-191]. Les composés du cadmium comme l'oxyde de cadmium (CdO), le sulfure de cadmium (CdS) et le carbonate de cadmium (CdCO₃) sont insolubles dans l'eau, ils peuvent être solubilisés dans des conditions d'oxydation ou d'acidification élevée. Le cadmium n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou végétaux et ne participe pas au métabolisme cellulaire. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus [192].

I.8.3.1.2. Toxicité et Persistance

Le cadmium, provenant de nombreuses applications industrielles est un danger potentiel pour l'homme et l'environnement. Très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques), le cadmium est l'un des rares éléments n'ayant aucune fonction connue dans le corps humain ou chez l'animal. Il ne se dégrade pas, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa mobilité, sa biodisponibilité dans différents milieux. D'une manière générale, la teneur en cadmium dans le sol est très inférieure à 1mg/Kg (1ppm), cependant, il est stable au contact à l'air, car il se recouvre d'une couche d'oxyde, sa concentration normale dans l'air est de 0,001µg/m³. Sa concentration dans l'eau est de 1µg/l [186-187, 193-194]. L'exposition à des doses même faibles pourrait avoir des conséquences importantes pour la santé, en affectant les reins, les os, les poumons [186, 193, 195], il provoque notamment l'augmentation de la tension [171]. Le Cadmium s'accumule dans les organes tout

au long de la vie. Il s'accumule provisoirement dans le foie avant de s'accumuler dans les reins où au-delà de 200 mg par kg chez l'adulte, il provoque des lésions irréversibles. D'après le directeur du centre de recherche de la fondation "vive la santé" le cadmium serait un des facteurs de stérilité [196-198].

I.8.3.1.3. L'utilisation du Cd par l'homme dans les cycles biologiques

Le cadmium est un sous-produit commercial du raffinage du zinc [199]. À l'échelle mondiale, le cadmium métallique est utilisé comme anticorrosif pour le Fer, il entre dans la composition de nombreux alliages à bas point de fusion (soudures, brasures) et sert à la fabrication des certaines batteries d'accumulateurs (Ni- Cd) [200], qui représentent près de 50% de la consommation mondiale de cadmium. Il est également utilisé comme stabilisant pour les plastiques (6%) et les pigments (18%). Il est présent dans les fongicides, certains engrais, la peinture, le caoutchouc, le verre et les céramiques. On retrouve également de petites quantités de cadmium dans les tubes images de téléviseurs, les fils de téléphone, les radiateurs d'automobile, les barres de contrôles des réacteurs nucléaires, les colorants (émail, glaçure), les huiles motrices et les agents de vulcanisation du caoutchouc [186, 193-194, 201].

I.8.3.2. Plomb

Le plomb est une ressource non renouvelable. Il est naturellement présent en moyenne de 0,002% dans la croûte terrestre. La production mondiale de plomb s'est accrue considérablement depuis 1945 [202]. Le plomb est un produit naturel de la désintégration de l'uranium [203], il ne se rencontre que rarement à l'état natif. Il est très souvent associé au zinc dans les minerais mais aussi à de nombreux autres éléments : Fe, Cu, Cd, Bi, Sb, Ge, As, Ag, Au qui sont en grande partie (sauf Fe) récupérés lors des opérations métallurgiques. Les minerais de plomb proviennent d'une coproduction du traitement du minerai de cuivre, de zinc ou d'autres métaux, le principal minerai du plomb est la galène (PbS) très souvent associé à la blende et à la pyrite [204]. L'industrie minière, la métallurgie et la sidérurgie représentant environ 80% des émissions de Pb dans l'environnement [205-209].

I.8.3.2.1. Propriétés

Le plomb appartient à la famille des cristallogènes, c'est un métal gris bleuâtre malléable dans son état naturel. Il est mou et résistant à la corrosion. Le plomb est le 36^{ème} élément de la croûte terrestre en termes d'abondance. Il présente un poids atomique de 207,2 g/mol et une densité égale à 11,3. Il fond à 327°C et bout à 1525°C. C'est le seul élément présentant 4

isotopes dont un stable ^{204}Pb et trois radioactifs ^{206}Pb , ^{207}Pb et ^{208}Pb [210]. Sa structure électronique est $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^{10}6s^26p^2$. Dans la nature, le plomb se trouve sous les degrés d'oxydation (+II) et (+IV). L'état tétravalent est un très fort oxydant, mais il n'est pas fréquent dans l'environnement, en revanche l'état divalent est le plus stable dans l'environnement [211], les espèces inorganiques sont le plus souvent sous l'état (+II), alors que le degré d'oxydation (+IV) se rencontre dans des composés organiques. Le Pb(II) en solution dans les eaux naturelles va être complexé par les carbonates, car ces eaux se trouvent en général dans un domaine de pH entre 6 à 8 unités [212]. Toutefois dans les eaux acides, le Plomb sera associé aux sulfates (PbSO_4) (Eq. I.3), alors que pour des pH élevés (plus de 8 unités) le Plomb se trouvera sous forme de complexe avec des hydroxydes (Figure I.26). Cependant, la spéciation peut varier de manière importante en fonction des concentrations en chlore et phosphore [213].

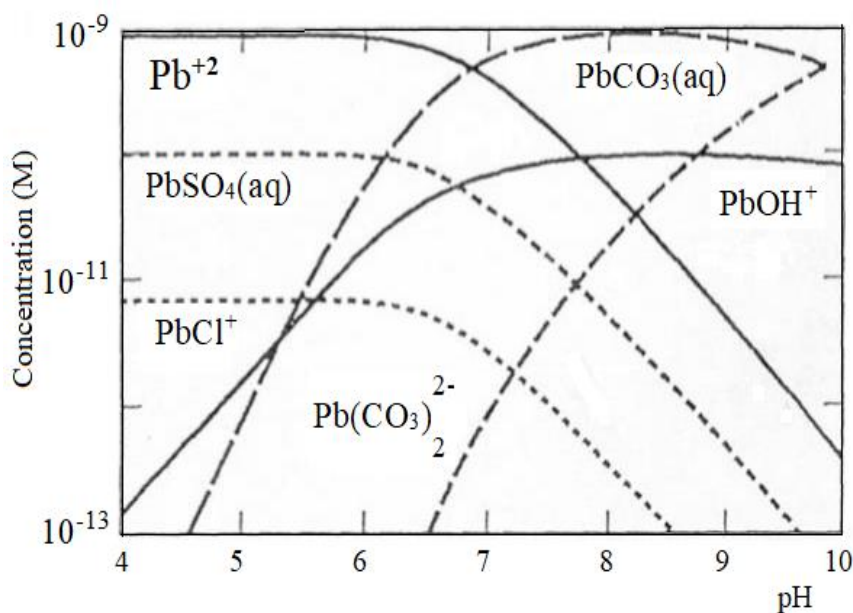


Figure I.26. Spéciation du Pb dans les eaux naturelles [114]

I.8.3.2.2. Toxicité et Persistance

Le plomb est l'un des métaux les plus étudiés au monde en raison de sa grande diffusion, sa facilité d'extraction, sa grande malléabilité et son bas point de fusion. On estime que 95% de la pollution atmosphérique en plomb provenait du plomb des essences et de l'industrie,

principalement sous forme de sulfure de plomb (galène (PbS), des déblais industriels et de certains pesticides [215]. D'autre part, la principale source de plomb, jusqu'au début des années 90, provenait de l'utilisation de composés organométalliques comme antidétonant dans les moteurs à explosion.

L'excès de plomb dans les plantes induit des troubles physiologiques et biochimiques diminuant la photosynthèse et la transpiration induisant ainsi un retard de croissance. Dans le sol, les micro-organismes sont plus sensibles que les plantes à la pollution en plomb. Cette toxicité vis-à-vis de la flore et la faune du sol peut aboutir à l'inhibition de la nitrification [216-217]. Dans le milieu aquatique, le plomb a tendance à être éliminé de la colonne d'eau en migrant vers les sédiments par adsorption sur la matière organique et les minéraux d'argile, précipitation comme sel insoluble (carbonate, sulfate ou sulfure) et réactions avec les ions hydriques et les oxydes de manganèse, mais la quantité de plomb restant en solution sera fonction du pH [218]. Le plomb dans les rivières est principalement sous forme de particules en suspension. En moyenne les rivières contiennent entre 3 et 30 ppb. L'eau de mer contient de faibles quantités de plomb 2-30 ppt [219]. À la différence des oligoéléments, le Plomb n'a aucune fonction essentielle pour l'être humain, il possède au contraire un caractère toxique pour l'Homme. Le plomb peut être absorbé par l'organisme par inhalation, ingestion, contact cutané (principalement lors d'une exposition professionnelle) ou par transmission à travers le placenta [220]. Les effets pathologiques d'une intoxication au Pb sont nombreux et peuvent être séparés en deux catégories : effets physiologiques et neurologiques [208, 221]. Les premiers produisent une augmentation de la tension artérielle et l'apparition de dommages vasculaires et intestinaux, ainsi que des troubles au niveau des reins (néphropathie saturnine). Chez l'enfant le plomb peut remplacer le Calcium dans les os, ce qui est facilement détectable à travers les radiographies [222]. Enfin, des cas de stérilité ont été aussi détectés quand l'exposition a été prolongée au Pb [223]. Finalement chez la femme quand elle est enceinte, le Plomb peut entraîner de très sérieux problèmes pour le fœtus [224]. Les troubles neurologiques sont des affections des systèmes central et périphérique, les symptômes le plus fréquents sont les pertes de mémoire et des perturbations des fonctions cognitives et comportementales, ces troubles sont la conséquence des changements produits dans le cerveau par l'empoisonnement au Pb [222]. Les enfants sont plus affectés par ces effets du Pb que les adultes [208, 221, 223-224].

I.8.3.2.3. L'utilisation du Pb par l'homme dans les cycles biologiques

Beaucoup d'applications historiques du plomb ont maintenant été proscrites en raison de sa toxicité lorsqu'il est absorbé par les organismes vivants [200, 208]. Depuis 1970 sa principale utilisation par les pays de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), qui en sont de loin les premiers consommateurs, est liée à la production de batteries et d'accumulateurs (75 % de la consommation en 2000) [225-226]. En 2004, les batteries au plomb, destinées à l'automobile ou à l'industrie, représentent 72 % de la consommation de plomb. Le plomb est aussi utilisé dans l'industrie du verre et il est d'une grande utilité pour construire des protections pour atténuer les rayons γ et les rayons X. Pendant la révolution industrielle, le plomb a trouvé des applications dans l'agriculture, l'imprimerie, les peintures et les carburants automobiles.

Références Bibliographiques

- [1] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102, 29-45, **1962**.
- [2] S.J. Updike, G.P. Hickson, the Enzyme Electrode. *Nature*, 214, 986 – 988, **1967**.
- [3] G. Guilbault, J. Montalvo, Urea specific enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 2164-2168, **1969**.
- [4] K.D. Gleria, H. HAO, C. McNeil, M. Green, Homogeneous ferrocene mediated amperometric biosensors. *Anal. Chem.*, 58, 1203-1205, **1986**.
- [5] T. Vo-Dinh, B. Tromberg, G. Griffin, K. Ambrose, M. Sepaniak, E. Gardenhire, Antibody-based fiberoptics biosensor for the carcinogen benzo (a) pyrene. *Appl. Spectrosc.*, 41(5), 735-738, **1987**.
- [6] L. Ruhlmann, G. Genet, Wells-Dawson-derived tetrameric complexes {K₂H₈[P₂W₁₅Ti₃O_{60.5}]₄}: electrochemical behaviour and electrocatalytic reduction of nitrite and of nitric oxide. *J. Electroanal. Chem.*, 568, 315-321, **2004**.
- [7] S Dong, X. Xi, M. Tian, Study of the electrocatalytic reduction of nitrite with silicotungstic heteropoly anion. *J. Electroanal. Chem.*, 385, 227-233, **1995**.
- [8] T. Tanigaki, H Nishikiori, S Kubota, N. Tananka, M. Endo, T. Fujii, *Chem. Phys. Lett.*, 448, 218, **2007**.
- [9] L. Gewu, S. Gaoquan, *J. Electroanal. Chem.*, 586, 154, **2006**.
- [10] S-J. Teertstra, W-Y. Lin, M. Gauthier, M. Ingratta, J. Duhamel, *Polymer*, 50, 5456, **2009**.
- [11] D-M. Connor, D-M. Collard, C-L. Liotta, D-A. Schiraldi, *Dyes Pigm.*, 43, 203, **1999**.
- [12] C. N. R. Rao, R. Voggu, A. Govindaraj, *Nanoscale*, 1, 96, **2009**.
- [13] M-J. Green, N. Behabtu, M. Pasquali, W-W. Adams, *Polymer*, 50, 4979, **2009**.
- [14] R.F. Lane and A.T. Hubbard, *J. Phys. Chem.*, 77, 1401, **1973**
- [15] P. R. Moses, L. Wier, R. W. Murray, *Anal. Chem.*, 47, 1882, **1975**.
- [16] C. M. Casado, I. Cuadrado, M. Morán, B. Alonso, B. García, B. González, Losada, *Coord. Chem. Rev.*, 53-80, 185-186, **1999**.
- [17] I. Cuadrado, M. Morán, C. M. Casado, B. Alonso, Losada, *Coord. Chem. Rev.*, 193-195, 395-445, **1999**.
- [18] B. Alonso, M. Moran, C. M. Casado, F. Lobete, J. Losada, I. Cuadrado, *Chem. Mater.*, 7, 1440-1442, **1995**.
- [19] J. Losada, I. Cuadrado, M. Morán, C. M. Casado, B. Alonso, M. Barranco, *Analytica Anal. Chim. Acta*, 338, 191-198, **1997**.
- [20] K. Takada, D. J. Diaz, H. D. Abruna, I. Cuadrado, C. Casado, B. Alonso, M. Moran, J. Losada, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, (44), 10763-10773, **1997**.
- [21] C. M. Casado, I. Cuadrado, B. Alonso, M. Morán, J. Losada, *J. Electroanal. Chem.*, 463, (1), 87-92, **1999**.
- [22] R.W. Murray, Chemically modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, BARD (A.J.) ed, Marcel Dekker, 13, 191, **1983**.
- [23] R.W. Murray, ed. Molecular design of electrode surfaces. *John Wiley & Sons, Inc.*, **1992**.
- [24] J. P. Collman, P. Denisevich, Y. Konai, M. Morocco, C. Koval. F. C. Anson, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 6027, **1980**.
- [25] J. W. Albery, M.J. Eddowes, H.A.O. Hill, A. R. Hillman, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3904, **1981**.
- [26] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 4481-4483, **1983**.
- [27] D. Mandler, I. Turyan, *Electroanal. Rev.*, 8, 207-213, **1996**.
- [28] A. E. Kaifer, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 103, 193-200, **1997**.
- [29] A. E. Kaifer, *Isr. J. Chem.*, 36, 389-397, **1997**.

- [30] A. Walcarius, *Electroanalysis*, 10, 1217-1235, **1998**.
- [31] J. Janata: *Principles of Chemical Sensors*. Springer, **1989**.
- [32] Matsushita Ltd: Quantitative determination of biochemicals with enzyme electrodes. *Brevet n°59217152*, Japon, **1984**.
- [33] C. M. Niemeyer, Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40, 4128-4158, **2001**.
- [34] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A. F. Bückmann, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:10321, **1996**.
- [35] I. Willner, Y. M. Yan, B. Willner, and R. Tel-Vered, *Fuel Cells* 9:7, **2009**.
- [36] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. M. Javier, L. Manna, and W. J. Parak, On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications. *Small*, 1, 48-63, **2005**.
- [37] J. M. Pingarron, P. Yanez-Sedeno, and A. Gonzalez-Cortes, *Electrochim. Acta*, 53, 5848-5866, **2008**.
- [38] S. Qu, F. Huang, G. Chen, S. Yu, J. Kong, *Electrochem commun*, 9, 2812–2816, **2007**.
- [39] M. Bagherzadeh, M. Pirmoradian, F. Riahi. *Electrochim Acta*, 115, 573– 580, **2014**.
- [40] X. Qin, H. Wang, X. Wang, Z. Miao, L. Chen, W. Zhao, M. Shan, Q. Chen. *Sens. Actuators, B*, 147, 593–598, **2010**.
- [41] S.N. Bondi, W.J. Lackey, R.W. Johnson, X. Wang, Z.L. Wang, *Carbon*, 44, 1393, **2006**.
- [42] R.S. Ruo, D. Qian, and W.K. Liu. *C R Phys*, 4, 993, **2003**.
- [43] H. Ra_i-Tabar, *Phys. Rep*, 390, 235, **2004**.
- [44] RH Baughman, AA Zakhidov, WA de Heer. *Science*, 297, 787-792, **2002**.
- [45] C-K. Yang, J. Zhao, J-P. Lu, *Phys. Rev. Lett*, 90, 257203, **2003**.
- [46] A. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1853-1859, **2002**.
- [47] V-N. Khabashesku, W.E. Billups, J.L. Margrave, *Acc. Chem. Res*, 35, 1087, **2002**.
- [48] Z. Gu, H. Peng, R.H. Hauge, R.E. Smalley, J.L. Margrave, *Nano Lett*, 2, 1009, **2002**.
- [49] Y.-L. Zhao, J.F. Stoddart, *Acc. Chem. Res*, 42, 1161, **2009**.
- [50] R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J.Am. Chem. Soc.*, 123, 3838, **2001**.
- [51] M. Antonietta Loi et al., *Adv. Mater*, 22, 1635-1639, **2010**.
- [52] Weiqiang Han et al., *Science*, 277, 5330, 1287-1289, **1997**.
- [53] B.-W. Smith, Marc Monthieux et D-E. Luzzi, *Chem. Phys. Lett*, 315, 31-36, **1999**.
- [54] R.J. Chen, S. Bangsaruntip, K.A. Drouvalakis, N.W.S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, .J. Utz, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 4984, **2003**.
- [55] R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 3830, **2001**.
- [56] O.K. Kim, J. Je, J.W. Baldwin, S. Kooi, P.E. Pehrsson, L.J. Buckley, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4426, **2003**.
- [57] A. Star, D.W. Steuerman, J.R. Heath, J.F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2508, **2002**.
- [58] Jie Liu, Andrew G. Rinzler, Hongjie Dai, Jason H. Hafner, R. Kelley Bradley, "Fullerene Pipes," *Science*, 280, 1253-1256, **1998**.
- [59] M. A. Hamon et al. *Chem. Phys. Lett*, 347, 8-12, **2001**.
- [60] H. Hu et al, *Chem. Phys. Lett*, 345, 25-28, **2001**.
- [61] Jian Chen et al. *J. Phys. Chem. B*, 105, 2525-2528, **2001**.
- [62] Nadir Meini, Conception et réalisation de Biocapteurs Impédimétriques, *Thèse de doctorat*, Université Claude Bernard Lyon 1, 2014.
- [63] C.R Lowe, H. Yon, B.F.Y. Cullen, D.C. Evans, S.E. Stephens, L.D.J. Maynard, *Biosensors, J. Chromatogram*, 510, p. 347-354, **1990**.
- [64] J.E. Frew, L. Hill, H.A.O., *Biosens. Bioelectron*, 59, 15, p.933A-944A, **1987**.
- [65] Borman, S., Biosensors: Potentiometric and Amperometric, *Anal. Chem*, 59, 18, p.1091A-1098A, **1987**,

- [66] C. Dejous, Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. Université Bordeaux 1. p.126, **2005**.
- [67] C. Tran-Minh, J. Beaux, Enzyme Electrodes for Inhibitors Détermination : Urease-Fluoride System, *Anal. Chem*, 51, 1, p.91-95, **1979**.
- [68] S. Kumaran, C. Tran-Minh, Evaluation de la Toxicité des Eaux par Biocapteur, Journées d'Etudes : *Electrochimie et Environnement*, Gif-sur-Yvette, Paris, 17- 18 April **1991**.
- [69] P. Durand, J.M. Nicaud, J. Mallevialle, Detection of Organophosphorous Pesticides with an Immobilized Cholinesterase Electrode, *J. Anal. Toxicol.* 8, 112-117, **1984**.
- [70] C. Tran-Minh, S. Kumaran, Comparative Study of Different Immobilisation Techniques Suitable for Inhibitor determination, *Biosensors '90*, Singapore, May 2-4, **1990**.
- [71] C. Tran-Minh, R. Guyonnet, Capteur Enzymatique pour la Détection et la Dosage en Continu de Substances Toxiques, *CR. Acad. Sc. Paris*, t. 286, Série C, p.357359, **1978**.
- [72] H. El Yamani, Mesure de la Toxicité de Polluants par Biocapteur. Réalisation d'une Electrode à Butyrylcholinestérase. Automatisation de la Détection de Pesticides, *Thèse*, Ecole des Mines de Paris, **1987**.
- [73] C., Tran-Minh, P.C., Pandey, S., Kumaran, Studies on Acetylcholine Sensor and its Analytical Application Based on the Inhibition of Cholinesterase, *Biosensors and Bioelectronics*, 5, 461-471. **1990**,
- [74] C. Tran-Minh, S. Kumaran, Biosensor for the Assessment of Aquatic Toxicity, *Biosensors '90*, Singapore, May 2-4, **1990**.
- [75] P. Taylor, Z. Radic, N. A. Hosca, S. Camp, P. Marchot, H. A. Berman, *Toxicol. Lett.* 82, 453, **1995**.
- [76] E. Giacobini, *Pharmacol.Res*, 50, 433, **2004**.
- [77] P. J. Taylor, *Biol. Chem*, 266, 4025, **1991**.
- [78] D. M. Quinn, *Chem Rev*, 87, 955, **1987**.
- [79] J-P Colletier, Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acétylcholinestérase. *Thèse de doctorat* d'université : Biomolécules. Grenoble : Université Joseph-Fourier. 273, France, **2006**.
- [80] J.-P. ; Colletier, M. Weik, *Ann. pharm. fr*, 65, 108, **2007**.
- [81] M Harry, Greenblatt. Hay Dvir. Israel silman. L Joel. Sussman. acetylcholinesterase. *J. Mol. Neurosci.* 20:369-383, **2003**.
- [82] V Matozzo, A Tomei, M.G Marin, Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 1686–1693, **2005**.
- [83] M. Lotti, Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem*, vol. 41 no. 12 1814-1818, **1995**.
- [84] F. Worek, H.Thiemann, L.Szinicz, P.Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compound and oximes. 68 (11), 2237-2248, **2004**.
- [85] F. Worek, M. Koller, H. Thiermann, L.Szincz, Diagnostic aspects of organophosphate poisoning, *Toxicology*, 214, 182-9, **2005**.
- [86] Y.H Zheng, *J. Food Eng.*, 74, 24–29, **2006**.
- [87] M. Cao, Z. Li, J. Wang, W. Ge, T. Yue, R. Li, V.L. Colvin, W. Yu, *Trends. J. Food Sci. Technol.*, 27, 47–56, **2012**.
- [88] C.R. Ispas, G. Crivat, S. Andreescu, *Anal. Lett*, 45, 168–186, **2012**.
- [89] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, *Anal. Chem. Acta*, 568, 200-210, **2006**.
- [90] S.F D'Souza, *Biosens, Bioelectron*, 16, 337-353, 2001.
- [91] A. Bratov, N. Abramova, J. Munor, C. Domínguez, S. Alegret, J. Bartrolí, *Anal. Chem*, 67, 3589-3595, **1995**.

- [92] K Wan, J.M Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, A.P Soldatkin, *Sens. Actuators, B.*, 58, 399-408, **1999**.
- [93] J.L Besombes, S. Cosnier, P. Labbe, *Talanta*, 44, 2209-2216, **1997**.
- [94] A. Sassolas, L.J Blum, B.D Leca-Bouvier, *Biotech. Adv*, 30, 489–511, **2012**.
- [95] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biological Techniques.*, 37, 790–802, **2004**.
- [96] J. Choi, *Microchem. Acta*, 148, 107-132, **2004**.
- [97] V.I.A. David, R. Walt, The Chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *Trac-Trend Anal Chem.*, 13, 425–430, **1994**.
- [98] A. Walter, J. Wu, G.U. Flechsig, D.A Haake, J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 689, 29-33, **2011**.
- [99] F. Wu, Y. Huang, Q. Li, *Anal. Chim. Acta.*, 536, 107–113, **2005**.
- [100] L. Tao, K. Zhang, Y. Sun, B. Jin, Z. Zhang, K. Yang, *Biosens. Bioelectron*, 35, 186-192, **2012**.
- [101] C. Fillit, N. Jaffrezic-Renault, F. Bessueille, D. Leonard, K. Mitsubayashi, J. Tardy, *Mater. Sci. Eng. C.*, 28, 781–786, **2008**.
- [102] J. Singh, S.K. Mittal, *Sens. Actuators B Chem.*, 165, 48–52, **2012**.
- [103] Y.G Li, Y.X Zhou, J.L. Feng., Z.H Jiang, L.R. Ma, *Anal. Chim. Acta*, 382, 277–282, **1999**.
- [104] K.S Chang, C. Chang, S.F Chou, H.C Han, C.Y Chen, *Sens. Actuators B Chem.* 122, 195-203, **2007**.
- [105] W.H Scouton, J.T Luong., R.S Brown. *Trends Biotechnol*, 13, 178 - 184. **1995**
- [106] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla and D.J. Sutton, *Pmc* 101, 133, **2014**. Doi: 10.1007/978-3-643-8340-4_6.
- [107] De Valk HA, Klaassen CH, Meis JF. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses*. Nov; 51(6):463-76, **2008**.
- [108] B.Volesky, "Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century", *Hydrometallurgy*, **59**, 203-216, **2001**.
- [109] E.T.Thostenson, T-W. Chou. *J. Phys. D J Phys D Appl Phys*, 35, 77-L80, **2002**.
- [110] Sayer. J.A and Gadd. G.M, Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus Niger*, *Mycol. Res*, 101, 653-661, **1997**
- [111] Hildebrandt. U, Regvar. M and Bothe. Arbuscular, mycorrhiza and heavy metal tolerance, *Phytochemistry*, 68, 139-146, **2007**.
- [112] Iyer, A., Mody, K.,Jha, B., Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloaceae*, *Mar. Pollut. Bull.*, 49, **2004**.
- [113] Morillo Pérez, J.A., García-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M., Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2699-2704, **2008**.
- [114] Kazy, S.K., Sar, P., Singh, S.P., Sen, A.K., D'Souza, S.F., Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 583-588, **2002**.
- [115] Gadd. G. M, Interaction of fungi with toxic metals, *New Phytologist*, 124, 25-60, **1993**.
- [116] Pirog. T.P, Role of *Acinetobacter* sp.exopolysaccharidesin protection against heavy metal ions, *Microbiology*, 66, 284-288, **1997**.
- [117] Fleming. H. C. and Wingender. J, Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Sci. Technol.*, 43, 9-16, **2001**.
- [118] Volesky. B, Biosorption and me, *Water Res*, 41, 4017-4029, **2007**.
- [119] Bowman. S. M. and Free. S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall, *Bio Essays*, 28, 799-808, **2006**.

- [120] Smits GJ, van den Ende H, Klis FM. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 14, 781-794, **2001**.
- [121] J.P. Latgé, The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell, *Mol. Microbiology*, 66, 279-290, **2007**.
- [122] Bernard. M. and Latgé. J. P, *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.J.*, 39, 9-17, **2001**.
- [123] Klis .F.M, Mol. P, Hellingwerf. K. and brul. S, Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 239-256, **2002**.
- [124] Wang. J.L. and Chen. C, Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotech Adv*, 27, 195-226, **2009**.
- [125] Wang. J. L and Chen. C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: Areview, *Biotech. Adv*, 24, 427-451, **2006**.
- [126] Brady D. and Duncan J.R. Binding of Heavy Metals by the Cell Walls of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 16 (7) :633-638, **1994**.
- [127] Wang J.L. Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 37: 847-850, **2002**.
- [128] J. Person, D. Lando, D. Mathieu, *Livre turquoise : algues, filières du futur*, **2011**.
- [129] K. BenMustapha, A. Afli, Report of the MedSudMed Expert Consultation on Marine Protected Areas and Fisheries Management. *Med Sud Med Technical Documents*, 32-55, 2007.
- [130] M. D. Guiry, G.M. Guiry, *Algae Base*, **2008**.
- [131] B. de Reviere, *Biologie et phylogénie des algues*, Belin, p 255, **2003**.
- [132] H. S. Stoker, *General, Organic, and Biological Chemistry (Fifth Edition)*, Nelson Education, **2010**.
- [133] W. J. Bauer, R. Badoud, J. Lölliger, A. Etouaud, *Science et technologie des aliments*, *Curr. Opin. Microbiol.* 235-236, **2010**.
- [134] J. Courtois. *Curr. Opin. Microbiol.*, 12, 261-273, **2009**.
- [135] A. Maury, J. Roque, *Biofutur*, 49, 1-17, **1986**.
- [136] T. Nishino, Y. Aizu, T. Nagumo, *Thromb. Res*, 64, 723-731, **1991**.
- [137] M. T. Ale, J.D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Mar. Drugs*, 9(10), 2106-2130, **2011**.
- [138] C.S. Lobban, M.J. Wynne, *The biology of seaweeds* (Vol. 17), University of California Press, **1981**.
- [139] E.C.C. Stanford, *brevet US349, 760*, **1886**.
- [140] N.S. Pawar, K.J. Edgar, *Biomaterials*, 33, 3279-3305, **2012**.
- [141] S.T. Moe, K.I. Draget, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, *Food polysaccharides and their applications* (9), New york: Marcel Dekker, **1995**.
- [142] A. Haug, B. Larsen, *Proceedings of the International Seaweed Symposium*, 5, 271-277, **1966**.
- [143] A. Haug, O. Smidsrød, *Acta Chem. Scand.*24, 843-854, **1970**.
- [144] K. I. Draget, O. Smidsrød, G. Skjåk-Braek. "Alginates from algae. *Biopolymers*, **2005**.
- [145] T. Funami, Y. Fang, S. Noda, S. Ishihara, M. Nakauma, K.I. Draget, G.O. Phillips. *Food Hydrocoll.* 23(7), 1746-1755, **2009**.
- [146] O. Smidsrød, A. Haug, B. Lian, *Acta Chem. Scand.*, 26 : 71-78, **1972**.
- [147] T.R. Cuadros, O. Skurtys, J.M. Aguilera, *Carbohydr. Polym.*, 89(4), 1198-1206, **2012**.
- [148] J.W. Rhim, *LWT- Food Sci. Technol.* 37(3), 323-330, **2004**.
- [149] A.H. King, *Food hydrocoll*, 2, 115-188, **1983**.
- [150] P. Sikarepaisan, U. Ruktanonchai, P. Supaphol, *Carbohydr. Polym*, 83(4), 1457-1469, **2011**.
- [151] B.H.A. Rehm, S. Valla, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 48, 281-288, **1977**.

- [152] K Sargeant, J O'Kelly, R.B.A Carnaghan, R. Allcroft, The essay of a toxic principle in certain groundnut meals, *Vet. Rec.*, 73, 1219-1222, **1961**.
- [153] T Asao, G Büchi, M.M Abdel-kader, S.B Chang, E.L Wick, G.N Wogan, Aflatoxins B and G, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1706, **1963**.
- [154] T. Asao, G Büchi, M.M Abdel-kader, S.B Chang, E.L Wick, G.N Wogan, Structures of aflatoxins B and G1, *J. Am. Chem. Soc.* 87, 822-826, **1965**.
- [155] A Pfohl-Leszkowicz et M Castegnaro, L'Ochratoxine A dans : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risqué, chapitre 9, Lavoisier, *Tec et Doc*, 249-278, Paris, **1999**.
- [156] T. Baydar, A.B Engin, G. Girgin, S. Aydin, and G. sahim, Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey, (*AAEM*) 12, 193-197, **2005**.
- [157] C.Juan, A. Zinedine, J.C.Molto, L. Idrissi, J. Manes, Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Sale' area, Morocco. *Food Control*, 19, 849-853, **2007**.
- [158] L. Reinhold, K. Reinhardt, Mycotoxins in foods in Lower Saxony (Germany): results of official control analyses performed in 2009, *Mycotoxin Res*, 27(2), 137-43, **2011**.
- [159] R.J. Cole, R.H. Cox, Handbook of Toxic Fungal Metabolites, *Academic Press*. 1-66, New York, **1981**.
- [160] J.L. Autrup, J. Schmidt, T. Seremet and H. Autrup, Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin, *Scand. J. Work Environ. Health*, 17, 436-440, **1991**.
- [161] H. Vainio, P. Magee, D. McGregor, A. McMichael, Mechanisms of Carcinogens in Risk Identification, *IARC Sci. Publ.* No 116, IARC, Lyon, **1992**.
- [162] J. Wang.; C. Chen, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: *Biotechnol Adv*, Sep-Oct; 24(5):427-51. Epub 2006, Jun 5, **2006**.
- [163] CO. Akujobi, NN. Odu, SI. Okorundu, Bioaccumulation of lead by *Bacillus* species isolated from pig waste. *J. Res. Bio* 2: 83-9, **2012**.
- [164] P. Li, C. Lin, H. Cheng, X. Duan and K. Lei, *Ecotoxicol Environ Saf*, 113, 391, **2015**. doi:10.1016/j.eco-env.2014.12.025.
- [165] Jung MC, Heavy metal contamination of soil and water in and around the Imcheon Au-Ag mine.Korea. *J. Appl. Geochem.* 16: 1369-75, **2001**.
- [166] I. Kanu and O.K. Achi, Industrial Effluents and Their Impact on Water Quality of Receiving Rivers in Nigeria, *J. Appl. Technol Envir.San*, 1(1), 75-86, **2011**.
- [167] D.C. Adriano, Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metal, *Springer-Verlag*, New York, **2001**.
- [168] M.L. El Hachimi, M. Fekhaoui, A.E. Abidi, A. Rhoujatti, Contamination des sols par les métaux lourds à partir de mines abandonnées : le cas des mines Aouli-Mibladen-Zeïda au Maroc. *Cah Agric* 23: 213-9, **2014**. Doi: 10.1684/agr.2014.0702
- [169] M. Maanan, B. Zourarah, C. Carruesco, A. Aajjane, J. Naud, The distribution of heavy metals in the Sidi Moussa lagoon sediments (Atlantic Moroccan Coast). *J. Afr. Earth Sci.* 39. 473- 483, **2004**.
- [170] G.P. Glasby, P. Szefer, J. Geldon, J. Warzocha, Heavy-metal pollution of sediments from Szczecin Lagoon and the Gdansk Basin, Poland. *Total Environ. SCI*, 330, 249-269 **2004**.
- [171] S. Ghali, Étude de la carbonisation d'un précurseur végétal, les noyaux d'olives. Utilisations dans le traitement des eaux, *Mémoire de Magister*. Université de 20 août SKIKDA, **2008**.
- [172] C. Boucheseiche, E. Crémille, T. Pelte, K. Pojer, *Pollution toxique et écotoxicologie* : Notions de base. Guide technique n°7 du SDAGE Rhône-Méditerranée-Corse, 83p, **2002**.
- [173] Les métaux lourds et leurs effets sur la santé, conférence, l'école polytechnique de Zurich.
- [174] J. Berthelin, P-H. Bourrelrier, Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. *Académie des sciences*. Rappel n°42. Technique et documentation, **1998**.

- [175] Technique de l'ingénieur. Trait 2 génie des procédés, adsorption, aspect théorique, J. 2730-2734.
- [176] D. Claisse. Surveillance du milieu marin « Les métaux lourds dans les sédiments de la baie de Seine». Travaux du RNO ; p 25, **1995**.
- [177] F. Ahmed Chekkat. Utilisation des adjuvants minéraux en traitement des eaux de surfaces usées, *Thèse de magister*, Université d'Annaba, **2002**.
- [178] F. Maou, Utilisation du Cr (VI) et Cr (III) dans les bains de chromage de l'entité (TTS), *Thèse de magister*, Université d'Annaba. **2003**.
- [179] J.Pierre Scharef, R. Perrin, chimie industrielle, 2ème édition, Université d'Annaba. **2003**.
- [180] Hubert Curien encyclopédie universalis : dictionnaire des roches et minéraux. Pétrologie et minéralogie.
- [181] D. W. Fassett, Cadmium, biological effects and occurrence in the environment. *Envir and ind. Toxicol.* Maine, p425- 435, **1975**.
- [182] A. Martin Garin, O. Simon, Cadmium 109 et environnement, fiche radionucléide. Direction de l'environnement et de l'intervention, service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes. *IRSN*, **2004**.
- [183] NAS/NRC, Recommended dietary allowances, National Academy of Science/National Research Council, Washington, **1989**.
- [184] Jr. Hurlbut, et C.Klein, Manual de Mineralogía de Dana. *Editorial Reverté*, Barcelona, pp564, **1982**.
- [185] CNRC, Conseil national de recherches du Canada, les effets de l'arsenic sur l'environnement canadien, CNRC n° 15391, Comité associé du CNRC sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, Ottawa, p 349, **1979**.
- [186] Manuel sur l'environnement Volume III : Catalogue des normes antipollution (GTZ / BMZ,), *Catalogue des normes antipollution*, éd. Vieweg. p 663, **1996**.
- [187] Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Section de l'alimentation et de la nutrition, Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque», Lavoisier, *Tec et Doc*, Paris, **1996**.
- [188] L. Sigg, P. Behra and W. Stumm, Chimie des milieux aquatiques, chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. *3ème édition*, *DUNOD*, Paris, **2000**.
- [189] D. Baize, Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols Références et stratégies d'interprétation, *Eds INRA*, France. Paris, p 408, **1997**.
- [190] B. J. Alloway, The origins of heavy metal in soils. (ed), *Heavy metals in soils*, Blackie, Glasgow, p 29-39, **1990**.
- [191] P. M. Godin, M. H. Feinberg, C. J. Ducauze, Modelling of soil contamination by airborne Lead and Cadmium around several emission sources, *Environ. Pollut.*, 10, 97-114, **1985**.
- [192] A. Martin-Garin, O. Simon, Fiche Radionucléide, Cadmium et environnement. Direction de l'environnement et de l'intervention-Service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes, **2004**
- [193] F. Collin, Pollution localisée des sols et sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, éd. *Tec et Doc*, Paris, **2000**.
- [194] J. M. Haghenoer, D. Furon, Toxicologie et hygiène industrielle, les dérivés minéraux. Tome 1, *1ère partie*, *Tech and Doc*, Paris, **1981**.
- [195] B. Miras-Moreno, L. Almagro, M.A. Pedreño, M.Á. Ferrer, Accumulation and tolerance of cadmium in a no metallicolous ecotypes of *Silene vulgaris* Garcke (Moench), *Ana. Biol*, 36: 55-60, **2014**.
- [196] R.R. Lauwerys, J.P. Buchet, H.A. Roels, J. Brouwers and D. Stanescu, Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. *Arch. Environ. Health*, 28, 145-148, **1974**.

- [197] Y. Suwazono, S. Sand, M. Vahter, A.F. Filipsson, S. Skerfving, J. Lidfeldt and A. Akesson, Benchmark dose for cadmium-induced renal effects in humans. *Environ. Health Perspect*, 114, 7, 1072-1076, **2006**.
- [198] M. Bisson, R. DiderichI, N. Houeix, C. Hulot, G. Lacroix, J.P. Lefevre, S. Leveque, H. Magaud, A. Morin, G. Pepin, A. Pichard, Cadmium et ses dérivés. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. DRC-11-117259-10308A, **2011**.
- [199] J. MacLatchy, Metals Data from Base Metal Smelters and Refineries, *Environnement Canada*, Direction des programmes industriels, Ottawa, **1992**.
- [200] Anonym, Britannica Encyclopedia, Sociedad Commercial Editorial Santiago Ltda, Lima, p 2800, **2007**.
- [201] CCMRE, « Conseil Canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement », Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Préparé par le Groupe de travail sur la qualité de l'eau potable, **1987**.
- [202] D. Cossa, F. Elbaz – Poulichet, M. Gnassia Barrelli, M. Roméo, Le plomb en milieu marin, biogéochimie et écotoxicologie. *Edition Efremer*, Brest, France (3), p 76, **1993**.
- [203] B.H. Mahan, Química. Curso Universitario, Fondo Educativo Interamericano S.A., **1987**.
- [204] J. F. Chiffolleau, D. Claisse, D. Cossa, A. Ficht, G. Gonzalez, T. Guyot, P. Michel, P. Miramand, C. Oger et F. Petit La contamination métallique. Programme scientifique Seine-Aval: 39, **2001**.
- [205] J.O. Nriagu, Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere, *Nature*, 279: 404-411, **1979**.
- [206] J.O.Nriagu, Human influence on the global cycling of trace metals. In: J.D. Farmer (Ed.), Heavy Metals in the Environment. CEP Consultants, Edinburgh, p 1-5, **1991**.
- [207] J.O. Nriagu, A History of Global metal Pollution, *Science*, 272(April): 223-224, **1996**.
- [208] J.E. Fergusson, The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effets, *Oxford Pergamon Press* p 614, **1990**.
- [209] J.M. Bouchereau, Estimation des émissions atmosphériques de métaux lourds en France pour le Cr, le Cu, Le Ni, Le Pb et le Zn, Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), Paris, **1992**.
- [210] BL. Gulson, Lead isotopes in mineral exploration. *Amsterdam. Elsevier*. p. 245, **1986**.
- [211] Callender, E. Heavy Metals in the Environment-Historical Trends. In: Lollar, B.S., Ed., Treatise on Geochemistry, *Environ. Geochem*, US Geological Survey, Westerly, 68-105, **2004**.
- [212] J.D. Hem, Geochemical controls on lead concentrations in stream water and sediments, *GCA*, 40(6): 599-609, **1976**.
- [213] J.O. Nriagu, Lead orthophosphates--IV Formation and stability in the environment, *GCA*, 38(6): 887-898, **1974**.
- [214] W. Stumm, and J.J. Morgan, 1996, Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters, *Wiley Intersci.*, New York.
- [215] B. J. Alloway, Soil processes and the behaviour of metals, In Heavy metals in soils, *Black Academic and Professional*, p 368, **1995**.
- [216] F.A. Bazzaz, G.L. Rolfe, R.W. Carlson, Effect of cadmium on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol. Plant.*, 32, 373377, **1974**.
- [217] Yao Mathieu N'guessan, Dynamique des éléments traces dans les eaux de surface des bassins versants agricoles de Gascogne. *Thèse de Doctorat*, Université de Toulouse, **2008**.
- [218] M. Schuhmacher, S. Granero, M. Bellés, J. M. Llobet, and J. L. Domingo, Levels of metals in soils and vegetation in the vicinity of a municipal solid waste incinerator, *Toxicol. Environ. Chem*. Vol. 56, no. 1-4, p 119-132, **1996**.

- [219] B. Baghdad, M. Naimi, A. Bouabdli, P. Sonnet, A. Garcia-Sanchez, "Evaluation de la contamination et évolution de la qualité des eaux au voisinage d'une mine abandonnée d'extraction de plomb, 12^{ème} Conférence Inter Régionale Enviro. Water, Marrakech, 2009.
- [220] N.F. Angell, J.P. Lavery, The relationship of blood lead levels to obstetric outcome, (*AJOG*) 142: 40, 1982.
- [221] G.S. Plumlee and T.L. Ziegler, The medical geochemistry of dust, soils and other earth materials. In: B.S. Lollar (Ed.), *Environ. Geochem. Treatise on Geochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, pp. 264-310, 2003.
- [222] R.S.Cotran, V Kumar. ; S.L. Robbins, Patologia ambiental, Patologia Estructural y Funcional. Interamericana- *Mc Graw-Hill*, Madrid, p 499-546, 1990.
- [223] R.A Goyer, T.W.Clarkson, Toxic effects of metals. In: D.C. Klassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. *McGraw-Hill*, New York, 811–868, 2001.
- [224] R.A. Goyer, Transplacental transport of lead, *Environ. Health Perspect.*, 89 : p 101-105, 1990.
- [225] G. Miquel, Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, p 366, 2001.
- [226] OCDE, Risk Reduction Monograph No1, Lead background and national experience with reducing risk, 1993.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à la présentation des dispositifs expérimentaux permettant l'étude et la caractérisation des différents biocapteurs développés au cours de cette thèse. Dans un premier temps nous présentons les techniques électrochimiques, telles que la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), la voltammétrie cyclique (VC), la voltammétrie en redissolution anodique à impulsions différentiels (DPASV) et la voltampérométrie à signaux carrés (SWV). Nous présentons par la suite les techniques d'observation des surfaces telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), Spectroscopie de dispersion d'énergie (EDS) et La spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (IRTF) ainsi que les protocoles de fabrication de l'élément sensible biorécepteur et leur mise en œuvre pour le développement des biocapteurs.

II.2. Dispositifs expérimentaux

II.2.1. Appareillage et montage électrochimique

Toutes les mesures électrochimiques telles que la voltammétrie cyclique, la spectroscopie d'impédance et la voltammétrie d'impulsion différentielle sont basées sur le montage expérimental de la **Figure II.1**. Ces expérimentations électrochimiques ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat (Autolab PGSTAT 320N piloté par un micro-ordinateur doté d'un logiciel Nova 1.5, prédestiné pour commander le potentiostat précité et traiter les données.

Ce potentiostat est un dispositif permettant d'appliquer et de contrôler une différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.



Figure II.1. Dispositif de mesure électrochimique

II.2.2. Cellule électrochimique

Pour la plus part des expériences électrochimiques la voltammétrie cyclique, l'impédance électrochimique et la voltammétrie d'impulsion différentielle sont réalisées dans une cellule électrochimique en verre, utilisant un système conventionnel à trois électrodes. La géométrie de cette cellule permet une disposition bien déterminée des trois électrodes. Il est important en effet, afin d'assurer une densité de courant homogène à l'électrode de travail et de minimiser le phénomène de la chute ohmique, de maintenir aussi proche que possible l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire. Toutes les mesures ont été effectuées dans une cage de Faraday sombre.

- Une électrode de travail sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer.
- Une électrode de référence (RE) saturée en Ag/AgCl/KCl, dont le potentiel est constant et connu ce qui permet ainsi de contrôler le potentiel à l'électrode de travail.
- Une électrode auxiliaire appelée aussi contre-électrode en fil de platine, qui permet de boucler le circuit électrique dans la cellule électrochimique.

Les électrodes de travail utilisées pour les expériences électrochimiques sont : le carbone vitreux et l'or.

- ✓ Le carbone vitreux (3mm de diamètre) est le matériau le plus couramment utilisé pour les électrodes d'électroanalyse. Il est disponible dans une variété d'architectures, y compris tiges, disques et plaques. Le carbone constitue un support intéressant comme matériau d'électrode car il est peu coûteux et possède une chimie de surface riche pouvant être exploitée pour influencer sa réactivité [1-2]. De plus, sa large plage de potentiel permet une bonne étude d'un point de vue électrochimique
- ✓ Les électrodes en or de 1 cm² (or 300 nm / titane 30 nm sur substrat de silicium) ont été fabriqués par le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS, Toulouse, membre du réseau français RENATECH) utilisant des technologies de silicium standard. Une couche de résine est déposée sur la surface d'or afin de protéger la surface d'or durant la découpe et le stockage.

II.3. Méthodes électrochimiques utilisées

Pour l'étude de la réponse d'un système électrochimique vis-à-vis d'une perturbation électrique, plusieurs techniques électrochimiques sont disponibles. Dans la suite de cette étude, trois techniques sont utilisées : la voltammétrie cyclique, la spectroscopie d'impédance et la voltammétrie en redissolution anodique avec balayage de potentiel pulsé (DPASV).

II.3.1. Voltammétrie

La voltammétrie est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés tests présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. Elle permet d'identifier et de mesurer quantitativement un grand nombre de composés (cations, certains anions, composés organiques), dont certains simultanément, et également d'étudier les réactions chimiques incluant ces composés [3].

L'analyseur voltammétrique est constitué de plusieurs unités de base (**Figure II.2**), une cellule composée d'un système à trois électrodes immergées dans la solution à analyser et un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant.

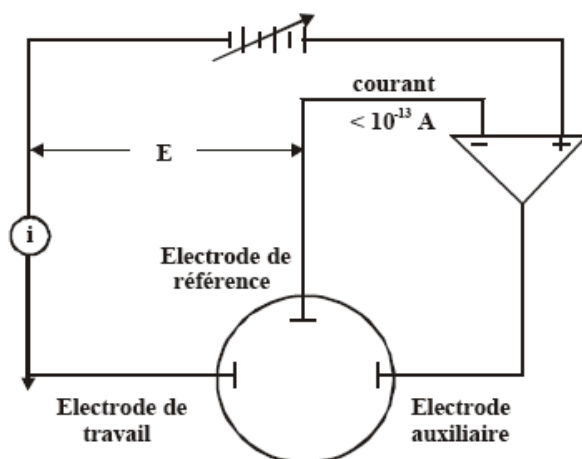


Figure II.2. Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat

En voltammétrie, le potentiel (E) appliqué à l'électrode de travail est varié en fonction du temps (t) et du courant (i) et mesuré en fonction du potentiel (E). Les courbes $i=f(E)$ obtenues sont appelées voltammogrammes. La variation de potentiel (E) peut être linéaire ou modulée,

donnant lieu à des techniques possédant des caractéristiques différentes. Le courant (i) dans le circuit est mesuré soit en continu, soit à des temps précis. Ce courant est principalement la somme de deux courants distincts : le courant faradique i_f et le courant capacitif i_c .

$$i = i_f + i_c$$

Le courant faradique i_f résulte des réactions d'oxydoréduction des éléments à analyser à l'interface électrode/solution et est donc la composante importante pour l'analyse quantitative des composés tests. Le courant faradique peut être influencé par les vitesses de différents processus, en particulier :

- ❖ la vitesse de transfert de masse de l'espèce oxydée électro-active du sein de la solution vers l'électrode (et vice-versa pour une espèce réduite)
- ❖ la vitesse de transfert d'électrons à l'interface électrode/solution
- ❖ la vitesse des réactions chimiques qui précède ou qui suivent le transfert d'électrons.

La vitesse du flux de courant faradique sera déterminée par le processus le plus lent. D'autre part, il est important de considérer les vitesses relatives de ces différents processus par rapport à la vitesse à laquelle le système est perturbé expérimentalement (vitesse de balayage : $E = f(t)$). Ainsi, le courant i est en fonction non seulement du potentiel (E), mais également du temps (t).

Le courant capacitif i_c est dû à la charge du condensateur représenté par l'interface entre la couche de surface de l'électrode et la couche de la solution adjacente. Le courant capacitif dépend de la surface de l'électrode, de la vitesse du changement du potentiel avec le temps, et de la composition du milieu mais non de la concentration du composé analysé.

Les différentes techniques voltammétriques découlent des innovations portant sur la façon dont le signal $E = f(t)$ est imposé et le signal $i = f(E)$ mesuré qui ont été développées dans le but de maximiser le rapport i_f/i_c afin d'augmenter la sensibilité.

II.3.1.1. Voltammétrie cyclique

C'est une des techniques électrochimiques les plus largement utilisées. Elle consiste à réaliser un balayage de potentiel linéaire aller-retour entre deux bornes de potentiel et de mesurer l'intensité du courant d'électrolyse. Son avantage provient de la richesse des informations qualitatives et quantitatives collectées dans une durée de temps courte (cinétique des réactions de transfert électronique hétérogène ou encore des processus d'adsorption).

Les réactions électrochimiques (oxydation ou réduction) sont observées à la surface de l'électrode de travail, ce montage potentiométrique comprend également une électrode de référence et une contre-électrode contrôlé par un potentiostat qui impose le potentiel d'électrode (c'est-à-dire la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence) en faisant circuler un courant entre l'électrode de travail et la contre électrode [4]. L'emploi d'une troisième électrode se justifie par le fait que le passage d'un courant dans l'électrode de référence pourrait l'endommager. La courbe représentant la réponse en courant en fonction du potentiel est appelée voltampérogramme ou voltammogramme. L'allure des voltammogrammes cycliques informe sur les caractéristiques des systèmes étudiés, elle permet de caractériser les espèces présentes au sein de l'électrolyte et surtout d'obtenir des informations sur les espèces réactives à la surface du matériau d'électrode. La **Figure II.3** présente les voltammogrammes cycliques obtenus dans le cas de systèmes rapide réversible, système quasi-rapide (quasi-réversible), système très lent (quasi-irréversible) et système irréversible.

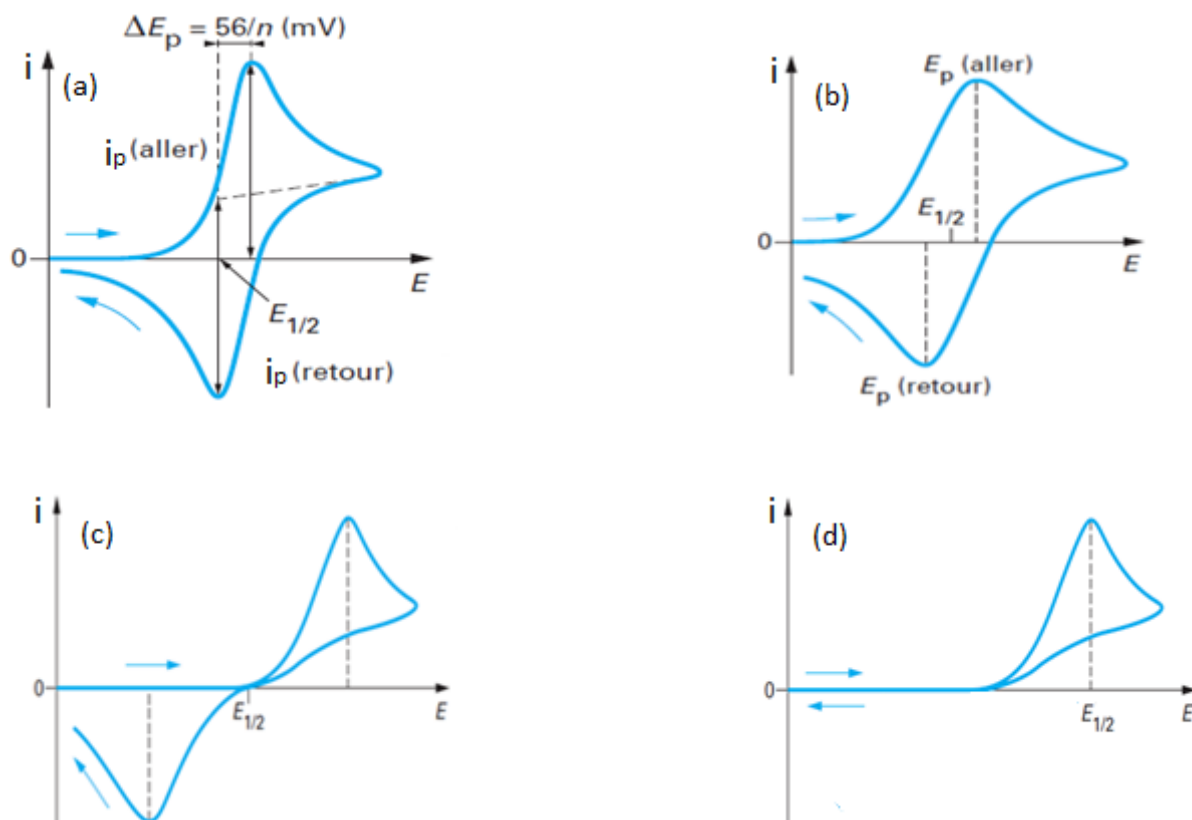


Figure II.3. Allures des voltammogrammes cycliques : (a) système rapide (réversible), (b) système quasi-rapide (quasi-réversible), (c) système très lent (quasi-irréversible) et (d) système irréversible

II.3.1.1.1. Système réversible (Système rapide)

Par la réversibilité électrochimique, le transfert d'électrons entre l'électrode et le substrat doit être rapide pour pouvoir maintenir la concentration des espèces oxydés et réduites en équilibre, le rapport des concentrations interfaciales en oxydant et en réducteur est donné par la loi de *Nernst*. En contraste, la réversibilité chimique implique qu'un composé peut à la fois être quantitativement oxydé, et le produit peut encore être quantitativement réduit pour avoir le matériau d'origine, mais il n'y a pas de limitation sur la façon dont cela doit se produire. En utilisant la voltammétrie cyclique on peut deviner si un système est électro chimiquement réversible ou pas. L'équation de *Randles-Sevcik* (**Eq(II.1)**) montre que les mesures de courant des systèmes électro chimiquement réversibles sont liées aux coefficients de diffusion (D). Si la relation entre le courant I_p et la racine carrée de la vitesse de balayage ($V.s^{-1}$) est linéaire, alors l'espèce électro-active est plutôt en solution qu'à la surface. Le diagnostic $\Delta E = 59$ mV pour un processus électrochimique de transfert d'électrons réversible est souvent difficile à réaliser. Ainsi, fréquemment les valeurs de ΔE sont de 90 mV pour les processus électrochimiques parfaitement réversibles. Dans ces cas, une relation linéaire entre I_p et $v^{1/2}$ est plus commode pour démontrer la réversibilité électrochimique que les valeurs de ΔE . La relation de *Randles-Sevcik*, pour un système réversible s'exprime par :

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) S \cdot n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} C_{Sol} \quad (\text{Eq II.1})$$

En outre, les potentiels des pics en oxydation et en réduction E_{pa} et E_{pc} permettent de déterminer le potentiel standard apparent :

$$E^\circ = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (\text{Eq II.2})$$

Cette différence de potentiel de pic permet d'évaluer le nombre d'électrons échangés :

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} \text{ (mV)} \quad (\text{Eq II.3})$$

II.3.1.1.2. Système quasi-réversible (système quasi-rapide)

$$\frac{\Delta E}{n} > 59 \text{ mV}$$

La valeur de ΔE est supérieure à celle d'un système réversible, les pics de courant sont plus séparés (**Figure II.3.b**).

II.3.1.1.3. Système irréversible (système lent)

La différence de potentiel est plus grande que celle d'un système quasi-réversible, on dit que c'est un système lent (**Figure II.3d**).

II.3.1.2. Voltammétrie en redissolution anodique à impulsions différentielle (DPASV)

La voltammétrie en redissolution anodique avec balayage de potentiel pulsé (Differential pulse anodic stripping voltammetry) est une technique souvent utilisée pour la détermination des métaux lourds à l'état de traces dans l'eau. Elle permet d'accéder à de très faibles concentrations métalliques et d'évaluer des capacités de complexation dans différents matrices. Elle offre des avantages certains comme une haute sensibilité, une simplicité à réaliser, une reproductibilité et un coût peu onéreux [5]. Le principal avantage de la DPASV est sa spécificité, il est en effet possible d'effectuer simultanément des mesures de concentration de plusieurs métaux ainsi que les espèces à partir de la même solution [6-7]. Cette technique permette un accroissement substantiel du courant faradique (if) tout en maintenant le courant capacitif (ic) à des valeurs comparables aux autres techniques. Ceci est obtenu par une mesure effectuée en trois étapes (**Figure II.4**).

II.3.1.2.1. Étape de préparation des électrodes à film métalliques

L'électrodéposition des ions (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}) sur la surface de l'électrode à partir d'une solution métalliques (mg/l) sous l'application d'un potentiel constant pendant un temps fixe (1-5 min).

II.3.1.2.2. Étape de Préconcentration du métal à déterminer

Durant la deuxième étape, un potentiel suffisamment négatif est appliqué pour permettre la réduction et la préconcentration des ions du métal Mn^+ en surface ou à l'intérieur, dans le cas des composés formant un amalgame avec une électrode de travail. Cette étape peut durer plusieurs minutes sous agitation L'électrolyse est conditionnée par non seulement le contrôle du potentiel mais également par l'aire de l'électrode, la durée de l'électrodéposition et la vitesse d'agitation.

II.3.1.2.3. Étape de redissolution

La troisième étape est une phase d'équilibre. L'agitation est ensuite arrêtée et la solution est laissée à l'équilibre de manière à ce que le métal se répartît de manière homogène sur la surface de l'électrode. Le transfert de masse passe peu à peu d'un régime de convection à un régime de diffusion pure. Après un court temps d'attente (typiquement 30s), permettant l'élimination de toute convection en solution, les composés sont ré-oxydés par balayage pulsé du potentiel vers des valeurs plus positives [8]. Ce balayage provoque l'apparition d'un signal de courant caractéristique du métal préconcentré.

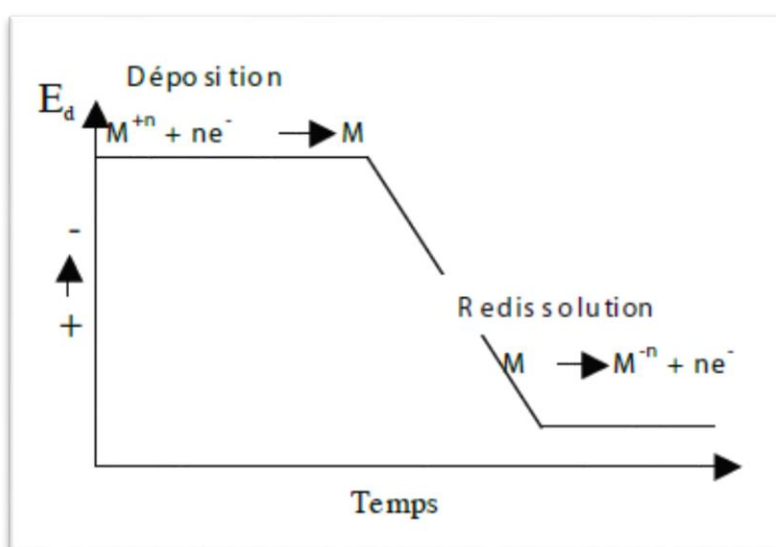


Figure II.4. Les étapes de voltammétrie à redissolution anodique

Lorsque le potentiel de l'électrode de travail atteint une valeur telle que l'espèce présente dans la solution étudiée est oxydée, l'intensité croît brusquement. La représentation graphique du courant résultant (nA) en fonction du voltage appliqué (mV) donne une courbe intensité-potentiel ($i = f(E)$) en forme de pic dont la hauteur, par rapport à l'axe du courant, est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution. La hauteur maximale du pic correspond à un voltage (Potentiel de pic : E_p) qui est caractéristique du composé dans un milieu donné (E_p proche du $E_{1/2}$ (potentiel de demi-vague)).

Cette technique permet donc une analyse à la fois qualitative et quantitative des éléments dosés et la précision est de l'ordre de 1 à 2%. Des concentrations très faibles peuvent être déterminées en augmentant le temps de pré électrolyse. Les limites de détection sont de l'ordre

de 10^{-8}M à 10^{-9}M , ce qui fait de cette méthode d'analyse de traces l'une des plus performantes [9].

II.3.1.3. Voltampérométrie à ondes carrées (Square Wave Voltametry) (SWV)

La voltammétrie à ondes carrées (Square Wave Voltametry) est une technique où le potentiel est appliqué par impulsions. La base de cette technique est la différence entre le taux de décroissance de la charge et le courant faradique qui suit l'étape du potentiel ou impulsion. Le courant de charge décroît de façon exponentielle, considérant que le courant faradique décroît en fonction de $1/t^{1/2}$. Ceci veut dire que le taux de décroissance du courant de charge est considérablement plus rapide que la décroissance du courant faradique. Comme montré à la **Figure II.5**, les impulsions de potentiel sont en forme d'ondes carrées. Ceci consiste en une succession d'ondes en forme de carré d'une amplitude constante superposé en forme d'échelon. Le courant est mesuré à la fin de chaque demi-cycle d'aller. La différence entre les deux courants ($I_1 - I_2$) est mise en graphique en fonction du potentiel appliqué [10].

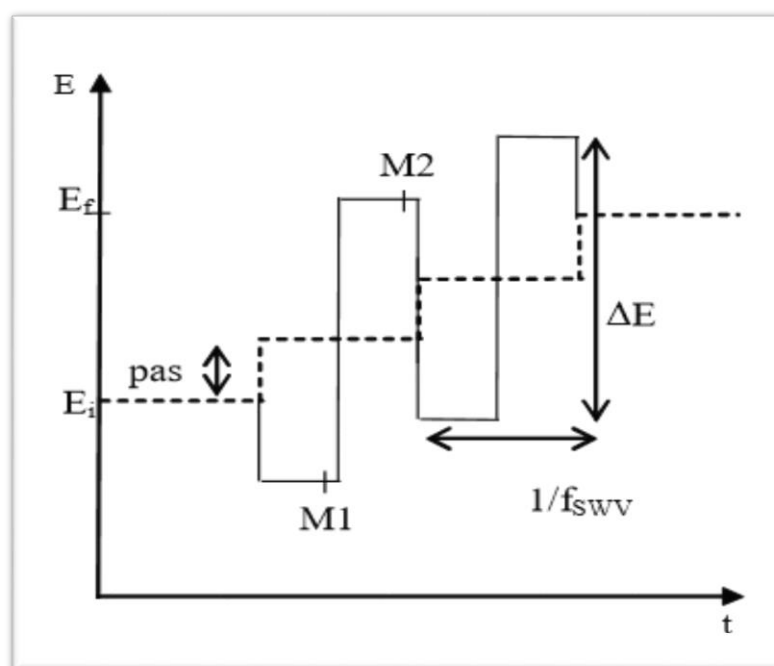


Figure II.5. Principe d'une mesure par voltampérométrie à signaux carrés (SWV)

Avec : Point M_1 , courant I_1 , Point M_2 , courant I_2 et $I = I_1 - I_2$

Pour cette technique, il y a deux grands avantages à mesurer la différence de potentiel. Le premier est la différenciation du courant de charge et la deuxième est l'allure du pic qui est plus symétrique. De plus, comme la différence de courant est mesurée à un potentiel donné et un potentiel un peu plus bas tout de suite après, il est possible d'observer des systèmes réversibles à la surface de l'électrode car les espèces produites n'ont pas le temps de diffuser dans la solution. Il est ainsi possible de distinguer des processus réversibles qui sont trop rapides pour être vus en voltampérométrie cyclique normale.

II.3.2. Spectroscopie d'impédance

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques interfaciales de n'importe quel matériau solide ou liquide connecté à un transducteur électrochimique. Cette méthode a été introduite en 1960 par *Sluyters* [11], elle permet de séparer les contributions des différents phénomènes chimiques et électrochimiques à l'interface métal-solution [12].

II.3.2.1. Principe de la spectroscopie d'impédance

La mesure d'impédance d'un système électrochimique s'effectue en appliquant au système une contrainte sous la forme d'une variation sinusoïdale de différence de potentiel électrique, de fréquence $f = \omega/2\pi$. Pour l'étude du comportement d'un système électrochimique à une électrode indicatrice donnée, cette différence de potentiel étant imposée entre l'électrode de travail et une électrode de référence (potentiel supposé fixe), la contrainte revient à surimposer une variation sinusoïdale $\Delta E(t)$ du potentiel de l'électrode de travail à une valeur fixe E (généralement E^0 est choisie de façon à avoir un courant nul) dans la cellule électrochimique. La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode voltampérométrique qui se distingue des autres méthodes [13] en deux points :

- ❖ L'impédance consiste à superposer au potentiel de l'électrode une tension sinusoïdale de faible amplitude (quelques mV).

$$E_t = E^0 + \Delta E \sin \omega t \quad (\text{Eq II.4})$$

- ❖ L'analyse de la réponse du courant (I_t) se fait en fonction de la fréquence f .

$$I_t = I^0 + \Delta I \sin(\omega t - \pi\varphi) \quad (\text{Eq II.5})$$

L'application des mesures d'impédance nécessite l'utilisation d'excitation de type alternatif (sinusoïdal) (**Figure II.6**). Une tension uniquement sinusoïdale s'exprime par la formule suivante :

$$E_t = E \sin \omega t \quad (\text{Eq II.6})$$

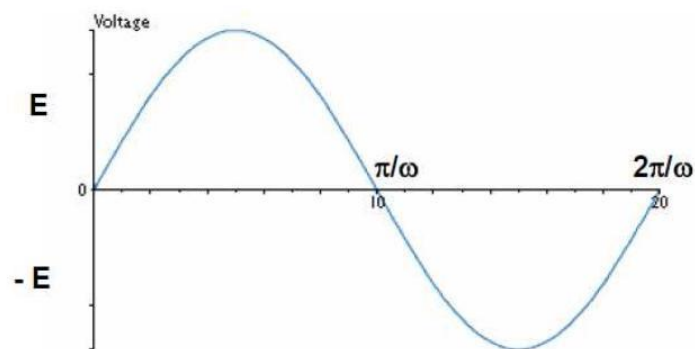


Figure II.6. Diagramme de phase pour une tension alternative

Le courant sinusoïdal s'exprime généralement comme :

$$I_t = I \sin(\omega t + \varphi) \quad (\text{Eq II.7})$$

La spectroscopie d'impédance comporte de nombreux avantages. Les plus importants sont :

- ✓ Une habilité expérimentale à faire des mesures d'une grande précision ;
- ✓ Une capacité à traiter les réponses théoriques avec des caractéristiques de courant potentiel linéaire ;
- ✓ Une large gamme de fréquences [14].

II.3.2.2. Représentation graphique de l'impédance

La spectroscopie d'impédance électrochimique permet de différencier les différents phénomènes qui peuvent avoir lieu dans une cellule électrochimique en fonction de la

fréquence. Ainsi, les phénomènes rapides tels que les transferts d'électrons se produisent à hautes fréquences, tandis que les phénomènes lents comme les transferts de masses et la diffusion se réalisent à basses fréquences (**Figure II.7**).

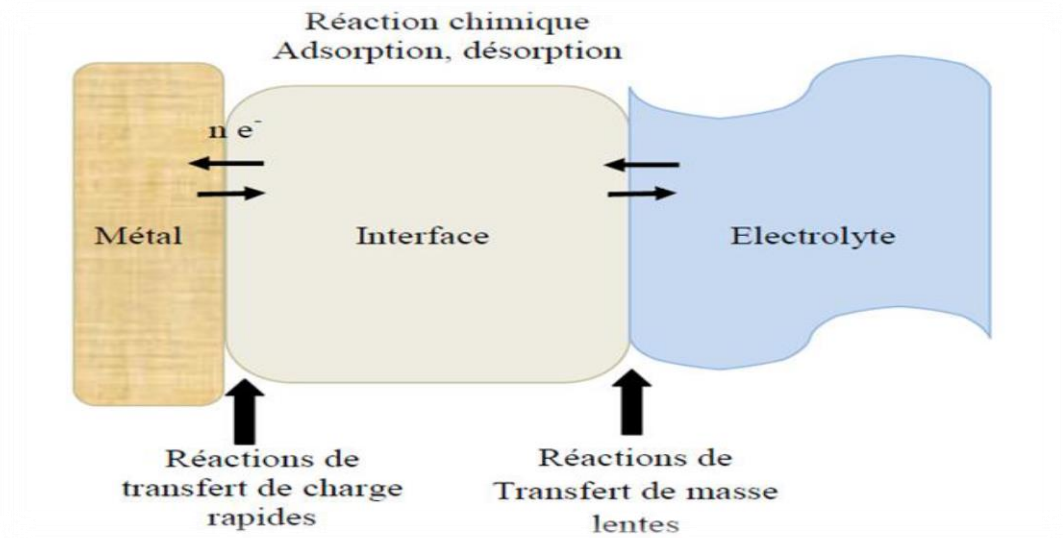


Figure II.7. Différents processus électrochimiques à l'interface métal/électrolyte

Les données d'impédance sont représentées suivant deux types de diagrammes : le diagramme de Bode et le diagramme de Nyquist.

II.3.2.2.1. Diagramme de Bode

Dans le diagramme de Bode, le logarithme du module $|Z(\omega)|$ et le déphasage φ de l'impédance sont tracés en fonction du logarithme de la fréquence.

$$\log \overline{|(\omega)|} = (\log f) \quad (\text{Eq II.8})$$

$$\varphi = (\log f) \quad (\text{Eq II.9})$$

Le diagramme de Bode peut être schématisé par deux droites qui se coupent à la valeur angulaire $1/RC$ (**Figure II.8**)

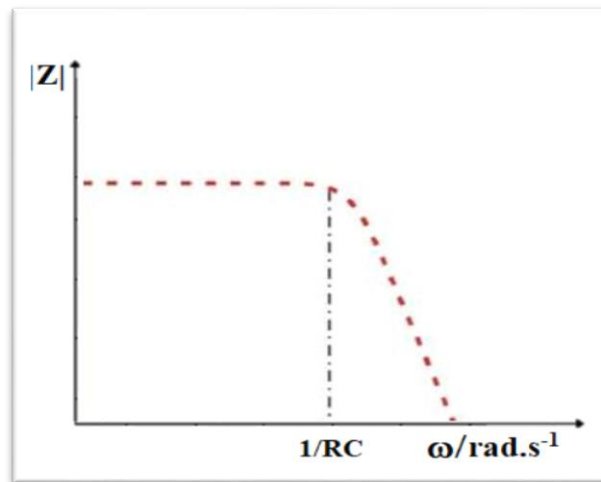


Figure II.8. Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle

II.3.2.2.2. Diagramme de Nyquist

Le diagramme de Nyquist, est une représentation graphique dans le plan complexe, l'axe des abscisses d'un système de coordonnées cartésiennes correspond à la partie réelle de l'impédance $Z(\omega)$, alors que l'axe des ordonnées correspond à sa partie imaginaire. Cette dernière représentation ne fournit qu'une seule courbe, le diagramme de Nyquist de l'impédance est donc un demi-cercle dont la vitesse angulaire au sommet correspond à l'inverse de RC. A basse fréquence, l'impédance tend vers le point $Z_R = R$, et à haute fréquence l'impédance tend vers l'origine (Figure II.9) [15].

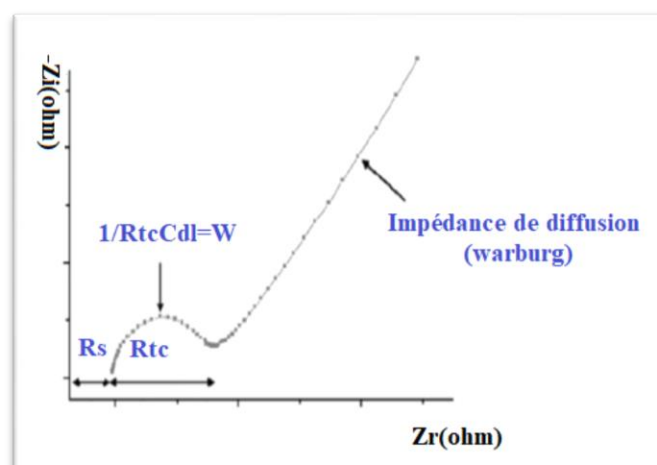


Figure II.9. Diagramme de Nyquist

Les spectres d'impédance obtenus pour n'importe quelle interface, peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent. Les paramètres du modèle peuvent être obtenus en ajustant la courbe expérimentale avec la courbe théorique.

II.3.2.2.3. Circuit électrique équivalent : Circuit de Randles

Les spectres d'impédance obtenus pour n'importe quelle interface, peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent. Les paramètres du modèle peuvent être obtenus en ajustant la courbe expérimentale avec la courbe théorique. Prenons comme exemple le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé pour les systèmes électrochimiques, le circuit de Randles [16]. Il se compose généralement de quatre éléments : une résistance représentant la résistance due à la chute ohmique R_s , un condensateur représentant la capacité de la double couche C_{dc} , une résistance de transfert de charge R_{tc} , et l'impédance de Warburg Z_w , représentant le phénomène de diffusion des espèces redox. La forme générale du circuit équivalent est présentée sur la **Figure II.10**.

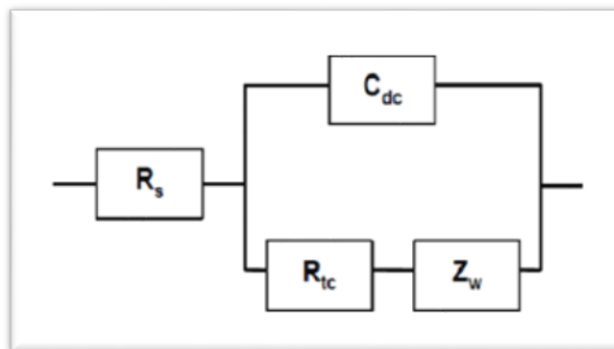


Figure II.10. Circuit électrique de Randles

II.3.2.3. Impédance de différents phénomènes électrochimiques

La spectroscopie d'impédance électrochimique permet d'étudier les paramètres électriques de l'interface métal/électrolyte. Le système électrochimique utilisé est une cellule à trois électrodes : une électrode indicatrice, une électrode de référence et une électrode auxiliaires.

II.3.2.3.1. Résistance de transfert de charge

La résistance de transfert de charge est due à un processus faradique, qui est défini par les transferts d'électrons à travers l'interface électrode de travail/solution. Ce transfert électronique provoque une réaction d'oxydation ou de réduction d'espèces à la surface de l'électrode. Au potentiel d'équilibre la résistance de transfert de charge s'écrit :

$$RTc = \frac{RT}{nF I_0} \quad (\text{Eq II.10})$$

I_0 : Densité de courant d'échange au potentiel d'équilibre , (c'est-à-dire le potentiel auquel la vitesse de diffusion de l'espèce réduite est égal à la vitesse de diffusion de l'espèce oxydée) qui est reliée directement à la constante cinétique de transfert d'électron K^0 selon la relation suivante :

$$I_0 = n F A C_0 K^0 \quad (\text{Eq II.11})$$

II.3.2.3.2. Résistance de la solution R_s

Du côté de l'électrode, le potentiel est constant en tout point de la surface. Par contre, dans la solution, il se crée une variation de potentiel et de courant dans l'électrolyte, qui conduit au concept de chute ohmique. En SIE (à définir), l'électrode de référence et la contre-électrode sont placées relativement loin de la surface de l'électrode de travail. A haute fréquence, la répartition des courants secondaires peut donc être négligée. La chute ohmique est alors classiquement décrite comme étant la résistance de la solution et des contacts électriques R_s . L'impédance de la chute ohmique est :

$$R_s = \rho \frac{L}{S} \quad (\text{Eq II.12})$$

II.3.2.3.3. Capacité de la double couche

Un phénomène observé à l'interface électrode/électrolyte est la formation d'une double couche d'ions. L'application d'une perturbation sinusoïdale lors de la mesure d'impédance

entraîne la charge et la décharge de cette couche qui se comporte, selon le modèle de Stern, comme un condensateur électrique.

A un potentiel donné l'interface électrode/solution est caractérisé par une capacité de double couche C_{dl} :

$$C_{dc} = \epsilon \epsilon_0 \frac{A}{E} \quad (Eq II.13)$$

Le côté de la double couche situé dans la solution est constitué de plusieurs couches. Celle qui est le plus proche de l'électrode est appelée couche d'Helmholtz. Elle contient les molécules de solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbées. Le lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH), situé à une distance x_1 de l'électrode. Les ions solvatés ne peuvent s'approcher du métal qu'à une distance au plus égale à x_2 ; le lieu des centres des ions solvatés est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des cations solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH au sein de la solution (**Figure II.11**) [17-18].

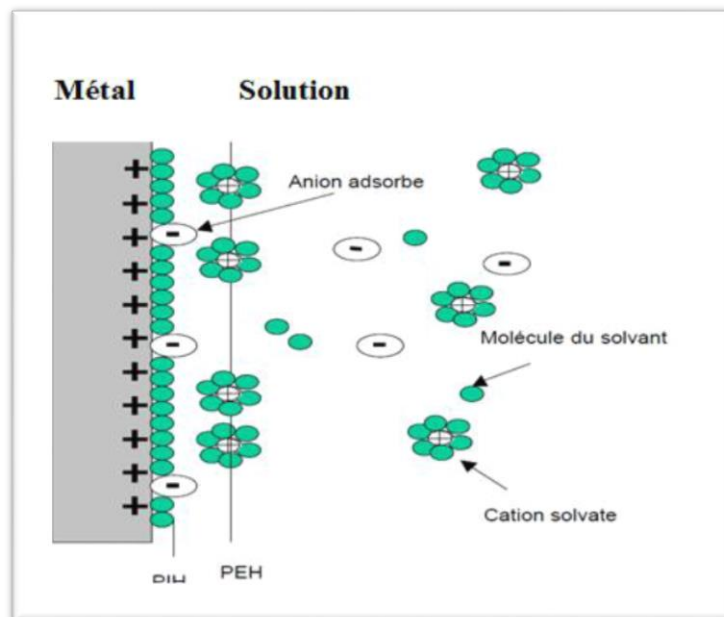


Figure II.11. Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution

II.3.2.3.4. Impédance de Warburg

L'impédance de Warburg est l'impédance résultant de la diffusion d'une espèce de la solution à l'électrode. C'est le premier élément électrochimique qui a été présenté dans la description de l'impédance de la diffusion semi-infinie. Cette impédance dépend de la fréquence de la perturbation, du potentiel appliqué et de la concentration des espèces qui diffusent. L'expression de l'impédance de Warburg est donnée par l'expression suivante [19]

$$Z_w = \sigma (1 - j \omega^{-0,5}) \quad (\text{Eq II.14})$$

II.4. Techniques d'analyse de surface

II.4.1. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

La Microscopie Electronique à Balayage est fondée sur les interactions électrons-matière. Elle permet l'obtention des images de hautes résolutions de la surface de l'échantillon avec des profondeurs de champs supérieures à la microscopie optique.



Figure II.12. MEB EVO MA 25

L'EVO MA 25 (**Figure II.12**) est le MEB de choix pour les utilisateurs manipulant les échantillons les plus gros et les plus lourds. Avec une chambre plus haute capable de traiter des échantillons de plus de 200 mm de hauteur, avec des mouvements plus importants sur la scène motorisée à 5 axes. L'EVO est un outil souple pour l'imagerie et l'analyse haute définition fournissant une information rapide, des résultats précis et reproductibles sur tous les échantillons.

II.4.1.1. Principe de fonctionnement

Les principaux éléments composant un Microscope Electronique à Balayage sont : une source d'électrons (canon) et un dispositif de haute tension, une colonne maintenue sous un vide secondaire, un ensemble de lentilles électroniques permettant l'obtention d'un fin faisceau, une platine permettant d'installer les échantillons, un détecteur d'électrons couplé à un amplificateur de signal et enfin un système de visualisation des images. Le fonctionnement du MEB est présenté dans la **Figure II.13**.

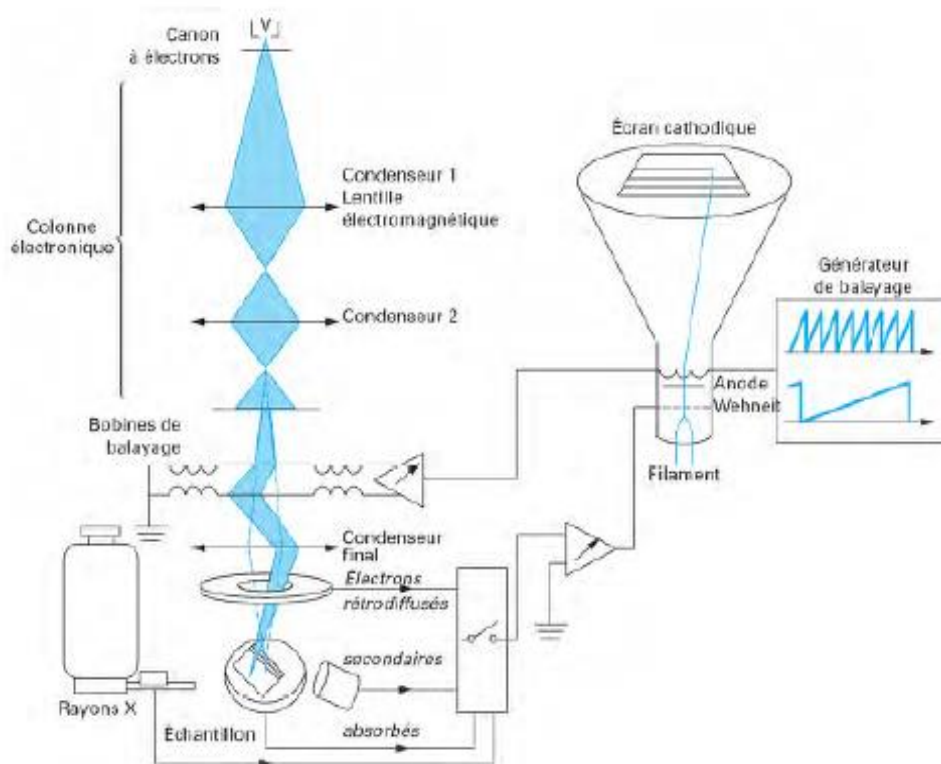


Figure II.13. Schéma du montage du microscope électronique à balayage

Deux principes sont utilisés pour extraire les électrons : l'émission thermoïonique et l'émission par effet de champ. La première correspond à la technologie utilisée dans les microscopes à balayage traditionnels : la source des électrons est un filament de tungstène ou d'hexaborure de Lanthane (LaB6), chauffé par effet Joule. L'émission par effet de champ correspond à la technologie utilisée dans un MEB-FEG (acronyme anglais de *Field Emission Gun*). Dans ce dernier cas, il y a utilisation d'une cathode métallique très pointue. L'application d'une tension entre cette cathode et l'anode permet d'obtenir un champ électrique très intense grâce à un effet de pointe. Cette différence de technologie présente trois principaux avantages. Le MEB-FEG possède une plus grande stabilité lors de l'observation et une meilleure brillance (efficacité d'une source électronique). Sa source d'électrons a une durée de vie plus importante que celle du MEB.

II.4.2. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX)

Durant une expérience MEB, le faisceau incident induit différentes interactions avec l'échantillon. Les électrons transmis à travers l'échantillon produisent les images MEB. Le microscope utilisé pour les expériences MEB est équipé d'un spectromètre qui permet de détecter les photons X (EDX) émis pendant les mesures. L'analyse EDX couplée au MEB permet l'identification des éléments chimiques de la zone de l'échantillon ciblée par le faisceau, aboutissant à une caractérisation de la composition de certains matériaux pluri métalliques.

II.4.3. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est utilisée depuis une centaine d'année pour identifier et quantifier les différents composés présents dans l'atmosphère [20]. De nos jours, la spectroscopie d'absorption infrarouge est considérée comme une méthode analytique très puissante car elle permet d'identifier un grand nombre d'espèces chimiques de façon non compliquée car tous les composés chimiques, sauf les atomes et les molécules diatomiques symétriques, possèdent un spectre vibrationnel qui leur est propre.

En raison de sa spécificité, l'infrarouge a été souvent employé comme une « norme » pour les études d'inter-comparaison des différentes mesures [21]. La majorité des mesures s'effectue dans l'infrarouge moyen car il s'agit de la zone où il est plus facile d'identifier la majorité des composés organiques. Le développement de la spectrométrie infrarouge à

transformée de fourier (IRTF) au début des années 70 a permis d'améliorer considérablement la détection des espèces traces organiques. Cette technique présente de nombreux avantages par rapport aux premiers spectromètres infrarouges, les spectromètres dispersifs (balayage du spectre longueur d'onde par longueur d'onde). D'autre part à temps d'échantillonnage T égal, le rapport signal-sur-bruit est nettement meilleur qu'avec un spectromètre dispersif. L'IRTF permet de gagner considérablement en résolution avec une perte d'énergie minimale et pratiquement sans perte de sensibilité.

De plus, les spectres obtenus par IRTF sont extrêmement précis en longueurs d'onde. Tous les avantages de l'IRTF et son principe, qui repose sur l'utilisation d'un interféromètre de Michelson. Expérimentalement, cette méthode offre une sensibilité élevée de détection, une excellente sélectivité, une détection in situ, une grande rapidité d'acquisition et une possibilité d'analyser des mélanges gazeux complexes (jusqu'à plusieurs dizaines de composants).

II.5. Méthodes et conditions expérimentales

II.5.1. Produits chimiques et réactifs

Trichoderma Asperellum, le micro-organisme de détection a été sélectionné à partir de sols contaminés par des métaux, fourni par le laboratoire UMR 5240 équipe pathogénies des champignons nécro trophées CNRS/Université LYON 1/Bayer Crop Science. Tous les autres réactifs de qualité analytique, y compris l'hexacyanoferrate de potassium (II) trihydraté $K_4 [Fe (CN)_6] \cdot 3H_2O$, l'hexacyanoferrate de potassium (III) ($K_3 [Fe (CN)_6]$), le chlorure de potassium (KCl), l'acide acétique (CH_3COOH), l'acétate de sodium (CH_3COONa), le nitrate de plomb (II) ($Pb (NO_3)_2$), le sulfate de cadmium (II) ($CdSO_4$) ont été obtenus auprès de Fluka Chemika. Glutaraldéhyde (GAD, solution aqueuse à 25%, v/v), acétylcholinestérase (C 3389-500UN), aflatoxine B1, Ochratoxine A, aflatoxine M1, chlorure d'acéthylthiocholine (ATCh), glycérol, sérum bovin et albumine de sodium (à partir d'algue brune), viscosité ≥ 2000 CP, 2% (25°C (lit.)) Ont été achetés auprès de sigma Aldrich. L'aflatoxine B1 a été dissoute dans de l'éthanol (1 mM). Les produits biologiques et chimiques utilisés pour la réalisation de ces travaux ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich et utilisés sans autre purification.

II.5.2. Elaboration D'un Biocapteur ECV/SWCNTs-CO/Biomasse

II.5.2.1. Protocole de préparation de la biomasse

Le champignon sélectionné (*Trichoderma asperellum*) a été maintenu en culture sur milieu PDA à 25°C et cultivé sur milieu de sporulation à 22°C [22]. Les spores ont été collectées en grattant le mycélium avec un étaloir et de l'eau additionnée de tween (0,1% v/v) stérile, elles ont ensuite été filtrées sur laine de verre, Les spores conservées à -80 °C sont préparées dans une solution eau-glycérol stérile (concentration finale 20% v/v glycérol). A partir de ces cultures sur milieu gélosé, une solution de conidies a été réalisée dans une solution tween (0,01% v/v) puis inoculées dans un milieu de culture liquide (milieu SP) a raison de 10⁵ conidies/ml en agitation continue à 250 rpm à 22°C. Le temps de culture dépend du champignon testé, est de cinq jours, Le mycélium est filtré sur toile à bluter et rincé deux fois pendant 30 minutes avec de l'eau distillée stérile. Le traitement appliqué au mycélium autoclavage à 110°C pendant 30 minutes suivi d'un séchage à 60°C pendant 24h, puis séchage à l'air libre sous hotte. La quantité de biomasse sèche a été déterminée par séchage à 60°C pendant 24 h. Le mycélium autoclavé est séché (sous la hotte ou à 60°C) ensuite broyé à l'aide d'un broyeur à billes (Braun BioTech) à 2000 rpm pendant 2 minutes pour obtenir une poudre homogène.

II.5.2.2. Nettoyage de la surface de l'électrode de carbone vitreux

Il est important de noter qu'avant chaque utilisation, un nettoyage minutieux préalable est nécessaire. La surface du carbone vitreux (CV) a d'abord été polie avec une solution d'alumine 0,05µm et lavée soigneusement avec une solution d'éthanol dans un bain à ultrason pendant 15 minutes, puis rincée dans l'eau distillée et séchée sous un flux d'azote (N₂). L'étape la plus importante pour la construction d'une électrode modifiée est la fonctionnalisation du transducteur. Dans ce contexte, nous présentons un système de capteur impédimétrique qui consiste à immobiliser un mélange de (SWCNTs-COOH) et de biomasse fongique sur la surface du carbone vitreux. Cette étape clé se manifeste par le dépôt chimique simple avec une micropipette à température ambiante sur la surface de carbone vitreux.

II.5.2.3. Dépôt de (SWCNTs-CO/Biomasse) sur l'électrode de carbone vitreux

La suspension (SWCNTs-CO/Biomasse) a été préparée comme suit : Tout d'abord, 1mg de (SWCNTs-COOH) a été dispersé dans 1 ml d'eau suivie d'une agitation et sonication pendant quelques secondes. Ensuite, 1 ml de la solution ci-dessus a été utilisé pour dissoudre 10 mg de biomasse qui ont été agités et soumis à une sonication pendant 1 heure pour former une suspension homogène. Pour les études électrochimiques, 10 μ l de la suspension (SWCNTs-CO/Biomasse) ont été déposés sur ECV et laissés séchés à température ambiante pendant 30 minutes. Cette électrode modifiée est dénommée (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse). La surface modifiée a été séchée à température ambiante pendant une nuit. Une bonne adhérence du film (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) à la surface d'ECV a été obtenue. La haute stabilité de l'interface (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse/ électrolyte) peut être attribuée à la forte adhérence de la membrane (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) sur la surface du carbone. En effet, les liaisons présentes dans (SWCNTs-COOH) interagissent avec la surface du carbone par des liaisons covalentes (C-C).

II.5.3. Elaboration d'un biocapteur Or/ AS /AChE

II.5.3.1. Extraction et identification des polysaccharides issus des algues brunes

II.5.3.1.1. Récolte de la matière algale

Les algues brunes *Cystoseira Compressa*, *Cystoseira sedoides*, et *Cystoseira crinita*, (*C.compressa*, *C.sedoides*, *C.crinita*), sont recueillies de différentes régions côtières de l'Algérie à une profondeur de 1 à 3 mètres. Les espèces sont identifiées et authentifiées par M. Rafik Ben Said de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (Salambôo, Tunisie). Après la collecte, les algues sont rincées dans l'eau douce pour éliminer les débris associés et les épiphytes. Elles sont ensuite séchées à l'abri de la lumière, pour garder intactes leurs propriétés pharmacologiques. Un séchage lent avec une insolation importante conduit à l'obtention de substances peu actives et instables. Après séchage complet, les algues ont été broyées et conservées à -20°C.

II.5.3.1.2. Extracteur Soxhlet

L'extraction au Soxhlet est une extraction solide-liquide. Cet appareil permet à un solide d'être extrait de façon continue à l'aide d'un solvant. L'échantillon solide est placé dans une cartouche en papier filtre. Ensuite, le solvant distillé du ballon à fond rond est ré-condensé par le réfrigérant et s'accumule graduellement dans la partie contenant la cartouche (échantillon). Cette partie du Soxhlet se remplit jusqu'à ce que le niveau du solvant distillé soit égal au niveau supérieur du siphon. À ce moment, le solvant est vidangé dans le ballon où les composés extraits sont concentrés. Ce processus s'effectue de façon cyclique jusqu'à ce que l'extraction soit complète. La (Figure II.14) présente les différentes parties d'un extracteur Soxhlet.

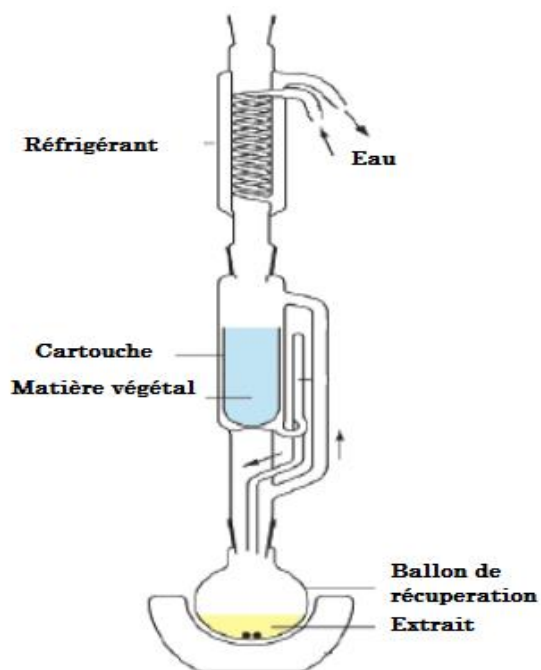


Figure II.14. Schéma simplifié d'un extracteur Soxhlet

II.5.3.1.3. Préparation de la matière algale

Dans un premier temps, les poudres d'algues sont macérées dans un mélange (méthanol/dichlorométhane) (1:1) à température ambiante pendant 48 h, le mélange est ensuite filtré. Ce

processus est répété trois fois successives. Une extraction séquentielle au soxhlet a été effectuée avec l'éther de pétrole puis de l'acétone pour éliminer les lipides ainsi que les pigments hydrophobes et liposolubles (les chlorophylles ou caroténoïdes).

II.5.3.1.4. Extraction des polysaccharides à partir des algues brunes

Le protocole expérimental adopté pour l'extraction spécifique des polysaccharides des algues brunes a été réalisé selon la méthode modifiée de Rioux *et al* (2009) [23]. (Figure II.15). 100g d'algues dépigmentés sont traités par 800 mL d'une solution aqueuse à 2% de CaCl_2 pendant 7 heures à 70°C. Le pH est ensuite ajusté à 2 avec une solution diluée d'acide chlorhydrique (HCl 0,01M). Le mélange est maintenu sous agitation mécanique pendant 3h afin de précipiter les alginates de calcium. Pour augmenter le rendement de l'extraction, le processus est répété trois fois de suite. Après chaque traitement, l'ensemble est centrifugé à une vitesse de (3000 tr/min) pendant 20 minutes. Le surnageant, renfermant les fucoïdes mélangés avec les laminaranes et les sels minéraux, est dialysé moyennant des boyaux coupant à 30 KDa puis lyophilisé. Alors que le culot, renfermant les alginates de calcium, est solubilisé dans une solution aqueuse de Na_2CO_3 à 3% pendant 3h×3 à 60°C pour permettre l'échange ionique. Les alginates de sodium ainsi récupérés sont ensuite dialysés moyennant des boyaux coupant à 30 KDa et enfin lyophilisés. Le rendement d'extraction est calculé comme étant le rapport de la masse de polysaccharides lyophilisés sur la masse d'algue sèche.

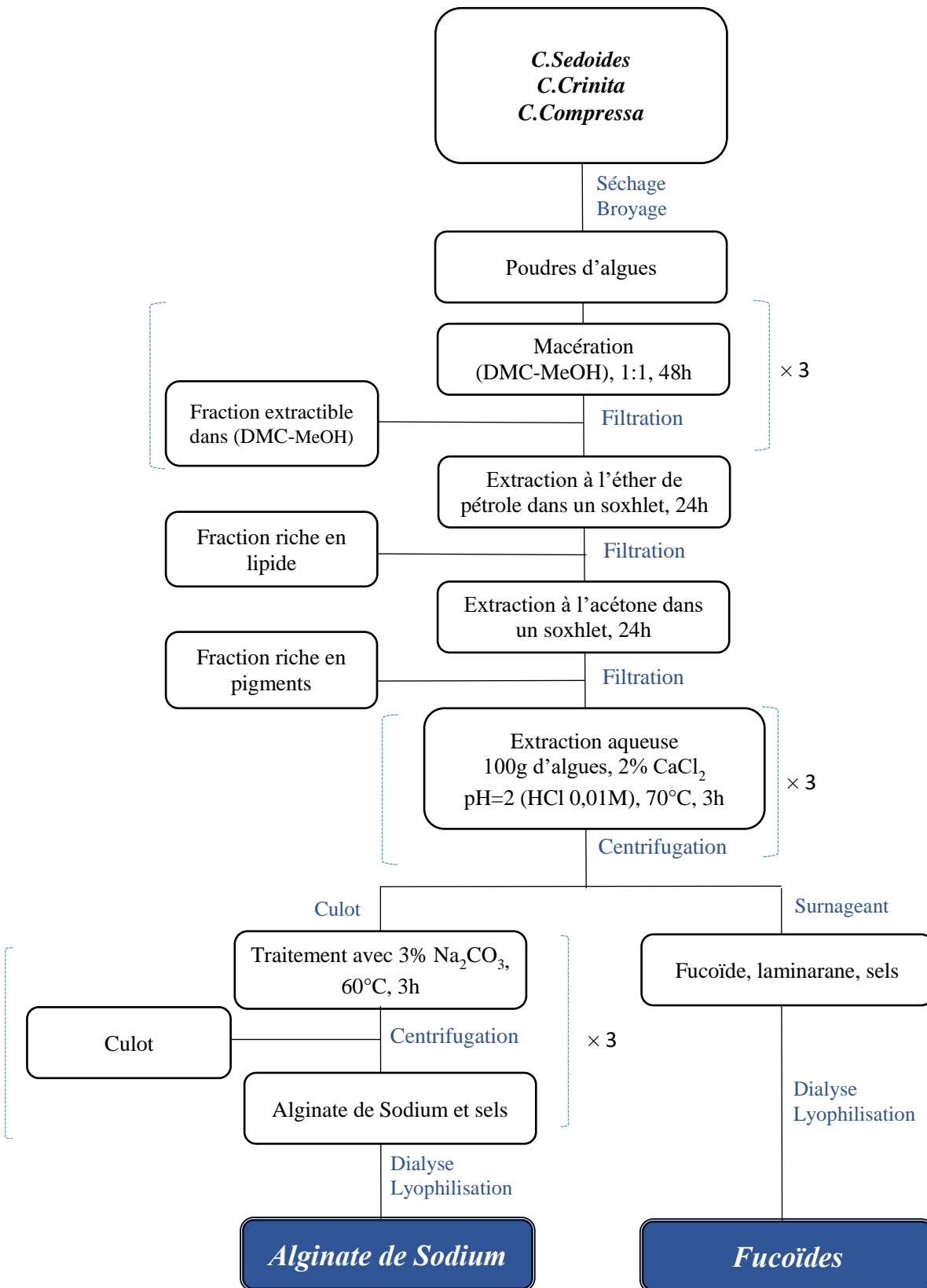


Figure II.15. Méthode d'extraction des polysaccharides à partir des algues brunes, *Cystoseira sedoides*, *Cystoseira crinita* et *Cystoseira compressa*

II.5.3.2. Développement d'un biocapteur à électrode modifié par Alginate de sodium

Avant toute analyse, l'électrode doit être nettoyée. Or, un traitement s'avère nécessaire. En effet l'électrode d'or a été nettoyée en deux étapes. Le premier nettoyage consiste à enlever la couche de résine sur la surface d'or. L'électrode a été alors trempée dans l'acétone pendant 10 min sous ultrason, ensuite, séchée sous flux d'azote (N_2). La deuxième étape de nettoyage est la plus importante. L'électrode d'or a été nettoyée en utilisant le mélange "piranha" [24]. Cette solution est composée d'un mélange de 2/3 d'acide sulfurique concentré (96%) (H_2SO_4), et de 1/3 d'eau oxygénée (H_2O_2). L'échantillon a été laissé 1 minute dans la solution. Après ce traitement, l'électrode a été rincée soigneusement à l'eau ultra pure et séchée sous un flux d'azote. Ensuite, l'électrode en or a été modifiée avec 15 μ L d'alginate de sodium dissous dans une solution tampon acétate de 0,1 M. Cette valeur a été fixée après la dégustation de trois électrodes différentes contenant 5, 15 et 20 μ L d'alginate de sodium. Ce biopolymère a été déposé sur la surface de l'électrode pendant 2 h pour former une couche d'ancrage à la surface de l'électrode.

II.5.3.3. Immobilisation de l'AChE par réticulation Glutaraldéhyde

La membrane a été préparée comme étant un mélange qui contient un ratio d'enzyme /support [5 mg d'AChE (500UN) /5 % (w/w) albumine de bovine sérique(BSA)] solubilisé dans 20 μ L d'un tampon phosphate à 20mM. Par ailleurs, du glycérol à 10% (P/V) est rajouté dans la membrane pour améliorer sa plasticité et éviter les phénomènes de "retrait" de la membrane. Il est bien évident que l'enzyme n'était active que dans une certaine gamme de pH, il est important de se placer à la valeur du pH permettant une activité catalytique optimale. Le mélange a été complètement homogénéisé, 20 μ L de ce mélange ont été déposés sur la surface sensible de l'électrode d'or modifiée. Ensuite, le biocapteur a été placé dans une vapeur saturée de glutaraldéhyde (agent de réticulation) pendant 10 min et stocké à 4°C pendant 24 h. L'ensemble du processus de conception des biocapteurs impédimétriques a été schématiquement présenté dans la **Figure II.16**. Avant les mesures, les biocapteurs ont été lavés avec une solution tampon pour éliminer l'excès de composants non liés de la membrane.

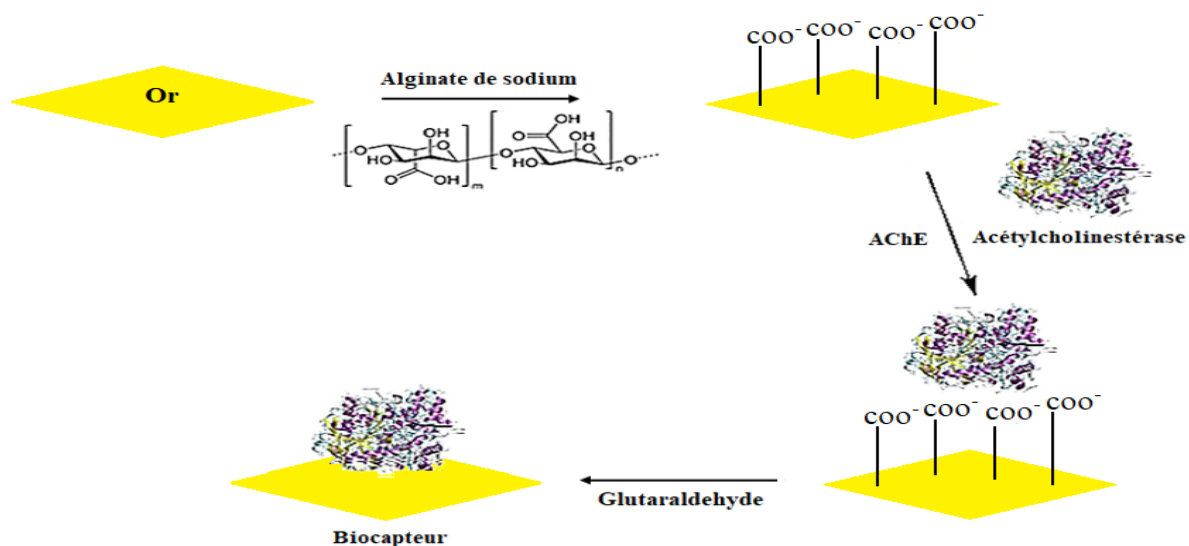


Figure II.16 Différentes étapes d'élaboration d'un biocapteur pour la détection de l'AFB1

Les biocapteurs AChE travaillent sur les effets inhibiteurs, lorsque l'analyte n'est pas présent dans la solution, le substrat acétylthiocholine est transformé en thiocholine et en acide acétique. La thiocholine est oxydée par une tension appliquée. En présence d'un inhibiteur, la conversion de l'acétylthiocholine diminue [25]. Ce n'est que lorsque l'impédance était la même après au moins trois mesures que les électrodes ont été considérées comme stables et ont été incubées dans du tampon phosphate contenant AFB1. La variation de la résistance au transfert d'électrons après addition d'AFB1 a été utilisée pour évaluer l'étendue de l'inhibition. Toutes les mesures ont été effectuées en au moins trois répétitions.

II.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté, en premier lieu, une description des dispositifs et des différentes méthodes électrochimiques mises en œuvre pour l'élaboration et la caractérisation d'un biocapteur. En second lieu, nous avons décrits l'ensemble des techniques de microscopie utilisés ainsi que les méthodes et conditions expérimentales. Ces méthodes vont être utilisées dans le chapitre suivant pour la caractérisation des électrodes nues et modifiées.

Références bibliographiques

- [1] R. L. Mc Creery, *Chem. Rev.*, 108, p 2646-2687, **2008**.
- [2] J. Wang, *Anal. Electrochem*, VCH, W. Ed. New York, **2000**.
- [3] M. Byrne and A.T. Kuhn. *J. Chem. Soc. Faraday Trans I*, 68, 355, **1972**.
- [4] S. Ching, R. Dudek, E. Tabet, Cyclic Voltammetry with Ultra microelectrodes, *J. Chem. Educ.*, 71, 602-605, **1994**.
- [5] M. Dechelette, S. Palvadeau, Mise en place d'une campagne de prélèvement : projet ECODYN. Maîtrise de chimie. Université de Toulon et du var année, Faculté des sciences et techniques, **2003/2004**.
- [6] M. El Makhfouk, A.Souissi, M. El Meray, Analyse de la fraction labile du zinc, cadmium, plomb et du cuivre dissous en milieu marin côtier par la redissolution anodique à impulsions différentielles, *C. R. Chimie* 6, p 689-693, **2003**.
- [7] S. Singh, S. Pradhan, L.C. Rai, Metal removal from single and multimetallic systems by different biosorbent materials as evaluated by differential pulse anodic stripping voltammetry, *Process Biochem*, 36, p 175-182, **2000**.
- [8] I. Adraoui, A. Aziz, Détermination des métaux lourds par voie électrochimique, les technologies de laboratoire - n°3, Mars-Avril **2007**.
- [9] F. Rouessac, A. Rouessac, Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, *Cours et exercices corrigés*, 6^{ème} édition, **2004**.
- [10] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Masson., **1982**.
- [11] J.H. Sluyers, *Recueil des Travaux Chimiques*, 79, 1092–1100, **1960**.
- [12] C. Gabrielli Gabrielli, Méthode électrochimique, mesure d'impédance, Techniques d'ingénieur, analyse et caractérisation, PE. 2210, 1-21, **2002**.
- [13] S.A. Sequoia, *J. Electroanal. Chem*, 223, 25-50, **1987**.
- [14] F. Scheller, F. Schubert, *Chemical Biosens*, 7, 513-517, **1992**.
- [15] E. Sabatini, I. Rubinstein, *J. Phys. Chem*, 91, 6663-6669, **1987**.
- [16] J. Randles, *Faraday Discuss.Soc*, 1, 11-19, **1947**.
- [17] N. Fishelson, O.L. Shkrob, J Gun, AD. Modestov. *Langmuir*, 17, 403- 412, **2001**.
- [18] M. D. Porter, B. Bright, D. L. Allara, C.E.D. Chidsey, *J.A.C. S*, 109, 3559-3568, **1987**.
- [19] L. Bousse, N. F. Rooij, P. Bergveld, « *J. IEEE Trans. Electron Devices Soc.* », 30, 1263-1270, **1983**.
- [20] M.P. Minimol, K. P. Rao, Y.R. Sai, K. Vidyasagar, *Proc. J. Indian Chem. Soc.* 115, 4, 419-429, **2003**.
- [21] L.V. Lukashuk, A.B. Lysenko, E.B. Rusanov, A.N. Chernega and K.V. Domasevitch, *Acta Crystallogr. Sect. B*, 63, 140-143, **2007**.
- [22] Rolland. S, Bruel.C, Rascle .C, Girard.V, Billon-Grand.G. Moreover, Poussereau.N, pH controls both transcription and post-translational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, *Microbiol*, 155, 2097-2105, **2009**.
- [23] L.E. Rioux, L.S. Turgeon, M. Beaulieu, *Phytochemistry* 701069–701075, **2009**.
- [24] S.Hleli, C. Martelet, A.Addelghani, N.burais, N.Jaffrezic-Renault, Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer, *Sens. Actuators B Chem.* 113, 711-717, **2006**.
- [25] N. Jha, S. Ramaprabhu, *J. Nanosci. Nanotechnol*, 9, 5676, **2009**.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Partie A

Biocapteur chimique à base de biomasse pour la détection des métaux lourds

III.A.1. Introduction

Les métaux lourds constituent de sérieux polluants environnementaux [1], leur accumulation dans les sols est une préoccupation en production agricole à cause de leurs effets néfastes sur la croissance des cultures, la qualité des produits alimentaires et la santé de l'environnement [2]. Ils sont considérés comme étant parmi les polluants les plus importants en raison de leur large diffusion, la persistance, la bioaccumulation et leur degré élevé de toxicité [3-4]. Afin de répondre aux nouvelles dispositions législatives concernant le contrôle des rejets de polluants, l'élaboration de nouvelles stratégies pour la détection des métaux lourds est essentielle [5-7]. De nombreuses équipes travaillent aujourd'hui sur le développement des biocapteurs permettant de détecter des polluants tels que les métaux lourds et les pesticides [8]. Pour mettre en jeu un tel dispositif, le choix du biorécepteur est capital. Les biocapteurs utilisent trois grands types de biomolécules comme éléments de reconnaissance : les enzymes, les immunoespèces, et les acides nucléiques. Une grande attention est portée sur la recherche de nouvelles stratégies d'immobilisation des microorganismes. La phase critique est l'optimisation des protocoles d'immobilisation sans que l'activité biologique ne soit altérée. Parmi plusieurs techniques utilisées, on s'intéresse à l'immobilisation covalente des biomolécules, qui permettent de fixer une biomasse sur un support grâce à des liaisons spécifiques, cette méthode d'immobilisation donne une reproductibilité accrue au cours du temps. En effet, la solidité des liaisons covalentes permet de travailler dans des conditions plus drastiques avec une meilleure résistance aux modifications de pH ou de température.

Dans ce contexte, nous rapportons le développement d'une électrode de carbone vitreux modifiée (ECV) par un mélange de nanotubes de carbone fonctionnalisés (SWCNTs-COOH) et les champignons filamenteux sous forme de biomasse (SWCNTs-CO/Biomasse) pour la détection des métaux lourds par ces microorganismes. La détermination des métaux lourds à l'état de trace par voie électrochimique a connu un essor important au cours de ces dernières années. Différentes techniques électrochimiques ont été employées, à savoir la voltammétrie à redissolution anodique à impulsion différentielle (DPASV) qui est basée sur la pré-concentration par réduction suivie d'une dissolution anodique d'accumulations de métaux lourds [9-10].

III.A.2. Caractérisations des champignons filamenteux

III.A.2.1. Observations macro et microscopiques

Cette partie du travail consiste à sélectionner et identifier des souches fongiques présentes dans différents sols pollués par des métaux lourds [11]. Les champignons présents dans les sols étudiés ont été isolés par une approche classique de mise en culture sur milieux nutritifs gélosés [12-13]. Ils ont ensuite été identifiés au niveau du genre par des observations macro et microscopiques (**Figure III.1**) [14], parmi ces souches, on a sélectionné *Trichoderma asperellum*.

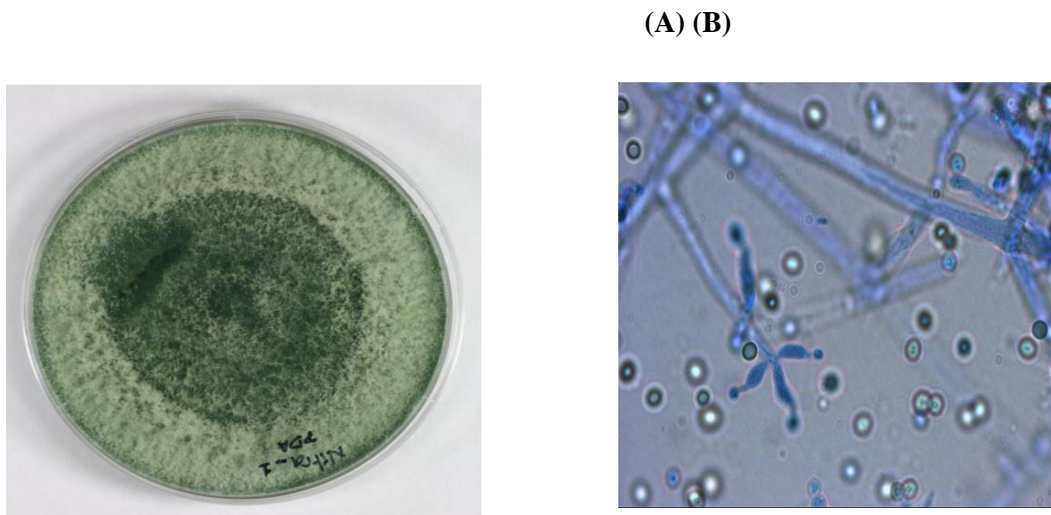


Figure III.1. (A) Aspect macroscopique de *Trichoderma asperellum* cultivé dans un milieu PDA, (B) Aspect microscopique de *Trichoderma asperellum*

III.A.2.2. Analyse des spectres FTIR

Les récents développements de la spectroscopie IRTF ont permis de nombreuses applications dans le domaine de la microbiologie, et notamment en tant qu'outil complémentaire de discrimination et d'identification adapté à un large spectre de microorganismes [15-16] comme les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Il est possible de faire correspondre certaines bandes caractéristiques de spectre infrarouge aux différentes fonctions chimiques des molécules présentes au sein des microorganismes (**Figure III.2**), **Tableau III.1**.

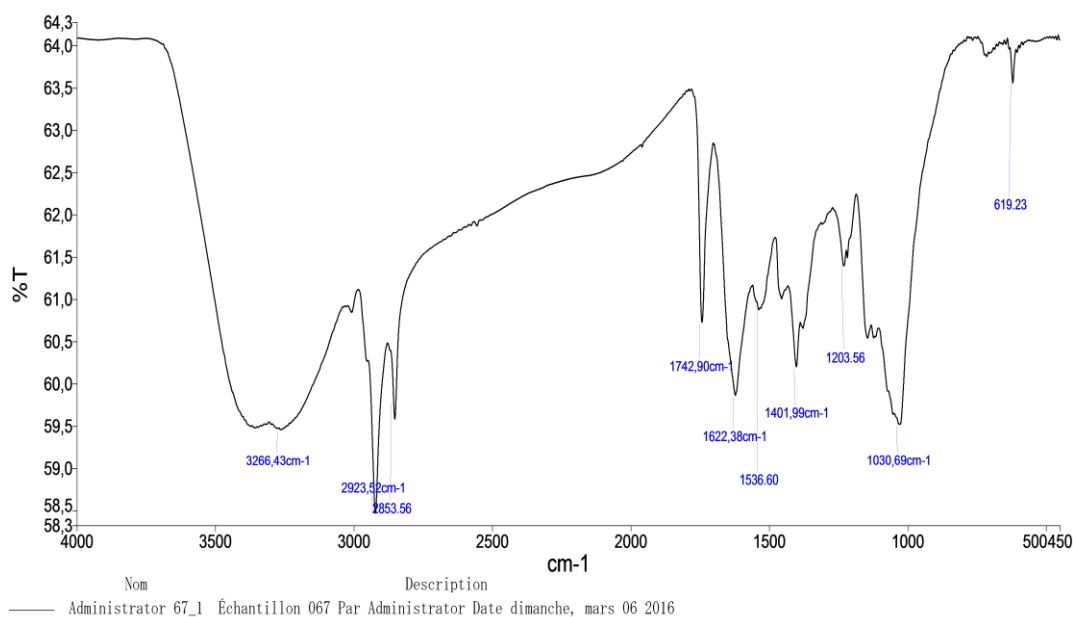


Figure III.2. Spectre d'absorption IR caractéristique du champignon filamenteux (*Trichoderma asperellum*)

Tableau III.1. Fréquences d'absorption observées dans les spectres infrarouges des microorganismes et leur attribution biomoléculaire.

Fréquences (cm ⁻¹)	Liaison moléculaire	Mode de vibration	Attribution biomoléculaire
3200-2800	CH ₂ , CH ₃ N-H	élongation symétrique et asymétrique élongation symétrique	Lipides, Protéines
1742-1700	C=O	élongation symétrique	Acides gras
1695-1625	C=O, C-N N-H	élongation symétrique déformation	Protéines (amide I)
1622-1536	C=O, C-N N-H	élongation symétrique déformation	Protéines (amide II)
1530-1400	CH ₃ , CH ₂ C=O	Déformation élongation symétrique	Lipides
1300-1200	P=O	élongation symétrique	Acides nucléiques
1200-1000	C-O-C, C-O, P=O, C-C/ C-O	élongation symétrique	Ribose, Glycogène, Chitine, Glucane, Mananne, Acides nucléiques
900-620	C-H	Déformation	Groupes aromatiques

III.A.3. Caractérisations électrochimiques des électrodes modifiées

III.A.3.1. Procédure et test électrochimique sur des électrodes modifiées

Une configuration à trois électrodes a été réalisée dans une cellule électrochimique, consistant en (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) en tant qu'électrode de travail, électrode de référence Ag/AgCl contenant de KCl et une contre-électrode en fil de platine ($\Phi = 1\text{mm}$). Une solution aqueuse de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) est préparée à partir d'une solution d'acétate (0.1 M, pH = 4.5) et versée dans la cellule électrochimique équipée de ces trois électrodes. Le système est soumis à une voltampérométrie cyclique (CV) de -200 mV à 600 mV à une vitesse de balayage de $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. La voltampérométrie est enregistrée sur une surface d'électrode en carbone vitreux nu puis sur une électrode modifiée par un mélange de (SWCNTs-CO/Biomasse). Pour accumuler des analytes sur la surface de l'électrode, l'électrode (ECV-SWNT-CO/Biomasse) a été immergée dans une solution tampon d'acétate agitée (300 tr / min) contenant une concentration connue d'ion métalliques pendant un temps d'accumulation de 10 min. L'électrode modifiée a été retirée après accumulation, rincée avec de l'eau ultrapure, séchée et transférée dans une solution tampon d'acétate 0.1 M de pH 4.5. Les mesures (DPASV) ont été enregistrées à un potentiel -1.2V pendant 120s suivi d'un balayage DPV négatif avec un incrément de 5mV et une amplitude de 50mV de -1.2 à -0.2 V. Au moins trois voltammogrammes (DPASV) ont été enregistrés pour chaque série.

III.A.3.2. Choix de la quantité de SWCNTs déposée sur une électrode de carbone vitreux

Le choix du volume déposé sur l'électrode de carbone vitreux a été fixé après avoir effectué différentes séries de mesure sur trois différentes électrodes sur lesquelles on a déposé respectivement $5\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$ et $20\mu\text{l}$ de SWCNTs. La caractérisation de ces trois couches est faite par la voltammétrie cyclique qui montre l'influence de la quantité de SWCNTs déposée sur l'intensité du courant des pics d'oxydation et de réduction. Le pic le plus fort correspond à un volume de $10\mu\text{L}$ de SWCNTs. La **Figure III.3** montre l'influence de la quantité de SWCNTs déposée sur l'intensité du courant des pics d'oxydation et de réduction. Le pic le plus fort correspond à un volume de $10\mu\text{L}$ de SWCNTs.

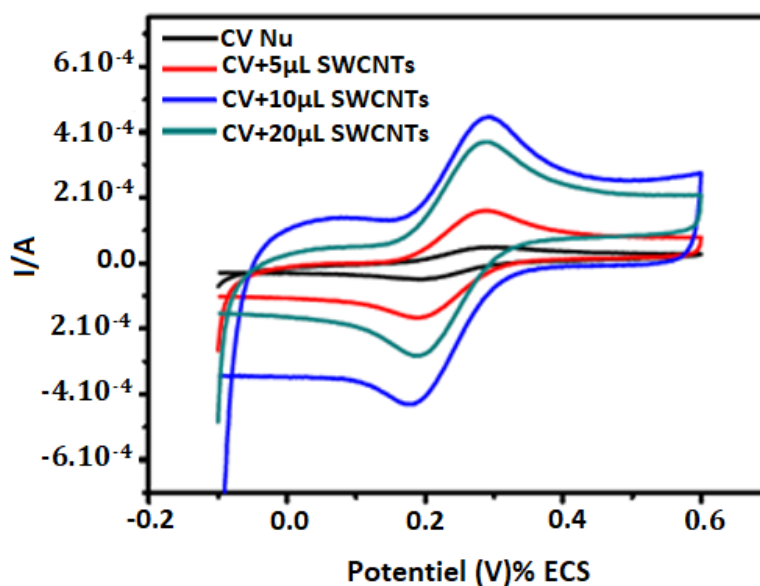


Figure III.3. Optimisation de la quantité de SWCNTs déposée sur ECV en présence de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ dans 0,1M KCl

A partir des voltammogrammes obtenus **Figure III.3**, on peut déterminer la valeur de l'intensité des pics d'oxydation correspondante à chaque couche déposée. Les résultats trouvés sont récapitulés dans le **Tableau III.2**.

Tableau III.2. Effet de la quantité des SWCNTs déposés sur la réponse de l'électrode

Volume SWCNTs	Intensité du pic (mA)
CV+5µL SWCNTs	16
CV+10µL SWCNTs	47
CV+20µL SWCNTs	44
CV nu	0,49

Les valeurs trouvées indiquent que la meilleure valeur du pic d'oxydation est observée à 10µL de SWCNTs. On remarque aussi que pour un dépôt correspondant à 20µL, le pic d'oxydo-réduction diminue. Cette variation peut être due à un encombrement au niveau de la surface de l'électrode et/ou à une perte de la quantité de ces nanotubes. Par conséquent, l'électrode ne répond pas bien au dépôt de 5µL et à l'électrode nue. Nous pouvons donc en déduire que les performances catalytiques de l'électrode sont optimales pour une quantité de 10µL de SWCNTs, valeur que nous adoptons pour la suite de nos essais.

III.A.3.3. Aspects morphologiques des électrodes modifiées -Caractérisation par MEB

La morphologie de (SWCNTs-COOH) et (SWCNTs-CO/Biomasse) déposé sur ECV, a été caractérisée par microscope électronique à balayage, pour confirmer l'immobilisation de la biomasse sur (ECV/SWCNTs-COOH). Les images MEB des électrodes (ECV/SWCNTs-COOH) et (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) sont présentées sur la **Figure III.4**. D'une part pour les électrodes (ECV/SWCNTs-COOH), l'image (A) met en évidence des morphologies en forme d'agrégats qui paraissent plus resserrés. La composition atomique des matériaux sur différentes zones observées, a été confirmée par des analyses EDS sur ces particules dans différentes zones. Ces analyses ont montré des teneurs de 65,7 % en Carbone (C) et 24,8 % en Oxygène (O) **Figure III.5. (A)**. La formation du film (SWCNTs-CO/Biomasse) sur les électrodes ECV a également été mise en évidence par MEB **Figure III.4. (B)**. On observe des filaments de nanotubes de carbone orientés aléatoirement, deviennent plus larges et enveloppés par une couche de champignons filamenteux. Le spectre de la radiographie dispersive d'énergie (EDS) présente des pics caractéristiques de carbone, d'oxygène et l'apparence d'autre pics qui correspond aux microorganismes déposés, confirmant ainsi le succès de l'immobilisation de la biomasse sur les nanotubes de carbone (SWCNTs-COOH) **Figure III.5.(B)**. Les clichés de microscope montrent que la morphologie de surface du film (SWCNTs-CO/Biomasse) immobilisé sur les électrodes ECV diffère considérablement de celle obtenue avec (ECV/SWCNTs-COOH).

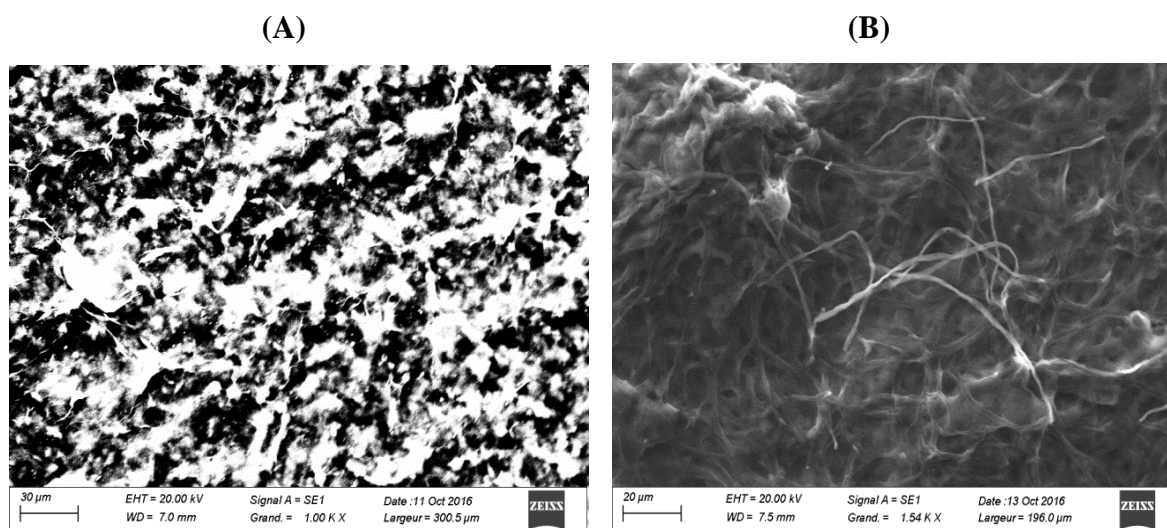


Figure III.4. Microscope électronique à balayage (MEB) (A)- ECV/ (SWCNTs-COOH), (B)- ECV/SWCNTs-CO/Biomasse

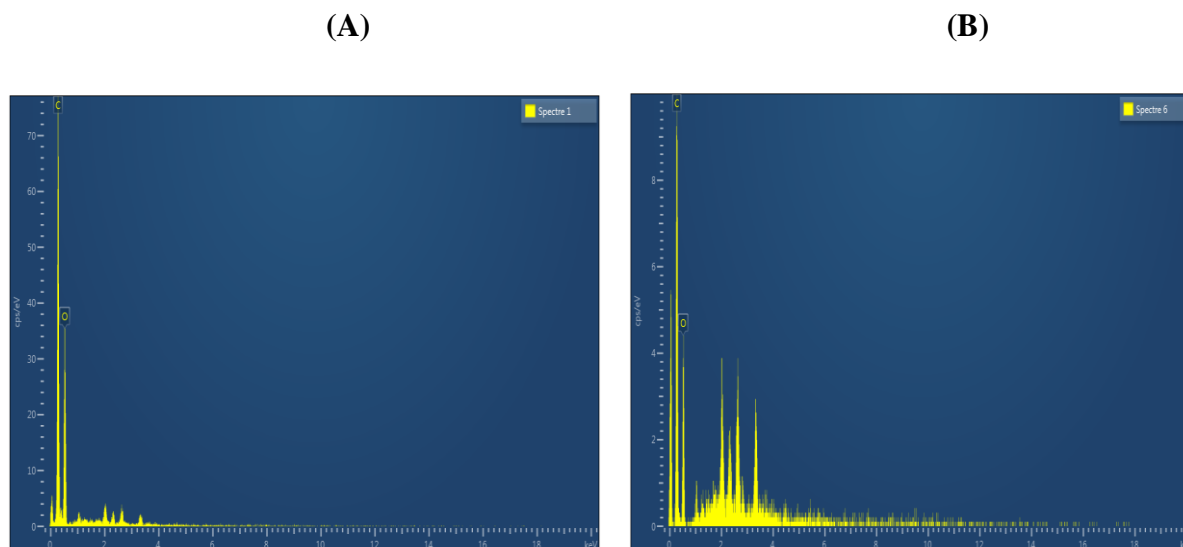


Figure III.5. Analyse EDS: (A) - ECV/(SWCNTs-COOH), (B) - ECV/SWCNTs-CO/Biomasse

III.A.3.4. Caractérisation par voltammétrie cyclique

La Figure III.6. montre les voltammogrammes cyclique de l'électrode de carbone vitreux nue et une électrode modifiée par un mélange de (SWCNTs-CO/Biomasse) en présence du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5mM). La voltammétrie cyclique a été effectuée pour vérifier le changement du comportement de l'électrode après l'étape de modification. Les résultats électrochimiques peuvent prouver l'adsorption de la matrice (SWCNTs-CO/Biomasse) sur la surface de l'électrode. En fait, le taux de transfert de charge à l'interface électrode / solution peut être évalué par voltammétrie cyclique [17].

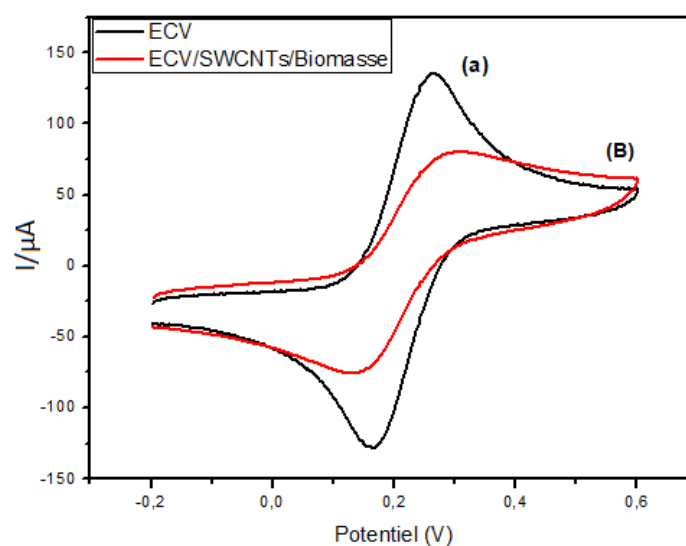


Figure III.6. Voltammogrammes cycliques de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5mM) sur l'électrode nue ECV et modifié (ECV/SWCNTs-CO-Biomasse)

Le voltammogramme de l'électrode nue (courbe a) montre un processus redox quasi-réversible caractéristique de l'oxydoréduction du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sur la surface de l'électrode. Les pics anodiques et cathodiques apparaissent respectivement à 0.270 et 0.160 V. La réduction électrochimique est en revanche ralentie sur la surface modifiée (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) (courbe b), le pic anodique ou cathodique observé dans la gamme des potentiels utilisés devient moins intense, les deux pics sont significativement réduits ce qui est attribué à la diminution du taux de transfert d'électrons qui confirme qu'une couche de (SWCNTs-CO/Biomasse) a été correctement formée sur la surface de ECV donnant une couverture dense du mélange. Après l'adsorption de la matrice (SWCNTs-CO/Biomasse), on a observé une diminution du courant démontrant le processus de fonctionnalisation.

III.A.3.5. Caractérisation par spectroscopie d'impédance

Les mesures d'impédance ont également été réalisées comme une approche hautement sensible. Les spectres d'impédance suivent les formes théoriques et comprennent une partie semi-circulaire pressée, observée à des fréquences plus élevées, qui correspond au processus de transfert d'électrons limité, suivi d'une partie linéaire caractéristique de la fréquence inférieure attribuable à un transfert d'électrons à diffusion limitée. Les diamètres de demi-cercle à haute fréquence, correspondant à la résistance de transfert d'électrons à la surface de l'électrode, augmentant lors de la formation d'une couche sur l'électrode. Les mesures EIS ont été effectuées dans une solution de KCl 0,1 M contenant 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans la gamme de fréquence allant de 100 mHz à 100 KHz,

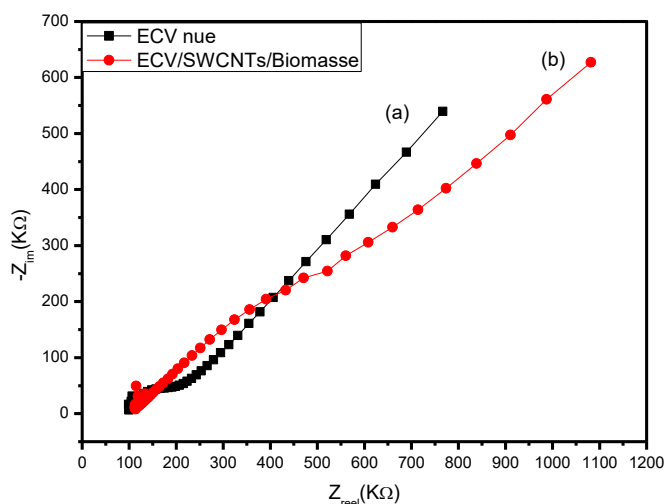


Figure III.7. Diagrammes de Nyquist de l'électrode nue ECV et modifiée ECV/SWCNTs-CO-Biomasse dans une solution de KCl (0,1 M) contenant du $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

La **Figure III.7** représente les courbes spectroscopiques en mode Nyquist, de l'électrode nue et modifiée par un mélange de (SWCNTs-CO/Biomasse) pour un temps d'immersion de 10 minutes et à un potentiel de 150 mV. Le voltammogramme d'ECV nue (**Figure III.7a**) présente un pic quasi réversible caractéristique de l'oxydoréduction du couple redox à la surface de l'électrode. On a obtenu un demi-cercle plus prononcé par rapport au spectre de Nyquist de l'électrode nue suivi d'une droite (**Figure III.7b**), indiquant une impédance plus importante résultant de l'inhibition de la réaction de transfert d'électrons de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sur ECV revêtue d'un mélange de (SWCNTs-CO/Biomasse). Cette inhibition se traduit par une augmentation du diamètre du demi-cercle du diagramme de Nyquist et par conséquent une augmentation de la résistance de transfert de charge (R_{tc}) et de la capacité de la couche formée (R_f) [18-19]. L'augmentation de transfert de charge s'explique par la présence de charges négatives sur les fonctions carboxyliques et les fonctions amines du mélange en milieu aqueux. Ces charges exercent une force électrostatique répulsive sur les ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ de l'électrolyte et limitent leur approche de l'électrode (diminution de ZW). Ces résultats confirment bien la bonne fonctionnalisation de ECV par (SWCNTs-CO/Biomasse). Les spectres et les données d'impédance expérimentales ont été modélisés et ajustés en utilisant le circuit équivalent de Randle standard $[R(C[RW])]$ donnée par la **Figure III.8**. Les paramètres électrochimiques installés ont été rassemblés dans le Tableau **III.3**.

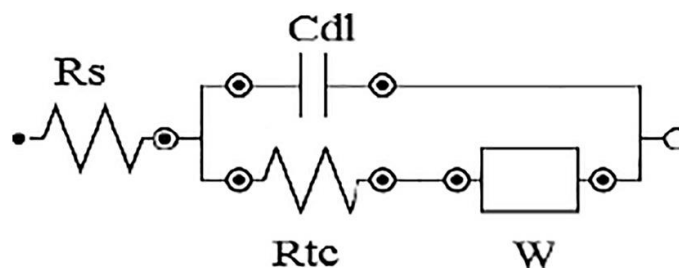


Figure III.8. Circuit électrique équivalent permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant

Les paramètres électrochimiques ajustés ont été rassemblés dans le **Tableau III.3**.

Tableau III.3. Paramètres électrochimiques de l'électrodes nue et modifiée ECV (SWCNTs-CO/Biomasse) obtenus à partir des données d'impédance d'analyse avec le circuit de randles [R(C[RW])]

Electrode	R_s (Ω)	C_{dl} (μF)	R_{tc} (Ω)	W (μF)	Θ	n=3
ECV nue	102.05	6.869	41.895	154.3		
ECV modifiée	120.31	2.926	155.93	7415	0.73	7.8%

III.A.3.6. Calcul du taux de recouvrement

A partir des valeurs R_{tc}° et R_{tc} (résistance de transfert de charge), avant et après modification de la surface (ECV), la couverture apparente de l'électrode (Θ) par la couche de SWCNTs-CO/Biomasse peut être approximativement calculée selon la relation suivante (1). [20-22].

$$\theta = 1 - R_{tc}^{\circ} / R_{tc} \quad (1)$$

L'adsorption de la couche SWCNTs-CO/Biomasse est équivalente à 73,1% de la surface ECV couverte. Ce qui confirme la formation d'une surface rugueuse et dense.

III.A.4. Application d'électrode modifiée (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) pour l'analyse des cations métalliques

III.A.4.1. Optimisation des conditions de détection

Les conditions de mesure d'un métal ont été optimisées en faisant varier le pH du tampon acétate 0,1 M, le temps d'accumulation, le potentiel de préconcentration et le temps de préconcentration sont des paramètres très importants pour l'analyse de la redissolution anodique car ils influent sur le signal. Ces paramètres ont été optimisés en utilisant Pb^{2+} et Cd^{2+} comme analytes. Dans notre mise en place, le temps d'accumulation était représenté par la durée de la réaction de complexation entre le système d'électrode (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) et le M^{2+} avant la redissolution. Le temps d'accumulation varie donc de 0 à 30 minutes, suivi d'une analyse par redissolution. Le signal de redissolution atteint un maximum après 10 minutes de temps d'accumulation. Aucune augmentation significative du pic de redissolution n'a été enregistrée lors de l'augmentation du temps d'accumulation. Ceci indique

que la réaction de complexation entre le système d'électrode (ECV-SWCNT-CO-Biomasse) et M^{2+} a atteint l'équilibre à ce moment et une situation d'équilibre a été obtenue. Par conséquent, un temps d'accumulation de 10 minutes a été utilisé dans les expériences ultérieures. La durée et l'ampleur du potentiel de réduction appliqué sont également des paramètres importants car ils influent sur la vitesse et l'efficacité de la conversion du M^{2+} complexé sur l'électrode en M^0 avant d'être ramenés dans la solution. Ces paramètres ont été optimisés séquentiellement d'une manière similaire à celle décrite ci-dessus pour le temps d'accumulation résultant en un temps de réduction optimisé de 120 secondes et un potentiel de réduction de 1,1 V.

III.A.4.1.1. Effet de pH

Le pH de la solution d'ions métalliques a un effet significatif sur le comportement voltampérométrique pendant le processus d'accumulation. L'influence de pH des solutions tampons sur la réponse électrochimique du capteur a été étudiée dans la gamme de pH de 3,5 à 6 par la méthode (DPASV) (**Figure III.9**). Un pic maximal de DPASV a été observé à un pH d'environ 4,5. La diminution du courant à un pH inférieur à 4,5 peut être expliquée par le processus de protonation qui affecte le caractère hydrophile de la matrice (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse). La diminution du courant à un pH supérieur à 4,5 est attribuée à l'hydrolyse des ions Cd (II) et Pb (II). Par conséquent, toutes les mesures électrochimiques pour différents ions métalliques testés ont été effectuées dans une solution tampon d'acétate (0,1M) à un pH optimal de 4,5.

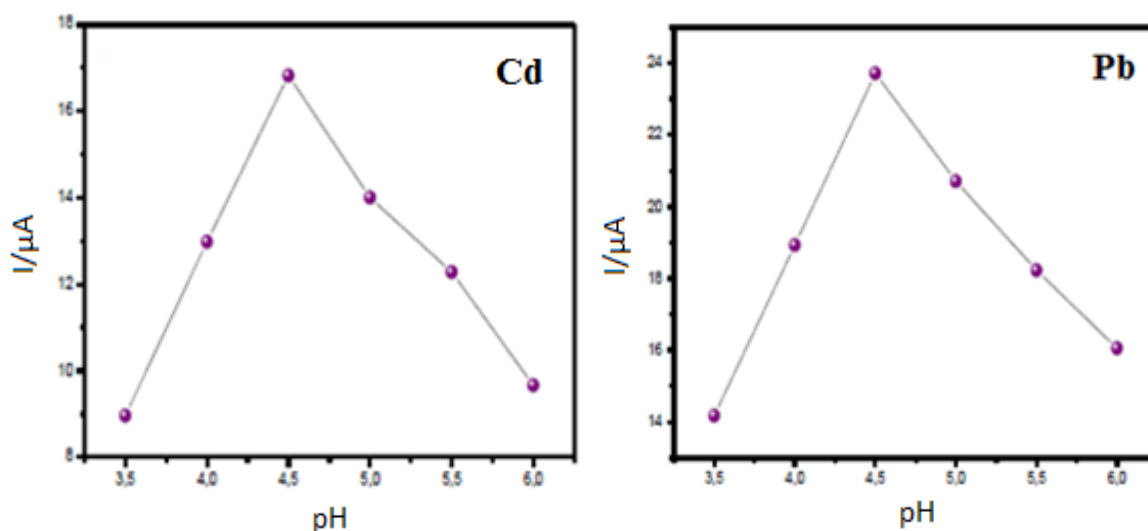


Figure III.9. Effet du pH sur la détection du Cd (II) et Pb (II)

III.A.4.1.2. Potentiel de préconcentration

L'influence du potentiel de préconcentration sur le courant de redissolution a été étudiée dans la région de potentiel entre -0,7 V et -1,1 V, comme représenté sur la **Figure III.10**. Plus le potentiel de pré-concentration est négatif plus les ions Cd (II) et Pb (II) sont facilement réduits, ce qui provoque l'augmentation évidente du courant de redissolution. Cependant, lorsque le potentiel de pré-concentration est plus négatif que -0,9V, le courant de redissolution diminue en raison de l'influence de la réaction de dégagement d'hydrogène.

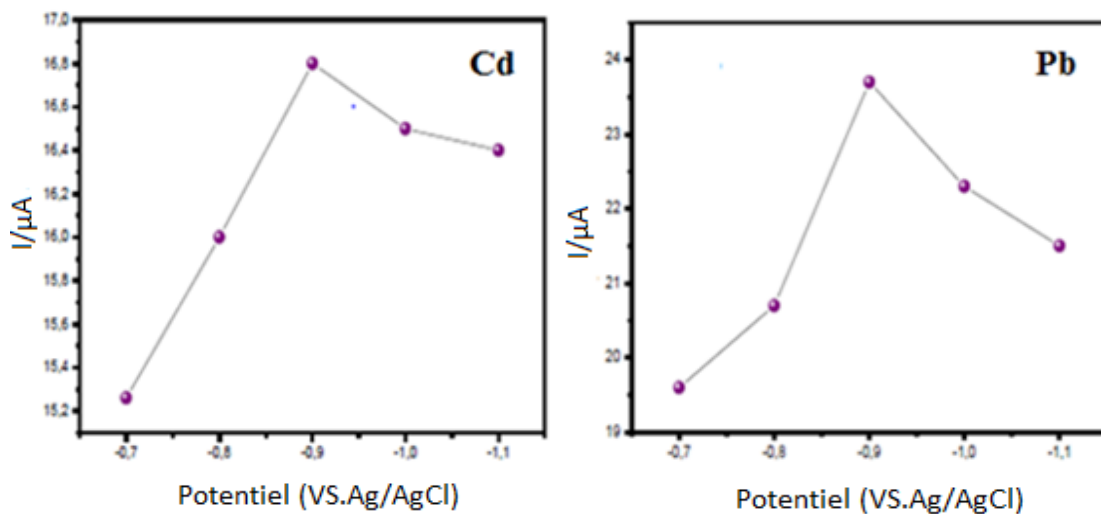


Figure III.10. Effet du Potentiel de préconcentration sur la détection du Cd(II) et Pb(II)

III.A.4.1.3. Temps d'accumulation

Nous avons également étudié l'effet du temps d'accumulation de la réaction de décapage dans l'intervalle de 5 et 25 minutes. La **Figure III.11** montre que le temps d'accumulation optimale était de 20 min.

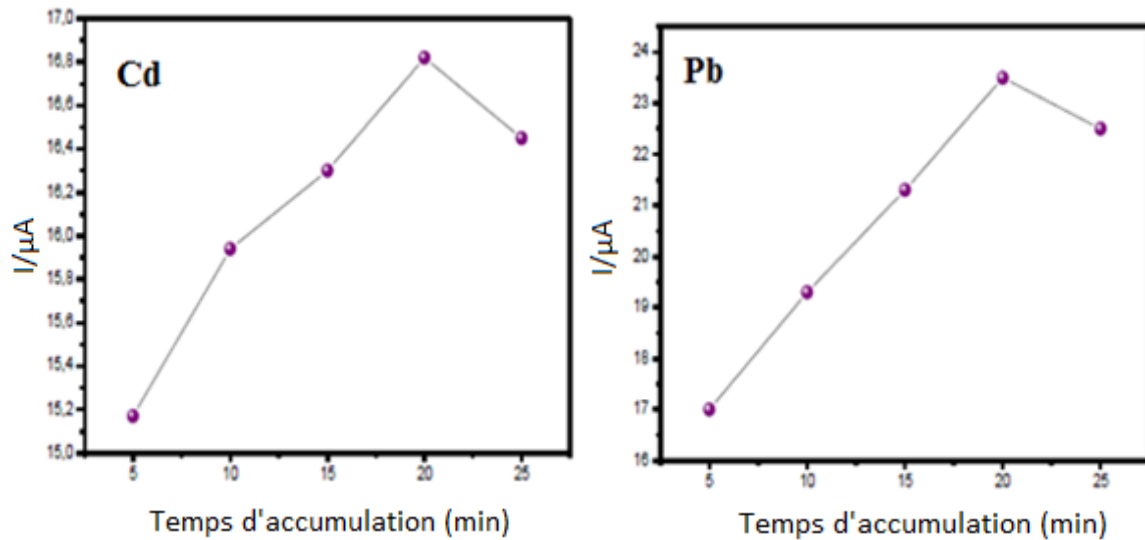


Figure III.11. Effet du temps d'accumulation sur la détection du Cd (II) et Pb (II)

III.A.4.1.4. Temps de réduction

Le temps de dépôt est un facteur important affectant la limite de détection et la sensibilité. Le temps de déposition a été étudié pour une concentration de 10^{-8} M en Cd^{2+} dans l'intervalle de temps allant 60 à 300 s comme montrent la **Figure III.12**. L'intensité du courant augmente avec l'augmentation du temps de dépôt dans l'intervalle de 60 à 300 s. Cependant, le tracé a tendance à diminuer la valeur de la pente jusqu'à 240 s en raison de la saturation rapide de la surface. Par conséquent, la durée de 240 secondes a été choisie comme étant le temps optimal de dépôt.

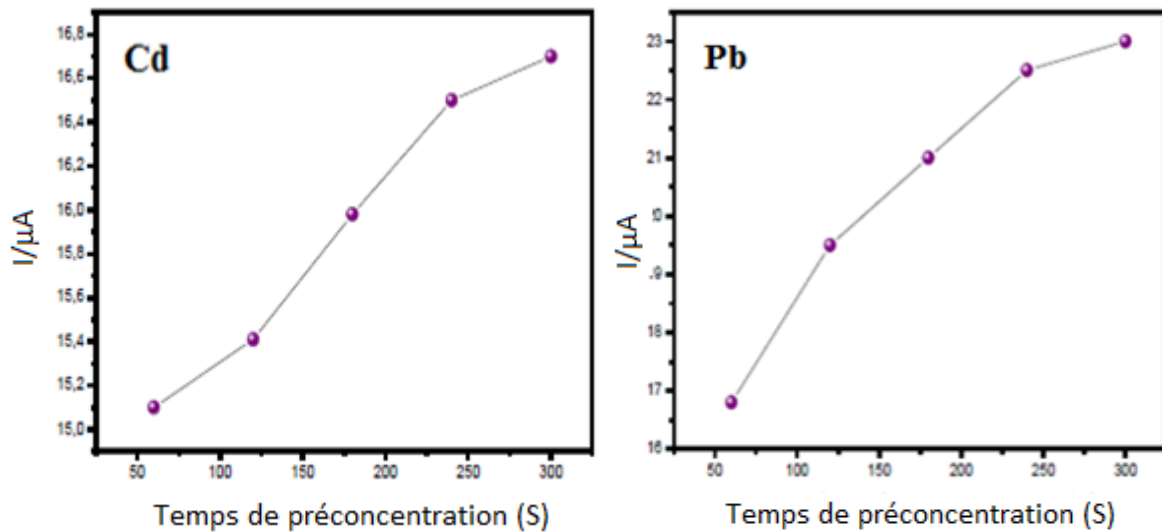


Figure III.12. Effet du temps de préconcentration sur la détection du Cd (II) et Pb (II)

III.A.4.2. Principe de détection

Sur la base des observations ci-dessus, le mécanisme proposé de l'accumulation, la réduction et la redissolution anodique est décrit dans la **Figure III.13** [23-24]. La première étape implique une formation des complexes entre la biomasse immobilisée et l'ion de métal lourd M^{2+} (**Figure III.13A**). La deuxième étape est la réduction des ions M^{2+} accumulés à M^0 par application du potentiel négatif (**Figure III.13B**). La troisième étape est l'étape de redissolution dans laquelle M^0 est récupéré électrochimiquement dans la solution par balayage vers des potentiels positifs (**Figure III.13C**). Le pic de redissolution résultant est proportionnel à la quantité de M^{2+} dans l'accumulation.

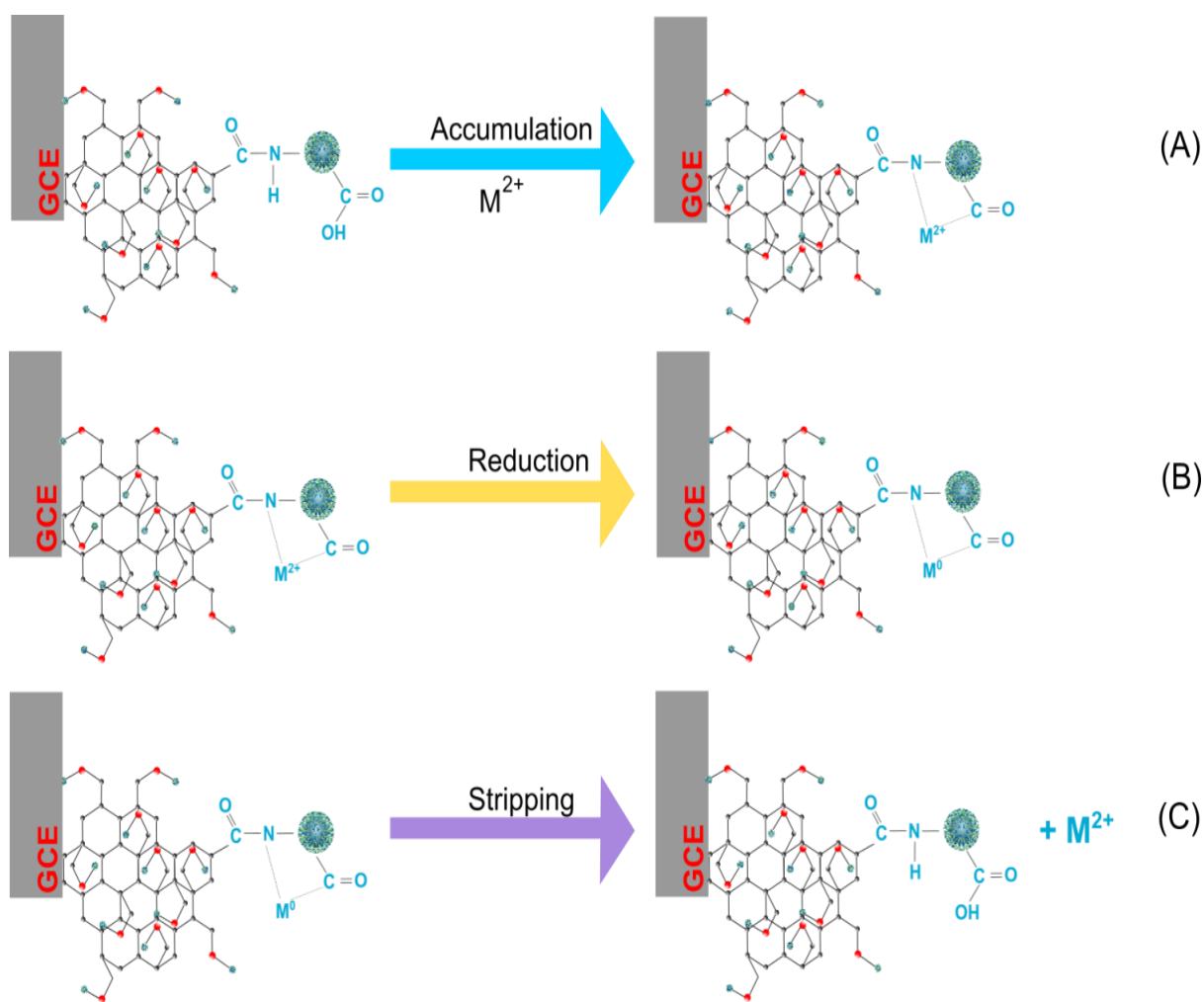


Figure III.13. Illustration schématique du principe de détection M^{2+}

III.A.4.3. La détection des métaux lourds par (DPASV)

La voltammétrie par redissolution anodique avec balayage de potentiel pulsé (PDASV) a été utilisée pour la détection de Cd (II) et Pb (II) dans des conditions optimisées [25-26]. Les mesures individuelles de Cd (II) et Pb (II) en utilisant l'électrode modifiée ECV/SWCNTs-CO- Biomasse ont été effectuées à diverses concentrations dans un tampon d'acétate 0,1 M et pH égal à 4,5. Les voltammogrammes différentiels résultants sont représentés sur la **Figure III.14**. Des pics bien définis, avec un courant proportionnel aux concentrations des ions métalliques Cd (II) et Pb (II) ont été observés respectivement à -0,8 V et -0,6 V. La **Figure III.15** représente les courbes d'étalonnage de Cd (II) et Pb (II) par

rapport aux courants de pics de redissolution correspondant. La linéarité a été validée pour les deux métaux, la limite de détection obtenue pour ces deux métaux après un temps de préconcentration de 20 min est de $10^{-7}M$ pour le Cd et $10^{-8}M$ pour le Pb. La sensibilité est un paramètre important pour les limites de détection basses. Les sensibilités calculées à partir des courbes d'étalonnage sont respectivement de l'ordre Cd = $17,889 \mu A/p$ [Cd (II)] et Pb = $21,983 \mu A/p$ [Pb (II)]. Sur la base des résultats ci-dessus, il convient de noter que la méthode proposée a une limite de détection plus faible et une sensibilité plus élevée de Cd (II) et Pb (II) que les méthodes électrochimiques les plus récemment rapportées pour la détection de ces ions métalliques. Par rapport aux méthodes de détection électrochimique pour les ions de métaux lourds basées sur les microorganismes, notre méthode possède en effet des propriétés souhaitables de l'électroanalyse et des parois cellulaires multifonctionnelles pour améliorer la sélectivité, la sensibilité et la stabilité. Le concept de tirer les meilleures parties des matériaux multifonctionnels devrait être très important pour le développement de biocapteurs à haute performance.

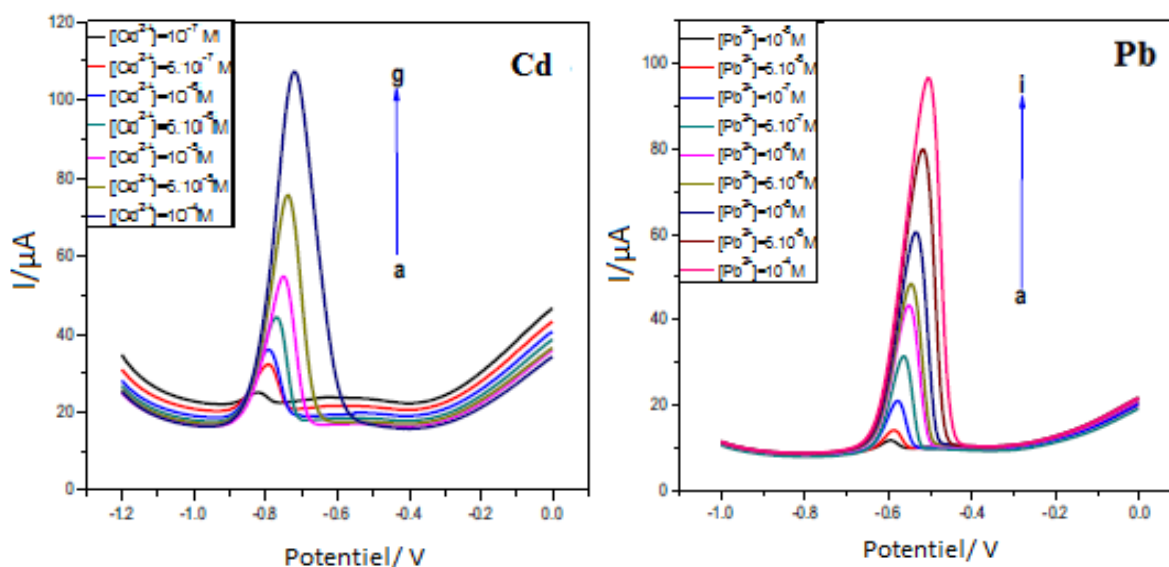


Figure III.14. Courbes DPASV de différentes concentrations des ions Cd(II) et Pb(II) accumulés sur l'électrode ECV/ SWCNTs-CO-Biomasse, temps d'accumulation 20 min dans un tampon d'acétate 0,1M, pH 4.5, temps de réduction 4 min, potentiel de réduction -0.9V

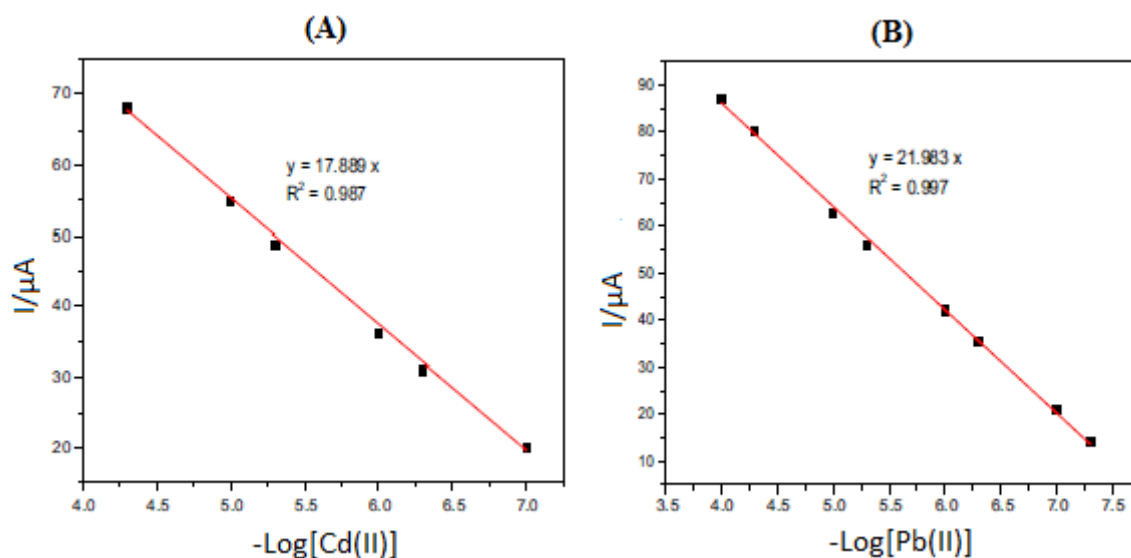


Figure III.15. (A) et (B) Courbes d'étalonnage de ECV / SWCNTs-CO-Biomasse pour différentes concentrations d'ions Cd(II) et Pb(II)

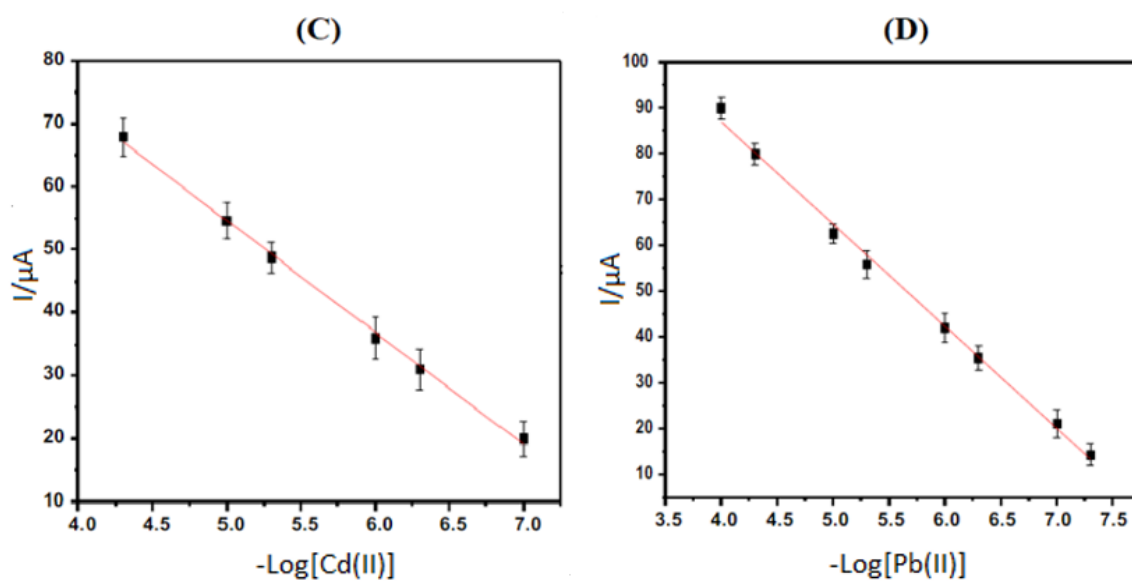


Figure III.16. (C) et (D) Variation linéaire de l'intensité du courant en fonction de la concentration de Cd(II) et Pb(II) sur ECV / SWCNTs-CO-Biomasse, DRS = 6,5% et 4,43% respectivement ($n = 3$)

Des répétitions de l'ordre de trois fois ($n=3$) dans la même solution contenant du plomb et du cadmium ont été réalisées. La **Figure III.16** montre les résultats obtenus, la déviation relative standard (DRS) du Cadmium et du Plomb a été respectivement de 6,5% et de 4,43 %.

Les performances analytiques de l'électrode modifiée pour différents ions testés étaient en bon accord avec certaines réponses rapportées pour d'autres électrodes chimiques modifiées citées dans la littérature **Tableau III.4**. Dans notre travail, une sensibilité élevée a été obtenue par l'électrode proposée pour la détection des ions Cd (II) et Pb (II).

Tableau III.4. Comparaison des performances analytiques des méthodes électrochimiques pour la détermination de Cd (II) et Pb (II)

Électrode	Méthode	Ion	Limite de détection	Sensibilité	Référence
ECV/CN-Polymère	DPASV	Cd (II)	2.27 μM	2.53 $\mu\text{A}/\text{mg L}^{-1}$	[27]
		Pb (II)	0.8 μM	3.67 $\mu\text{A}/\text{mg L}^{-1}$	
HGNTs/SPEd	SWASV	Cd (II)	-	0.0073 $\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$	[28]
		Pb (II)	3.00 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.014 $\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$	
Pt/MWCNT/P1, 5-DAN électrode	SWASV	Cd (II)	-	0.348 $\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$	[29]
		Pb (II)	2.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.577 $\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$	
MWCNT/CPE	SW-AdASV	Cd (II)	-	-	[30]
		Pb (II)	0.03 μM	-	
Cyclam- électrode en feutre de graphite	DPASV	Cd (II)	-	-	[31]
		Pb (II)	0.025 μM	-	
Bi ₂ O ₃ - électrode Modifiée	DPASV	Cd (II)	0.14 μM	1,05 $\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$	[32]
		Pb (II)	0.04 μM	0,99 $\mu\text{A}/\mu\text{g L}^{-1}$	
Nafion-MPCS-CO-Cys-ECV	SWASV	Cd (II)	0.5 μM	2.86 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	[33]
		Pb (II)	0.1 μM	2.29 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	
ECV-SWCNTs-CO-Biomasse	DPASV	Cd (II)	0.1 μM	17.889 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Ce travail
		Pb (II)	0.01 μM	21.983 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	

III.A.4.4. Étude d'interférence

Après avoir démontré la faisabilité des matrices développées pour la détection de certains ions de métaux lourds, nous avons étudié la technique de potentielle pour la quantification de quelques ions de métaux lourds. Le potentiel de préconcentration est un paramètre important pour les techniques analytiques qui a une influence significative sur la sensibilité de la détermination des métaux lourds. Le potentiel pour la détection de deux ions métalliques a été démontré par le voltammogramme de l'électrode modifiée (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) après accumulation dans une solution de 10^{-5} M contenant un mélange d'ions (Cd (II) et Pb (II)). Les voltammogrammes résultants présentent des pics proéminents et bien résolus sous les paramètres optimisés comme montré sur la **Figure III.17**. Des pics de

redissolution notables et distincts ont été observés pour différents ions de métaux lourds testés, accumulés sur l'électrode de carbone vitreux fonctionnalisée par une couche de (SWCNTs-CO/Biomass). Aucune variation de courant n'a été détectée pour l'ECV nu traité dans des conditions similaires. Cette variation de courant peut être attribuée à la liaison de haute affinité entre la couche (SWCNTs-CO/Biomasse) et les ions métalliques accumulés.

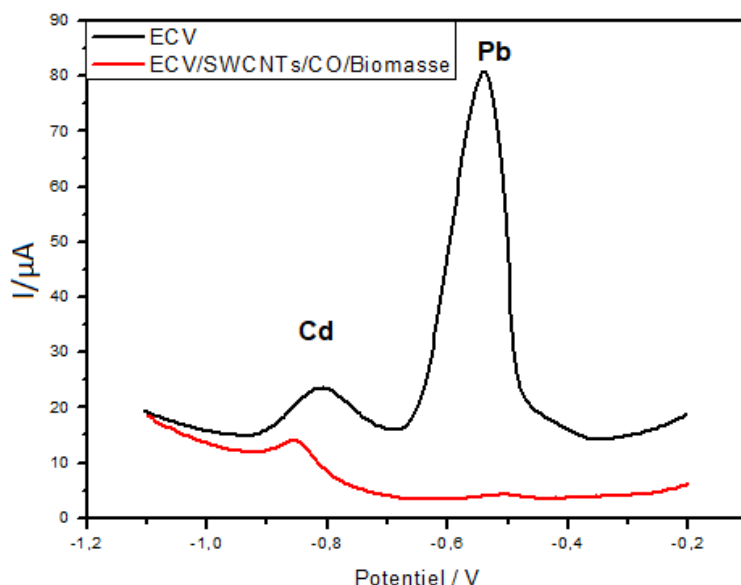


Figure III.17. Courbes de détection simultanée par DPASV de différentes concentrations des ions Cd(II) et Pb(II) accumulés sur ECV nue et modifié ECV/SWCNTs-CO-Biomasse

III.A.4.5. Répétabilité de l'électrode

Pour étudier les performances du (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse), une série d'expériences a été réalisée pour évaluer la répétitivité de la méthode dans la même solution contenant 10^{-5} mol L⁻¹ du plomb et du cadmium. Plusieurs électrodes modifiées ont été testées sur une période de quatre semaines. Le **Tableau III.5** montre les résultats obtenus, la déviation relative standard (DRS) du Cadmium et du Plomb a été respectivement de 5.2 % et de 3.6 %. La stabilité de l'électrode a été évaluée sur une électrode maintenue dans un tampon acétate et stockée à 4°C pendant six semaines. Ensuite, les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions citées auparavant. Les résultats obtenus ne montrent aucun changement significatif dans la réponse analytique, ce qui indique une stabilité acceptable.

Tableau III.5. Stabilité de la réponse du capteur pendant quatre semaines

Semaine	Ion	Sélectivité $\mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$
1	Cd(II)	17.889 ± 1.34
	Pb(II)	20.6 ± 0.78
2	Cd(II)	15.299 ± 1.21
	Pb(II)	19.99 ± 0.64
3	Cd(II)	14.969 ± 1.27
	Pb(II)	19.10 ± 0.71
4	Cd(II)	13.019 ± 0.79
	Pb(II)	17.51 ± 0.37

III.A.4.6. Analyse d'un échantillon réel

Pour tester la capacité du capteur (ECV-SWCNTs-CO/Biomasse), un échantillon d'eau réelle a été analysé. Les performances analytiques ont été évaluées en mesurant les concentrations en ions de métaux lourds dans les échantillons d'eau réelle. Les conditions DPASV ont été établies en utilisant un potentiel initial de -1 V, un potentiel final de 0 V et une amplitude de 50 mV. La réponse DPASV sur des échantillons d'eau réelle a été testée en utilisant les différentes concentrations du Cd (II) et Pb (II).

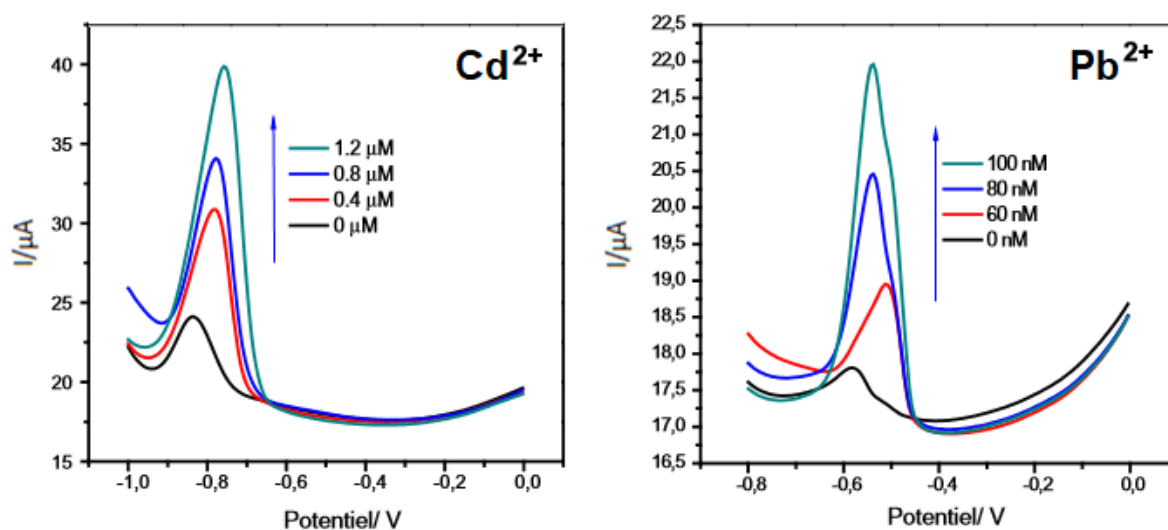


Figure III.18. La détection des ions Cd(II) et Pb(II) dans l'échantillon d'eau réelle par DPASV

Comme le montre la **Figure III.18**, des pics net peuvent être observés près de -0,78V et -0,58V respectivement. De plus, comme le montre le **Tableau III.6**, les bons résultats de l'expérience de récupération sont obtenus avec un taux dans l'intervalle de 95,3 à 106,5%. Ces bons résultats suggèrent que les capteurs proposés sont Potentiellement applicables à la surveillance de l'environnement.

Tableau III.6. Résultats de l'expérience de récupération

Échantillons	Pb(II) concentration (nM)			Cd(II) concentration (μ M)		
	ajoutée	trouvé	Récupération %	ajoutée	trouvé	Récupération %
1	-	50	-	-	0.22	-
2	60	63	105	0.4	0.426	106.5
3	80	78	97.5	0.8	0.794	99.2
4	100	95	95.3	1.2	1.258	104.8

III.A.5. Conclusion

Ce travail décrit un biocapteur électrochimique basé sur (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) comme ligand sélectif pour la détection du Cadmium et plomb. L'analyse DPASV utilisant les électrodes de film (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) ont été démontrées. Les paramètres de préconcentration (potentiel de dépôt et temps de dépôt) et le pH de la solution ont été optimisés. La sensibilité du biocapteur a été considérablement augmentée en raison de la capacité d'adsorption élevée et de la grande surface des SWCNTs. Le film (ECV/ SWCNTs-CO/Biomasse) présente une sensibilité, une sélectivité et une reproductibilité élevées pour les ions Cd (II) et Pb (II). Nos résultats suggèrent que ce système offre une grande promesse pour la détection simultanée et polyvalente d'une grande variété d'analytes importants.

Partie B

*Biocapteur ampérométrique à
acétylcholinestérase pour la
détermination d'aflatoxine B1*

III.B.1. Introduction

Plusieurs études de biocapteurs basées sur l'acétylcholinestérase (AChE) pour la détermination de l'aflatoxine B1 (AFB1) ont été proposées [34-36]. *Ben Rjeb et all* ont développé un biocapteur bio-électrochimique pour la détection de l'AFB1 dans l'huile d'olive, l'inhibition a été quantifiée par la méthode ampérométrique, la limite de détection a été atteinte 2 ppb [36]. *Arduini et all* ont conçu un biocapteur pour la détection d'AFB1 en utilisant l'enzyme (AChE), le degré d'inhibition a été déterminé par la méthode spectrophotométrique d'Ellman. La limite de détection obtenue est de 10 ng mL⁻¹ [37]. Un nouvel essai de biocapteur impédimétrique à base d'acétylcholinestérase (AChE) innovant et spécifique a été élaboré, pour la détection de l'aflatoxine B1 (AFB1) qui appartient à la classe des mycotoxines et qui est l'un des produits naturels les plus toxiques, puisqu'elle contamine fortement la nourriture humaine et les animaux [38]. La toxicité sévère de l'AFB1 rend indispensable la mise au point de méthodes d'analyse rapides, sensibles et spécifiques. Des méthodes largement utilisées pour identifier les substances toxiques dans l'industrie alimentaire, telles que la chromatographie en couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), l'électrophorèse capillaire (CE), et une variété de tests immunologiques [39]. Les biocapteurs sont des alternatives pour la détection des aflatoxines, les principaux avantages étant une sensibilité et une spécificité élevées, une rentabilité, une rapidité et une détection portable [40]. L'acétylcholinestérase (AChE), est l'enzyme la plus utilisée de nos jours dans ces biocapteurs, en raison de sa sensibilité à un certain nombre de substances toxiques, de pesticides et de glycoalkoloroïdes [41]. Son activité catalytique est très élevée, chaque molécule d'AChE dégrade environ 25 000 molécules d'ACh par seconde en choline et acide acétique [42], est inhibée par AFB1 [43].

L'alginat de sodium, un excellent biopolymère, est un polysaccharide linéaire extrait des algues naturelles. L'alginat de sodium est un adsorbant très prometteur qui a été préféré à d'autres matériaux pour ses avantages divers tels que la biodégradabilité, les propriétés hydrophiles, l'origine naturelle, l'abondance et la présence de sites de liaison en raison de ses fonctions carboxylates [44]. De plus, il possède des propriétés uniques telles que non-toxicité, biocompatibilité et capacité de chélation [45]. Enfin, les membranes modifiées en alginat de sodium peuvent fournir un microenvironnement favorable aux molécules d'enzyme, améliorant ainsi la stabilité de l'enzyme, en maintenant sa bio activité et en prolongeant sa durée de

stockage [46-51]. Dans ce travail, nous développons un biocapteur impédimétrique à base d'AChE pour l'analyse inhibitrice d'AFB1 qui utilise des électrodes en or modifiées par un biopolymère d'alginate de sodium. Nous explorons l'effet d'un polymère hydrophile d'alginate de sodium sur l'immobilisation et la fonctionnalité d'AChE. En utilisant la voltampérométrie à signaux carrés (SWV), une technique d'analyse performante, utilisée dans différents domaines de recherche, tels que l'étude des caractéristiques de réactions chimiques interfaciales et l'interprétation des processus électrochimiques [52]. Cette technique (SWV) a été utilisée avec succès pour la détection directe de petites molécules, mais jusqu'à présent, aucun document ne la décrit pour la détection de l'AFB1. L'avantage de cette technique est sa rapidité, sa limite de détection très faible, sa sensibilité, meilleure précision, et la réduction du temps de mesure.

III.B.2. Choix de biorécepteur et de transducteur

D'après l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un biocapteur est un dispositif intégré défini comme un outil analytique associant un élément de reconnaissance biologique (enzyme, anticorps, antigène, ADN, ARN, microorganisme...) appelé biorécepteur à un système physique, le transducteur, qui convertit la modification biochimique survenue au niveau du biorécepteur en un signal électrique [53] aisément exploitable à l'aide d'un traitement d'information adéquate. Il existe un grand nombre de biorécepteurs et de transducteurs dans la littérature, le choix est fait en fonction de l'application finale du biocapteur et des contraintes du problème. La nature des biorécepteurs est très variée et il existe autant de biorécepteurs que d'analytes potentiellement détectables. Le transducteur est choisi en fonction de la modification biochimique. Les plus courants sont de type électrochimique où le transducteur est une électrode.

III.B.3. Caractérisation des algues brunes étudiées

Les caractéristiques physicochimiques des polysaccharides telles que la composition en sucre et la masse moléculaire dépendent fortement de la méthode d'extraction utilisée. Fondamentalement, les objectifs de l'extraction des polysaccharides sont d'en récupérer la plus grande quantité sans en modifier la structure, et d'avoir des échantillons hautement purifiés.

III.B.3.1. Rendements de l'extraction des fucoïdes et des alginates

Dans cette étude, l'extraction des polysaccharides des algues brunes *C. sedoides*, *C. crinita* et *C. compressa* a été réalisée selon la méthode de Rioux *et al.* L'extraction à chaud, en présence de CaCl_2 a permis de séparer l'alginate de calcium insoluble de la fraction soluble. Cette dernière est riche en fucoïdes mélangés aux laminarane et les sels. Afin de récupérer les fucoïdes uniquement, nous avons eu recours à la dialyse. Les boyaux de dialyse ayant un seuil de coupure à 30 KDa vont laisser passer les sels, les protéines de petites tailles et les laminaranes dont le poids moléculaire ne dépasse pas les 5 KDa.

Cette extraction se fait également en milieu acide pour dissocier les gels d'alginate de calcium et magnésium qui sont présents dans les parois cellulaires et qui empêchent l'extraction. Les rendements d'extraction des fucoïdes et des alginates de sodium sont déterminés et présentés dans le (Tableau III.7). Les résultats montrent que l'algue *C. compressa* est la plus riche en alginates avec 17,5%. Elle est aussi la plus riche en fucoïdes avec un rendement de 3,7% qui est légèrement supérieur que ceux des autres algues.

Tableau III.7. Rendements de l'extraction des fucoïdes et des alginates pour les algues brunes *Cystoseira compressa*, *Cystoseira sedoides* et *Cystoseira crinita*

Algues brunes	Rendement d'extraction %	
	Fucoïdes	Alginate de sodium
<i>C. sedoides</i>	3,3	11
<i>C. crinita</i>	2,8	17
<i>C. compressa</i>	3,7	17,5

III.B.3.2. Analyse des échantillons extraits par IRTF

Les spectres infrarouges des polysaccharides issus des algues brunes *C. sedoides*, *C. crinita* et *C. sedoides* sont déterminés en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (*Perkin-Elmer BX FTIR*). Chaque échantillon est broyé avec la poudre de KBr puis comprimé en pastilles. Les mesures sont réalisées dans une gamme de fréquences

de 4000 à 400 cm^{-1} . L'exploitation de ces spectres a permis d'une part d'identifier les bandes correspondant au squelette de base des résidus osidiques, et d'autre part de révéler la présence des groupements marqueurs de certaines catégories de polysaccharides tels que la présence et la position des groupements sulfates et la présence d'oses particuliers comme les acides uroniques.

Les spectres IR enregistrés pour les alginates de sodium extraits à partir des algues brunes *C.sedoides*, *C.crinita* et *C.compressa* sont présentés dans la **Figure III.19**.

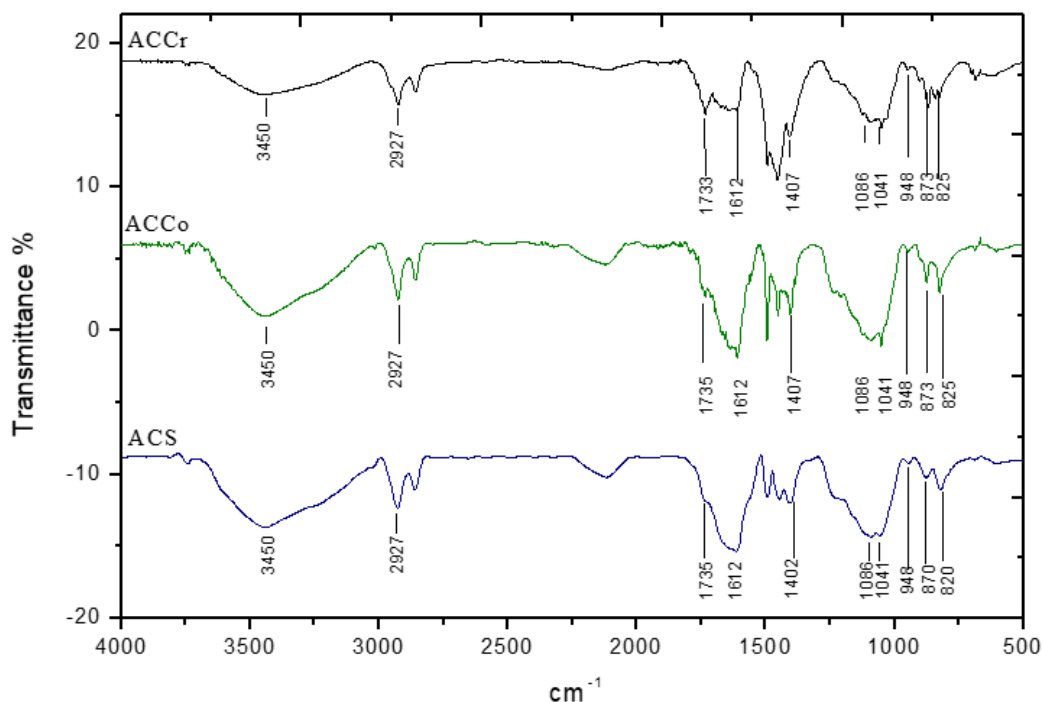


Figure III.19. Spectres IRTF des échantillons ACS, ACCr et ACCo

La région de 3600 à 1600 cm^{-1} est marquée par la présence des bandes suivantes, une large bande centrée à 3450 cm^{-1} attribué aux vibrations d'élongation des liaisons hydroxyles lié et une bande de faible intensité centrée vers 2927 cm^{-1} attribuable aux vibrations d'élongation des liaisons C-H. Les bandes intenses centrée aux alentours de 1612 et 1400 cm^{-1} correspondent respectivement aux groupes C=O et C-O ce qui confirme la présence des groupes carboxylates. De plus, les bandes fines et fortes centrée vers 1087 et 1041 cm^{-1} correspondent respectivement à la vibration des liaisons C-O-C et C-OH, suggérant ainsi la présence de cycles osidique. Les spectres enregistrés montrent une bande à 948 cm^{-1} , attribuée à la vibration d'élongation des liaisons C-O de résidus d'acides uroniques [54-55]. De plus, la bande centrée vers 870 cm^{-1}

peut être attribuée à la vibration de la déformation du lien C1-H des résidus de l'acide mannuronique [55].

III.B.4. Caractérisations électrochimiques des électrodes modifiées

III.B.4.1. Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La topologie de la surface de l'électrode d'or nue et modifiée avec un bio polymère d'alginate de sodium a été réalisée en utilisant Microscopie Electronique à Balayage par émission de champ (MEB) JSM 5100 provenant des images JEOL (JSM-SEM) est obtenu avec un poste de travail entièrement contrôlé par ordinateur. La **Figure III.20.** donne la morphologie du film du bio polymère déposé sur l'électrode d'or. On observe que l'alginate de sodium couvrait toute la surface. Le biofilm déposé présente une densité plus élevée, homogène et plus rides, mais une faible porosité.

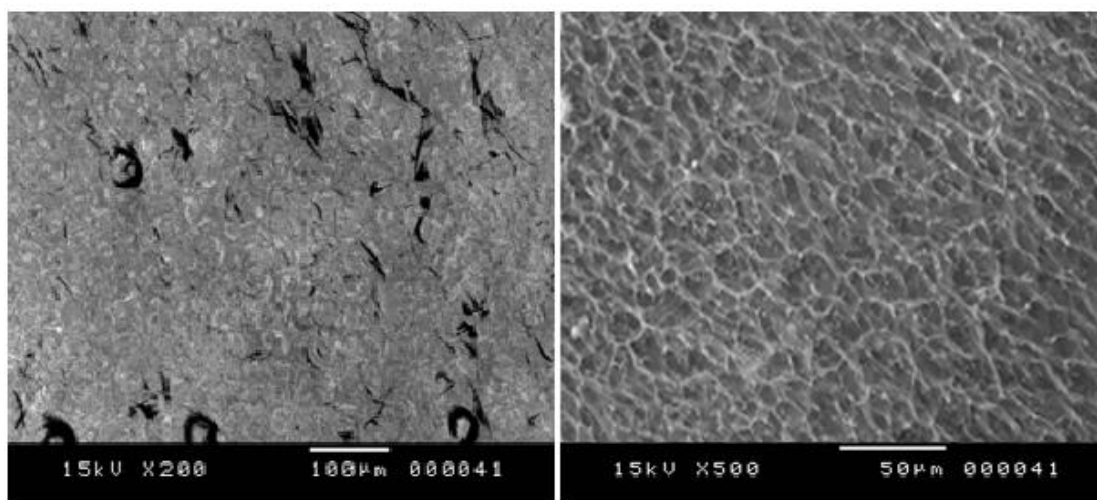


Figure III.20. Image en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) d'une électrode d'or nue et modifiée par un biofilm d'alginate

III.B.4.2. Caractérisation électrochimique des interfaces électrodes /électrolytes modifiées

Les électrodes modifiées par l'alginate de sodium ont été caractérisées par voltammétrie cyclique (CV), le potentiel étant cyclé de -400 et +600 mV à une vitesse de balayage de 100 mV s⁻¹ jusqu'à ce que plusieurs courbes consécutives soient superposées. Une solution saline tampon phosphate (PBS, 20mM, pH 7,0) contenant 5 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} a été choisie comme électrolyte. La caractérisation faradique (EIS) de l'électrode modifiée a été effectuée en couple,

5mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ avec 20mM PBS (pH 7,0), en appliquant une légère modulation sinusoïdale (amplitude 10 mV), en faisant varier la fréquence dans la plage de 100 MHz à 100 kHz et en acquérant 5 points par décennie. Une tension d'excitation de 10 mV a été superposée au système sur un potentiel continu au potentiel d'un circuit ouvert. Après chaque mesure, la solution d'électrolyte a été rafraîchie, et les électrodes ont été lavées avec de l'eau ultra pure pour éliminer tout résidu.

III.B.4.2.1. Caractérisation par voltammétrie cyclique

Après modification, l'électrode de travail est soigneusement nettoyée dans un bain ultrason pendant 5 min pour éliminer les molécules adsorbées à la surface de l'électrode et rincée avec l'eau distillée avant d'être étudiée en présence d'une solution redox. En effet, une solution aqueuse de ferri/ferrocyanure de potassium ($5 \cdot 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$) est préparée à partir d'une solution de PBS (10^{-1}M) et versée dans la cellule électrochimique équipés de trois électrodes. Le système est soumis à une voltampérométrie cyclique de -400 mV à 600 mV à une vitesse de balayage de 100mV.s^{-1} . Dans un premier temps, une voltampérométrie est enregistrée sur une surface d'or nue et fonctionnalisée par un biopolymère d'alginate (**Figure III.21**).

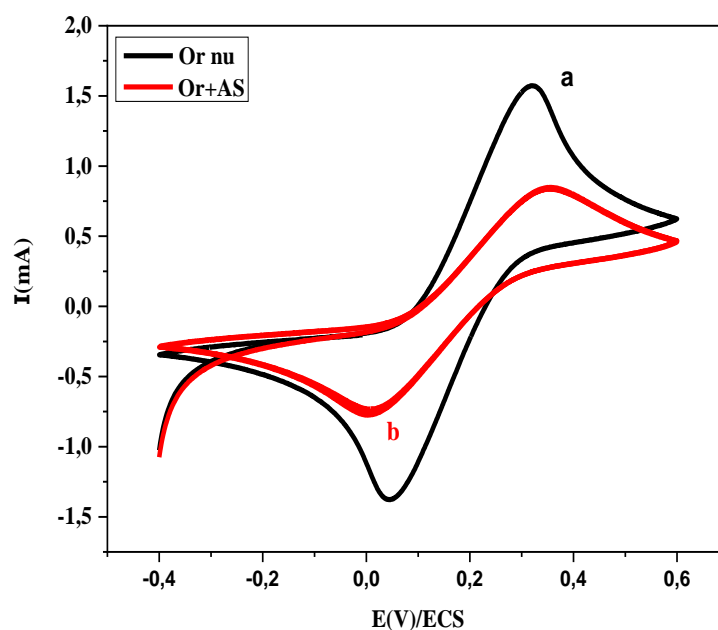


Figure III.21. Mesure par Voltammétrie cyclique à $V = 100 \text{mVs}^{-1}$, en présence de 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$: (a) or nue, (b) or modifié par 15 μL Alginate de sodium

Sur l'électrode d'or nue la courbe obtenue (**Figure III.21(a)**) présente un pic quasi-réversible caractéristique de l'oxydo-réduction du couple redox à la surface de l'électrode. Les valeurs de I_{pa} et E_p sont de $1630\mu A$ et 261 mV (**courbe a**). La réduction électrochimique est en revanche très fortement ralentie par l'alginate (**courbe b**) puisqu'aucun pic anodique ou cathodique n'est observé dans la gamme des potentiels utilisés. Une diminution du courant de pointe de la sonde redox ($760\mu A$) associée à une augmentation d' E_p ($E_p = 750\text{ mV}$) a été observée. On devrait s'attendre à cette variation en raison de l'effet de blocage de la couche dense de l'alginate de sodium et du (COO^-) chargé négativement sur la surface de l'électrode, ce qui confirme qu'une couche du biopolymère a été correctement formée à la surface d'électrode d'or, qui pourrait servir de barrière électrostatique et réduire la capacité des électrons de la sonde redox à atteindre la surface.

III.B.4.2.2. Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

L'EIS est une technique très puissante et sensible largement utilisée pour explorer les caractéristiques diélectriques et isolantes des interfaces électrode métal/électrolyte aqueux fortement influencées par la modification de la surface de l'électrode par les couches chimiques et biologiques [56]. Les mesures EIS ont été effectuées dans une solution tampon phosphate 20mM (PBS) pH 7.0 contenant 5mM de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. On considère que le film formé est stable et n'évolue pas pendant la mesure.

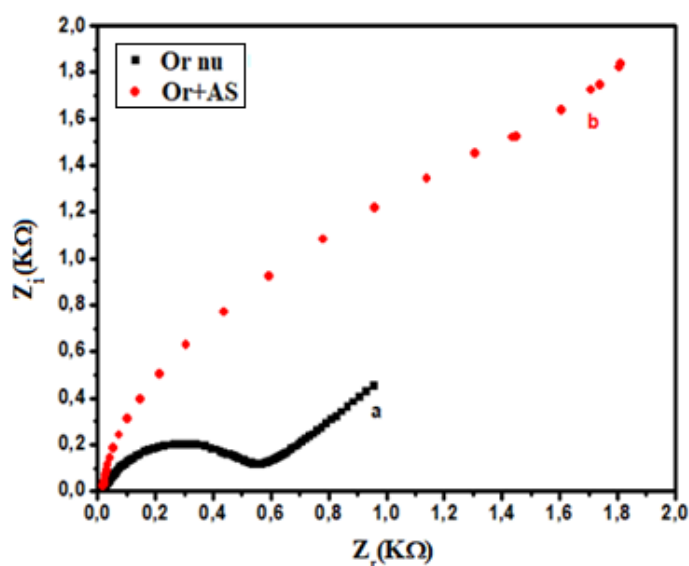


Figure III.22. Diagrammes de Nyquist obtenus dans une gamme de fréquence de 100 mHz – 100 kHz, en présence de 5mM de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, (a) or nue, (b) or modifié par 15 μL Alginate de sodium

Les diagrammes d'impédances obtenus sont représentés sur la **Figure III.22**. Le diagramme de Nyquist correspondant, présente comme attendu un demi-cercle suivi d'une droite (**Figure III.22(a)**). L'augmentation du diamètre du demi-cercle reflète l'augmentation de la résistance de transfert de charge interfaciale (R_{TC}) [57]. Pour l'électrode en or nu (**courbe a**), $R_{TC1} = 60\Omega$. Comme le montre la **Figure III.22(b)**, après le dépôt de la couche de (AS), le R_{TC2} augmente jusqu'à 160Ω (courbe b), ce qui est attribué à la formation de la couche de biopolymère dense. Le film (AS) rend plus difficile le transfert de charge interraciale. Ces résultats sont en bonne accord avec ceux obtenus à partir des mesures de (CV).

Les diagrammes de Nyquist de l'électrode modifiée peuvent ensuite être modélisés dans un circuit de Randles modifié qui prend en compte la présence du film formé par la fonctionnalisation (**Figure III.23**). Ce circuit électrique est composé de la résistance de la solution R_s , la résistance de transfert de charges R_{TC} , la capacité imparfaite de double couche entre l'électrode et l'ectrolyte (CPE), l'impédance de Warburg de diffusion (Z_W), la résistance du film R_f , et la capacité du film C_f . La détermination des différents éléments du circuit électrique équivalent (CEE) est réalisée à l'aide du logiciel Zview pour chaque diagramme de Nyquist enregistré.

Le logiciel Zview / Zplotmodeling compatible avec Windows (fourni par Scribner Associate Inc, Southern Pines, NC, USA) a été utilisé pour l'adaptation des spectres d'impédance Faradique correspondant au circuit équivalent.

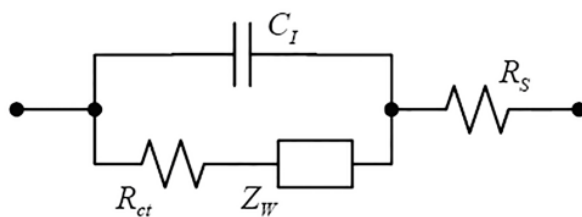


Figure III.23. Circuit électrique équivalent pour la modélisation de l'électrode fonctionnalisée

Les mesures d'impédances donnent également accès au taux de recouvrement en évaluant la présence de pores et de trous dans le film. Ce taux de recouvrement est calculé grâce à la résistance de transfert de charge de l'électrode d'or nu et de l'électrode fonctionnalisée par la relation suivante :

$$\theta = 1 - R_{TC1} / R_{TC2} = 62,5\%$$

III.B. 5. Réponse impédimétrique du biocapteur en présence de l'Aflatoxine B1

III.B.5.1. Détection du Thiocholine par l'enzyme acétylcholinestérase

Le fonctionnement du biocapteur est basé sur la réaction enzymatique se produisant dans la membrane d'acétylcholinestérase déposée sur la surface du transducteur. Le mécanisme de dégradation du (TCh) par l'enzyme est donné par le mécanisme suivant (**Figure III.24**).

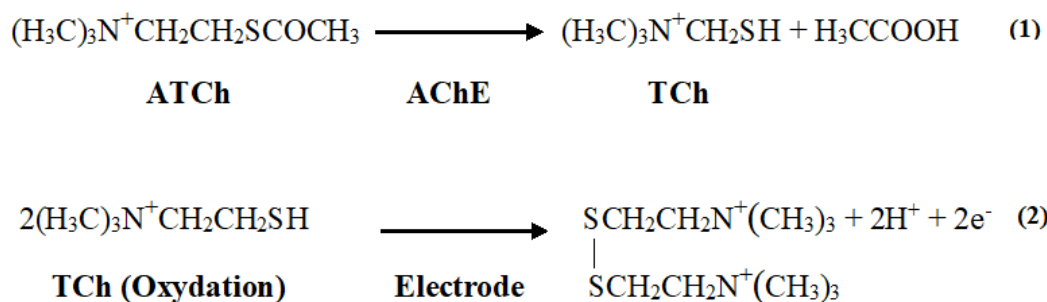


Figure III.24. Mécanisme de dégradation du substrat TCh par AChE

III.B.5.2. Principe d'inhibition de l'aflatoxine B1 par l'enzyme acétylcholinestérase

Parmi les réactions de détection complexes, l'utilisation de substrat artificiel (ATCh) a attiré l'attention en raison de la conception simple du biocapteur, de la stabilité à l'oxydation chimique, l'hydrolyse spontanée, et une voie de détection en une seule étape [58].

Pour les inhibiteurs irréversibles, l'interaction enzyme-inhibiteur entraîne la formation d'une liaison entre le centre actif enzymatique et l'inhibiteur. Le terme irréversible signifie que la décomposition du complexe inhibiteur-enzyme entraîne la destruction de l'enzyme, par exemple : Oxydation par hydrolyse. La procédure d'inhibition est illustrée dans la **figure III.24**. Si l'inhibiteur n'est pas présent dans le système, (ATCh) serait transformé en thiocholine et acide acétique, tel que présenté dans l'équation 1. Si l'inhibiteur existe dans la solution d'essai, la concentration de la thiocholine est complètement diminuée, c'est-à-dire que la thiocholine et l'acide acétique ne se forment pas ; autrement dit, il inhibe absolument la conversion.

Pour détecter l'aflatoxine B1 par inhibition, il était nécessaire de déterminer une concentration optimale d'ATCh comme substrat pour une analyse inhibitrice. Il est connu que pour une analyse de biocapteur basée sur une inhibition réversible, la valeur de la concentration de substrat de travail se situe souvent dans une plage correspondant à la partie linéaire d'une courbe d'étalonnage du biocapteur utilisé.

III.B.5.3. Réponse du biocapteur en présence du substrat Thiocholine

La réponse impédimétrique du biocapteur est donnée après injection de différentes concentrations d'ATCh dans PBS (**Figure III.25**).

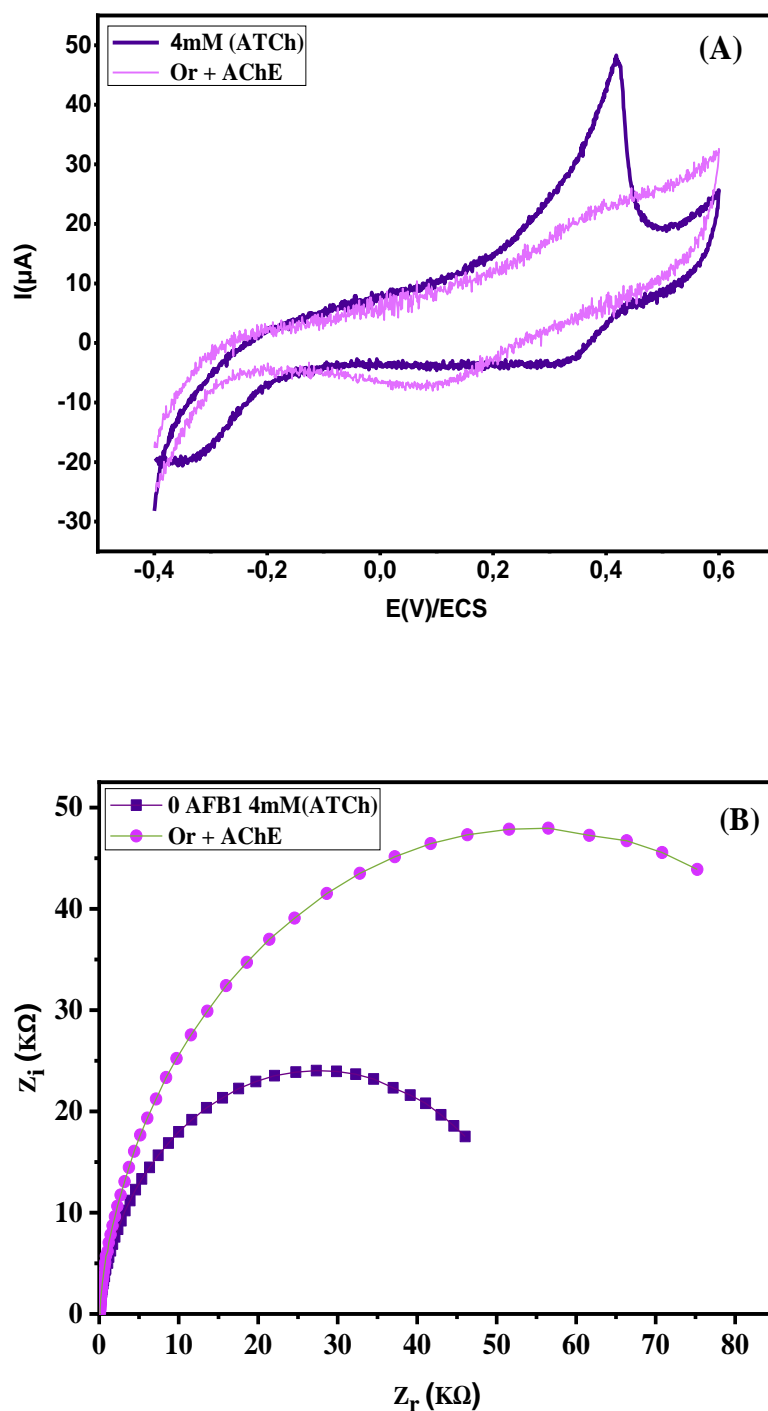
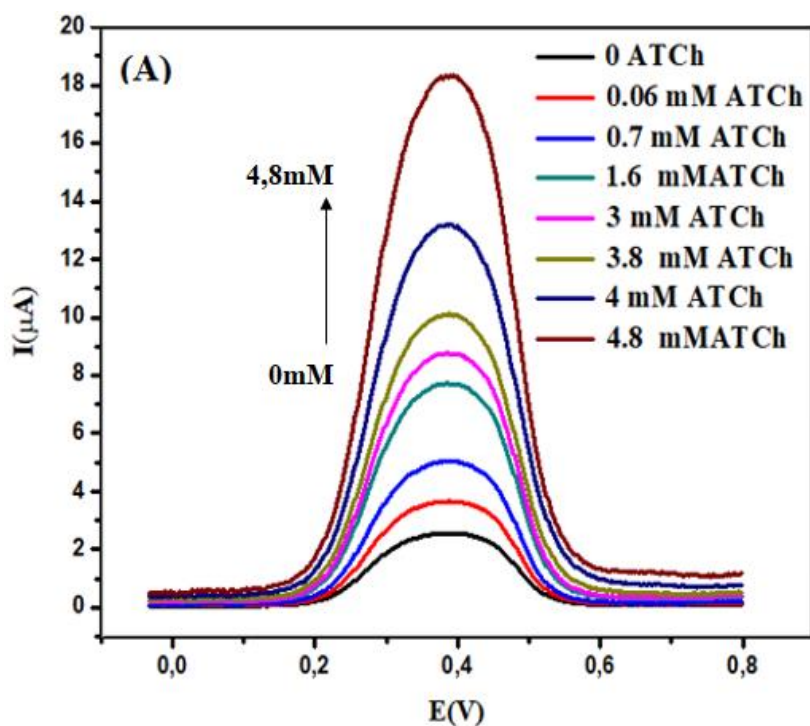


Figure III.25. (A) Voltammogrammes obtenus dans une solution de PBS (0,1M), (B) Diagramme de Nyquist obtenu après addition d'une concentration de 4 mM d'AFB1 dans la solution de PBS (0,1M)

Le comportement électrochimique de l'électrode modifiée Or/AS/AChE a été étudié par voltampérométrie cyclique (CV) et EIS avec une vitesse de balayage de 50 mV/s. la (**Figure III.25.A**), montre les (CV) de l'électrode Or/AS/AChE sans ATCh (courbe **A**) et après l'injection de 4 mM de solution d'ATCh (courbe **B**) dans 0,1 M de PBS (pH = 7,0). En absence d'ATCh, aucun pic redox n'apparaissait entre 0,2 et 0,6 V, ce qui confirme la stabilité de l'électrode Or/AS/AChE. Après avoir ajouté 4 mM de solution ATCh, un pic d'oxydation plus élevé a été obtenu à un potentiel de 0,49 V [59] avec une augmentation significative du courant, indiquant que l'électrode Or/AS/AChE, présente une activité électro-catalytique vis-à-vis l'ATCh. Ce pic est dû à l'oxydation du thiocholine (TCh). Ces résultats montrent le succès d'immobilisation d'AChE sur l'électrode à film Or/AS et l'effet du biopolymère dans l'immobilisation et la fonctionnalité de l'AChE. Sous l'influence de l'application tension, la thiocholine est oxydée. Le courant d'oxydation anodique est inversement proportionnel à la concentration de complexes toxiques dans l'échantillon et au temps de contact.

La **Figure III.26(A)** montre que le courant augmente avec l'augmentation de la concentration [ATCh]. Un pic anodique centré à 0,4V est observé, caractéristique de l'oxydation directe de la thiocholine. La courbe d'étalonnage, est obtenue en fonction de la concentration d'acétylthiocholine [ATCh].



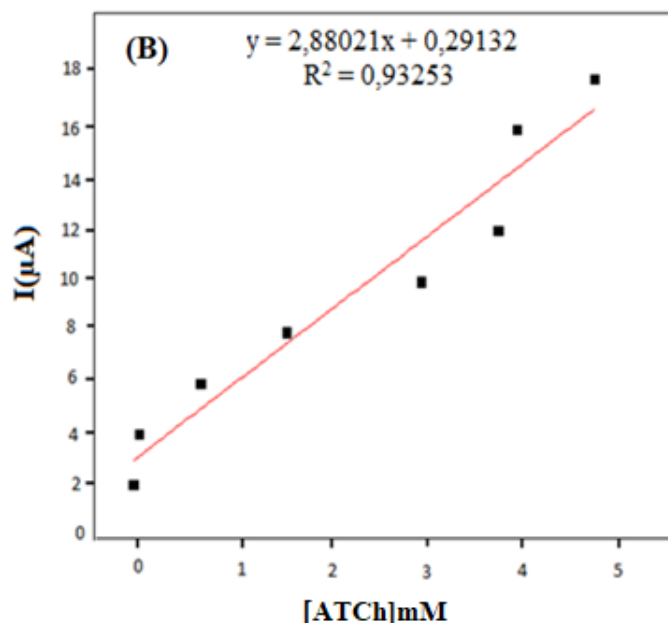


Figure III.26. (A) Diagrammes (SWV) de l'électrode modifiée Or/AS/AChE dans différentes concentrations d'ATCh (0 à 4,8 mM) dans PBS (0,1 M, pH 7,0) ; (B) Courbe d'étalonnage de l'électrode modifiée Or/AS/AChE (dans PBS 0,1 M, pH 7,0)

La **Figure.III.26(B)** montre une linéarité jusqu'à une concentration 4,8 mM d'ATCh. Une fois la plage déterminée, il est nécessaire de trouver une concentration optimale de chlorure d'acétylthicholine comme substrat pour une analyse inhibitrice supplémentaire. Le biocapteur atteint la sensibilité élevée pour la détection de l'aflatoxine B1 à la concentration d'ATCh de 0,01 à 4,95 mM. Pour la détection de mycotoxine AFB1, nous avons utilisé seulement 4 mM d'ATCh comme substrat, car la réponse du biocapteur à cette concentration est suffisamment grande et que sa valeur réside dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage.

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme (I%) a été évalué en comparant les réponses du biocapteur à la concentration du substrat avant (A_0) et après l'inhibition (A_i) selon la formule

$$I\% = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \times 100\%$$

L'inhibition de l'activité AChE (I%), est proportionnelle à la concentration de l'AFB1, ceci est due à une diminution de la quantité de thiocholine et de l'accrochage de la mycotoxine AFB1 au site AChE. Une inhibition non compétitive se produit probablement au cours de cette détection [60]. La totalité du cycle de mesure dure moins de dix minutes, ce qui représente un avantage important dans les essais rapides sur le terrain.

✚ Détection de l'aflatoxine par voltampérométrie à ondes carrées (SWV)

La méthode de transduction choisie pour détecter l'aflatoxine B1 est la voltampérométrie à ondes carrées, qui présente l'avantage d'améliorer la sensibilité non seulement par une augmentation du rapport courant faradique/courant capacitif mais également par la réduction du temps de mesure. Toutes les mesures ont été réalisées en présence du couple redox 3mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans un tampon phosphate salin (PBS). L'optimisation des paramètres électrochimiques a été réalisée dont le but d'avoir une meilleure sensibilité du biocapteur avec une faible limite de détection.

Les réponses du biocapteur impédimétrique en présence de différentes concentrations de l'aflatoxine B1 de 0.01 à 100 ng/mL sont représentées par les diagrammes (SWV) (**Figure III.27**). Les mesures ont été réalisées dans une gamme de fréquence allant de 100 mHz jusqu'à 100 kHz en présence du couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ comme sonde redox dans PBS à pH=7.

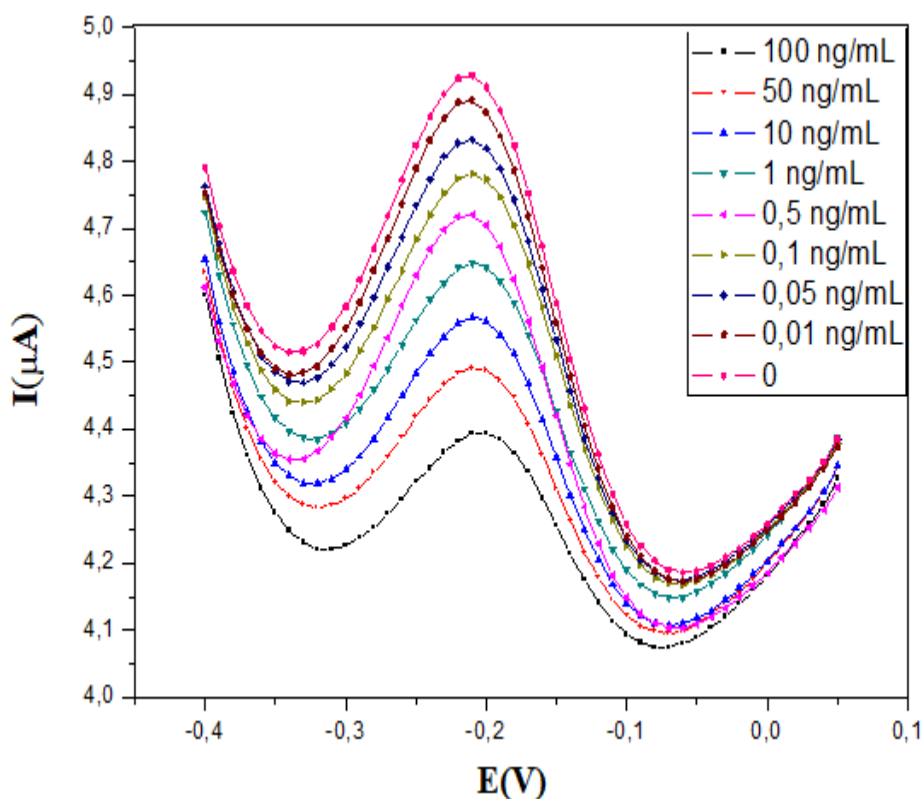


Figure III.27. Voltampérométrie à signaux carrés de potentiel (SWV) à différentes ajouts de concentrations d'AFB1 (0-100 ng/mL)

III.B.5.4. Calibrage du biocapteur AFB1

La courbe donnant le pourcentage d'inhibition (I%) en fonction de la concentration AFB1 (allant de 0,01 ng/mL à 100 ng/ml) est présentée dans la **Figure III.28**. On observe que, pour une concentration d'Aflatoxine B1 comprise entre 0,01 ng/mL à 100 ng/mL, l'inhibition augmente de manière linéaire avec une équation $y = 0,2107 \ln(x) + 0,1006$ et un bon coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9688$). La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant un temps d'incubation de 10 min. La limite de détection définie par une concentration donnant une inhibition de 5 %, est de 0,01 ng / mL AFB1. Cette valeur est sous la limite légale du règlement de la communauté européenne pour l'alimentation humaine, qui est de 2 ppb [61].

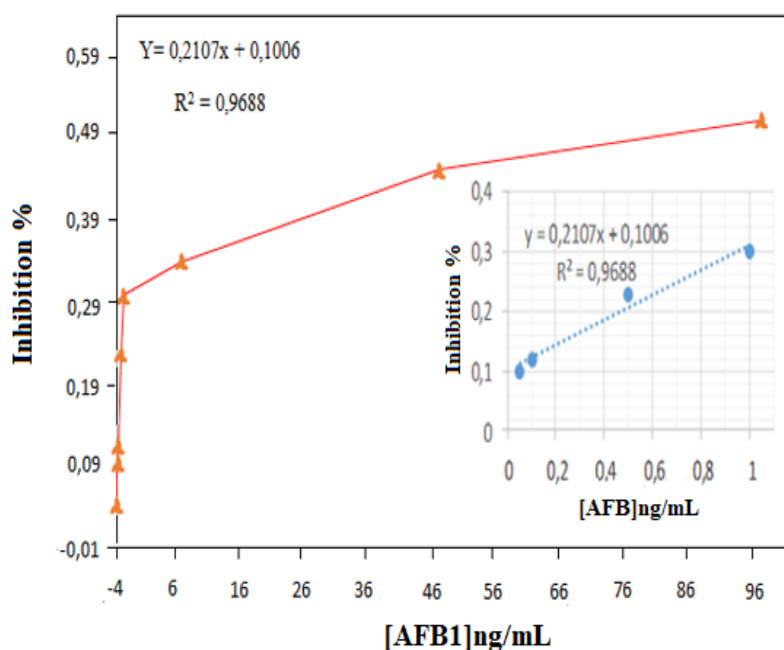


Figure III.28. Courbe de calibration de [AFB1]

III.B.5.5. Comparaison des performances de notre biocapteur a des travaux antérieurs

Une étude comparative a été réalisée pour différentes méthode de détection de l'aflatoxine AFB1 basée sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase, à savoir l'utilisation du biocapteur impédimétrique à base d'AChE développé, avec d'autres méthodes existantes. Les plus courantes de ces dernières sont les méthodes ampérométrique, potentiométrique, spectrophotométrique d'Ellman et conductimétrie. Nous avons comparé les caractéristiques

principales, c'est-à-dire la nécessité de prétraitement des échantillons, le temps d'analyse et la limite de détection des aflatoxines (**Tableau III.8**).

Tableau III.8. Etude Comparative de différentes méthodes de détection d'aflatoxine B1

Biocapteurs	Méthode	Limite de détection	Réactivation	Temps de détection
Choline oxydase [62]	Ampérométrique	10-60 ppb	Phosphate buffer pH=7.4	15min
Acétylcholinestérase [63]	Potentiométrique	0.2- 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Phosphate buffer pH=7	20min
Acétylcholinestérase [64]	Conductimétrique	0.05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Phosphate buffer pH=6,5	20min
Acétylcholinestérase [65]	spectrophotométrique d'Ellman	10-60 ng-mL ⁻¹	Phosphate buffer pH=7	3 min
Acétylcholinestérase [66]	Ampérométrique	4.8ppb	Phosphate buffer pH=7	10 min
Acétylcholinestérase Ce travail	Impédimétrique	0.1 ng/mL	Phosphate buffer pH=7	10min

III.B.5.6. Sensibilité et reproductibilité du biocapteur

La courbe d'étalonnage nous a permis de calculer la sensibilité de notre biocapteur pour la détection de l'aflatoxine B1. La sensibilité qui correspond à la pente de cette partie linéaire est 0,2107 μA et le coefficient de corrélation est de 0,9688 (**Figure III.28**). Pour s'assurer que le signal du biocapteur diminue après l'introduction de l'aflatoxine dans la solution testée en raison de l'inhibition de l'élément bio sélectif et non du fait d'un courant instable et l'erreur de mesure, nous avons testé l'une des caractéristiques les plus importantes des biocapteurs à savoir la reproductibilité opérationnelle. La reproductibilité du biocapteur a été étudiée en répétant les expériences avec trois biocapteurs différents préparés dans les mêmes

conditions expérimentales. Au cours des mesures, le biocapteur a été conservé dans le tampon sous agitation et lavage continus (deux fois deux minutes). Le biocapteur développé est caractérisé par des signaux hautement reproductibles obtenus lors de la détermination directe du substrat principal, ainsi que par addition d'aflatoxine B1, l'erreur ne dépasse pas les 9 %.

III.B.5.7. Sélectivité du biocapteur pour l'aflatoxine B1

La sélectivité du biocapteur impedimétrique développé pour d'autres mycotoxines a également été étudiée. La **Figure III.29** montre les résultats expérimentaux du biocapteur développé AChE à AFB1, l'ochratoxine A (OTA) et l'Aflatoxine M1 (AFM1). Le biocapteur a été inhibé avec tous les groupes de substances toxiques mais de différentes façons. La plus grande sensibilité a été observée à l'aflatoxine AFB1 (67 k Ω /dec).

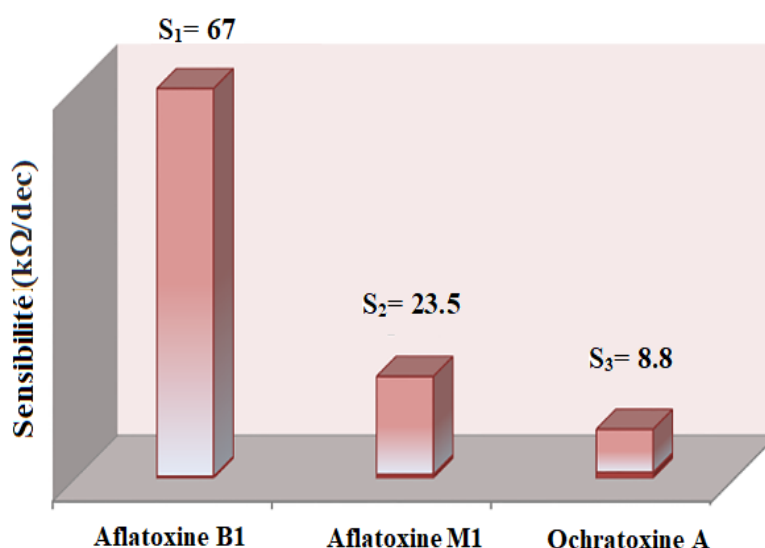


Figure III.29. Sélectivité du biocapteur en présence de l'Aflatoxine M1 et Ochratoxine A

III.B.5.8. Détection de l'Aflatoxine B1 dans un échantillon de lait

Pour tester les performances de notre biocapteur développé on a utilisé trois échantillons de lait écrémé, demi écrémé et entier. La préparation des solutions consiste à faire l'écémage pour séparer la matière grasse du lait par la centrifugation pendant 15 min à 6000 tr/min [67-68]. Après la séparation des deux phases. L'échantillon de lait écrémé a été récupéré et testé directement. Les concentrations de l'AFB1 ont été obtenues à partir de la courbe de calibration. Les résultats obtenus dans les trois échantillons sont donnés dans le tableau ci dessous :

Tableau III.9. Détection de l'aflatoxine B1 dans trois échantillons de lait : écrémé, demi écrémé et entier

Echantillons	AFB1 (ng/mL)	Taux de recouvrement \pmRSD %
Ecrémé	0.51	102\pm4
Demi-écrémé	0.49	98\pm5
Entier	0.48	96\pm4

III.B.6. Conclusion

Un nouveau biocapteur impédimétrique pour la détermination inhibitrice de l'aflatoxine B1 a été mis au point. L'acétylcholinestérase (AChE) en tant que bioélément de détection a été immobilisée en utilisant une matrice polymère hydrophile et biocompatible à base d'alginate de sodium sur une électrode en or. Les paramètres de travail des biocapteurs AChE pour l'analyse AFB1 ont été étudiés et optimisés. En conséquence, une sensibilité élevée pour la détection de l'aflatoxine B1 a été obtenue dans une plage dynamique allant de 0,01 à 100 ng/ml avec une limite de détection de 0,01 ng/ml. Cette limite de détection très basse montre l'avantage du système impédimétrique développé pour la détection AFB1 par rapport à d'autres méthodes d'analyse telles que la technique spectrophotométrique. La facilité d'exécution et la rentabilité du système proposé pour la détection de l'AFB1 et les bons résultats obtenus en termes de récupération dans des échantillons réels montrent le potentiel élevé de cette analyse en tant que procédure de dépistage pour la détection de l'AFB1 dans le lait (écrémé, demi-écrémé et entier) comme exemple d'application.

Références Bibliographiques

- [1] Akujobi CO, Odu NN, Okorundu SI. Bioaccumulation of lead by *Bacillus* species isolated from pig waste, *J Biol Res*, 2: 83-9, **2012**.
- [2] Augusto Costa AC, Pereira Duta F, Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*, *Braz. J. Microbiol*, 32: 32-50, **2001**.
- [3] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla and D.J. Sutton, *Pmc*, Doi: 10.1007/978-3-643-8340-4_6, 101, 133, **2014**.
- [4] El Hachimi ML, Fekhaoui M, Abidi AE, Rhoujatti A, Contamination des sols par les métaux lourds à partir de mines abandonnées : le cas des mines Aouli-Mibladen-Zeïda au Maroc. *Cah Agric*, Doi: 10.1684/agr.2014.0702, 23: 213-9, **2014**.
- [5] G. Aragay, J. Pons, A. Merkoci, Recent Trends in Macro-, Micro-, and Nanomaterial-Based Tools and Strategies for Heavy-Metal Detection, *Chem. Rev*, 111, 3433–3458, **2011**.
- [6] L. Cui, J. Wu, H. Ju, Electrochemical sensing of heavy metal ions with inorganic, organic and bio-materials, *Biosens. Bioelectron*, 63, 276–286, **2015**.
- [7] Z. Yanaz, H. Filik, R. Apak, Development of an optical fibre reflectance sensor for lead detection based on immobilized arsenazo III, *Sens. Actuators B Chem. B*, 147, 15–22, **2010**.
- [8] M. Pohanka, K. Kuca, D. Jun, Optimization of acetylcholinesterase immobilization onto screen-printed platinum electrode. *J. Appl. Biomed*, 6, 27-30, **2008**.
- [9] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry, *Anal. Chem*, 72, 3218–3222, **2000**.
- [10] E.P. Achterberg, C. Braungardt, Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters, *Anal. Chim. Acta*, 400, 381–397, **1999**.
- [11] E.T. Thostenson, T.W. Chou. *J. Phys. D J Phys D Appl Phys*, 35, 77–L80, **2002**.
- [12] a) C.N.R. Rao, B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, *Chemphyschem*, 2, 78,105, **2001**; b) P. J. F. Harris, *Carbon Nanotubes and Related Structures: New Materials for the Twenty-first Century*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1999**; c) R. Saito, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Physical Properties of Carbon Nanotubes*, Imperial College Press, London, **1998**.
- [13] A. K. Feldman; M. L. Steigerwald, X. Guo, C. Nuckolls. *Acc. Chem. Res*, 41(12), 1731–1741, **2008**.
- [14] Z. Chen, Appenzeller, J, Knoch, Y-M. Lin, P. Avouris, *Nano Lett*, 5 (7), 1797-1502, **2005**.
- [15] D. Duygu, T. Baykal, D. Açıkgöz, K. Yildiz, Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies, *J. science*, 22, 117-121, **2009**.
- [16] M. Wenning, S. Scherer, Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 97, 7111-7120, **2013**.
- [17] L.H. Tang, Y. Wang, Y.M. Li, H.B. Feng, J. Lu, J.H. Li, *Adv. Funct. Mater*, 19, 2782–2789, **2009**.
- [18] M. Wang, L. Wang, G. Wang, X. Ji, Y. Bai, T. Li, S. Gong, J. Li, Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody–antigen reactions, *Biosens. Bioelectron*, 19, 575-582, **2004**.
- [19] A. Ayoub. M. Boubié. P-L. Guel, Fabre, Electrochemical behaviour of iron (II) at a Nafion-1, 10-phenanthroline-modified carbon paste electrode: assessing the correlation between preconcentration potential, surface morphology and impedance measurements, *J. (SOACHIM)*, 039, 41-56, **2015**.
- [20] K. Zinoubi, H. Majdoub, H. Barhoumi, S. Boufi, N. Jaffrezic-Renault, Determination of trace heavy metal ions by anodic stripping voltammetry using nanofibrillated cellulose modified electrode, *J. Electroanal. Chem*, **2017**.

- [21] Y. Oztekina, M. Toka, H. Nalvuran, S. Kiyak, T. Gover, Z. Yazicigil, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper(II), *Electrochim. Acta*, 56, 387-395, **2010**.
- [22] M. Bourourou, H. Barhoumi, A. Maaref and N. Jaffrezic-Renault, Electrochemical Study of Modified Glassy Carbon Electrode with Carboxyphenyl Diazonium Salt in Aqueous Solutions, *Sensors and Transducers*, 27, 22-28, **2014**.
- [23] X.T. Zheng, A. Than, A. Ananthanaraya, D.-H. Kim, P. Chen, Graphene Quantum Dots as Universal Fluorophores and Their Use in Revealing Regulated Trafficking of Insulin Receptors in Adipocytes, *ACS Nano*, 7, 6278–6286, **2013**.
- [24] Y. Dong, C. Chen, X. Zheng, L. Gao, Z. Cui, H. Yang, C. Guo, Y. Chi, C.M. Li, One-step and high yield simultaneous preparation of single- and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black, *J. Mater. Chem*, 22, 8764–8766, **2012**.
- [25] J.H. Liu, X.C. Fu, X. Chen, Z. Guo, C.G. Xie, L.T. Kong, X.J. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 685, 21-28, **2011**.
- [26] Q. Song, M. Li, Li. H, Q. Wu, Y. Zhou, Y. Wang, Bifunctional polydopamine@Fe₃O₄ core-shell nanoparticles for electrochemical determination of lead (II) and cadmium (II), *Anal. Chim. Acta*, 787, 64-70, **2013**.
- [27] M.F. Philips, A.I. Gopalan, K.-P. Lee, Development of a novel cyano group containing electrochemically deposited polymer film for ultrasensitive simultaneous detection of trace level cadmium and lead, *J. Hazard. Mater*, 237–238, **2012**.
- [28] G. Aragay, J. Pons, A. Merkoci, Enhanced electrochemical detection of heavy metals at heated graphite nanoparticle-based screen-printed electrodes, *J. Mater. Chem*, 21 4326–4331, **2011**.
- [29] H.D. Vu, L.H. Nguyen, T.D. Nguyen, H.B. Nguyen, T.L. Nguyen, D.L. Tran, Anodic stripping voltammetric determination of Cd²⁺ and Pb²⁺ using interpenetrated MWCNT/P1, 5-DAN as an enhanced sensing interface, *Ionics*, 21, 571–578, **2015**.
- [30] M.M. Abdel-Galeil, M.M. Ghoneim, H.S. El-Desoky, T. Hattori, A. Matsuda, Anodic Stripping Voltammetry Determination of Lead ions using Highly Sensitive Modified Electrodes Based on Multi-walled Carbon Nanotube, *J. Chem. Biochem*, 2, 25-43, **2014**.
- [31] R. Nasraoui, D. Floner, C. Paul-Roth, & F Geneste, Flow electroanalytical system based on Cyclam-modified graphite felt electrodes for lead detection, *J. Electroanal. Chem*, 638, 9–14, **2010**.
- [32] R.O Kadara, I.E. Tothill, Development of disposable bulk-modified screen printed electrode based on bismuth oxide for stripping chronopotentiometric analysis of lead (II) and cadmium (II) in soil and water samples, *Anal. Chim. Acta*, 623, 76–81, **2008**.
- [33] Y. Zhang, J. Zhang, Y. Liu, H. Huang, Z. Kang, Highly ordered three-dimensional macroporous carbon spheres for determination of heavy metal ions, *Mater. Res. Bull*, 47, 1034–1039, **2012**.
- [34] F. Arduini, I. Errico, A. Amine, L. Micheli, G. Palleschi, and D. Moscone, *Anal. Chem*, 79, 3409, **2007**.
- [35] T. Hansmann, B. Sanson, J. Stojan, M. Weik, J.-L. Marty and D. Fournier, *Biosens. Bioelectron*, 24, 2119, **2009**.
- [36] I. Ben Rejeb, F. Arduini, A. Arvinte, A. Amine, M. Gargouri, L. Micheli, C. Bala, D. Moscone, and G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron*, 24, 1962, **2009**.
- [37]. F. Arduini, S. Guidone, A. Amine, G. Palleschi, and D. Moscone, *Sens. Actuators B. Chem*, 179, 201, **2013**.
- [38] M. Puiu, O. Istrate, L. Rotariu, C. Bala, *Anal. Biochem*, 421, 587, **2012**.
- [39] L. Chen, J. Jiang, G. shen, R. Yu, 00, 1, **2013**.
- [40] L. Zhanming, Y. Zunzhong, F. yingchun, X. Yonghua, Li. Yanbin, *Anal. Methods*, **2015**.

- [41] K.V. Stepurska, O.O. Soldatkin, I.S. Kucherenko, V.M. Arkhypova, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin. *Anal. Chim. Acta*, 854, 161, **2015**.
- [42] C.S. Pundir, N. Chauhan, *Rev. Anal. Biochem*, 429, 19, **2012**.
- [43] MF. Cometa, P. Lorenzini, S. Fortuna, MT. Volpe, A. Meneguz, M.Palmery, *Toxicology*, 206, 125, **2005**.
- [44] A.F. Ngomsik, A.Bee, J.M.Siaugue, D.Talbolt, V.Cabil, G.Cote, *J. Hazard. Mater*, 166, 1043, **2009**.
- [45] H.Y. Zhao, W. Zheng, Z.X. Meng, H.M. Zhou, X.X. Xu, Z. Li, Y.F. Zheng, *Biosens. Bioelectron*, 24, 2352, **2009**.
- [46] F.A. Johnson, D.Q.M. Craig, A.D. Mercer, *J. Pharmacol*, 49, 639, **1997**.
- [47] G. Orive, R.M. Hernandez, A.R. Gascon, R. Calafiore, T.M. Chang, P. De Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacik, A.M. Shapiro, J.L. Pedraz, Cell encapsulation: Promise and progress, *Nat Med*, 9, 1104, **2003**.
- [48] N. Munial, S.K. Sawhney, *Enzyme Microb. Technol*, 30, 613, **2002**.
- [49] R.E. Ionescu, K. Abu-Rabeach, S. Cosnier, R.S.Marks. *Electrochem. Comm*, 7, 1277, **2005**.
- [50] S. Cosnier, A. Novoa, C. Mousty, R.S. Marks, *Analytica. Chimica. Acta*, 453, 71, **2002**.
- [51] C.F. Ding, M.L. Zhang, F. Zhao, S.S. Zhang. *Anal. Biochem*, 78, 32, **2008**.
- [52] G. H. Chen, D. J.Wu, W. G. Wen, W. L. Yan, *J. Appl. Polym. Sci*, 82, 2506-2513, **2001**.
- [53] M. Ghaedi, M. Nejati Biyareh, S. Nasiri Kokhdan, S. Shamsaldini, R. Sahraei, A. Daneshfar, S. Shahriyar, *Mater. Sci. Eng. C*, 32, 725-734, **2012**.
- [54] B. Chandia, A.E.Matsuhira, Vasquez, *Carbohydrate Polymers*, 46, 81-87, **2001**.
- [55] N.P. Chandía, B. Matsuhira, E. Mejías, A. Moenne, *J. Appl. Phycol*, 16, 127-133, **2004**.
- [56] E.P. randviir, C.E. Banks, *Anal. Methods*, 5, 1098, **2013**.
- [57] R.M. Kong, X.B. Zhang, L.L. Zhang, X.Y. Jin, *Chem Comm*, 37, 5633, **2009**.
- [58] L.F. Sgobbi, C.A. Razzino, I.G. Rosset, A.C.B. Burtoloso, S.A.S. Machado, *Electrochim Acta*, 12, 500, **2013**.
- [59] R.V. Shamagsumova, D.N. Shurpik, PL. Padnya, I.I. Stoikov, G.A. Evtugyn, *Talanta*, 144, 559, **2015**.
- [60] M.Pohanka, K. Kuca, D. Jun, *Sens Lett*, 6, 1, **2008**.
- [61] I. Ben. Rejeb, F. Arduini, A. Arvinte, A. Amine, M. Gargouri, L. Micheli, C. Bala, D.moscone, G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron*, 24, 1962, **2009**.
- [62] Château,C. ; Dzyadevych, S.; Durrieu, C.; Chovelon, J. M. *Biosens. Bioelectron*, 21, 273-281, **2005**.
- [63] K.V. Stepurska, O.O. Soldatkin, V.M. Arkhypova, A.P. Soldatkin, F. Lagarde, N. Jaffrezic Renault,S.V. Dzyadevych ,*Talanta*, 1,1079-1084, **2015**.
- [64] O.O. Soldatkin, O.S. Burdak, T.A. Sergeyeva, V.M. Arkhypova, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldakin, *Sens. Actuators B Chem*, 188, 999-1003, **2013**.
- [65] F. Arduini, I. Errico, A. Amine, L. Micheli, G. Palleschi, and D. Moscone, *Anal. Chem*, **79**, 3409-3415, **2007**.
- [66] L. Micheli, R. Grecco, M. Badea, D. Moscone, G. Palleschi, Bi. *Biosens. Bioelectron*, 21, 588-596, **2005**.
- [67] N. Paniel, A. Radoi, J.L. Marty, *Sens*, 10, 9439, **2010**.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Les biocapteurs se positionnent aujourd'hui comme des véritables alternatives aux méthodes de caractérisations classiques, ce qui leur garantit une large application dans les domaines de la sécurité alimentaire, de la surveillance environnementale, et de la santé.

Ce travail a été consacré au développement de systèmes d'analyse d'entités chimiques et biologiques. Cet objectif a nécessité la modification de surfaces de carbone vitreux et d'or par des nanomatériaux et des biopolymères responsables de l'interaction avec les espèces cibles. Notre choix s'est porté sur l'utilisation de ces nanomatériaux et les biopolymères dans le but de former des films sur les surfaces des électrodes. La caractérisation de ces films, a été réalisée par électrochimie, en effet, l'utilisation de plusieurs méthodes électrochimiques permet de quantifier les processus de transfert d'électrons au sein des électrodes à surfaces modifiées.

En premier lieu, nous nous sommes appliqués à présenter les tenants et aboutissants des électrodes modifiées. Ceci a permis d'apprécier l'extrême diversité des constituants disponibles et des stratégies mises en œuvre pour parfaire ces applications. L'état de l'art nous a permis de souligner les propriétés et les caractéristiques des différents types de nanomatériaux utilisés pour la réalisation des électrodes modifiées dédiées à la détection d'une multitude d'analytes. Ainsi, en comparaison des travaux existants, nous avons choisi de mettre en place un système simple, sensible, efficace et fonctionnel pour la détection d'un spectre large d'analytes, à un moindre coût.

Dans la première partie, un biocapteur électrochimique a été développé avec succès en fonction de (SWCNTs-CO/Biomasse) comme matrice sensible à la détection des ions métalliques tels que le cadmium (II) et le plomb (II) par voltamétrie en redissolution anodique à impulsion différentielles (DPASV). La sensibilité du capteur développé a été largement augmentée en raison de la forte capacité d'adsorption et de la grande surface des (SWCNTs) supplémentaires qui améliorent les performances analytiques de l'électrode modifiée. Le système (ECV/SWCNTs-CO/Biomasse) présente des bonnes performances en termes de sélectivité et de reproductibilité vis-à-vis des ions Cd^{2+} et Pb^{2+} avec une sensibilité de l'ordre de $17,889 \mu\text{A/p} [\text{Cd} (\text{II})]$ pour le Cadmium et $21,983 \mu\text{A/p} [\text{Pb} (\text{II})]$ pour le Plomb. La linéarité a été validée pour les deux métaux, la limite de détection obtenue pour ces deux métaux après un temps de préconcentration de 20 min est de 10^{-7}M pour le Cd et 10^{-8}M pour le Pb. Nos

résultats suggèrent que ce système offre une grande promesse pour la détection simultanée et polyvalente d'une grande variété d'analytes importants. Il a été démontré que le biocapteur électrochimique conçu peut être appliqué à la détermination qualitative et quantitative des ions de métaux lourds dans des échantillons réels d'eau avec de bons résultats de récupération.

Dans la deuxième partie, un nouveau biocapteur impédimétrique pour la détermination inhibitrice de l'aflatoxine B1 (AFB1) a été développé. L'acétylcholinestérase (AChE) en tant que bioélément de détection a été immobilisée en utilisant une matrice biopolymère d'alginate de sodium hydrophile et biocompatible sur une électrode en or. La voltampérométrie à signaux carrés (SWV) est utilisée comme méthode de transduction pratique pour évaluer l'activité (AChE) par l'oxydation du produit métabolique thiocholine. Les paramètres de travail des biocapteurs (AChE) pour l'analyse d'AFB1 ont été étudiés et optimisés. De bonnes performances analytiques en termes de sensibilité et de reproductibilité sont obtenues avec une gamme dynamique linéaire de 0,01 à 100 ng/mL. Notre biocapteur a une limite de détection basse 0,01 ng/mL, ce qui est inférieur au niveau recommandé d'AFB1 [5 µg/mL]. Cette limite de détection très basse démontre l'avantage du système impédimétrique développé en comparaison avec d'autres méthodes d'analyse comme la technique spectrophotométrique. L'adéquation de la méthode est évaluée à l'aide d'échantillons de lait commercial (écrémé, demi-écrémé, entier) additionné de 0,5 ng/ml d'AFB1. La sélectivité du biocapteur d'acétylcholinestérase impédimétrique développé pour d'autres mycotoxines (OTA, AFM 1) a également été étudiée. La plus grande sensibilité a été observée avec l'aflatoxine AFB1.

En conclusion, nous avons démontré à travers les nombreuses applications effectuées au cours de ce travail de thèse, que les systèmes à base de biocapteurs électrochimiques constituent des alternatives très intéressantes par rapport aux différentes techniques classiques en termes de rapidité, portabilité, coût réduit et facilité d'utilisation. Par ailleurs, de nombreuses perspectives sont envisageables pour la poursuite de ces travaux de recherche qui utilisent le principe de modification des SWCNTs par des complexes organométalliques pour l'élaboration d'immunocapteurs et de biocapteurs à ADN par marquage enzymatique de la cible détectée.

Concernant le volet agroalimentaire, nous envisageons le développement de capteurs et de biocapteurs à base des polymères à empreintes moléculaires pour la détection d'autres contaminants alimentaires tels que les ochratoxines (OTA) et les pesticides. Nous pouvons également élargir le champ d'application de nos travaux de recherche sur le volet biomédical.

Annexes

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/322980210>

A biosensor based on fungal soil biomass for electrochemical detection of lead (II) and cadmium (II) by differential pulse anodic stripping voltammetry

Article · February 2018

DOI: 10.1016/j.jelechem.2018.02.009

CITATIONS

4

READS

743

6 authors, including:



Mounira Dali

Badji Mokhtar - Annaba University

2 PUBLICATIONS 17 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Khaoula Zinoubi

University of Monastir

3 PUBLICATIONS 13 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Amani Chrouda

Claude Bernard University Lyon 1

9 PUBLICATIONS 91 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Cherrad Semcheddine

CONIDIA

8 PUBLICATIONS 44 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Sensor [View project](#)



Review

A biosensor based on fungal soil biomass for electrochemical detection of lead (II) and cadmium (II) by differential pulse anodic stripping voltammetry

Mounira Dali^{a,*}, Khaoula Zinoubi^b, Amani Chrouda^b, Sihem Abderrahmane^a, Semcheddine Cherrad^c, N. Jaffrezic-Renault^d

^a Laboratory of Surface Engineering, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria

^b Laboratory of Interfaces and Advanced Materials, Faculty of Sciences, University of Monastir, Monastir, Tunisia

^c UMR 5240 Laboratory, Pathogenesis Mushrooms Necro Trophies Team CNRS, University of Lyon 1, Bayer Crop Science. 69263 Lyon, France

^d Laboratory of Analytical Sciences, Doua, 69100 Villeurbanne, Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Fungal soil biomass
Single walled carbon nanotubes (SWCNTs)
Chemically modified CGE
DPASV
Heavy metals biosensor

ABSTRACT

A sensitive voltammetric method for detection of trace heavy metal ions using a glassy carbon electrode surfaces chemically modified by a mixture of (SWCNTs/Biomass) was applied. The fungus is used as an inactive biomass, which was selected from soil contaminated with metals. The cell walls have a large number of chemical groups such as carboxyl, sulfonate, amine, hydroxyl, carbonyl and imidazole with which may affect and intervene in the fixing of metal ions. In this assay, heavy metals ions accumulated on the GCE/SWCNTs/Biomass electrode surfaces prior to being subjected to differential pulse anodic stripping voltammetry analysis (DPASV). The resulting peak currents were linearly related to the concentrations of the metal ions. The method was optimized with respect to accumulation time, reduction time and reduction potential. The detection limits were found to be 10^{-8} M and 10^{-7} M for Pb^{2+} and Cd^{2+} respectively.

1. Introduction

Heavy metals are serious environmental pollutants [1], their presence in the atmosphere, soil and water, even in trace amounts [2,3] can cause serious problems in all organisms [4–6]. They can easily enter into the food chain through various channels [7]. These metallic elements have a high atomic weight and are considered among the most significant pollutants due to their wide distribution, persistence, bioaccumulation and their high toxicity [8,9]. According to Lee and al [10], mining is one of the most important sources of heavy metals into the environment [11]. The development of new strategies for the detection of heavy metals is essential [12–14]. The determination of trace metals by the electrochemical process has increased significantly in recent years. Different electrochemical techniques have been used, namely differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) [15–18]. This technique has the advantage of being powerful for trace metals owing to its remarkable sensitivity, relatively inexpensive instrumentation, ability to determine several elements and its ease of implementation [19–24]. During the last years, intensive research has been carried out in the field of the modification of the working

electrode surface by chemicals reagents [23]. In this context, it is possible to use chemically modified electrodes with a mixture of functionalized single walled carbon nanotubes (SWCNTs-COOH) and filamentous fungi.

Since the discovery of carbon nanotubes (CNTs) in 1991 by Iijima [25]. The carbon nanotubes have received much attention for their several potential applications [26], such as [27] electronic devices, the effect of emission devices [28] field, reinforcement of composite materials [29], the sensors [30], biofuel cells [31] ... in fact, this material has excellent mechanical, electrical, thermal and chemical properties [32]. The exact magnitude of these properties depends on the diameter and chirality of the nanotubes and on whether they are single-walled (SWCNTs) or multi-walled form (MWCNTs). The single-walled carbon nanotubes are sheets of graphene with cylindrical diameters of about 0.7–2 nm and lengths up to several microns. Due to the geometry of these carbon nanotubes, this material has a high surface area which is estimated theoretically to $10^3 m^2 g^{-1}$ [32,33] which gives them good adsorption capacity. This property makes them particularly promising for the development of biosensors [34]. Filamentous fungi reveal interesting potential to clean up the polluted soils by organic chemicals

* Corresponding author.

E-mail address: mounira.dali@univ-annaba.dz (M. Dali).

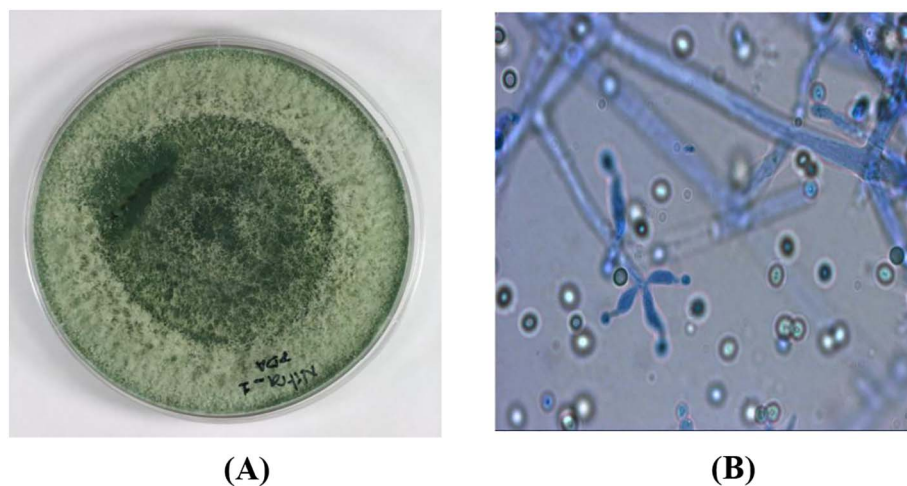


Fig. 1. (A) Macroscopic aspect of *Trichoderma asperellum* grown on PDA medium, (B) Microscopic aspect of *Trichoderma asperellum*.

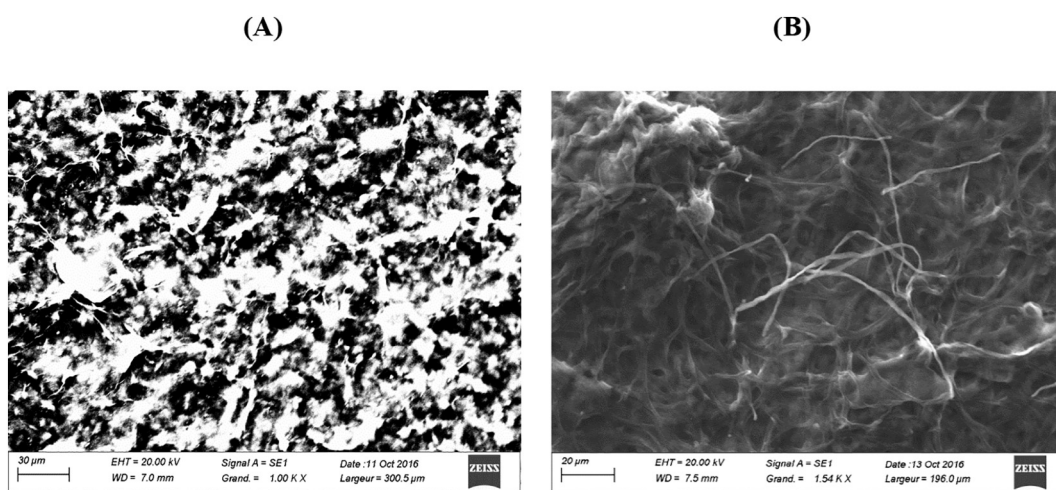


Fig. 2. (A) Scanning electron micrographs (SEM) of (SWCNTs-COOH) on glassy carbon electrode (GCE). (B) SEM of SWCNTs-CO-biomass mixture on GCE.

[35,36]. The up to date available literature mark the potential ability of microbes to the substantial removal of heavy metals and other xenobiotics aqueous solutions [37,38]. The potential use of fungi in bioremediation and waste treatment has not received much attention [39,40]. The fungi found in the soils studied were isolated by a conventional approach culturing on agar nutrient media [41,42]. They were then identified to the genus level by macro and microscopic observations [43]. The binding capacity of metals by filamentous fungi was performed on multiple strains, some of which were selected from soil contaminated with metals [44]. Among these strains, we selected *Trichoderma asperellum*.

For twenty years, many biosensors for environmental control were developed [45–47] and in some cases commercialized, to detect the great families of substances that can pollute aquatic ecosystems. In this study, we report the development of a modified glassy carbon electrode (GCE) [48] with a mixture of functionalized carbon nanotubes (SWCNTs-COOH) and filamentous fungi for lead (II) and cadmium (II) detection by these microorganisms using differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) [49,50].

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Trichoderma asperellum, the detection microorganism used in this work, was selected from soils contaminated with metals. This strain was

provided by the laboratory UMR 5240 pathogenesis mushrooms necrotrophies Team CNRS/University of Lyon 1/Bayer Crop Science. All other reagents of analytical grade including potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, potassium hexacyanoferrate (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$), potassium chloride (KCl), acetic acid (CH_3COOH), sodium acetate (CH_3COONa), lead(II) nitrate ($Pb(NO_3)_2$), cadmium (II) sulfate ($CdSO_4$) were obtained from Fluka Chemika. The biological and chemical products used for the realization of this work were obtained from Sigma-Aldrich and used without further purification.

2.2. Apparatus

All electrochemical measurements including cyclic voltammetry, differential pulse anodic stripping voltammetry analysis (DPSAV) and electrochemical impedance spectroscopy were performed with a computer-controlled potentiostat, Autolab electrochemical analyzer model PGSTAT 302N (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). All measurements were performed in a dark Faraday cage. The detection was carried out in a common electrochemical cell containing the glassy carbon (GC) working electrode, an Ag/AgCl/KCl reference electrode and a platinum counter electrode. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin Elmer 781 spectrophotometer and an Impact 400 Nicolet FT-IR spectrophotometer. The EVO MA 25 is a Scanning Electron Microscope with various chamber sizes for the materials analysis. EVO MA 25 is your SEM for large and heavy samples.

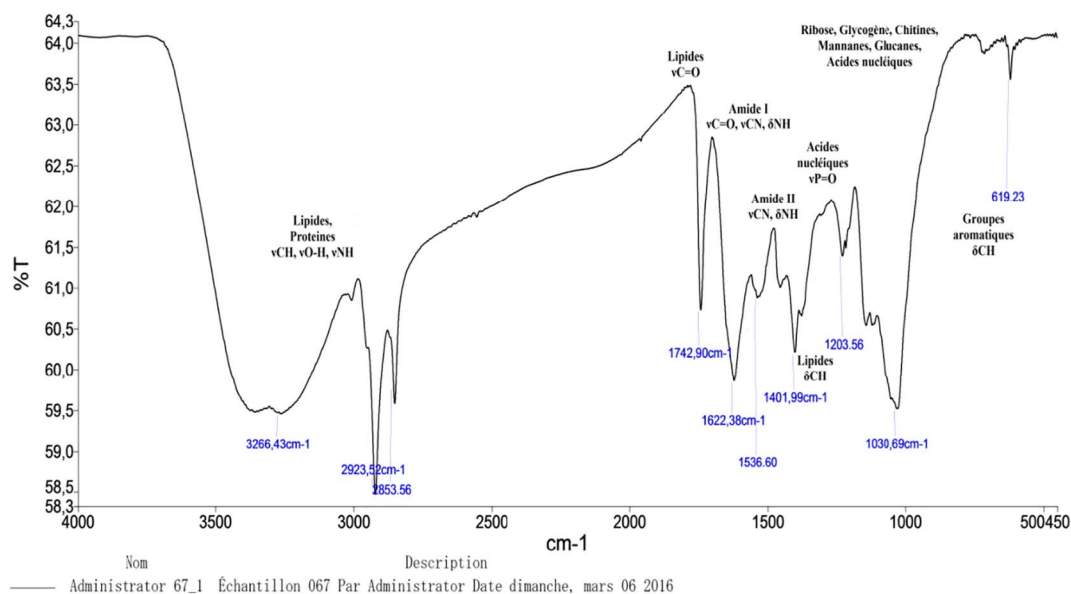


Fig. 3. Absorption spectra IR characteristics of a fungal soil biomass (*Trichoderma sperellum*).

Table 1

Characteristic infrared absorption frequencies typical of microorganisms and their biomolecular attribution.

Fréquences (cm ⁻¹)	Molecular bond	Vibration mode	Biomolecular award
3266–2853	CH ₂ , CH ₃ HO C	Symmetric and asymmetric stretching	Lipids, proteins
	N–H	Symmetric stretch	
1742–1700	C=O	Symmetric stretch	Fatty acids
1695–1625	C=O, C–N	Symmetric stretch	Proteins (amide I)
	N–H	Deformation	
1622–1536	C–N	Symmetric stretch	Proteins (amide II)
	N–H	Deformation	
1530–1400	CH ₃ , CH ₂ C=O	Deformation Asymmetric stretch	Lipids
1300–1200	P=O	Asymmetric stretch	Nucleic acids
1200–1000	C–O–C, C–O, P=O, C–C/ C–O	Symmetric stretch	Ribose, glycogen, chitin, glucan, mannan, nucleic acids
900–620	C–H	Deformation	Aromatic groups

2.3. Preparation of biomass

Identification of the isolated strains was carried out by the classical systematics which is based on the macroscopic criteria of mycelial colonies such as the color and appearance of the crop on different nutrient media, and microscopic observations allowing to observe the hyphae and the reproductive structures of asexual and sexual. These analyses make it possible to identify the strains at the genus and species level. The selected fungi (*Trichoderma asperellum*) were maintained in culture on PDA environment at 25 °C and grown in sporulation environment at 22 °C [51]. Spores were collected by scraping the mycelium with a strainer and tween water (0.1% v/v) sterile, they were then filtered through glass wool. The spores kept at –80 °C is prepared in a sterile water-glycerol solution (final concentration 20% v/v glycerol). From these cultures on agar environments, a conidia solution was performed in a solution tween (0.01% v/v) and then inoculated into a culture of the liquid environment (SP) due to 10⁵ conidia/ml in a continuous stirring at 250 rpm at 22 °C. The culture time is five days (Fig. 1), the mycelium is filtered on canvas bluter and rinsed twice for

30 min with a sterile distilled water. The treatment applied to the mycelium: autoclaving at 110 °C for 30 min followed by drying at 60 °C for 24 h, then drying in the open air under a hood. The amount of dry biomass was determined by drying at 60 °C for 24 h. The mycelium autoclaved and dried (under the hood or at 60 °C) was then crushed using a ball mill (Braun Biotech) at 2000 rpm for 2 min to obtain a homogeneous powder.

2.4. Preparation of modified electrode

The surface of glassy carbon (GC) was first polished with 0.05 μm alumina. The electrode was thoroughly washed with an ethanol solution in an ultrasonic bath for 15 min, then rinsed in distilled water and dried under a nitrogen flow. The SWCNT-CO-Biomass suspension were prepared as follows. Firstly, 1 mg of the SWCNTs-COOH were dispersed in 1 ml of water by sonication for a few seconds. Then, 1 ml of the above solution was used to dissolve 10 mg of biomass which was stirred and sonicated for 1 h to form a homogeneous suspension. For electrochemical studies, 10 μL of the SWCNTs-CO-Biomass suspension were cast on the GCE electrode and left to dry at ambient conditions for 30 min. This modified GCE electrode is denoted as GCE-SWCNTs-CO-Biomass. The modified electrodes were transferred into an electrochemical cell containing an acetate buffer solution at pH = 4.5.

2.5. Selection of the amount of SWCNTs deposited onto a glassy carbon electrode

The choice of the volume deposited on the glassy carbon electrode was set after performing different measurement series of three different electrodes. The characterization of these three layers is made by the cyclic voltammetry method which shows the influence of the amount of SWCNTs-CO-Biomass deposited on the current intensity of the oxidation and reduction peaks, the optimal volume corresponds to 10 μL from SWCNTs-CO-Biomass.

2.6. Apparatus and electrochemical test procedure

A three-electrode configuration was performed in an electrochemical cell, consisting of GCE-SWCNT-CO-Biomass as the working electrode, Ag/AgCl containing KCl was the reference electrode and a platinum wire (Φ = 1 mm) was the counter-electrode. An aqueous solution of potassium ferri/ferrocyanide [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (5 mM) is

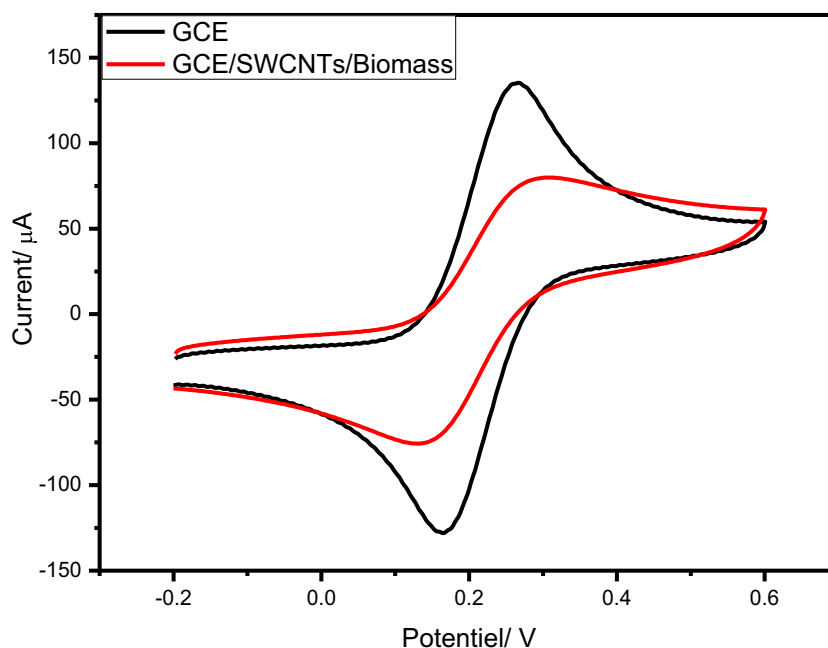


Fig. 4. Cyclic voltammograms of 5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} on the bare (a) and modified GCE (b).

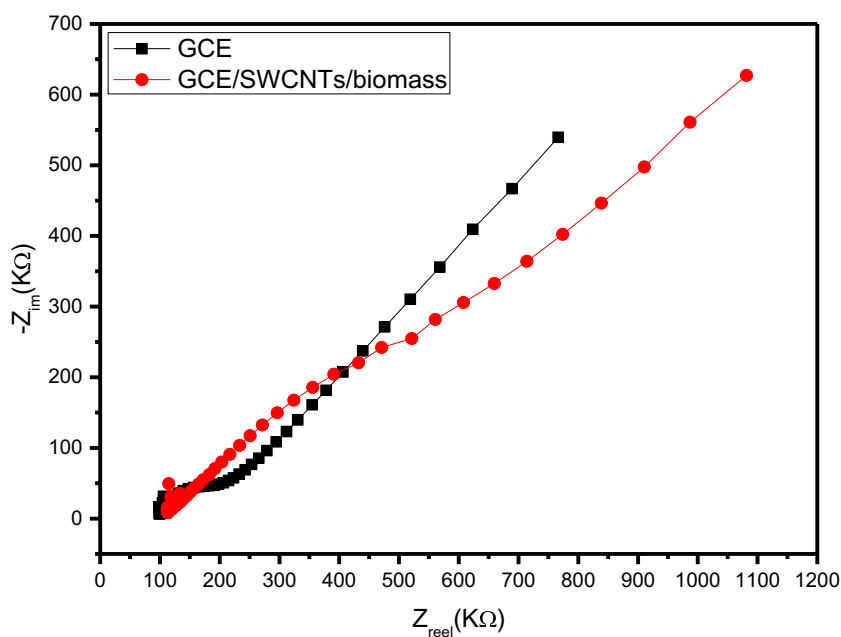


Fig. 5. EIS of 5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} on the bare (a) and the modified GCE.

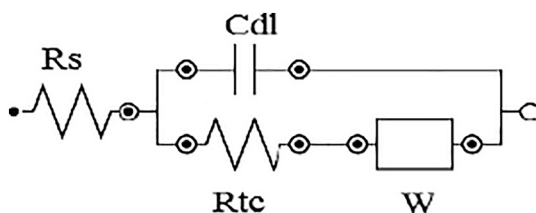


Fig. 6. Randles equivalent circuit for the system based on CGE/SWCNTs-CO-Biomass.

prepared from an acetate solution (0.1 M) and poured into the electrochemical cell equipped with three electrodes. The system is subjected to cyclic voltammetry (CV) from -200 mV to 600 mV at a scanning speed of 100 mV s⁻¹. The voltammetry is recorded on a bare

glassy carbon electrode surface and then on an electrode modified by a mixture of (SWCNTs-CO-Biomass). To accumulate analytes on electrode surface, GCE-SWNT-CO-Biomass electrode was immersed in a stirred (300 rpm) acetate buffer solution containing a known concentration of metal ions during an accumulation time of 10 min. The modified electrode was removed after accumulation, rinsed with ultrapure water, dried and transferred to a 0.1 M acetate buffer solution of pH 4.5 for differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV). The differential pulse anodic stripping voltammograms were recorded at -1.2 V potential for 120 s followed by a negative DPV scan with an increment of 5 mV and an amplitude of 50 mV from -1.2 to -0.2 V. At least three differential pulse anodic stripping voltammograms were recorded for each run.

Table 2

Electrochemical parameters of CGE/SWCNTs-CO-Biomass and bare electrodes obtained from the analysis impedance data with theandles circuit [R(C|RW)].

Electrode	R_s (Ω)	C_{dl} (μF)	R_{tc} (Ω)	W (μF)	Θ	$n = 3$
Bare GCE	102.05	6.869	41.895	154.3		
Modified GCE	120.31	2.926	155.93	7415	0.72	7.8%

3. Results and discussion

3.1. Morphological aspects of modified electrodes

The morphology of (SWCNTs-COOH) and (SWCNTs-CO-Biomass), was characterized by scanning electron microscope to confirm the immobilization of the SWCNTs and biomass on GCE. The SEM images of the electrodes (GCE-SWCNTs-COOH) and (GCE-SWCNTs-CO-Biomass) are shown in Fig. 2. On the one hand for the electrodes (GCE-SWCNTs-COOH), these images show aggregate-shaped morphologies that appear to be tighter Fig. 2A. The formation of the film (SWCNTs-CO-Biomass) on the GCE electrodes was also demonstrated by MEB. Filaments of carbon nanotubes enveloped by a layer of filamentous fungi were observed Fig. 2B confirming the success of the biomass immobilization on carbon nanotubes (SWCNTs-COOH). The microscope images show that the surface morphology of the film (SWCNTs-CO-Biomass) immobilized on the GCE electrodes differs considerably from that obtained with (GCE-SWCNTs-COOH).

3.2. Analysis of FT-IR spectra

Recent developments in FTIR spectroscopy have enabled numerous applications in the field of microbiology, in particular as a complementary tool of discrimination and identification adapted to a wide spectrum of microorganisms [52,53] such as bacteria, yeasts and filamentous fungi, which makes it possible to match certain characteristic bands of infrared spectrum Fig. 3 to the different chemical functions of the molecules present in these microorganisms (Table 1).

3.3. Extracellular response of the fungal cell

Filamentous fungi excrete organic acids which can bind heavy metals. This extracellular response leads to the immobilization of soluble metal ions outside the cell and thus allows fungi to ensure their survival in environments containing potentially toxic metal concentrations [54,55]. Some organisms (fungi and algae) produce and secrete extracellular polymeric substances (EPS), which include polysaccharides, glycoproteins, lipopolysaccharides and soluble peptides. These substances have a number of functional groups capable of adsorbing anionic metal ions. In the literature, the work on biosorption of metals with extracellular polymeric substances (EPS) is described for bacteria, such as *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa* and cyanobacteria, while studying the SPE in fungi and algae is still very limited [56–58]. The cell walls have a large number of chemical groups such as carboxyl, sulfonate, amine, hydroxyl, sulphhydryl, carbonyl, imidazole with which the elements can interact [59]. The wall is the first fungal cell structure which comes into contact with the metal and at which the binding ions can take place. It is composed mainly of polysaccharides (80%–90%) some of which are associated with proteins, lipids or melanin. All filamentous fungi contain chitin polymer of *N*-acetylglucosamine residues. Chitin is 1–20% of the wall in yeast, and in much greater proportion in filamentous fungi as in *Neurospora* and *Aspergillus*, it constitutes more than 20% of the dry weight of the wall [60]. Glucan is the major component of the fungal cell wall structure it is about 50–60% [60–62]. The wall structure analysis shows that it can also contain mannan, galactan, and phosphate polysaccharides according to the studied species group [63–65]. The functional groups of the wall (phosphates, carboxyl, amine, and phosphodiester) involved in the fixing of metal ions [66].

3.4. Characterization of the immobilization of SWCNTs-CO-biomass on the surface of glassy carbon by electrochemical measurements

3.4.1. Characterization by cyclic voltammetry

The curves obtained are shown in Fig. 4. On the bare glassy carbon

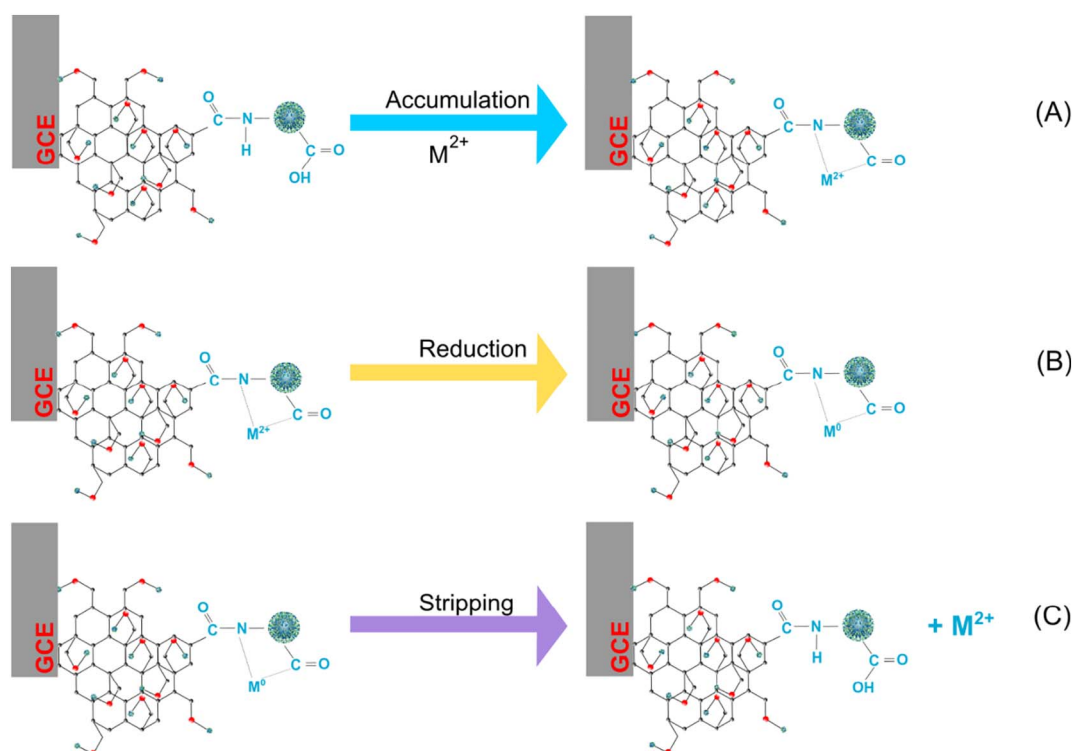


Fig. 7. Schematic illustration of the detection principle M^{2+} .

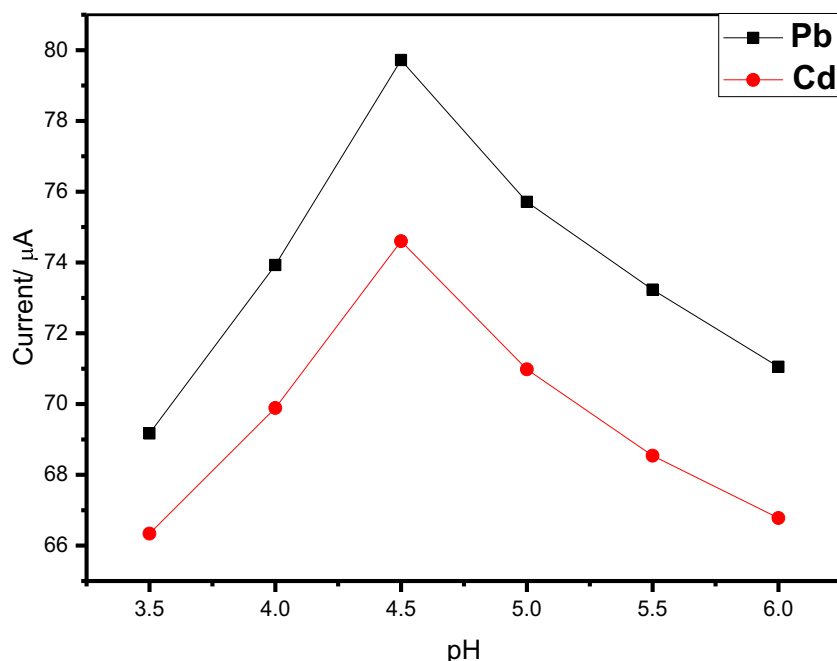


Fig. 8. The effect of pH on the stripping peak currents of $5 \cdot 10^{-5}$ M Pb(II) and Cd(II) at SWCNTs-CO-biomass modified electrodes.

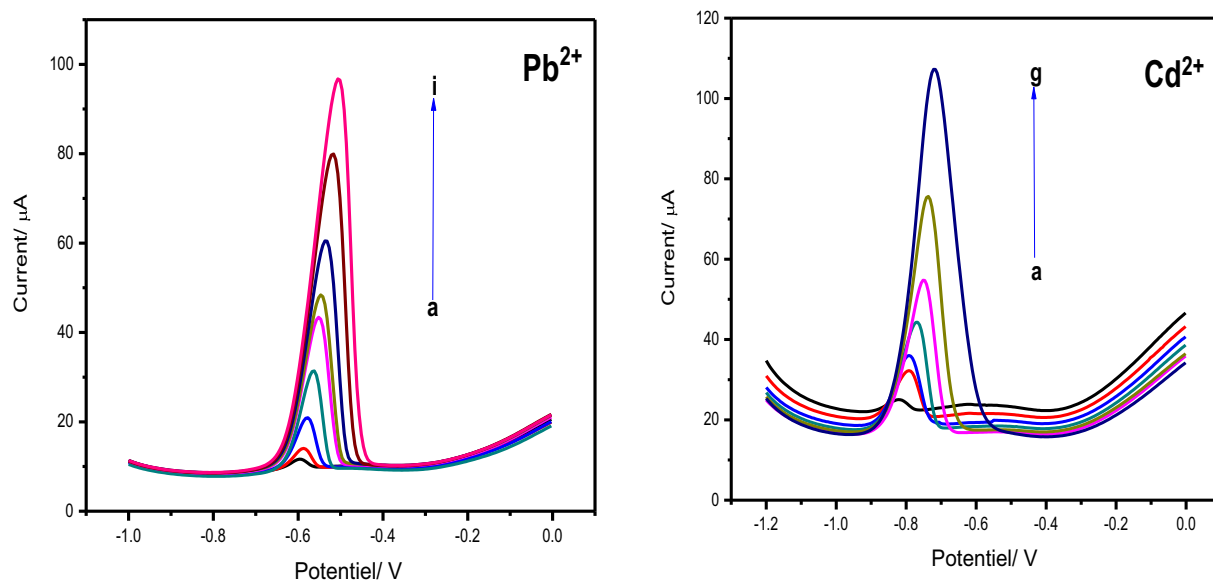


Fig. 9. Differential pulse anodic stripping voltammograms of GCE/SWCNTs-CO-Biomass for different concentrations of Pb(II) and Cd(II) in 0.1 M acetate buffer.

electrode the curve obtained (Fig. 4a) exhibits a pair of quasi-reversible peaks characteristic of the oxidation-reduction of the redox couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ on the surface of the electrode. The anodic and cathodic peaks appear at 0.270 and 0.160 V respectively. The electrochemical reduction is slowed down on the modified surface (GCE-SWCNTs-CO-Biomass) (curve b), the anodic or cathodic peak observed in the range of potentials becomes less intense. The two peaks are significantly reduced, which is attributed to the decrease in the electron transfer rate. We confirmed that the layer of (SWCNTs-CO-Biomass) has been properly formed on the surface of EGC giving a dense coverage of the mixture.

3.4.2. Specification by impedance measurement

Impedance measurements have also been studied as a highly sensitive approach. The impedance spectra follow the theoretical forms

and include a pressed semicircular part observed at higher frequencies which corresponds to the limited electron transfer process followed by a characteristic linear part of the lower frequency attributable to a transfer of limited-scattered electrons. The high-frequency semicircle diameters corresponding to the electron transfer resistance at the electrode surface increase upon formation of a layer on the electrode. Fig. 5 shows Nyquist spectroscopic curves in the frequency range 100 MHz to 100 KHz of bare GCE and modified by a mixture of (SWCNTs-CO-Biomass) at a potential of 150 mV in 5 mM of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. The voltammogram of bare GCE (Fig. 5A) exhibits a quasi-reversible peak characteristic of the oxidation-reduction of the redox couple at the surface of the electrode. A more pronounced semicircle was obtained compared to the Nyquist spectrum of the bare electrode followed by a straight line (Fig. 5B), indicating a higher impedance resulting from the inhibition of the electron transfer reaction of

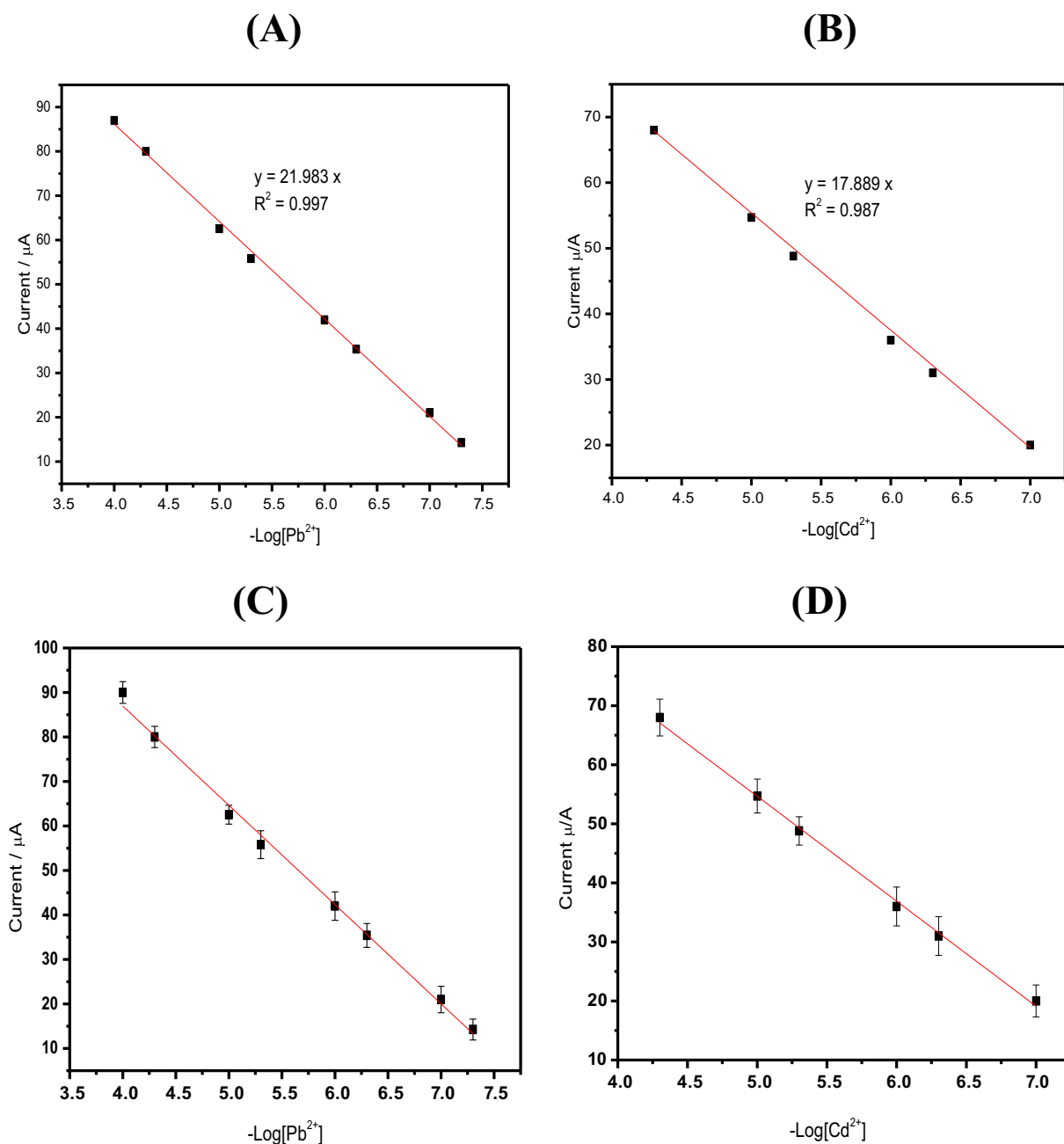


Fig. 10. (A) and (B) Calibration curves of the GCE/SWCNTs-CO-Biomass electrode for different concentrations of Pb(II) and Cd(II) ions. (C) and (D) the plots of the electrocatalytic peak current as a function of Pb(II) and Cd(II) concentration RSD = 4.43 and 6.5% respectively ($n = 3$).

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ on EGC coated with a mixture of (SWCNTs-CO-Biomass). This inhibition results in an increase in the diameter of the semicircle of the Nyquist diagram and consequently an increase in the charge transfer resistance (R_{tc}) [67,68]. The increase in charge transfer is explained by the presence of negative charges on the carboxylic functions and the amine functions of the mixture in an aqueous medium. These charges exert an electrostatic repulsive force on the ferri/ferrocyanide ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ of the electrolyte and limit their approach of the electrode (decrease of W). These results confirm the good functionalization of GCE by (SWCNTs-CO-Biomass).

The Experimental EIS data were fitted using standard Randle's equivalent circuit [R(C[RW])] (Fig. 6). The fitted electrochemical parameters were gathered in Table 2. From the R_{tc}° and R_{tc} values, (The charge transfer resistance before and after surface GCE modification), it is possible to calculate approximately the recovery rate (θ) of the

surface (GCE) by the mixture SWCNTs-CO-Biomass according to Eq. (1) [69–71].

$$\theta = 1 - R_{tc}^{\circ}/R_{tc} \quad (1)$$

Layer adsorption of the SWCNTs-CO-Biomass is equivalent to 73.1% of the covered GC surface, which confirms the formation of a rougher and dense surface.

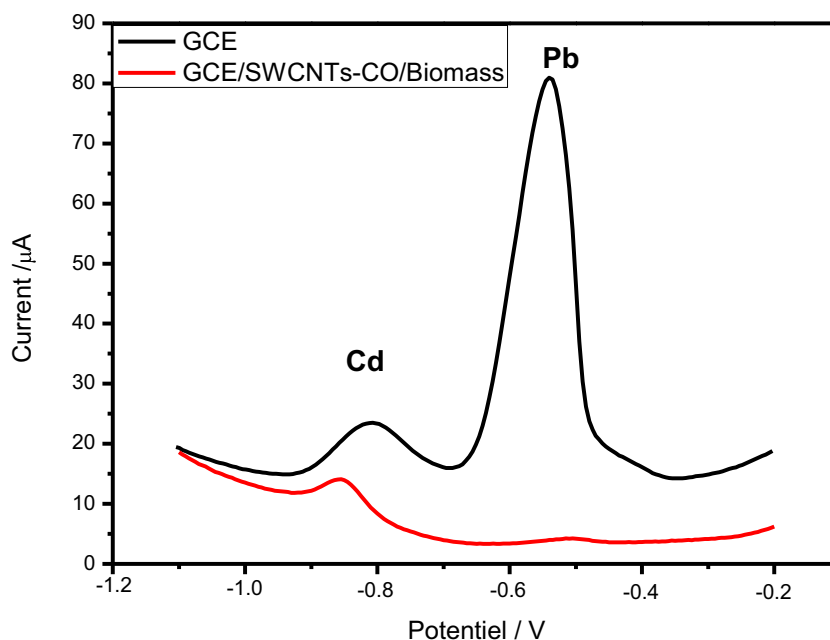
3.5. Principle of detection

Based on the above observations, the proposed mechanism of accumulation, reduction, and anodic stripping analysis is described in Fig. 7 [72–74]. The first step involves complex formation at open circuit between the immobilized biomass and the heavy metal ion M^{2+} (Fig. 7A). The second step is the reduction of the accumulated M^{2+} ions

Table 3Comparison of the analytical performance of electrochemical methods for the determination of Cd²⁺ and Pb²⁺.

Electrode	Method	Analyte	Detection limit	Sensitivity	Reference
GCE/CN-polymer	DPASV	Cd(II)	2.27 μM	2.53 μA/mg L ⁻¹	[77]
HGNTs/SPEd	SWASV	Pb(II)	0.8 μM	3.67 μA/mg L ⁻¹	[78]
		Cd(II)	–	0.0073 μA/μg L ⁻¹	
Pt/MWCNT/P1,5-DAN electrode	SWASV	Pb(II)	3.00 μg L ⁻¹	0.014 μA/μg L ⁻¹	[79]
		Cd(II)	–	0.348 μA/μg L ⁻¹	
MWCNT/CPE	SW-AdASV	Pb(II)	2.1 μg L ⁻¹	0.577 μA/μg L ⁻¹	[80]
		Cd(II)	–	–	
Cyclam-modified graphite felt electrode	DPASV	Pb(II)	0.03 μM	–	[81]
		Cd(II)	0.025 μM	–	
Bi ₂ O ₃ -modified electrode	DPASV	Pb(II)	0.14 μM	1,05 μA/μg L ⁻¹	[82]
		Cd(II)	0.04 μM	0,99 μA/μg L ⁻¹	
Nafion-MPCS-CO-Cys-GCE	SWASV	Pb(II)	0.5 μM	2.86 μA/μM	[83]
		Cd(II)	0.1 μM	2.29 μA/μM	
GCE-SWCNTs-CO-Biomass	DPASV	Pb(II)	0.1 μM	17.889 μA/μM	This work
		Cd(II)	0.01 μM	21.983 μA/μM	
		Pb(II)	0.01 μM	21.983 μA/μM	

GCE: glassy carbon electrode, CPE: Carbone paste electrode, GO: graphene oxide, SPE: screen printed electrode, CN-Polymer: cyano groups modified poly(diphenylamine Co-2-aminobenzonitrile). MWCNT: multi-walled carbon nanotube, HGNTs: heated graphite nanoparticle-based screen-printed electrode, Bi₂O₃: bismuth oxide, HGNTs/SPE: heated graphite nanoparticle-based screen-printed electrode, MPCSS: macroporous carbon spheres, Cys: cysteine, 1,5-DAN:1,5-Diaminonaphthalene.

**Fig. 11.** Differential pulse anodic stripping voltammograms for simultaneous determination of (10⁻⁵ M) Pb(II) and Cd(II) obtained at bare GCE, and modified GCE.**Table 4**

Stability of the sensor response during four weeks.

Week	Ion	Selectivity μA·M ⁻¹
1	Cd(II)	17.889 ± 1.34
	Pb(II)	20.6 ± 0.78
2	Cd(II)	15.299 ± 1.21
	Pb(II)	19.99 ± 0.64
3	Cd(II)	14.969 ± 1.27
	Pb(II)	19.10 ± 0.71
4	Cd(II)	13.019 ± 0.79
	Pb(II)	17.51 ± 0.37

to M⁰ at the closed circuit under negative potential Fig. 7B. The third step is the stripping step where M⁰ is electrochemically stripped back into the solution at closed circuit by scanning towards positive potentials Fig. 7C. The resulting stripping peak was found to be proportional to the amount of M²⁺ in the accumulation solution.

3.6. Influence of pH

The influence of the electrolyte pH variation on the of Cd²⁺ and Pb²⁺ accumulation on the (SWCNTs-CO-Biomass) matrix was studied in the pH range from 3.5 to 6 by DPASV method Fig. 8. A maximum peak current for Cd²⁺ and the other for Pb²⁺ were observed at pH of around 4.5. The peak current was extensively affected by the pH electrolyte variation, a decrease of the current at pH below 4.5 can be explained by the protonation process which affects the hydrophilic character of the (SWCNTs-CO-Biomass) matrix and the decrease of current at pH higher than 4.5 is attributed to the hydrolysis of Cd²⁺ ions and Pb²⁺.

3.7. Calibration and detection limit

Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) was used for the detection of Pb²⁺ and Cd²⁺ under optimized conditions [75,76]. The individual measurements of Pb²⁺ and Cd²⁺ using the

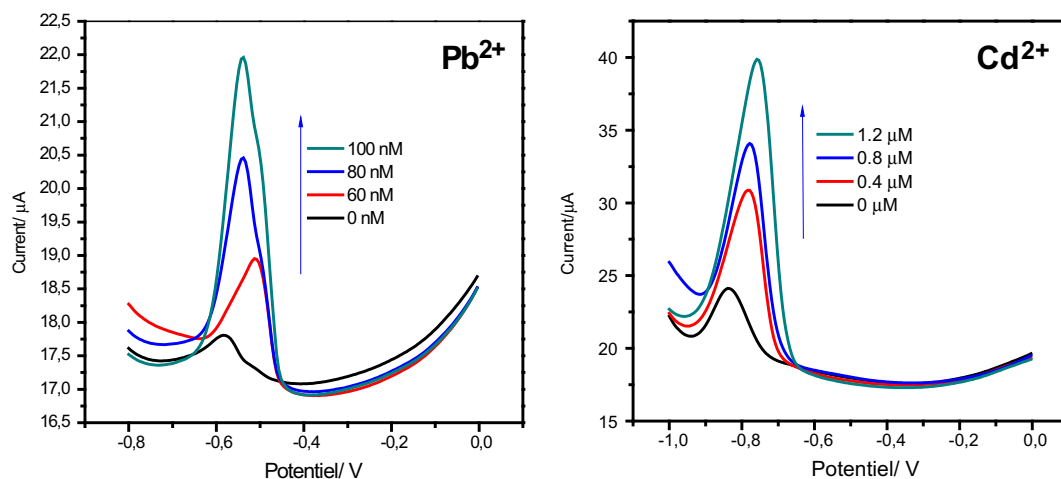


Fig. 12. DPASV signals for detection Pb(II) and Cd(II) in real water sample.

Table 5

The results of the recovery experiment.

Samples no.	Pb(II) concentration (nM)			Cd(II) concentration (µM)		
	Added	Found	Recovery %	Added	Found	Recovery %
1	–	50	–	–	0.22	–
2	60	63	105	0.4	0.426	106.5
3	80	78	97.5	0.8	0.794	99.2
4	100	95	95.3	1.2	1.258	104.8

modified GCE-SWCNTs-CO-Biomass electrode were performed at various concentration in 0.1 M acetate buffer and pH 4.5. The resulting differential voltammograms are shown in Fig. 9. Well-defined peaks with a current proportional to the concentrations of the metal ions Pb^{2+} and Cd^{2+} were observed respectively at -0.6 V and -0.8 V. The Fig. 10 represent the calibration curves of Pb^{2+} and Cd^{2+} compared to the corresponding stripping peak current. Linearity was validated for both metals, the detection limit obtained for these two metals is $Pb^{2+} = 10^{-8}$ M and $Cd^{2+} = 10^{-7}$ M. The sensitivities calculated from the calibration curves are respectively in the order $Pb = 21.983 \mu A/p [Pb^{2+}]$ et $Cd = 17.889 \mu A/p [Cd^{2+}]$. Based on the above results, it should be noted that the proposed method has a lower detection limit and a higher sensitivity of Pb^{2+} and Cd^{2+} than the most recently reported electrochemical methods for the detection of these metal ions. Compared with the reported electrochemical methods for sensing of Pb^{2+} and Cd^{2+} , based on microorganisms, this method possesses desirable properties of electroanalysis and multifunctional cell walls to improve selectivity, sensitivity, and stability. The concept of drawing the best parts of multifunctional materials should be very important for the development of high performance biosensors.

In our work, high sensitivity was obtained by the proposed electrode for Cd(II) and Pb(II) ions detection compared to other carbon-based electrodes. The analytical performances of the modified electrode for different tested ions were in good agreement with some responses reported for other cited modified chemical electrodes Table 3.

3.8. Interference study

The preconcentration potential is an important parameter for analytical techniques, and has a significant influence on the sensitivity of the determination of heavy metals. The potential for two metal ion detection was demonstrated by the (SWCNTs-CO-Biomass) modified voltammogram (DPASV) after accumulation in a 10^{-5} M solution containing a mixture of ions (Pb (II) Cd (II)). The resulting voltammograms show prominent and well resolved peaks under the optimized

parameters as shown in Fig. 11. Noticeable and distinct re-dissolution peaks were observed for the two tested heavy metal ions accumulated on the carbon glassy electrode functionalized with the (SWCNTs-CO-Biomass) layer. No current variation was detected for the bare GCE under similar conditions. This current variation can be attributed to the high affinity binding between the layer (SWCNTs-CO-Biomass) and the accumulated metal ions.

3.9. Repeatability of the electrode

To study the performance of GCE/SWCNTs-CO-Biomass, a set of experiments was made to evaluate the repeatability of the method in the same solution containing $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ of lead and cadmium. Several modified electrodes were tested over a period of four weeks. Table 4 shows the results obtained, the standard relative deviation (DSR) of lead and cadmium was respectively 3.6% and 5.2%. The stability of the electrode was evaluated on an electrode kept in an acetate buffer and stored at 4°C for 6 weeks. The measurements are carried out under the same conditions mentioned previously. The results obtained show no significant change in the analytical response. These results indicated an acceptable stability.

3.10. Analysis of real sample

Furthermore, the DPASV response on real water samples was also tested using Pb(II) and Cd(II) as a representation. Besides, as shown in Fig. 12, Table 5, the good results of recovery experiment are obtained and the recoveries were in the range of 95.3–106.5%. These good results suggest that the proposed sensors have the potential applicability in environmental monitoring.

4. Conclusion

This work describes an electrochemical biosensor based on (GCE-SWCNTs-CO-Biomass) as a selective ligand for the detection of Cd (II) and Pb (II). DPASV analysis using the GCE-SWCNT-CO-Biomass film electrodes has been demonstrated. The sensitivity of the biosensor has been significantly increased due to the high adsorption capacity and the large surface area of SWCNTs. Real samples of groundwater were also analyzed and quantified successfully, good recovery results are obtained. Our results suggest that the proposed sensor offers great promise for the simultaneous and versatile detection of a wide variety of important analytes.

References

- [1] C.O. Akujobi, N.N. Odu, S.I. Okorondu, Bioaccumulation of lead by *Bacillus* species isolated from pig waste, *J. Res. Biol.* 2 (2012) 83–89.
- [2] P. Li, C. Lin, H. Cheng, S. Duan, K. Lei, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113 (2015) 391, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eco-env.2014.12.025>.
- [3] Costa Augusto, A.C. Pereira, F. Duta, Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* SP, *Bacillus cereus*, *Bacillus spearecus* and *Bacillus subtilis*, *Braz. J. Microbiol.* 32 (2001) 32–50.
- [4] I. Kanu, O.K. Achi, Industrial effluents and their impact on water quality of receiving rivers in Nigeria, *J. Appl. Technol. Environ. San.* 1 (2011) 75–86.
- [5] C. Tu, Y. Shao, N. Gan, Q. Xu, Z. Guo, Oxidative DNA strand scission induced by a trinuclear copper(II) complex, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 4761–4766.
- [6] V. Antochshuk, M. Jaroniec, *Chem. Commun.* (2002) 258–259.
- [7] M.C. Jung, Heavy metal contamination of soil and water in and around the Imcheon Au-Ag mine. Korea, *Appl. Geochem.* 16 (2001) 1369–1375.
- [8] Paul B. Tchounwou, Clement G. Yedjou, Anita K. Patolla, Dwayne J. Sutton, Heavy Metals Toxicity and the Environment *PMC*, 101 (2014), pp. 133–164.
- [9] M.L. El Hachimi, M. Fekhaoui, A. El Abidi, A. Rhoujatti, Soil contamination by heavy metals from abandoned mines: the case of the Aouli-Mibladen-Zeïda mines in Morocco, *Cah. Agric.* 23 (2014) 213–219.
- [10] C.G. Lee, H.T. Chon, M.C. Jung, Heavy metal contamination in the vicinity of the Daduk Au–Ag–Pb–Zn mine in Korea, *Appl. Geochem.* 16 (2001) 1377–1386.
- [11] Jianlong Wang, Can Chen, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 427–451.
- [12] G. Aragay, A. Merkoçi, Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals, *Electrochim. Acta* 84 (2012) 49–61.
- [13] L. Cui, J. Wu, H. Ju, Electrochemical sensing of heavy metal ions with inorganic, organic and bio-materials, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 276–286.
- [14] Z. Yanaz, H. Filik, R. Apak, Development of an optical fibre reflectance sensor for lead detection based on immobilised arsenazo III, *Sensors Actuators B Chem.* 147 (2010) 15–22.
- [15] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3218–3222.
- [16] E.P. Achterberg, C. Braungardt, Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 381–397.
- [17] C. Gao, X.-J. Huang, Voltammetric determination of mercury(II), *TrAC Trend. Anal. Chem.* 51 (2013) 1–12.
- [18] Z.-G. Liu, X.-J. Huang, Voltammetric determination of inorganic arsenic, *TrAC Trends Anal. Chem.* 60 (2014) 25–35.
- [19] H. Xu, L. Zeng, D. Huang, Y. Xian, L. Jin, A nafion-coated bismuth film electrode for the determination of heavy metals in vegetable using differential pulse anodic stripping voltammetry: an alternative to mercury-based electrodes, *Food Chem.* 109 (2008) 834–839.
- [20] J. Wang, J. Lu, U. Kirgöz, S. Hocevar, B. Ogorevc, Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 29–34.
- [21] G. Herzog, V. Beni, Stripping voltammetry at micro-interface arrays: a review, *Anal. Chim. Acta* 769 (2013) 10–21.
- [22] J.M. Gong, T. Zhou, D.D. Song, L.Z. Zhang, X.L. Hu, Stripping voltammetric detection of mercury(II) based on a bimetallic Au-Pt inorganic-organic hybrid nanocomposite modified glassy carbon electrode, *Anal. Chem.* 82 (2010) 567–573.
- [23] W. Deng, Y. Tan, Z. Fang, Q. Xie, Y. Li, X. Liang, S. Yao, ABTS-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite/Bi film electrode for sensitive determination of Cd and Pb by differential pulse stripping voltammetry, *Electroanalysis* 21 (2009) 2477–2485.
- [24] Jairo Alberto, José Barón-Jaimez, Luddey Marulanda-Arévalo, José Barba-Ortega, Electrodes friendly with the environment for detect heavy metal, *DYNA* 81 (2014) 122–128.
- [25] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56–58.
- [26] a) C.N.R. Rao, B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, *Chem. Phys.* 2 (2001) 78–105;
b) P.J.F. Harris, *Carbon Nanotubes and Related Structures*, New Materials for the Twenty-First Century, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1999;
c) R. Saito, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, *Physical Properties of Carbon Nanotubes*, Imperial College Press, London, 1998.
- [27] A.K. Feldman, M.L. Steigerwald, X. Guo, C. Nuckolls, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 1731–1741.
- [28] Z. Chen, J. Appenzeller, J. Knoch, Y.M. Lin, P. Avouris, *Nano Lett.* 5 (2005) 1497–1502.
- [29] E.T. Thostenson, T.-W. Chou, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 35 (2002) 77–80.
- [30] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 7–14.
- [31] F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, N. Mano, *Nat. Commun.*, doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms1000>.
- [32] A. Peigney, C. Laurent, E. Flahaut, R.R. Bacsa, A. Rousset, Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes, *Carbon* 39 (2001) 507–514.
- [33] R. Saito, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, *Imperial College Press*, London, 1998.
- [34] a) P.M. Ajayan, T.W. Ebbesen (Ed.), *Carbon Nanotubes: Preparation and Properties*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1997(Ch. 3);
b) P.M. Ajayan, *Chem. Rev.* 99 (1999) 1787–1800;
c) S. Iijima, *Physica B+C* 323 (2002) 1–5;
d) M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P.C. Eklund (Eds.), *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, New York, 1996;
e) M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. Avouris (Eds.), *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- [35] Christian Mougín, Véronique Chaplain, Rachel Rama-Mercier, Laurent Sohier, Jean-Claude Sigoillot and Marcel Asther. *Phytopharmacy and Chemical Mediators Unit of INRA, Krebs, Laboratory of Filamentous Fungi Biotechnology.*
- [36] C. White, J.A. Sayer, G.M. Gadd, Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination, *FEMS Microbiol. Rev.* 20 (2006) 503–516.
- [37] C.L. Brierley, Bioremediation of metal contaminated surface and groundwaters, *Geomicrobiol. J.* 8 (1990) 201–223.
- [38] T. Muraleedharan, L.I. Venkobachar, Further insight into the mechanism of bio-sorption of heavy metals by *Ganoderma lucidum*, *Environ. Technol.* 15 (1994) 1015–1027.
- [39] H. Harms, D. Schlosser, L.Y. Wick, Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011) 177–192.
- [40] G. Bhavya, K.C.R. Sunil, B. Nandini, K. Swati, H.S. Prakash, N. Geetha, In search of industrial clean-up clients, evaluation of heavy metal tolerability of rhizospheric trichoderma, *Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol.* 2 (2015) 948–952.
- [41] M. Verscheure, G. Lognay, M. Marlier, *Revue bibliographique: chemical methods of identification and fungi classification*, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6 (2002) 131–142.
- [42] M.E. Bounoux, F. Espinasse, New applications of molecular biology techniques in medical mycology, *Fr. Lab. Rev.* 351 (2003) 67–71.
- [43] H.A. de Valk, C.H. Klaassen, J.F. Meis, Molecular typing of *Aspergillus* species, *Mycoses* 51 (2008) 463–476.
- [44] B. Volesky, Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century, *Hydrometallurgy* 59 (2001) 203–216.
- [45] Guo. Zhao, Hui. Wang, Gang. Liu, Direct quantification of Cd²⁺ in the presence of Cu²⁺ by a combination of anodic stripping voltammetry using a Bi-film-modified glassy carbon electrode and an artificial neural network, *Sensors* 17 (2017) 1558.
- [46] Huakun Xing, Jingkun Xu, Xiaofei Zhu, Xuemin Duan, Limin Lu, Yinxiu Zuo, Youshan Zhang, Wenmin Wang, A new electrochemical sensor based on carboidazole grafted reduced graphene oxide for simultaneous detection of Hg²⁺ and Pb²⁺, *J. Electroanal. Chem.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.043>.
- [47] Zheng. Guoa, b.Myeong-Lok. Seolb, Chao. Gaoa, Moon-Seok. Kimb, Jae-Hyuk. Ahnb, Yang-Kyu. Choib, Xing-Jiu. Huang, Functionalized porous Si nanowires for selective and simultaneous electrochemical detection of Cd(II) and Pb(II) ions, *Electrochim. Acta* 211 (2016) 998–1005.
- [48] V.K. Gupta, M.L. Yola, N. Atar, Z. Ustundag, A.O. Solak, A novel sensitive Cu(II) and Cd(II) nanosensor platform: graphene oxide terminated p-aminophenyl modified glassy carbon surface, *Electrochim. Acta* 112 (2013) 541–548.
- [49] Y. Lian, M. Yuan, H. Zhao, DNA wrapped metallic single-walled carbon nanotube sensor for Pb(II) detection, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 22 (2014), pp. 510–518.
- [50] Gregory. March, Tuan.Dung. Nguyen, Benoit Piro, Modified electrodes used for electrochemical detection of metal ions in environmental analysis, *Biosensors* 5 (2015) 241–275.
- [51] S. Rolland, C. Bruel, C. Rasclé, V. Girard, G. Billon-Grand, N. Poussereau, pH controls both transcription and post-translational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, *Microbiology* 155 (2009) 2097–2105.
- [52] D. Duygu, T. Baykal, D. Açıköz, K. Yildiz, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies, *J. Sci.* 22 (2009) 117–121.
- [53] M. Wenning, S. Scherer, Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 7111–7120.
- [54] J.A. Sayer, G.M. Gadd, Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*, *Mycological Research*, Vol. 101 1997, pp. 653–661.
- [55] U. Hildebrandt, M. Regvar, Bothe, Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance, *Phytochemistry* 68 (2007) 139–146.
- [56] G.M. Gadd, Interaction of fungi with toxic metals, *New Phytol.* 124 (1993) 25–60.
- [57] T.P. Pirog, Role of Acinetobacter sp. exopolysaccharides in protection against heavy metal ions, *Microbiology* 66 (1997) 284–288.
- [58] H.C. Fleming, J. Wingender, Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-part II: Technical aspects, *Water Sci. Technol.* 43 (2001) 9–16.
- [59] B. Volesky, Biosorption and me, *Water Res.* 41 (2007) 4017–4029.
- [60] S.M. Bowman, S.J. Free, The structure and synthesis of the fungal cell wall, *BioEssays* 28 (2006) 799–808.
- [61] Smits, G.J., van den Ende, H. Klis, FM, Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast, *Microbiology* 14 (2001) 781–794.
- [62] J.P. Latgé, The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell, *Mol. Microbiol.* 66 (2007) 279–290.
- [63] M. Bernard, J.P. Latgé, *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis, *Med. Mycol.* 39 (2001) 9–17.
- [64] F.M. Klis, P. Mol, K. Hellingwerf, S. Brul, Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 26 (2002) 239–256.
- [65] J.L. Wang, C. Chen, Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotech. Adv.* 27 (2009) 195–226.
- [66] J.L. Wang, C. Chen, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review, *Biotech. Adv.* 24 (2006) 427–451.
- [67] Meijia Wang, Lianying Wang, Gang Wang, Xiaohui Ji, Yubai Bai, Tiejun Li, Shaoyun Gong, Jinghong Li, Application of impedance spectroscopy for monitoring colloidal Au-enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 575–582.
- [68] Abdoukadi Ayoub, Mahamane Boubié, Guel Paul-Louis, P.L. Fabre,

- Electrochemical behaviour of iron(II) at a Nafion-1,10-phenanthroline-modified carbon paste electrode: assessing the correlation between preconcentration potential, surface morphology and impedance measurements, *J. Soc. Ovest-Afr. Chim.* 039 (2015) 41–56.
- [69] K. Zinoubi, H. Majdoub, H. Barhoumi, S. Boufi, N. Jaffrezic-Renault, Determination of trace heavy metal ions by anodic stripping voltammetry using nanofibrillated cellulose modified electrode, *J. Electroanal. Chem.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.039>.
- [70] Y. Oztokina, M. Toka, H. Nalvuran, S. Kiyak, T. Gover, Z. Yazicigil, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper(II), *Electrochim. Acta* 56 (2010) 387–395.
- [71] Mariem Bourourou, Houcine Barhoumi, Abderrazak Maaref, Nicole Jaffrezic-Renault, Electrochemical study of modified glassy carbon electrode with carboxyphenyl diazonium salt in aqueous solutions, *Sens. Transducers* 27 (2014) 22–28.
- [72] X.T. Zheng, A. Than, A. Ananthanaraya, D.-H. Kim, P. Chen, Graphene quantum dots as universal fluorophores and their use in revealing regulated trafficking of insulin receptors in adipocytes, *ACS Nano* 7 (2013) 6278–6286.
- [73] Y. Dong, C. Chen, X. Zheng, L. Gao, Z. Cui, H. Yang, C. Guo, Y. Chi, C.M. Li, One-step and high yield simultaneous preparation of single- and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 8764–8766.
- [74] Song Luong Ting, Shu Jing Ee, Arundithi Ananthanarayanan, Kam Chew Leong, Peng Chen, Graphene quantum dots functionalized gold nanoparticles for sensitive electrochemical detection of heavy metal ions, *Electrochim. Acta* 172 (2015) 7–11 (G Model EA 24078 No. of Pages 5).
- [75] J.H. Liu, X.C. Fu, X. Chen, Z. Guo, C.G. Xie, L.T. Kong, X.J. Huang, *Anal. Chim. Acta* (2011) 21–28.
- [76] Qian. Song, Maoguo. Li, Li. Huang, Qikang. Wu, Yunyou. Zhou, Yinling. Wang, Bifunctional polydopamine@Fe₃O₄ core-shell nanoparticles for electrochemical determination of lead(II) and cadmium(II), *Anal. Chim. Acta* 787 (2013) 64–70.
- [77] M.F. Philips, A.I. Gopalan, K.-P. Lee, Development of a novel cyano group containing electrochemically deposited polymer film for ultrasensitive simultaneous detection of trace level cadmium and lead, *J. Hazard. Mater.* (2012) 237–238.
- [78] G. Aragay, J. Pons, A. Merkoci, Enhanced electrochemical detection of heavy metals at heated graphite nanoparticle-based screen-printed electrodes, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 4326–4331.
- [79] H.D. Vu, L.H. Nguyen, T.D. Nguyen, H.B. Nguyen, T.L. Nguyen, D.L. Tran, Anodic stripping voltammetric determination of Cd²⁺ and Pb²⁺ using interpenetrated MWCNT/P1,5-DAN as an enhanced sensing interface, *Ionics* 21 (2015) 571–578.
- [80] M.M. Abdel-Galeil, M.M. Ghoneim, H.S. El-Desoky, T. Hattori, A. Matsuda, Anodic stripping voltammetry determination of lead ions using highly sensitive modified electrodes based on multi-walled carbon nanotube, *J. Chem. Biochem.* (2014) 25–43 December, 2.
- [81] R. Nasraoui, D. Floner, C. Paul-Roth, F. Geneste, Flow electroanalytical system based on cyclam-modified graphite felt electrodes for lead detection, *J. Electroanal. Chem.* 638 (2010) 9–14.
- [82] R.O. Kadara, I.E. Tohill, Development of disposable bulk-modified screen printed electrode based on bismuth oxide for stripping chronopotentiometric analysis of lead (II) and cadmium (II) in soil and water samples, *Anal. Chim. Acta* 623 (2008) 76–81.
- [83] Y. Zhang, J. Zhang, Y. Liu, H. Huang, Z. Kang, Highly ordered three-dimensional macroporous carbon spheres for determination of heavy metal ions, *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 1034–1039.