



Faculté des Sciences Appliquées  
Département de Génie des Procédés  
**Thèse de Doctorat LMD**

Présenté par  
**MENAA Sabah**

Spécialité : Génie des procédés de l'environnement.

---

**Elaboration d'un biocapteur (MWCNTs-AuNPs/E.coli) pour la  
détection de quelques métaux lourds (Pb, Cd, Hg)**

---

Soutenue publiquement le : 08 janvier 2023  
Devant le jury composé de :

SELLOUM Djamel	professeur.	Univ. Ouargla	Président
ACHI Fethi	M.C.A.	Univ. Ouargla	Directeur de thèse
MEHELLOU Ahmed	M.C.A	Univ. El'Oued	Examineur
HENNI Abdelallah	Professeur	Univ. Ouargla	Examineur
BENABEDESALAM Soulaf	MCA	Univ. Ouargla	Examineur
GHIABA Zineb	professeur	Univ. Ouargla	Examineur

**Année universitaire : 2022/2023**

## Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, le Dr. ACHI Fethi, pour avoir accepté de me superviser et de me tenir compagnie pour la réalisation de ce travail de thèse.

Et sa noblesse remarquable, pour sa générosité et sa grande patience, dont il a fait preuve malgré les défis académiques et professionnels.

Je remercie également tous les enseignants de département de génie des procédés de la faculté des sciences appliquées.

Je n'oublierais jamais les efforts, le soutien et la patience de mes parents.

Je tiens à remercier les membres de jury pour avoir accepté d'examiner le contenu de ma thèse de Doctorat.

Je tiens à remercier également monsieur le directeur du laboratoire de valorisation des promotions sahariennes de l'université de Ouargla pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire. Sans oublier toute l'équipe de personnel et il m'est impossible d'oublier mes très chères amies et collègues pour leurs aides précieuses. Je suis ravie d'avoir travaillé en leur compagnie, elles ont toujours été là pour me soutenir. Elles ont toujours fait tous leurs possible pour m'aider.

Je remercie mes amies et mes proches Iman BENTARFA, ses sœurs et BENSANA Amira qui m'ont toujours encouragée durant toute la période de la formation de doctorat.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur et toute l'équipe de PTAPC Ouargla pour me soutenir

Je tiens à remercier très sincèrement tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la finalisation de ce travail.

*Mena Sabah*

**Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail à toute la famille "*

*Menaa"et "Dechach "*

*A mon père et ma très chère mère*

*Qui m'ont toujours encouragé pour que*

*j'arrive à ce point.*

*A mon mari et sa famille*

*A mes chers frères "Salah eldin et Abd elhak,*

*Idris, Djamel eldin " et tous mes*

*Sœurs "Ikram, Amani, Farah "*

*A tous mes meilleures amies*

*Et toute personne qui m'a aidée à franchir un*

*horizon dans ma*

*vie...*

*MENAA Sabah*

## Table des matières

Remerciements .....	II
Dédicace .....	III
Table des matières .....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURE .....	VIII
LISTE DES SCHÉMAS.....	X
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	XI
Introduction générale.....	1
I. CHAPITRE I: GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS POUR LA DETECTION DES METAUX LOURDS .....	2
I.1. Introduction .....	4
I.2. Les principaux métaux lourds .....	5
I.2.1. Toxicité du plomb.....	6
I.2.2. Toxicité du cadmium.....	6
I.2.3. Toxicité du mercure.....	7
I.3. Méthodes de détermination des métaux lourds .....	7
I.3.1. La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) .....	8
I.3.2. Méthodes électrochimiques .....	9
I.4. Généralités sur les biocapteurs électrochimiques.....	9
I.4.1. Éléments constituant un biocapteur .....	9
I.4.2. Classification des biocapteurs .....	10
I.4.3. Techniques d'immobilisation des éléments de reconnaissance.....	10
I.4.4. Utilisation des nanocomposites pour la construction des Biocapteurs .....	13
I.4.5. Caractéristiques analytiques du biocapteur .....	13
I.4.5.1. La gamme de linéarité de la réponse .....	14
I.4.5.2. Limite de détection (LOD) .....	14
I.4.5.3. Sélectivité .....	14
I.4.5.4. Reproductibilité .....	15
I.4.5.5. Répétabilité.....	15
I.4.5.6. Stabilité.....	15
I.4.5.7. Limite de quantification (L.O.Q.).....	15
I.4.5.8. Temps de réponse .....	15
I.5. Types des biocapteurs pour la détection des métaux lourds .....	15
I.5.1. Biocapteurs enzymatiques .....	15
I.5.2. Biocapteurs à base de bactérie.....	18
I.6. Mécanisme d'interaction de la bactérie avec l'analyte cible.....	19

I.6.1.	Bioaccumulation.....	19
I.6.2.	Biosorption .....	19
I.6.3.	Biotransformation.....	20
I.7.	Généralités sur les méthodes électrochimiques.....	20
I.7.1.	Méthode d'ampérométrie .....	20
I.7.2.	Conductimétries.....	21
I.7.3.	Méthode de potentiométrie.....	21
I.7.4.	Mesure d'impédance .....	21
I.7.5.	Voltampérométrie cyclique .....	22
I.8.	Mécanisme de la détection électrochimique .....	22
I.9.	Mécanisme d'interaction entre l'enzyme et les métaux lourds .....	23
Conclusion.....		24
Référence.....		25
<b>II. CHAPITRE II : PREPARATION DU CAPTEUR A BASE D'E. COLI POUR LA DETECTION DES METAUX LOURDS : OPTIMISATION DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX.</b> .....		
II.1.	Introduction .....	29
II.2.	Matériels et Méthodes .....	29
II.2.1.	Réactifs.....	29
II.2.2.	Appareillage .....	30
II.3.	Dispositifs expérimentaux d'élaboration de la détection des métaux lourds .....	30
II.4.	Préparation des solutions.....	31
II.4.1.	Préparation de solution du plomb.....	31
II.4.2.	Préparation de solution du cadmium .....	31
II.4.3.	Préparation de l'analyte (mercure) .....	32
II.4.4.	Préparation de solution d'oxyde d'aluminium .....	32
II.5.	Préparation de la plateforme de détection à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF/pt32	
II.6.	Caractérisation du nanocomposite à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF par FTIR34	
II.7.	Analyse de la morphologie de nanocomposite MWCNTs-AuNPs-PVDF .....	35
II.8.	Effet du pH sur la réponse électrochimique du nanocomposite.....	36
II.9.	Effet de la vitesse de balayage sur la réponse électrochimique du nanocomposite37	
II.10.	Étude de la conductivité du nanocomposite par spectroscopie d'impédance .	38
II.11.	Préparation de la bactérie <i>E. coli</i> .....	39
II.11.1.	Inactivation de la bactérie <i>E. coli</i> .....	40
II.11.2.	Immobilisation de la bactérie <i>E. coli</i> .....	40
Conclusion.....		42
Références .....		43

III. CHAPITRE III :PERFORMANCE ANALYTIQUE D'UN CAPTEUR A BASE D' <i>E. COLI</i> POUR LA DÉTECTION DES METAUX LOURDS .....	45
III.1. Introduction .....	45
III.2. Effet de l'ajout de l' <i>E.coli</i> sur (Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF).....	46
III.3. Influence de la présence de Albumine de sérum bovine .....	47
III.4. Détection électrochimique des ions de plomb.....	48
III.4.1. Réponse électrochimique du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs.....	48
III.4.2. Effet de l'ajout de l' <i>E.coli</i> sur la détection du plomb.....	49
III.4.3. Effet de l'inactivation de l' <i>E.coli</i> * sur la détection de plomb .....	50
III.5. Influence de l'ajout d' <i>E.coli</i> sur la détection du cadmium.....	51
III.6. Influence de l'ajout d' <i>E.coli</i> sur la détection des ions mercure .....	52
III.7. Étude de l'inhibition enzymatique .....	53
III.7.1. Inhibition par les ions du plomb.....	53
III.7.2. Influence de l'ajout de l' AuNPs .....	54
III.7.3. Degré d'inhibition par les ions du plomb .....	55
III.8. Degré d'inhibition par les ions du cadmium .....	57
III.9. Degré d'inhibition par les ions du mercure .....	58
III.10. Étude de la performance analytique du capteur.....	59
III.10.1. Étude de la reproductibilité.....	60
III.10.1.1. Reproductibilité du capteur pour la détection du plomb .....	60
III.10.1.2. Reproductibilité du capteur pour la détection de cadmium.....	60
III.10.1.3. Reproductibilité du capteur pour la détection de mercure.....	61
III.10.2. Étude de la stabilité du capteur.....	61
III.10.2.1. Étude de la stabilité du capteur pour la détection du plomb.....	62
III.10.2.2. Étude de la stabilité du capteur pour la détection du cadmium.....	62
III.10.2.3. Étude de la stabilité du capteur pour la détection du Hg <sup>+</sup> .....	63
III.10.3. Étude de la sélectivité du capteur .....	64
III.11. Étude de l'applicabilité du capteur .....	64
III.11.1. Application du capteur pour la détection des ions de plomb aux eaux usées.....	65
III.11.2. Application du capteur pour la détection des ions de plomb au rouge à lèvres.....	66
Conclusion.....	70
Références .....	71
Conclusion générale .....	75

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1: Avantages et Inconvénients des différentes méthodes d'immobilisation [21].....	11
Tableau I-2: Paramètres analytiques pour la détermination de l'enzyme des biocapteurs à base de métaux. ....	17
Tableau II -1 Tableau II -1 valeurs des résistances et conductivités des électrodes (pt, Pt/MWCNTs, Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF).....	39
Tableau III-1: Réponses électrochimiques du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour la détection des métaux lourds dans les échantillons réels .....	67
Tableau III-2: Comparaison des performances analytiques de la réponse des MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA avec un autre capteur .....	69

## LISTE DES FIGURE

Fig I-1: l'élément métallique du plomb et sa classification dans le tableau périodique. ....	6
Fig I-2: l'élément métallique du cadmium et sa classification dans le tableau périodique.....	7
Fig I-3: l'élément métallique du mercure et sa classification dans le tableau périodique.....	7
Fig I-4: Méthode d'immobilisation par la liaison covalente . ....	11
Fig I-5: Méthode d'immobilisation par adsorption. ....	12
Fig I-6: Méthode d'immobilisation des enzymes par encapsulation.....	12
Fig I-7: Méthode d'immobilisation par réticulation.....	13
Fig I-8: Principe de construction d'un biocapteur enzymatique pour la détection des polluants Diminution de la réponse par l'effet de l'inhibiteur.....	16
Fig I-9: Interactions métal-bactérie affectant la bioaccumulation.....	19
Fig I-10: Interactions métal-bactérie affectant la biosorption.....	19
Fig I-11: Interactions métal-bactérie affectant la Biotransformation de bactérie. ....	20
Fig I-12: Réponses ampérométriques d'un capteur pour la détection de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	20
Fig I-13: Courbe spectroscopie impédance électrochimique. ....	21
Fig I-14: Réponses de voltamètre cyclique d'un capteur pour la détection d'acide caféique..	22
Fig II-1: Dispositif expérimental (la cellule et le Voltalab). ....	30
Fig II-2: Spectres FTIR de MWCNT dans DMF, MWCNTs-AuNPs et MWCNTs-AuNPs- PVDF.....	34
Fig II-3: Images MEB des MWCNT synthétisés (a, b) et (c, d) MWCNTs-AuNPs-PVDF...	35
Fig II-4: analyse EDX de nanocomposite. ....	36
Fig II-5: Réponse de l'électrode modifiée pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA en présence de 10 µg/l de Pb <sup>2+</sup> pour des valeurs de pH allant de 5 à 7 avec (0,1 M ABS pH = 5,0) à une vitesse de balayage 100 mV/s. a) Voltammogramme cyclique, b) Variation de la réponse. ....	36
Fig II-6: Réponse de l'électrode à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour 50µg/l de plomb (a) Volampérogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 V/s). (b) Relation entre le courant de pic redox (I <sub>p</sub> ) et la racine car.....	37
Fig II-7: Spectres d'impédance de l'électrode de platine Pt, Pt/MWCNTs, Pt/MWCNTs- PVDF, Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF, en ABS 0,1 M pH=5,0 en présence 50 µg/l Pb <sup>2+</sup> .....	38
Fig II-8: Coloration de gram sur Escherichia coli.....	39
Fig II-9: Images de la bactérie E. coli avant (A) et après traitement (B) à ultrasons à 80 Hz à pendant 25 min. ....	40
Fig III-1: Influence de la présence d'E. coli sur le transfert des électrons à travers l'électrode modifiée Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF. Conditions expérimentales : Solution tampon d'acétate (0,1 M pH=5,0) en présence 50 µg/l de Pb <sup>2+</sup> . ....	47
Fig III-2: Effet de l'ajout de protéine (BSA) sur la conductivité du nanocomposite à base de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/E.coli. Conditions expérimentales : Solution tampon d'acétate (0,1 M pH=5,0) en présence 50 µg/l Pb <sup>2+</sup> .....	47
Fig III-3: Réponses électrochimiques du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection du plomb (a) Voltampèremètre linéaire pour différentes concentrations de Pb <sup>2+</sup> (0,2-80 µg / l) (b) d'étalonnage : évolution linéaire de la densité de courant pour diff.....	48
Fig III-4: Réponses électrochimiques du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli pour la détection du plomb. (a) Voltampèremètre linéaire pour différentes concentrations de	

Pb <sup>2+</sup> + (0,2-80 µg / l) (b) Courbe d'étalonnage de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/E.coli	49
.....	
Fig III-5: Réponses électrochimiques du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour la détection du plomb. (a) Voltampèremètre linéaire pour différentes concentrations de Pb <sup>2+</sup> + (0,2-80 µg / l) (b) Courbe de calibration de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-. .....	50
Fig III-6: Réponses électrochimiques du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection du cadmium (a) sans et (c) avec E.coli*-BSA . (b,d) courbes de calibration correspondantes. ....	51
Fig III-7: Réponses électrochimiques du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection des ions de mercure Hg <sup>2+</sup> + (a) sans et (c) avec E.coli*-BSA . (b,d) courbes de calibration correspondantes. Conditions : Solution tampon d'acétate de 0,1 M-1, (pH=5). ....	52
Fig III-8: Réponses ampérométriques du capteur pour la détection de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (a) Effet de l'ajout de plomb sur la réponse du capteur pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs /E.coli*-BSA. Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate (pH 5,0,0,1M).(b) courbe d'étalonnage .....	54
Fig III-9: Réponses ampérométriques du capteur pour la détection de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (a) Effet de l'ajout des nanoparticules d'Or (AuNPs) sur la réponse ampérométrique du capteur de MWCNTs-PVDF-AuNPs avec et sans incubation de Pb <sup>2+</sup> Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; tampo .....	55
Fig III-10: Degré d'inhibition des enzymes par les ions du plomb en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur (Pb <sup>2+</sup> ). Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate 0.1 M (pH=5) .....	56
Fig III-11:Tracé de 1/K <sub>obs</sub> en fonction de 1/[Pb <sup>2+</sup> ]. Détermination des constantes cinétiques de l'inhibition par les ions de Plomb.....	57
Fig III-12: Degré d'inhibition des enzymes par les ions du plomb en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur (Cd <sup>2+</sup> ). Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate 0.1 M (pH=5). ....	57
Fig III-13: Tracé de 1/K <sub>obs</sub> en fonction de 1/[Cd <sup>2+</sup> ]. Détermination des constantes cinétiques de l'inhibition par les ions de Cadmiuim. ....	58
Fig III-14: Degré d'inhibition des enzymes par les ions du plomb en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur (Hg <sup>2+</sup> ). Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate 0.1 M (pH=5). ....	59
Fig III-15: Tracé de 1/K <sub>obs</sub> en fonction de 1/[Hg <sup>2+</sup> ]. Détermination des constantes cinétiques de l'inhibition par les ions de mercure. ....	59
Fig III-16: Voltammogrammes cycliques à ondes carrées (SWV) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour cinq différentes électrodes en présence 10 µg/l des ions de plomb (Pb <sup>2+</sup> )......	60
Fig III-17: Voltammogrammes cycliques à ondes carrées (SWV) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour cinq différentes électrodes .....	61
Fig III-18: Voltammogrammes cycliques à ondes carrées (SWV) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour cinq électrodes différentes en présence de 10 µg/l de Hg <sup>2+</sup> .....	61
Fig III-19: Étude de la stabilité du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli *-BSA par voltampérométrie cyclique pour 25 cycles consécutifs en présence 10µg/l Pb <sup>2+</sup> .....	62
Fig III-20: Voltammogrammes cycliques de stabilité du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour 25 cycles consécutifs en présence de 10µg/l Cd <sup>2+</sup> . ....	63
Fig III-21: Voltammogrammes cycliques de stabilité du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pendant 25 cycles consécutifs en présence de Hg <sup>2+</sup> . ....	63

Fig III-22: Sélectivité de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA pour Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> ; Hg <sup>2+</sup> dans solution tampon acétate (pH 5.0, 0.1M). .....	64
Fig III-23: Voltammogrammes à ondes carrées des échantillons de Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , et Hg <sup>2+</sup> de eaux usées par le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli* -BSA dans un tampon d'acétate (pH 5.0),(0,1M).....	65
Fig III-24: Préparation de l'échantillon de rouge à lèvres.....	66
Fig III-25: Voltammogrammes à ondes carrées des échantillons de Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , et Hg <sup>2+</sup> de rouge à lèvres par le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli*-BSA dans un tampon d'acétate (pH 5.0,0,1M). .....	67

## LISTE DES SCHÉMAS

Schéma I-1 : Classification périodique des éléments chimiques « tableau de MENDELIEËV. ....	5
Schéma I-2: Principe de fonctionnement de la spectroscopie d'absorption atomique.....	8
Schéma I-3: des éléments constituant un biocapteur.....	9
Schéma I-4: Différents types des transducteurs d'un capteur.....	10
Schéma I-5: Différentes natures des nanomatériaux pour la préparation des capteurs.....	13
Schéma I-6: des caractéristiques analytiques du biocapteur.....	14
Schéma II-1: Procédé de préparation de solution du MWCNTs.....	32
Schéma II-2: Procédé de préparation du nanocomposite à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF. ....	33
Schéma II-3: Étapes de préparation du capteur à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF pour la détection électrochimique.....	33
Schéma II-4: Représentation schématique de la fabrication du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli-BSA pour la détection des ions plomb.....	41

## LISTE DES ABBREVIATIONS

ABS	Acetate buffer solution
Au	OR
AuNPs	Nanoparticules d'or
AuNCs	Nanocomposites d'or
BSA	bovine serum albumine
CA	Acide caféique
CB	Noir carbone
CBPE	Electrode en pate de noir de carbone
Cd	Cadmium
CH <sub>3</sub> COOH	Acide acétique
CH <sub>3</sub> COONa	Acétate de sodium
CNTs	nanotubes de carbon
CPE	electrode en pate de carbone
Cs	chitosane
CV	Voltamètre cyclique
Co	cobalt
Cu	cuivre
DMF	Dimethyle forme aldehyde
EIS	impédance spectroscopie électrochimique
FTIR	Infrarouge a transformée de fourier
E-Coli	Escherichia coli
E	Potentiel (V).
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Oxyde de fer(III)
HRP	Horse Radish Peroxydase
G	graphite
GA	glutaraldehyde
GCE	Electrode de carbone vitreux
Go	Oxyde de graphene
GR	graphene
ITO	Oxyde de titanium
I	Degré d'inhibition (%).
L.O.D	limit de detection
L.R	La gamme linéaire
MWCNTs	Nanotube de carbone a paroi multiples
MOF	Metal -Organic Framework
Ni	nickel
NC	nanocomposite
Pb	Plomb
Cd	Cadmium
Hg	mercure
PVDF	Polyvinyle fluridene
pt	Electrode de platine.
Ref	références
rGo	Oxyde de graphene reduction
MEB	microscope électron en balayage
SV	sinusoidal voltages

SWCNTs	Nanotube de carbone a paroi
SWV	Voltamétrie a onde carée
Tyr	tyrosinase
QD	Quantum dots
ox	Oxydation

## **Introduction générale**

La présence des métaux lourds dans l'environnement menace directement l'écosystème en raison des rejets industriels qui se trouvent dans l'air, l'eau et le sol [1][2]. Ces rejets se caractérisent généralement par la forte présence des polluants inorganiques, ce qui multiplie les risques de la contamination par les métaux lourds [3]. Le rejet de ces métaux lourds dans les eaux souterraines et le sol pollue l'environnement et le rend hautement toxique en raison de leur forte degré de toxicité [4]. L'exposition aux métaux lourds peut provoquer des maladies graves qui perturbent l'équilibre de l'écosystème [5]. Les caractéristiques physico-chimiques de ces polluants inorganiques se différencient de l'un à l'autre, mais ils sont tous extrêmement toxiques même à l'état de trace. Les métaux lourds peuvent facilement contaminer les eaux de surface et les sols en s'y déversant ou en pénétrant dans les eaux souterraines et en se déposant dans les aquifères [6]. Les métaux lourds peuvent interagir avec plusieurs types des éléments biologiques tels que les protéines, les enzymes et les molécules d'ADN ce qui forme des complexes biotoxiques stables qui peuvent facilement inhiber l'activité biologique chez les êtres vivants.

Pour la détermination des métaux lourds, de nombreuses méthodes de détection peuvent être appliquées telles que : les méthodes de détection spectroscopique, électrochimique et optique [7]. La spectroscopie d'absorption atomique ou d'émission atomique et la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif sont aussi appliquées pour la détection des métaux lourds [8]. Aussi, récemment d'autres méthodes comme la fluorescence de rayon X (XRF) et la spectroscopie de dégradation induite par laser ont été appliquées pour la quantification des métaux lourds [9]. Contrairement à ces méthodes, l'approche électrochimique se caractérise par plusieurs avantages tels que, la mise en œuvre facile, des outils de mesures de faible coût offrant des mesures sur site, et donnent des résultats en temps très court [10]. Les outils de l'analyse électrochimique appelés « capteurs » se composent généralement d'une électrode sur laquelle est immobilisée une couche sensible à la détection de l'analyte cible [11] [12]. La sélectivité et la sensibilité sont le plus fortement influencées par la variété et la structure du matériau d'électrode [13]. L'utilisation des éléments biologiques immobilisés sur la plateforme de détection améliore considérablement la sensibilité des capteurs électrochimiques. A titre d'exemple, les capteurs enzymatiques sont le plus largement utilisés pour la détection des métaux lourds [14]. Cependant, les capteurs enzymatiques souffrent de plusieurs inconvénients comme le coût très élevées des enzymes oxydoréductases et aussi faible disponibilité de ces enzymes, en plus la diminution rapide de leur activité limite leur utilisation. L'originalité de ce travail de thèse s'articule autour de

l'utilisation de la bactérie *E.coli* comme une source des enzymes très disponible et moins chers pour la fabrication des biocapteurs électrochimiques à base des enzymes pour la détection des métaux lourds.

La thèse est répartie en trois chapitres, dont le premier décrit la problématique de la thèse en évoquant la toxicité des métaux lourds et leur effet nocif et très indésirable sur l'environnement et sur la santé de l'être vivant. Les méthodes classiques de la détection des métaux lourds ainsi que des généralités sur les biocapteurs comme nouveaux outils analytiques sont présentés dans ce chapitre. Aussi, une analyse bibliographique très profonde est effectuée sur la classification des types des biocapteurs pour la détection des métaux lourds est présentée à la fin de ce chapitre.

Le deuxième chapitre présente la méthode de préparation du capteur à base d'*E.Coli* pour la détection des métaux lourds où les étapes de l'optimisation des paramètres expérimentaux sont expliquées en détail. Le matériel et les méthodes de synthèse de la plateforme de détection sont montrés dans le même chapitre. Aussi, les résultats de la caractérisation du nanocomposite à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF par FTIR sont présentés et discutés. La méthode de préparation de la bactérie *E.coli* et l'influence de différents paramètres expérimentaux sur la performance de l'électrode modifiée est détaillée à la fin du deuxième chapitre.

Les résultats de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA sont montrés dans le troisième chapitre pour décrire l'influence de la présence de bovine sérum d'albumine et pour montrer aussi l'influence de l'ajout d'*E.coli* sur la détection des métaux lourds. Ce chapitre présente aussi l'étude de la performance analytique du biocapteur tel que l'étude de la reproductibilité et de la stabilité. L'applicabilité du biocapteur pour la détection des métaux lourds dans des échantillons réels est montrée à la fin de ce chapitre. En outre, le chapitre décrit le mécanisme de l'inhibition de l'activité catalytique des enzymes par les métaux lourds.

La thèse se termine par une conclusion générale qui résume l'essentiel de ce travail.

## Références

- [1] R.K. Soodan, Y.B. Pakade, A. Nagpal, J.K. Katnoria, Analytical techniques for estimation of heavy metals in soil ecosystem: A tabulated review, *Talanta*. 125 (2014) 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.033>.
- [2] P. Taylor, M. Zhang, Z. Liu, H. Wang, *Communications in Soil Science and Plant Analysis Use of Single Extraction Methods to Predict Bioavailability of Heavy Metals in Polluted Soils to Rice*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/00103621003592341>.
- [3] C. Li, K. Zhou, W. Qin, C. Tian, M. Qi, X. Yan, W. Han, A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques, *Soil and Sediment Contamination*. 28 (2019) 380–394. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1592108>.
- [4] S. Mishra, R.N. Bharagava, N. More, A. Yadav, S. Zainith, S. Mani, P. Chowdhary, Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health, *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. (2019) 103–125. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_5).
- [5] N. Mekonen, G. Habte, Effect of Water and Soil Contamination by Heavy Metals in Lettuce (*Lactuca sativa*), *Cabbage Different Stage*, 6 (2022) 35–40.
- [6] M.C. Chuan, G.Y. Shu, J.C. Liu, Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH, *Water, Air, and Soil Pollution*. 90 (1996) 543–556. <https://doi.org/10.1007/BF00282668>.
- [7] L.I. Simeonov, M. V. Kochubovski, B.G. Simeonova, *Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development: Risk Assessment and Prevention Strategies*, NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. 1 (2011). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0253-0>.
- [8] L.A. Malik, A. Bashir, A. Qureashi, A.H. Pandith, Detection and removal of heavy metal ions: a review, *Environmental Chemistry Letters*. 17 (2019) 1495–1521. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00891-z>.
- [9] S.H. Chen, Y.X. Li, P.H. Li, X.Y. Xiao, M. Jiang, S.S. Li, W.Y. Zhou, M. Yang, X.J. Huang, W.Q. Liu, Electrochemical spectral methods for trace detection of heavy metals: A review, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 106 (2018) 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.005>.
- [10] Y. Lu, X. Liang, C. Niyungeko, J. Zhou, J. Xu, G. Tian, A review of the identification and detection of heavy metal ions in the environment by voltammetry, *Talanta*. 178 (2018) 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.033>.
- [11] N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14 (2003) 159–173. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003>.
- [12] W. Samples, *Nanocomposites for Electrochemical Sensors and Their Applications on the Detection of Trace Metals in Environmental*, (2021).
- [13] U. Guth, J. Zosel, J. Riedel, N. Tran, M. Berthold, C. Vonau, U. Sasum, P. Shuk, M. Paramasivam, V. Vashook, Novel electrode materials for electrochemical sensors, *Proceedings of the International Conference on Sensing Technology, ICST*. (2011) 685–689. <https://doi.org/10.1109/ICSensT.2011.6137070>.
- [14] R. Ilangovan, D. Daniel, A. Krastanov, C. Zachariah, R. Elizabeth, Enzyme based biosensor for heavy metal ions determination, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 20 (2006) 184–189. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817330>.

**CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS  
POUR LA DETECTION DES METAUX LOURDS**

## I.1. Introduction

Les métaux lourds sont des substances de densité supérieures à  $5000 \text{ kg/m}^3$ . Même en de très petites quantités, ces produits chimiques sont très dangereux et peuvent causer des graves maladies [1]. Les métalloïdes tels que l'arsenic, le zinc, le plomb, le cadmium et le mercure sont capables de générer de l'activité à de faibles niveaux d'exposition. Ils se caractérisent par leur caractère dangereux de bioaccumulation dans les systèmes biotiques qui est dû à leur forte solubilité dans le milieu aquatique, sont également classés comme métaux lourds [2].

Actuellement, le monde entier se préoccupe à la lutte contre la contamination quotidienne de l'environnement par les métaux lourds qui se trouvent largement dans les effluents liquides issus de l'industrie chimique [3]. La pollution de l'environnement par ces métaux est un problème écologique et de santé publiques mondiales croissant ces dernières années. De plus, en raison d'une expansion exponentielle de leur utilisation dans une variété d'applications industrielles, agricoles, domestiques, l'exposition humaine a augmenté. Plusieurs sources de ces métaux sont signalées comme les activités industrielles, médicales aussi l'exploitation des mines et les fonderies [4].

Dans certains pays, les éruptions volcaniques peuvent être une source majeure de la contamination de l'environnement par les métaux lourds [5][6]. Quelques techniques analytiques ont été utilisées pour la détermination des métaux lourds comme la spectrométrie de masse à plasma ou d'absorption atomique (AAS) sont quelques-unes des techniques utilisées pour détecter les ions de métaux lourds. Ces méthodes sont extrêmement sensibles et sélectives, mais elles nécessitent un appareillage relativement coûteux, des processus opérationnels complexes et des périodes de détection prolongées [7].

Les techniques électrochimiques, en revanche, sont plus rentables, conviviales et fiables sur le terrain. Par rapport à d'autres méthodes spectroscopiques, ces procédures sont également rapides en termes de temps d'analyse [8]. Cependant, par rapport à d'autres approches spectroscopiques et optiques, ces techniques électrochimiques ont une sensibilité et une limite de détection très faible. En plus, ils nécessitent des améliorations de conception pour augmenter leur efficacité de détection des métaux lourds. Diverses techniques électrochimiques sont couplées pour augmenter leur sensibilité par modification de la surface du matériau d'électrode [9].

Dans ce chapitre, nous présentons des généralités sur le sujet de la thèse en expliquant la problématique générale. Ainsi, un rappel sur les propriétés de quelques métaux lourds, le

principe de fonctionnement d'un (bio)capteur électrochimique et les différents types des biocapteurs pour la détection des métaux lourds sont discutés. Aussi, des généralités sur les méthodes électrochimiques utilisés sont décrit à la fin de ce chapitre.

## I.2. Les principaux métaux lourds

Les métaux lourds sont omniprésents dans la nature et pénètrent dans le corps humain par diverses voies, perturbant les fonctions cellulaires et provoquant une toxicité, et sont excrétés par le foie ou les reins [10][11]. Les métaux lourds comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd) ou le mercure (Hg), peut effectuer très lentement le système nerveux.

L'accumulation plus longue de ces minéraux dans les organes est limitée par certaines protéines riches en cystéine. Une accumulation plus longue entraîne des dommages aux

Le tableau périodique des éléments chimiques est présenté avec les légendes suivantes :

- nom de l'élément (gaz, liquide ou solide à 0°C et 101,3 kPa)
- numéro atomique
- symbole chimique
- masse atomique relative (ou celle de l'isotope le plus stable) d'après [CIAAW "Atomic Weights 2013" - rev. 2015]

Les éléments sont classés en groupes (IA à VIIIB) et périodes (1 à 7). Les métaux lourds sont encadrés en rouge dans le tableau, incluant des éléments comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg), l'arsenic (As), le sélénium (Se), le tellure (Te), le bismuth (Bi), le polonium (Po), l'actinium (Ac), le thorium (Th), le protactinium (Pa), l'uranium (U), le néptunium (Np), le plutonium (Pu), l'américium (Am), le curium (Cm), le berkelium (Bk), le californium (Cf), l'europium (Eu), le gadolinium (Gd), le terbium (Tb), le dysprosium (Dy), l'holmium (Ho), l'erbium (Er), le thulium (Tm), l'ytterbium (Yb), le lutécium (Lu), le radon (Rn), le francium (Fr), le radium (Ra), l'actinide (Ac), le lanthane (La), le cérium (Ce), le praséodyme (Pr), le néodyme (Nd), le prométhium (Pm), le samarium (Sm), l'europium (Eu), le gadolinium (Gd), le terbium (Tb), le dysprosium (Dy), l'holmium (Ho), l'erbium (Er), le thulium (Tm), l'ytterbium (Yb), le lutécium (Lu), le radon (Rn), le francium (Fr), le radium (Ra), l'actinide (Ac), le lanthane (La), le cérium (Ce), le praséodyme (Pr), le néodyme (Nd), le prométhium (Pm), le samarium (Sm), l'europium (Eu), le gadolinium (Gd), le terbium (Tb), le dysprosium (Dy), l'holmium (Ho), l'erbium (Er), le thulium (Tm), l'ytterbium (Yb), le lutécium (Lu).

Les légendes de classification sont :

- Métaux** : Alcalins, Alcalino-terreux, Lanthanides, Actinides, Métaux de transition, Métaux pauvres, Métaux lourds.
- Non-métaux** : Autres non-métaux, Halogènes, Gaz nobles, Non classés.
- Autres** : primordial, radioactif, éléments synthétiques.

Schéma I-1 : Classification périodique des éléments chimiques « tableau de MENDELIEËV.

organes en altérant la fonction cellulaire.

**Toxicité des métaux lourds :** Ces métaux sont connus par des caractéristiques très dangereuses, comme :

- La non-dégradabilité
- La bioaccumulation dans les organismes vivants.
- Leur réponse très forte à des très faibles concentrations.
- Pouvoir former des ligands complexes très toxiques.

- Le degré de la toxicité de chaque élément métallique dépend fortement de sa structure chimique.

### I.2.1. Toxicité du plomb

Le plomb est un métal extrêmement toxique, pratiquement tous les organes du corps sont sensibles à la toxicité du plomb, le système nerveux est l'organe le plus endommagé par l'intoxication au plomb [12]. Cependant, il a une plus grande influence sur les jeunes que sur les adultes. Les adultes qui ont été exposés pendant une période prolongée peuvent obtenir de moins bons résultats à divers tests de performance cognitive qui évaluent les activités du système nerveux. Les nourrissons et les jeunes enfants sont particulièrement vulnérables même à de faibles quantités de plomb, ce qui peut contribuer à des problèmes de comportement [13].

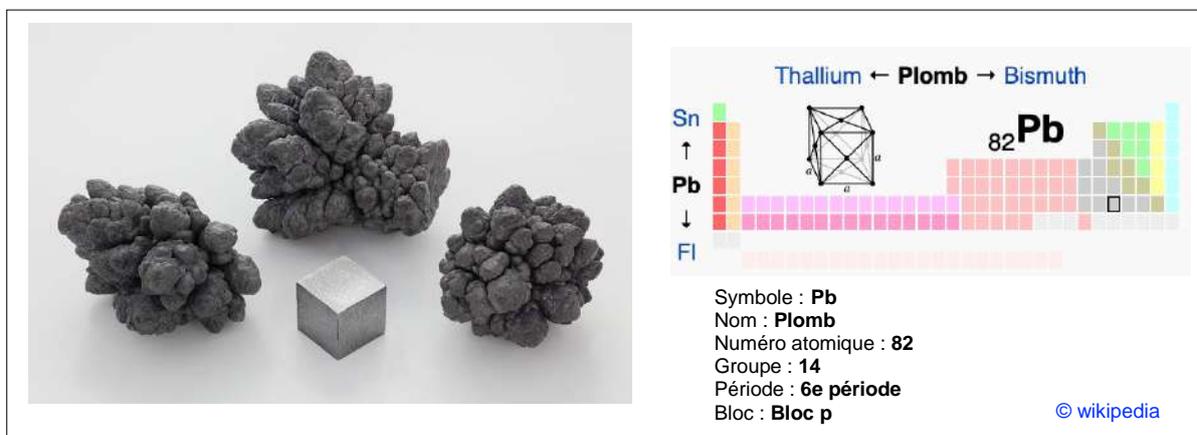


Fig I-1: L'élément métallique du plomb et sa classification dans le tableau périodique.

### I.2.2. Toxicité du cadmium

L'empoisonnement au cadmium a été enregistré dans plusieurs pays à travers le monde. C'est l'un des problèmes de santé mondiaux qui affecte divers organes et dans certaines circonstances, tue des gens chaque année [14]. L'exposition à long terme au cadmium par l'air, l'eau, le sol et les aliments provoque le cancer ainsi que des lésions dans les systèmes squelettique, urinaire, cardiovasculaire, neurologique central et périphérique et les systèmes respiratoires [15]. Les niveaux de cadmium dans le sang, l'urine, les cheveux, les ongles et la salive peuvent tous être testés. Les patients souffrant d'empoisonnement au cadmium nécessitent une irrigation gastro-intestinale, des soins de soutien et un nettoyage chimique, ainsi qu'un traitement de chélation standard avec de nouveaux agents chélateurs appropriés et des antidotes à base de nanoparticules [16].

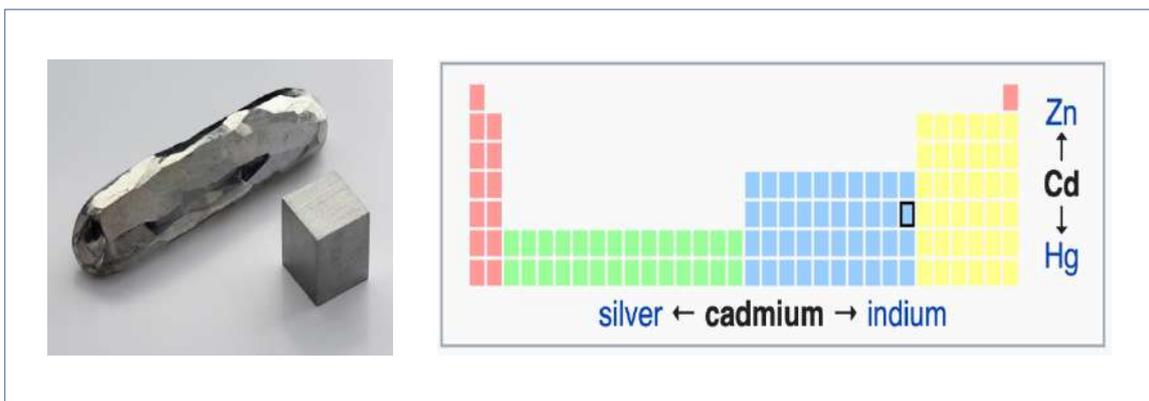


Fig I-2: L'élément métallique du cadmium et sa classification dans le tableau périodique.

### I.2.3. Toxicité du mercure

Le mercure est un élément lourd dangereux qui est abondant dans la nature. La majorité de l'exposition humaine provient de la consommation de poisson ou de l'utilisation d'amalgames dentaires [17]. Le mercure peut se trouver sous diverses formes, comme le mercure inorganique (métallique, vapeur, sels mercuriques et le dioxyde de mercure). Le mercure organique (qui comprend les composés dans lesquels le mercure est lié à une structure contenant des atomes de carbone), et le mercure sous forme de composés (méthyle, éthyle, phényle ou groupes similaires) [18].

Le mercure élémentaire et le méthyle mercure sont toxiques pour les systèmes nerveux central et périphérique. L'inhalation de vapeurs de mercure peut avoir des effets nocifs sur les systèmes nerveux, digestif et immunitaire, et sur les poumons et les reins, et peut être fatale. Les sels de mercure inorganique sont corrosifs pour la peau, les yeux et le tractus gastro-intestinal, et peuvent être toxiques pour les reins en cas d'ingestion [19].

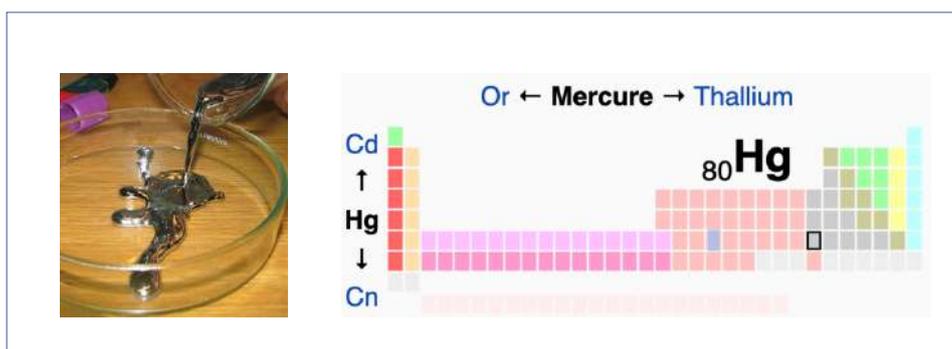


Fig I-3: L'élément métallique du mercure et sa classification dans le tableau périodique.

### I.3. Méthodes de détermination des métaux lourds

Les métaux lourds sont déterminés par plusieurs méthodes, on peut citer les méthodes de spectrométrie et les méthodes électrochimiques.

### I.3.1. La spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

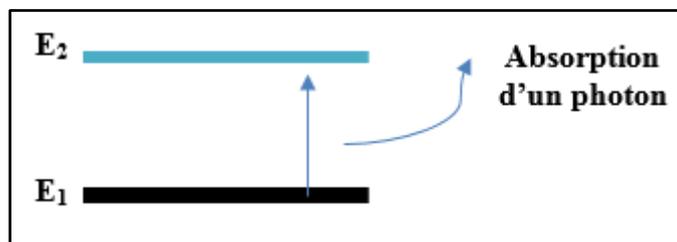
Cette technique d'analyse basée sur l'absorption des atomes libres. La spectrométrie d'absorption atomique est une méthode pour le dosage des métaux en solution où l'analyte est transformé à l'état d'atomes libres sous une température comprise entre 2000 à 3000 °C. Le principe de la méthode est basé sur la quantification de l'énergie de l'atome qui peut varier durant le mouvement des électrons entre les orbites électroniques, la différence de l'énergie est donnée par la formule suivante :

$$\Delta E = h\nu$$

Où

$h$  est la constante de Planck

$\nu$  est la fréquence du photon absorbé



L'appareil expérimental de l'absorption atomique se compose des éléments suivants :

1. Lampe à cathode creuse,
2. Brûleur et un nébuliseur,
3. Monochromateur
4. Détecteur relié à un amplificateur
5. Dispositif d'acquisition.

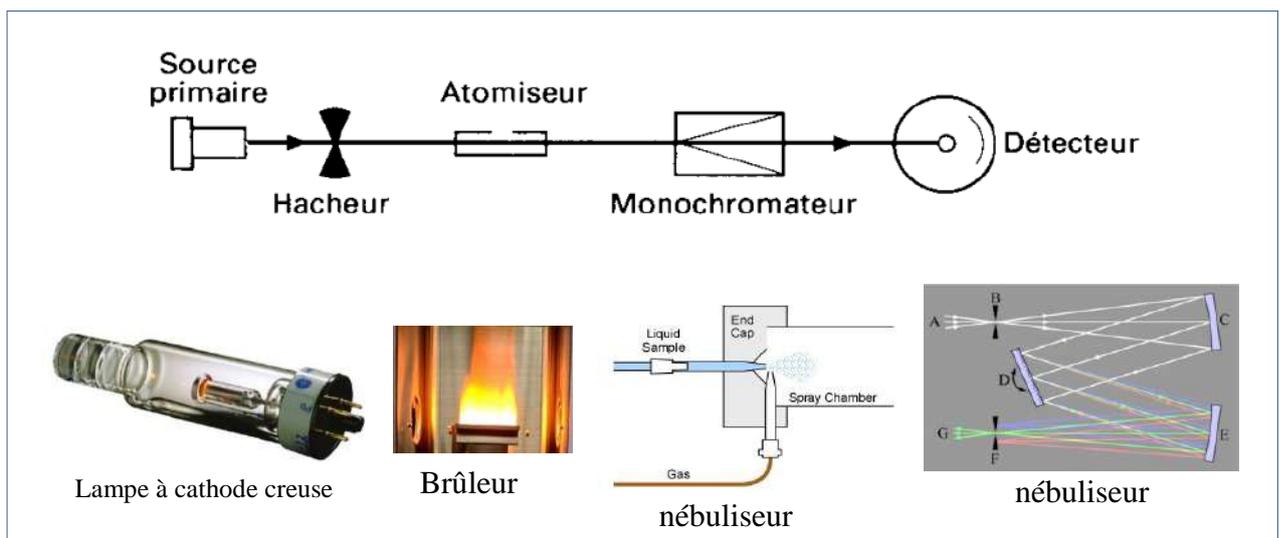


Schéma I-2: Principe de fonctionnement de la spectroscopie d'absorption atomique.

La concentration d'un atome peut être déterminée si la longueur d'onde d'un faisceau lumineux correspond à l'une des valeurs discrètes propres à chaque élément chimique, un

atome isolé va absorber l'énergie dégagée par les photons du faisceau. L'intensité lumineuse diminue du fait que l'atome absorbe de l'énergie, et la diminution est proportionnelle au nombre d'atomes, en mesurant l'absorption de la lumière, ou la vitesse à laquelle l'intensité de la lumière diminue.

### I.3.2. Méthodes électrochimiques

En utilisant l'approche électrochimique, le signal biologique et/ou chimique est converti en un signal électrique facilement accessible. Un système de transducteur convertit les changements physico-chimiques provoqués par la reconnaissance dans la couche sensible en un signal électrique. Il se compose d'une couche sensible et un transducteur.

### I.4. Généralités sur les biocapteurs électrochimiques

Le capteur se compose de deux parties essentielles : un récepteur et un système de transduction. Le récepteur est un élément de biorecognition biologique intégré à la surface du transducteur qui est pour objectif de reconnaître l'élément cible à détecter. Cette reconnaissance est basée sur le principe de la ressemblance physique entre le site actif du récepteur et l'élément à détecter.

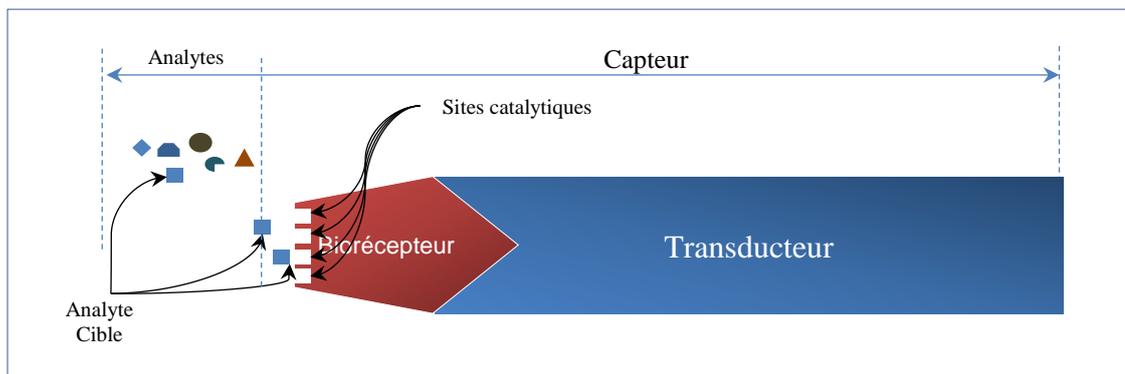


Schéma I-3: les constituants d'un biocapteur.

Les biocapteurs sont largement appliqués dans divers domaines, tels que :

- Secteur médicale
- Analyse clinique (Dépistage et diagnostic)
- Applications vétérinaires et agricoles
- Application industriels (analyse des produits, échantillons, toxicité des rejets.).
- Contrôle de l'environnement et surveillance de la pollution.

#### I.4.1. Éléments constituant un biocapteur

Les biocapteurs se composent de deux éléments essentiels un biorécepteur et un transducteur, la nature du transducteur se diffère selon le type de l'interaction de la grandeur à

mesurer, le schéma 2 montre les différents types de transduction du capteur. Le biorécepteur est un élément de reconnaissance moléculaire où se déroule la réaction, il est fixé directement sur la surface de transducteur. La performance des biocapteurs dépend fortement de la méthode d'immobilisation du biorécepteur.

#### I.4.2. Classification des biocapteurs

Le transducteur est un élément essentiel du biocapteur, il assure le transfert de l'interaction produite au niveau du biorécepteur pour qu'elle soit mesurable. On peut distinguer trois grands types du système de transduction, physique, optique ou électrochimique (schéma 2).

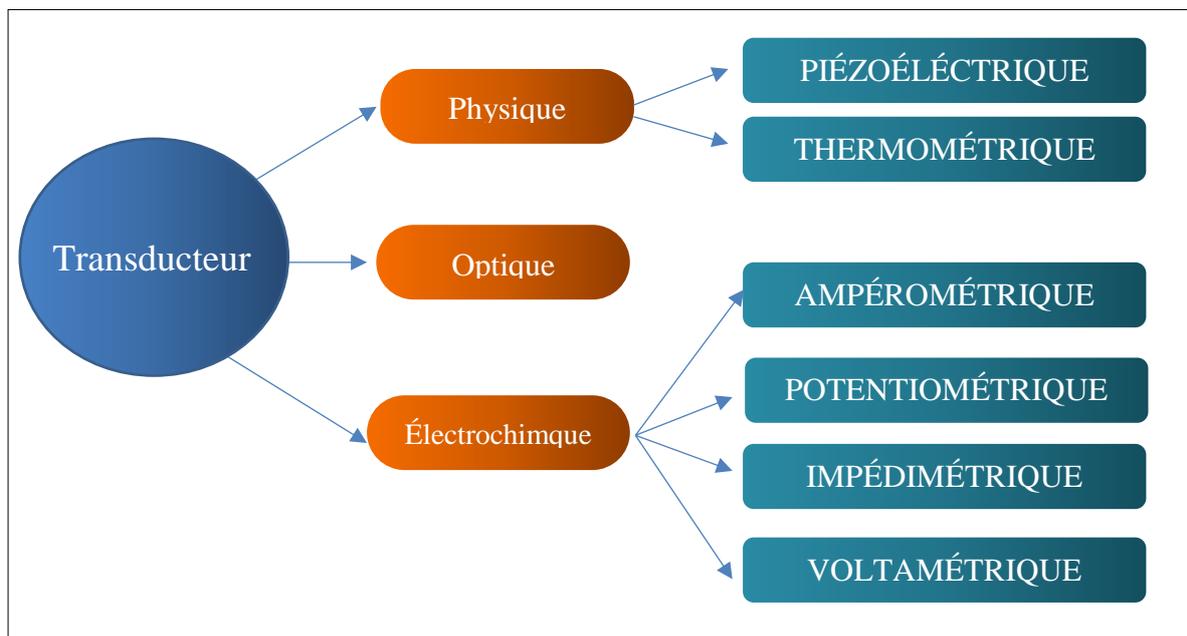


Schéma I-4: Différents types des transducteurs d'un capteur.

#### I.4.3. Techniques d'immobilisation des éléments de reconnaissance

La fabrication de biocapteurs nécessite une immobilisation efficace de l'élément biologique pour assurer une bonne détection du signal biochimique. Les bactéries peuvent être immobilisées par des méthodes physiques ou chimiques telles que l'adsorption, l'encapsulation, le couplage covalent ou la réticulation. Les méthodes traditionnelles consistent à adsorber ou à lier de manière covalente des cellules à un support solide, ou à les inclure dans une matrice. Le tableau 1 présente les avantages et les inconvénients de quelques méthodes d'immobilisation.

L'objectif principal des méthodes d'immobilisation est d'établir une fixation de l'élément biologique sur la surface du transducteur tout en maintenant la stabilité du biocapteur [20].

Tableau I-1: Avantages et Inconvénients des différentes méthodes d'immobilisation [21].

Méthode d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
<b>Adsorption</b>	Simple et facile à mise en œuvre. Activité catalytique élevée Immobilisation sans additives chimiques.	- Fragilité de l'immobilisation - Stabilité faible
<b>Encapsulation</b>	Protection biocatalyseur Permet l'immobilisation de grande quantité du biorécepteur. Permet le transport de molécules de faible poids moléculaire.	- La taille de pores affecte le transfert de masse - Seulement les molécules de petites tailles peuvent pénétrer
<b>Inclusion dans une matrice</b>	La force de liaison des biocatalyseurs Les fuites sont évitées. Diminue le taux d'absorption l'élément biologique La stabilité du biocatalyseur est améliorée.	- Il est possible que cela entraîne une modification du site actif. - Restrictions de diffusion - L'activité enzymatique diminue
<b>Couplage covalent</b>	Un lien fort entre le récepteur et le support solide. La stabilité thermique est excellente. Forte interaction entre l'enzyme et son substrat.	- L'activité enzymatique est réduite lorsque la mobilité enzymatique est restreinte. - L'immobilisation des cellules est moins efficace. - Les matériaux utilisés pour le support ne sont pas renouvelables.
<b>Réticulation</b>	Force de liaison du biocatalyseur La désorption est ralentie. Augmente la stabilité du biocatalyseur.	- Il est possible que cela entraîne une modification du site actif. - Restrictions de diffusion - L'activité enzymatique diminue.

### a) Liaison covalente

L'immobilisation par la liaison covalente est l'une des procédures les plus largement utilisées dans le domaine de l'immobilisation du biorécepteur. C'est une méthode d'immobilisation très connue basée sur la création de liaisons covalentes entre les cellules d'immobilisation et le support solide en présence d'un liant [22][23]. La liaison covalente, contrairement à l'adsorption, est une approche d'immobilisation irréversible [24].

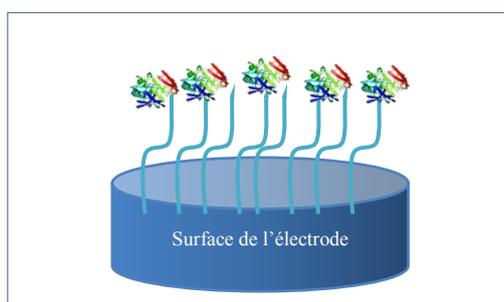


Fig I-4: Méthode d'immobilisation par la liaison covalente [25].

## b) Adsorption

C'est la méthode la plus simple et la plus rapide parmi toutes les techniques d'immobilisation [26]. La fixation est basée sur des liaisons faibles de type Van der Waals ou les liaisons hydrogène. L'immobilisation par adsorption offre une surface catalytique très sensible mais l'inconvénient se trouve dans la fragilité de la fixation, où les molécules peuvent se détacher facilement ce qui affecte les caractéristiques analytiques du biocapteur [27].

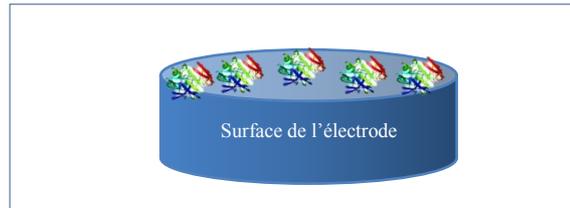


Fig I-5: Méthode d'immobilisation par adsorption.

## c) Encapsulation

Le piégeage de l'élément de biorecognition par encapsulation est basé sur l'utilisation d'une membrane.

C'est un procédé physico-chimique ou mécanique qui consiste à enfermer la substance encapsulée. La semi-perméabilité de la membrane aide à piéger l'enzyme et le protège du milieu extérieur, ce qui offre un milieu favorable pour la réaction enzymatique. L'avantage de la méthode d'encapsulation est qu'elle est purement physique ou mécanique et elle ne nécessite pas l'intervention des agents chimiques pour l'immobilisation.

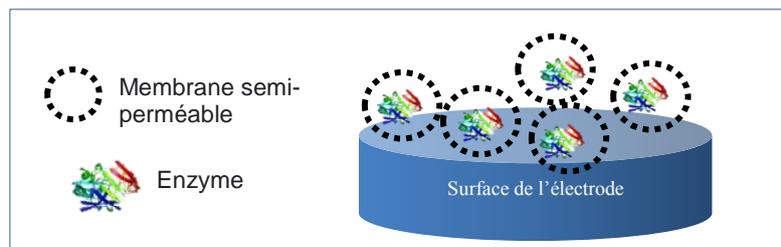


Fig I-6: Méthode d'immobilisation des enzymes par encapsulation.

## d) Réticulation

La réticulation est une approche chimique de l'immobilisation des biorécepteurs tels que les enzymes dans laquelle des produits chimiques bi- ou multifonctionnels forment des liaisons covalentes entre les enzymes. Le glutaraldéhyde est souvent utilisé comme agent réticulant pour fixer les éléments biologiques à la surface d'un support solide sans trop affecter leur propriétés catalytiques [28]. Cette méthode offre un certain nombre d'avantages, y compris une activité et une stabilité enzymatique plus ou moins acceptable [29].

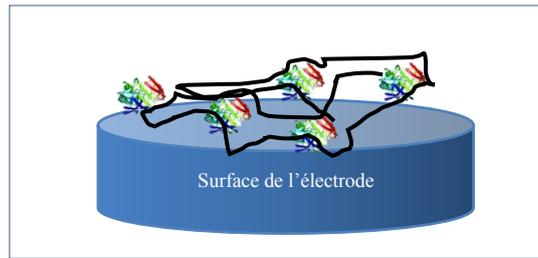


Fig I-7: Méthode d'immobilisation par réticulation.

#### I.4.4. Utilisation des nanocomposites pour la construction des Biocapteurs

Pour améliorer la performance analytique des biocapteurs, les nanocomposites ont été identifiés comme un choix avantageux pour améliorer les propriétés catalytiques des biorecepteurs.

Par conséquent, divers nanomatériaux sont utilisés pour préparer des plateformes sensibles à la détection des analytes. Les particules métalliques ou les composés organiques ou encore sous forme organométalliques sont largement utilisés pour construire des biocapteurs sensibles. Aussi, les polymères conducteurs et les matériaux carbonés comme le graphène et les nanotubes de carbone (CNT) ont montré leur aptitude à offrir des réponses catalytiques très améliorées en raison de leurs capacités de transduction efficaces. Aussi, les capteurs à base des métaux nobles et les matériaux de points quantiques (QD) appelés en anglais (quantum dots) offre une sensibilité très élevée et une limite de détection de l'ordre de picomole ou même à l'échelle atome.

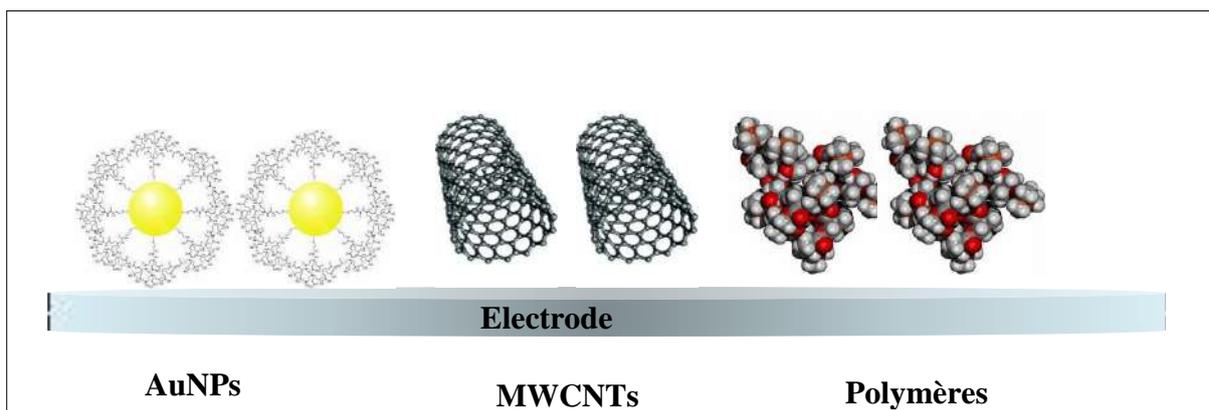


Schéma I-5: Différents natures des nanomatériaux pour la préparation des capteurs.

#### I.4.5. Caractéristiques analytiques du biocapteur

La performance analytique de chaque outil de mesure, y compris les biocapteurs électrochimiques, est estimée à partir des paramètres analytiques tels que : la sensibilité, la stabilité, la limite de détection, la gamme de linéarité, le temps de réponse, la reproductibilité,

la répétabilité, la stabilité, la sélectivité et aussi le temps de réponse. Ces paramètres sont déterminés expérimentalement et ils dépendent de la nature de l'électrode et les nanomatériaux utilisés ainsi que de la méthode de préparation du nanocomposite.

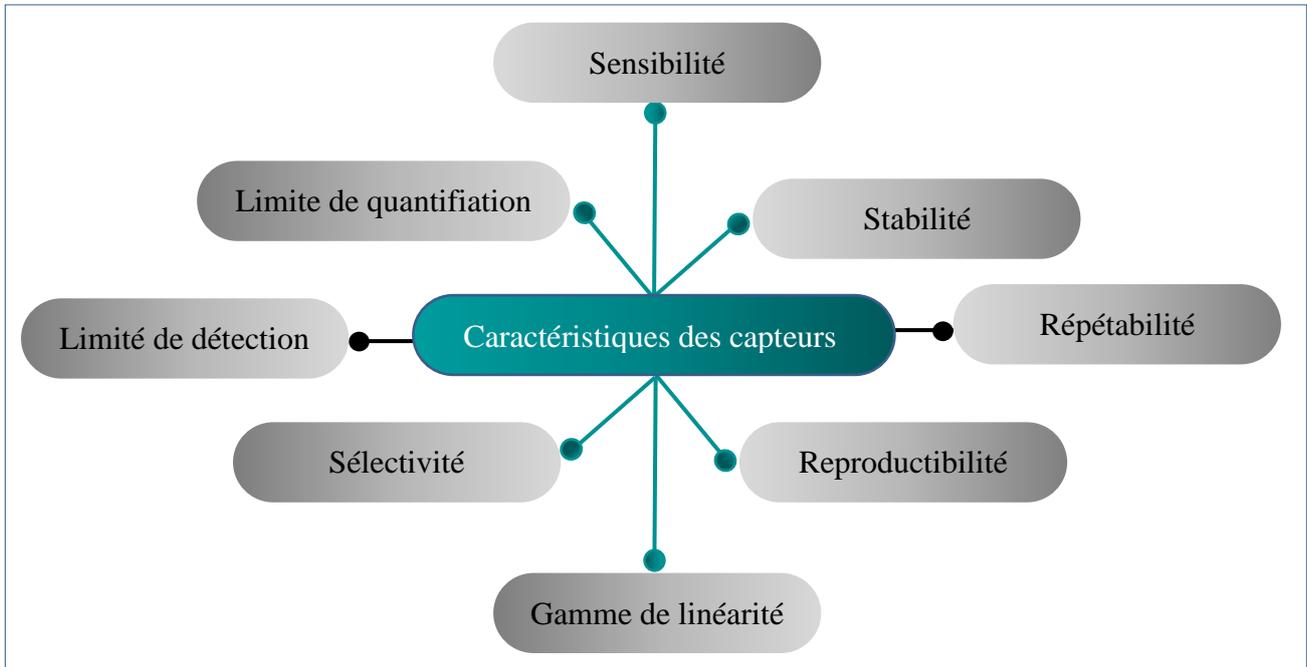


Schéma I-6: des caractéristiques analytiques du biocapteur.

#### **I.4.5.1. La gamme de linéarité de la réponse**

Ce paramètre traduit l'aptitude du biocapteur à délivrer une réponse linéaire lorsque la variation de la grandeur de sortie (réponse du capteur en courant) est linéaire avec la variation de la grandeur d'entrée (Concentration de l'analyte). L'intervalle est déterminé par le traçage de la courbe de calibration du capteur.

#### **I.4.5.2. Limite de détection (LOD)**

Ce paramètre est défini comme la plus petite concentration d'analyte que le biocapteur peut détecter. Pour calculer la limite de détection (LOD), les chercheurs utilisent la formule ( $LOD=3S/N$ ) pour distinguer le signal (S : calculé à l'aide du type d'écart SD de la courbe d'étalonnage) du bruit de l'appareil (N :Noise en anglais) [30].

#### **I.4.5.3. Sélectivité**

La sélectivité du biocapteur exprime son aptitude à détecter seulement l'analyte cible parmi les autres analytes qui peuvent intervenir et réagir dans le milieu réactionnel où se trouve l'analyte cible. Ce paramètre est très important dans le cas où l'analyte cible se trouve

dans des échantillons composés de plusieurs molécules de structure chimique semblables à celui de l'analyte cible.

#### **I.4.5.4. Reproductibilité**

Ce paramètre décrit la capacité du même biocapteur à fournir des réponses similaires pour des tests expérimentaux successifs dans le cas où les mesures sont effectuées dans les conditions différentes (changement de l'expérimentateur, changement du lieu d'analyse, ...etc.).

#### **I.4.5.5. Répétabilité**

Contrairement à la Reproductibilité, le paramètre de la répétabilité traduit l'aptitude du même (bio)capteur à fournir des réponses similaires pour des tests expérimentaux successifs effectués par la même méthode, avec le même expérimentateur en utilisant les mêmes instruments de mesure et dans un intervalle du temps très courts.

#### **I.4.5.6. Stabilité**

La stabilité est l'aptitude du biocapteur à offrir la même réponse, soit le signal en courant pour les biocapteurs électrochimiques. Généralement, la stabilité de chaque outil analytique diminue progressivement avec le temps d'utilisation et du stockage. Ce paramètre est mesuré en pourcentage par rapport à sa réponse obtenue de sa première utilisation. On peut alors distinguer la stabilité opérationnelle (répétabilité) qui traduit la diminution de la réponse du capteur pour des mesures répétées et la stabilité due au stockage de l'outil.

#### **I.4.5.7. Limite de quantification (L.O.Q.)**

La plus faible concentration détectable de l'analyte qui peut être quantifiée avec précision dans des conditions expérimentales déterminées.

#### **I.4.5.8. Temps de réponse**

Ce paramètre caractérise la rapidité du capteur à répondre dans une durée très courte aux variations brusque de la grandeur de mesure. C'est donc le temps de nécessaire entre la variation de la grandeur à mesurer et l'apparition du signal.

### **I.5. Types des biocapteurs pour la détection des métaux lourds**

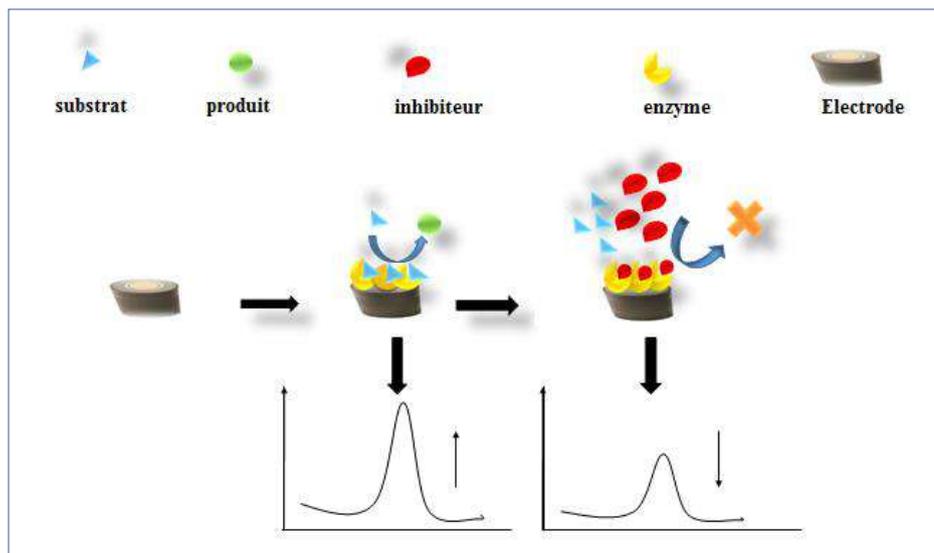
#### **I.5.1. Biocapteurs enzymatiques**

Les biocapteurs chimiques à base d'enzymes sont basés sur la reconnaissance biologique. Les enzymes catalysent la réaction électrochimique, améliore la sensibilité du

capteur, la stabilité du capteur enzymatique dépend de la méthode d'immobilisation et la nature du milieu réactionnel [31].

Ce type des biocapteurs fonctionnent sur la base de l'interaction entre une enzyme et son substrat. Comme le montre la figure 1, ce type de biocapteur fonctionne selon deux méthodes principales en fonction de l'analyte cible : la détection du substrat par la réaction de catalyse et la détection du polluant par l'effet de l'inhibition enzymatique. Les mécanismes de détection du substrat reposent sur la conversion du substrat par une enzyme de type oxydoréductase intégrée dans le biocapteur [32].

La détection des polluants est basée sur le principe de l'inhibition enzymatique, c'est-à-dire une diminution de l'effet catalytique des enzymes pour la catalyse du substrat. L'inhibiteur arrive au site catalytique de l'enzyme et bloque la réaction catalytique ce qui provoque une diminution du signal et par conséquent une diminution de la réponse du biocapteur. Le capteur développé dans ce travail est basé sur le principe de l'inhibition par les ions de plomb ( $Pb^{2+}$ ).



**Fig I-8: Principe de construction d'un biocapteur enzymatique pour la détection des polluants Diminution de la réponse par l'effet de l'inhibiteur.**

La linéarité de la réponse des biocapteurs indique que la proportionnalité entre les différentes concentrations de l'analyte et la réponse électrochimique Comme le montre le (tableau I.2),

La limite de détection présente un intérêt particulier dans l'évaluation des performances analytiques des biocapteurs notamment pour la détermination des substances dangereuses. La stratégie d'immobilisation des biorécepteurs dans les nanocomposites organiques-inorganiques est efficace car elle offre des limites de détection très basses surtout en utilisant

catalase comme biorécepteur (LOD=0,018 nM) [33]. Les glutaraldehyde utilisés pour construire une matrice à glucose oxidase contenant des nanotube de carbone (SWCNTs) et le BSA étendent la gamme linéaire de concentration de plomb de 4–35  $\mu\text{M}$  [37]. La combinaison de Nafion avec de la nanotube de carbone et de la catalase permet la détermination des métaux lourds (LOD = 13  $\mu\text{M}$ ) [43]. Ainsi, mélanger le polypyrrole (PPY) avec glucose oxidase est un procédé efficace pour détecter le mercure à l'état de trace (LOD = 0,48 $\mu\text{M}$ ) [38]. De même, l'immobilisation de la peroxydase (HRP) dans nanotube de carbone offre une détection à l'échelle micromolaire du métaux lourds [46]. En outre, de larges gammes de linéarité ont été obtenues en utilisant du nafion (0.5–2.2  $\mu\text{M}$ ) dans la plateforme à urease en présence des oxydes métalliques [52].

**Tableau I-2: Paramètres analytiques pour la détermination de l'enzyme des biocapteurs à base de métaux.**

Capteur	Potentiel (mV)	Métaux lourds	limite de Détection	Gamme linéaire	Sensibilité	IC <sub>50</sub>	Type d'inhibition	Références
Cat-BSA/GA/GCE	-400	Hg <sup>2+</sup>	0.018 nM	0.05–0.5 nM	1.23 $\mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$	3,5 nM	irréversible	[33]
Tyr/SPCPtE GOx/SPCPtE	250	Cr <sup>(VI)</sup>	-	1.8 - 15.8 $\mu\text{M}$ 89 - 769 nM	157.8 nA. $\mu\text{M}^{-1}$ 1 4422 nA. $\mu\text{M}^{-1}$	-		[34]
GOx-BSA/GA – Au	175	Cd <sup>2+</sup> Cr <sup>(VI)</sup>	6,95 $\mu\text{g/L}$ 91,7 ng/L	2.36 – 2.36 M 2.94 mM–2.94M	- -	-	reversible	[35]
GOx-CS/GLM)8 GCE		Hg <sup>2+</sup>	0.076 $\mu\text{M}$	0.5 - 5 $\mu\text{M}$	N.R	-	irréversible	[36]
GOx-Nb-SWNTs-GA-BSA/GrE	-580	Hg <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup>	100 $\mu\text{M}$	3–25 $\mu\text{M}$ 4–35 $\mu\text{M}$	0.9572 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ 0.5988 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$	-	Reversible	[37]
GOx - PPy/Pt	700	Hg <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup>	0.48 $\mu\text{M}$ 1.5 $\mu\text{M}$ 1.6 $\mu\text{M}$ 4.0 $\mu\text{M}$	0.48–3.3 $\mu\text{M}$ 1.5–11 $\mu\text{M}$ 1.6–7.7 $\mu\text{M}$ 4–26 $\mu\text{M}$	4.0 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ $\mu\text{M}^{-1}$ 1.2 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ $\mu\text{M}^{-1}$ 1.0 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ 0.5 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$	1.5 $\mu\text{M}$ 5.2 $\mu\text{M}$ 4.9 $\mu\text{M}$ 14 $\mu\text{M}$	Reversible	[38]
GOx/N-CNT/ GCE		Ag <sup>2+</sup>	1.8 nM	20 –200 nM	-	-	reversible	[39]
GOx/PNR/CF E		Co <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup>	18.6 $\mu\text{M}$ 1.2 $\mu\text{M}$ 7.9 $\mu\text{M}$	-	55.9 nA $\text{cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ $\mu\text{M}^{-1}$ 43 nA $\text{cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ 39 nA $\text{cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$	4.3	Reversible	[40]

					$\mu\text{M}^{-1}$			
<b>GOx/CuHCF/CFE</b>	-450	$\text{Cd}^{2+}$	1.2 $\mu\text{M}$	1.5–6.0 $\mu\text{M}$	17.6 nA $\text{cm}^{-2}$	5.8	-	[41]
		$\text{Cu}^{2+}$	0.5 $\mu\text{M}$	0.2–3.0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{M}^{-1}$	2.2		
					30.5 nA $\text{cm}^{-2}$			
					$\mu\text{M}^{-1}$			
<b>PLT-Tyr-GOx/Au</b>	-100	$\text{Cr}^{(\text{VI})}$	0.08 nM	50 -1000 $\mu\text{M}$	-	-	reversible	[42]
<b>Laccase-MWCNTs-Nafion/pt</b>	600	$\text{As}^{3+}$	13 $\mu\text{M}$	1 – 20 mM	46.9 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	-	reversible	[43]
<b>ChOx/Cs/BSA/GA/MWCNT/GCE</b>	-300	$\text{Pb}^{2+}$	0.04 $\mu\text{M}$	0.1-1.0 $\mu\text{M}$	0.05 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	1.55 nM	reversible	[44]
<b>AChE/Pt/Ru(II)-tris(bipy)-GO</b>		$\text{As}^{3+}$	0.03 $\mu\text{M}$	0.05-0.8 $\mu\text{M}$	106.05	-	reversible	[45]
		$\text{Cd}^{2+}$	0.07 $\mu\text{M}$	0.02-0.7 $\mu\text{M}$	$\mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$			
					124.7			
					$\mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$			
<b>HRP/MT-MWCNT/GCE</b>		$\text{Pb}^{2+}$	2.50 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.092–0.55 $\mu\text{M}$	2.6634	-	reversible	[46]
		$\text{Cu}^{2+}$	4.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.068–2.0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$			
<b>HRP/RGO/TH</b>		$\text{Cr}(\text{VI})$	0.02 mM	0.039–0.78 mM	6.98 mA/mM	3 $\mu\text{M}$	reversible	[47]
<b>HRP/PANI-co-PDTDA /Pt</b>		$\text{Pb}^{2+}$	0.938 $\mu\text{M}$	0–1 mM	$5.37 \times 10^{-2}$	6.6 $\mu\text{M}$	reversible	
		$\text{Hg}^{2+}$	0.78 $\mu\text{M}$	0–1 mM	$\mu\text{A} / \text{mM}$	6.0 $\mu\text{M}$		[48]
		$\text{Cd}^{2+}$	0.8 $\mu\text{M}$	0–0,01mM	$1.02 \times 10^{-2} \mu\text{A} / \text{mM}$	1.2 $\mu\text{M}$		
					$1.07 \times 10^{-2} \mu\text{A} / \text{mM}$			
<b>HRP/PNR/CFE</b>		$\text{Cr}(\text{VI})$	0.27 $\mu\text{M}$	0 - 0.8 $\mu\text{M}$	154 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	-		[49]
<b>HRP/MT-MWCNT/GCE</b>		$\text{Cd}^{2+}$	0.51 mM	2–30 mM	-	-	reversible	
							Reversible	[50]
<b>Urease/PANiNafion®(NSPN)/Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>		$\text{Pb}^{2+}$	0.45 ppm	0.1–1.0 ppm	743.5 $\mu\text{A } \text{ppm}^{-1}$	-	irreversible	[51]
<b>Urease/nafion/CeO<sub>2</sub>/Pt</b>	300	$\text{Pb}^{2+}$	0.019 $\mu\text{M}$	0.5–2.2 $\mu\text{M}$	89.2 $\times$	0.03 $\mu\text{M}$	-	[52]
		$\text{Hg}^{2+}$	0.018 $\mu\text{M}$	0.02–0.8 $\mu\text{M}$	$10^{-3} \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$	0.42 $\mu\text{M}$		
					$94.1 \times 10^{-3} \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$			

## I.5.2. Biocapteurs à base de bactérie

Les microbes (bactéries, champignons (levures et moisissures), algues, protozoaires et virus) sont utilisés dans la construction de biocapteurs à base de cellules entières car ils possèdent des éléments de biorecognition potentiels. Ils s'auto-répliquent et peuvent générer des éléments de reconnaissance comme des anticorps sans avoir besoin d'extraction et de purification [53] [54].

Les biocapteurs basés sur des cellules entières sont plus faciles à manipuler et prolifèrent plus rapidement que les cellules animales ou végétales. Les cellules peuvent

interagir avec une large gamme d'analytes, affichant la réaction électrochimique qu'un transducteur peut capturer et communiquer (principe du biocapteur à cellule entière) [55]. En raison de leur excellente sensibilité, sélectivité et capacités de détection, ces biocapteurs ont été utilisés avec succès dans la surveillance de l'environnement, l'analyse des aliments, la pharmacologie, les métaux lourds, les pesticides, la détection des polluants, le dépistage des substances organiques et des médicaments [56].

## I.6. Mécanisme d'interaction de la bactérie avec l'analyte cible

### I.6.1. Bioaccumulation

La bioaccumulation est généralement définie comme une augmentation des concentrations de polluants chez les espèces aquatiques résultant de l'absorption par le milieu environnant [57].

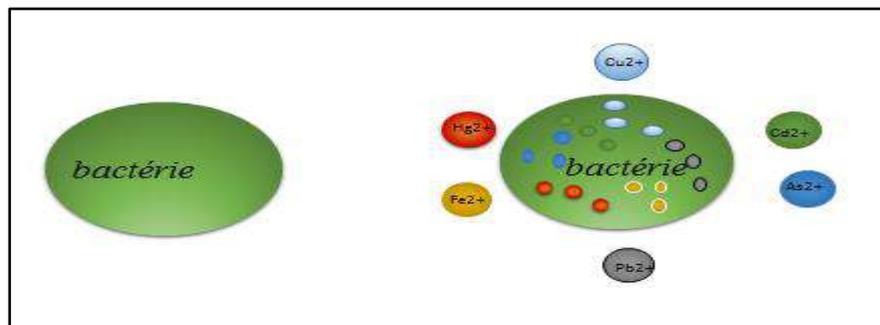


Fig I-9: Interactions métal-bactérie affectant la bioaccumulation.

### I.6.2. Biosorption

L'absorption, l'adsorption, l'échange d'ions, la complexation de surface et la précipitation sont toutes des méthodes pour éliminer les contaminants des systèmes d'eau utilisant des matériaux biologiques. L'accessibilité, l'efficacité et la capacité sont tous des avantages des biosorbants. Cette procédure est simple et directe. La régénération est simple, ce qui la rend incroyablement attrayante. Lorsque la concentration de la solution d'alimentation est suffisamment élevée, cependant, le procédé s'approche rapidement d'une percée, empêchant une élimination supplémentaire des polluants [58].

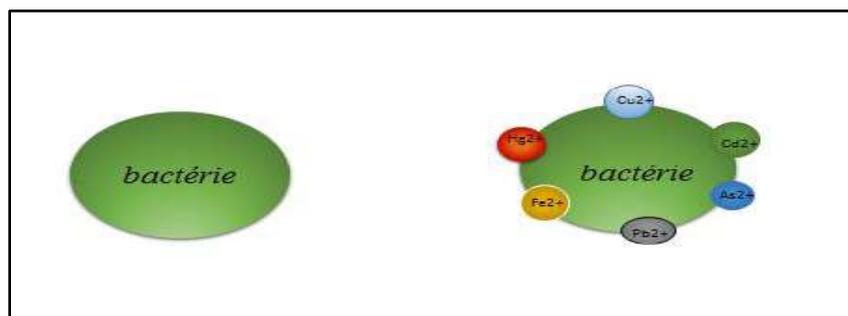


Fig I-10: Interactions métal-bactérie affectant la biosorption.

### I.6.3. Biotransformation

Les substances organiques sont modifiées d'une forme à une autre lors de la biotransformation afin de réduire leur persistance et leur toxicité. Les micro-organismes et leurs produits, tels que les bactéries, les champignons et les enzymes, contribuent à ce processus. Si les techniques de synthèse sont difficiles à trouver, les biotransformations peuvent être utilisées pour créer des produits chimiques ou des matériaux. La transformation naturelle est inefficace, lente et non spécifique [59]. Les biotransformations microbiennes, également connues sous le nom de biotechnologie microbienne, sont de plus en plus populaires et largement utilisées pour produire des métabolites en grande quantité et avec plus de sélectivité [60].

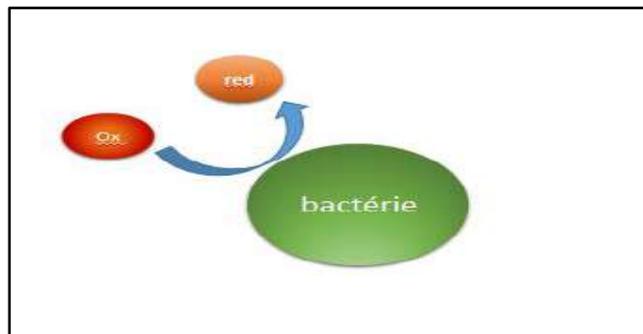


Fig I-11: Interactions métal-bactérie affectant la Biotransformation de bactérie.

## I.7. Généralités sur les méthodes électrochimiques

### I.7.1. Méthode d'ampérométrie

C'est l'une des méthodes électrochimiques les plus élémentaires, nécessitant simplement l'application d'un potentiel de consigne et la mesure du courant suivant en fonction du temps. L'approche générale de cette technique utilise un potentiel constant appliqué dans une solution sous convection forcée. Avant la mesure, le courant de charge

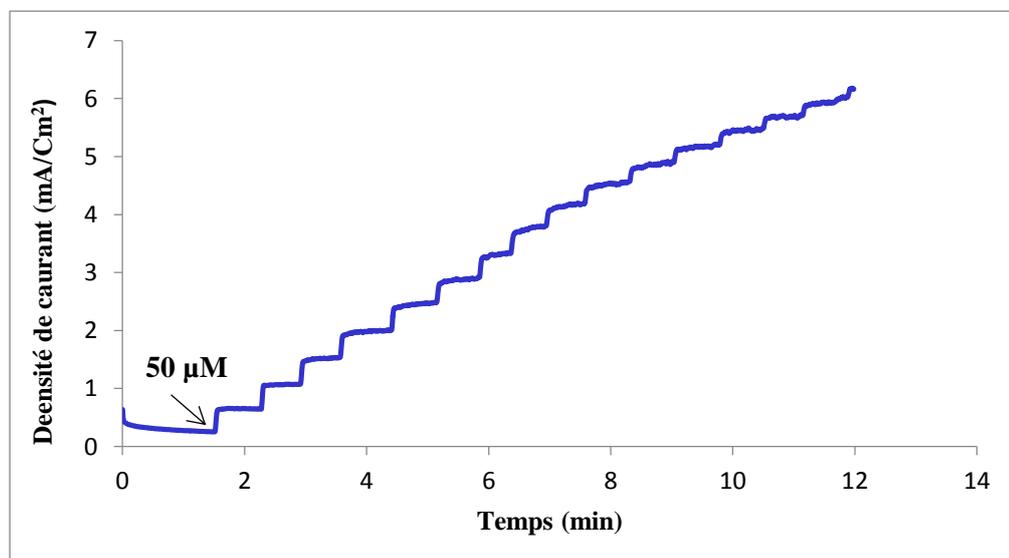


Fig I-12: Reponses ampérométriques d'un capteur pour la détection de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

initial à court terme peut avoir diminué. La technique d'ampérométrie peut être utilisée pour déterminer une courbe intensité-potential en délivrant une tension suffisamment élevée entre les électrodes de travail et de référence. L'intensité du niveau de diffusion sur cette courbe de la concentration des espèces réduites ou oxydées à la surface de l'électrode [61].

### I.7.2. Conductimétries

La conductance peut être utilisée pour détecter les activités enzymatiques qui convertissent les substrats neutres en produits chargés. Bien que cette approche soit normalement non spécifique, lorsqu'elle est associée à des biocapteurs à base de cellules entières, elle s'est avérée extrêmement sensible et rapide [62].

### I.7.3. Méthode de potentiométrie

Dans une cellule électrochimique, on mesure l'augmentation d'un potentiel de charge à l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence lorsqu'aucun courant ne circule entre elles [63][64]. En d'autres termes, la potentiométrie fournit des informations sur l'activité des ions dans un processus électrochimique [65]. L'équation de Nernst régit la relation entre la concentration et le potentiel dans les expériences potentiométriques.

### I.7.4. Mesure d'impédance

Les mesures d'impédance électrochimique caractérisent la conductivité/résistivité ou la capacité d'un matériau, c'est une technique utile dans le développement et l'analyse de matériaux pour la transduction de biocapteurs, tels que la recherche de la dégradation des polymères. Par exemple, en recouvrant des électrodes conductrices de polymères isolants puis en les exposant à un processus enzymatique, on peut étudier la dégradation directe ou indirecte du revêtement polymère. Si des ions libres existants sont capables de s'infiltrer dans le polymère pendant la réaction, la qualité isolante du polymère est perturbée, ce qui entraîne des caractéristiques d'impédance altérées de l'élément transducteur [66][67].

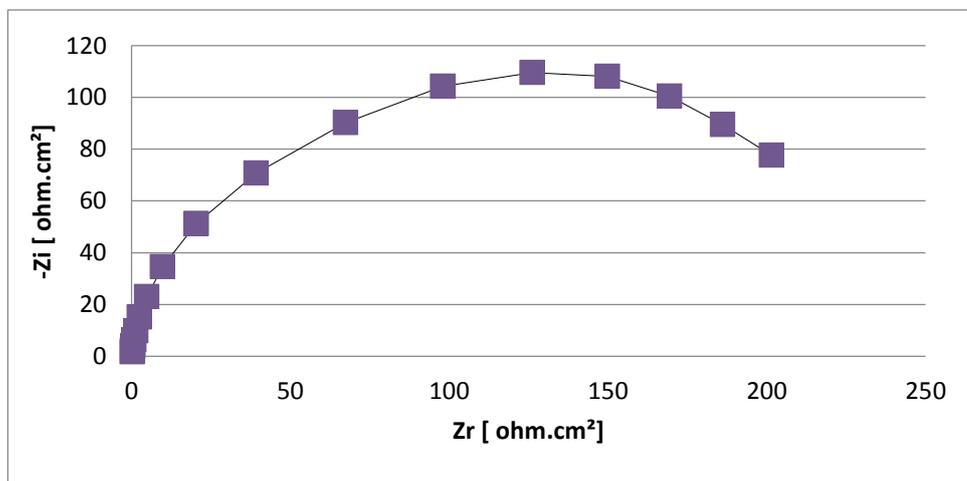


Fig I-13: Courbe spectroscopie impédance électrochimique.

### I.7.5. Voltampérométrie cyclique

La voltamétrie cyclique est une technique électrochimique utilisée pour étudier le statut redox du nanocomposite appliquée pour la préparation des biocapteurs [68]. Cette méthode mesure la réponse en courant lors des changements de potentiel à la couche sensible du capteur où la réaction électrochimique se produit. C'est une technique où le potentiel est varié à vitesse de balayage constante (exprimée en V/s), de façon répétée entre deux potentiels faisant le cycle. Le résultat délivré par la technique de la voltampérométrie cyclique est une courbe exprimant la variation du courant en fonction du potentiel. La méthode de la voltampérométrie cyclique peut offrir une étude complète sur les caractéristiques des espèces électrochimiques mise en jeu qui s'oxydent ou se réduisent [69].

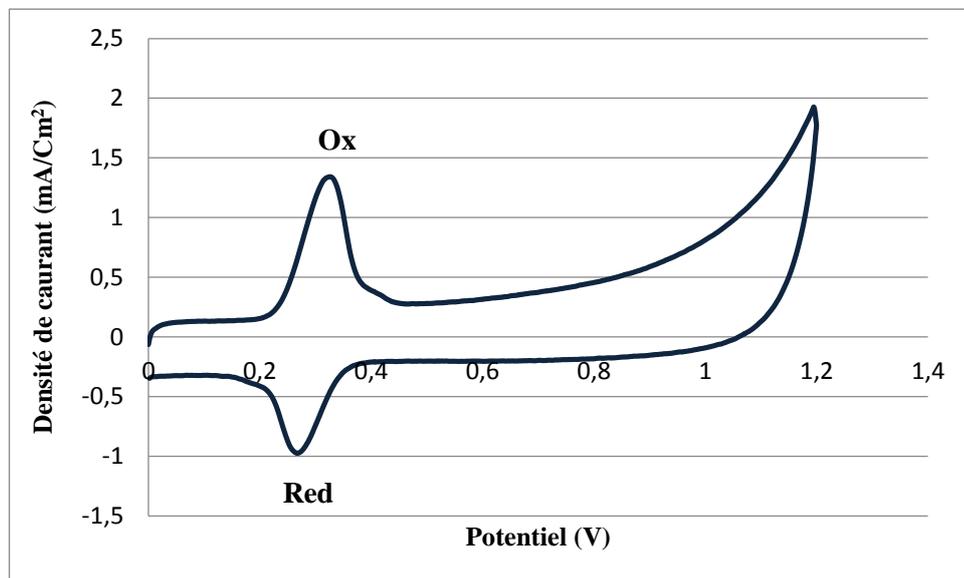
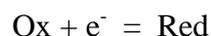


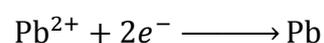
Fig I-14: Réponses de voltamètre cyclique d'un capteur pour la détection d'acide caféique.

### I.8. Mécanisme de la détection électrochimique

Lorsqu'une électrode (conducteur électronique) entre en contact avec un électrolyte (conducteur ionique), des phénomènes électrochimiques se produisent, c'est-à-dire sur la surface de contact électrode/électrolyte (interface électrochimique) pour une réaction redox, l'équation (1) [70] :



Les ions plomb incolores sont générés près de la cathode et réduits en pb, générant les couches grises ; comme les ions plomb sont des solutions incolores, ils ne changent pas de couleur. C'est une réduction puisque chaque pb acquiert  $e^-$  électrons ; c'est aussi une réduction car le nombre d'oxydation du plomb a diminué de  $e^-$  électrons en  $\text{pb}^{2+}$  à 0 en pb.





### **I.9. Mécanisme d'interaction entre l'enzyme et les métaux lourds**

Les métaux lourds peuvent interférer avec la fonction enzymatique en interférant avec le complexe enzyme-substrat, en dénaturant la protéine enzymatique et en interférant avec les sites actifs, ou en interférant avec la capacité des organismes microbiens à produire des enzymes. Les changements induits par les métaux dans la structure du groupe peuvent potentiellement avoir un impact sur la fonction enzymatique. La toxicité des métaux lourds a tué un grand nombre de micro-organismes et les microbes survivants avaient besoin d'énergie pour survivre et résister à la toxicité des métaux lourds.

Lorsque les métaux lourds se fixent sur les sites actifs, des enzymes telles que la catalase, l'uréase, la déshydrogénase et la phosphatase alcaline, ainsi que d'autres fonctions enzymatiques, sont inactivées, entraînant l'interruption du métabolisme. En plus d'être un inhibiteur enzymatique, plusieurs métaux lourds peuvent altérer la structure et la fonction de la membrane en se liant à des ligands tels que les groupes phosphate et protéine cystéinyle et histidyle [71].

## **Conclusion**

Le chapitre présente des généralités sur les métaux lourds et leur impact nocifs sur l'environnement ainsi que des définitions sur les méthodes classiques de détection. Les biocapteurs électrochimiques sont définis au début de ce chapitre en expliquant leurs caractéristiques analytiques pour la détection des éléments nocifs dans un milieu aqueux. Le mécanisme d'interaction de la bactérie avec l'analyte cible et la classification des méthodes d'immobilisation des éléments biologiques est illustré. Aussi, une classification des types des capteurs à base des éléments biologiques pour la détection des métaux lourds est présentée avec une analyse bibliographique très profonde. Cette analyse touche les paramètres influençant sur la performance analytique des biocapteurs tels que : les matériaux nanocomposites utilisés, la technique électrochimique de détection adoptée, le type du métal lourd à détecter, la limite de détection et la gamme de linéarité.

## Référence

- [1] J.J. Kim, Y.S. Kim, V. Kumar, Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54 (2019) 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>.
- [2] R. Shrestha, S. Ban, S. Devkota, S. Sharma, R. Joshi, A.P. Tiwari, H.Y. Kim, M.K. Joshi, Technological trends in heavy metals removal from industrial wastewater: A review, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 105688. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105688>.
- [3] V. Masindi, K.L. Muedi, Environmental Contamination by Heavy Metals, *Heavy Met.* (2018). <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>.
- [4] T.O. Ajiboye, O.A. Oyewo, D.C. Onwudiwe, Simultaneous removal of organics and heavy metals from industrial wastewater: A review, *Chemosphere.* 262 (2021) 128379. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128379>.
- [5] R. Vigneri, P. Malandrino, F. Gianì, M. Russo, P. Vigneri, Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* 457 (2017) 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.027>.
- [6] L.N. Suvarapu, S.O. Baek, Determination of heavy metals in the ambient atmosphere: A review, *Toxicol. Ind. Health.* 33 (2017) 79–96. <https://doi.org/10.1177/0748233716654827>.
- [7] Y. Lu, X. Liang, C. Niyungeko, J. Zhou, J. Xu, G. Tian, A review of the identification and detection of heavy metal ions in the environment by voltammetry, *Talanta.* 178 (2018) 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.033>.
- [8] L. Pujol, D. Evrard, K. Groenen-Serrano, M. Freyssinier, A. Ruffien-Cizsak, P. Gros, Electrochemical sensors and devices for heavy metals assay in water: The French groups' contribution, *Front. Chem.* 2 (2014) 1–24. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00019>.
- [9] B.K. Bansod, T. Kumar, R. Thakur, S. Rana, I. Singh, A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms, *Biosens. Bioelectron.* 94 (2017) 443–455. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.031>.
- [10] J. Qin, M. Cho, Y. Lee, Ultrasensitive Detection of Amyloid- $\beta$  Using Cellular Prion Protein on the Highly Conductive Au Nanoparticles-Poly(3,4-ethylene dioxithiophene)-Poly(thiophene-3-acetic acid) Composite Electrode, *Anal. Chem.* 91 (2019) 11259–11265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02266>.
- [11] F. Long, A. Zhu, H. Shi, H. Wang, J. Liu, Rapid on-site/in-situ detection of heavy metal ions in environmental water using a structure-switching DNA optical biosensor, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep02308>.
- [12] P. Foladori, B. Laura, A. Gianni, Z. Giuliano, Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-Fecal indicators, wastewater and activated sludge, *Water Res.* 41 (2007) 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.021>.
- [13] A.L. Wani, A. Ara, J.A. Usmani, Lead toxicity: A review, *Interdiscip. Toxicol.* 8 (2015) 55–64. <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009>.
- [14] R.A. Bernhoft, Cadmium toxicity and treatment, *Sci. World J.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/394652>.
- [15] J. Godt, F. Scheidig, C. Grosse-siestrup, V. Esche, P. Brandenburg, A. Reich, D.A. Groneberg, *Journal of Occupational Medicine* The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health, 6 (2006) 1–6. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>.
- [16] M.R. Rahimzadeh, M.R. Rahimzadeh, S. Kazemi, A.A. Moghadamnia, Cadmium toxicity and treatment: An update, *Casp. J. Intern. Med.* 8 (2017) 135–145. <https://doi.org/10.22088/cjim.8.3.135>.
- [17] D. Raj, S.K. Maiti, Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review, *Environ. Monit. Assess.* 191 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7743-2>.
- [18] R.A. Bernhoft, Mercury Toxicity and Treatment : A Review of the Literature, 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/460508>.
- [19] G. Matta, L. Gjyli, Mercury, lead and arsenic: Impact on environment and human health, *J. Chem. Pharm. Sci.* 9 (2016) 718–725.
- [20] X. Huang, Y. Zhu, E. Kianfar, Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques, *J. Mater. Res. Technol.* 12 (2021) 1649–1672. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048>.
- [21] I. Eş, J.D.G. Vieira, A.C. Amaral, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>.
- [22] D.A. Cowan, R. Fernandez-lafuente, Enzyme and Microbial Technology Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization, *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 326–346. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.023>.
- [23] S. Cláudia, S. Martins, C.M. Martins, L. Maria, C. Guedes, S.T. Santaella, Immobilization of microbial cells : A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater, 12 (2013) 4412–4418. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2677>.

- [24] M. Garmroodi, M. Mohammadi, A. Ramazani, M. Ashjari, J. Mohammadi, B. Sabour, M. Yousefi, Covalent binding of hyper-activated Rhizomucor miehei lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports, *Int. J. Biol. Macromol.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.076>.
- [25] H.T. Imam, P.C. Marr, A.C. Marr, Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment, *Green Chem.* 23 (2021) 4980–5005. <https://doi.org/10.1039/d1gc01852c>.
- [26] F. Wang, C. Guo, H. Liu, C. Liu, Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles, 104 (2008) 97–104. <https://doi.org/10.1002/jctb>.
- [27] Z. Bayat, M. Hassanshahian, S. Cappello, Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments : A Mini Review, (2015) 48–54.
- [28] M. Sharma, S.P. Singh, Enzyme entrapment approaches and their applications, BV, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819820-9.00011-9>.
- [29] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes, 1st ed., Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>.
- [30] J. Leuermann, A. Fernández-Gavela, A. Torres-Cubillo, S. Postigo, A. Sánchez-Postigo, L.M. Lechuga, R. Halir, Í. Molina-Fernández, Optimizing the limit of detection of waveguide-based interferometric biosensor devices, *Sensors (Switzerland)*. 19 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.3390/s19173671>.
- [31] G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M.I. Demartis, V. Fiore, R. Manetti, P.A. Serra, Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids, *Sensors (Switzerland)*. 16 (2016). <https://doi.org/10.3390/s16060780>.
- [32] V. Hooda, A. Gahlaut, A. Gothwal, V. Hooda, Recent trends and perspectives in enzyme based biosensor development for the screening of triglycerides: a comprehensive review, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 626–635. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1465946>.
- [33] B. Elsebai, M.E. Ghica, M.N. Abbas, C.M.A. Brett, Catalase based hydrogen peroxide biosensor for mercury determination by inhibition measurements, *J. Hazard. Mater.* 340 (2017) 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.021>.
- [34] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, Ma. Alonso-Lomillo, Mj. Arcos-Martínez, Speciation of chromium using chronoamperometric biosensors based on screen-printed electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 833 (2014) 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.006>.
- [35] H. Fourou, A. Zazoua, M. Braiek, N. Jaffrezic-Renault, An enzyme biosensor based on beta-galactosidase inhibition for electrochemical detection of cadmium (II) and chromium (VI), *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 96 (2016) 872–885. <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1209659>.
- [36] J. Yu, H. Guan, D. Chi, An amperometric glucose oxidase biosensor based on liposome microreactor-chitosan nanocomposite-modified electrode for determination of trace mercury, *J. Solid State Electrochem.* 21 (2017) 1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3468-0>.
- [37] M.J. Varjovi, R.E. Sabzi, S.M. Borzhei, Determination of heavy metal ions by an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized onto single-walled carbon nanotubes/Nile blue nanocomposite, *J. Iran. Chem. Soc.* 15 (2018) 1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1374-3>.
- [38] J.G. Ayenimo, S.B. Adeloju, Rapid amperometric detection of trace metals by inhibition of an ultrathin polypyrrole-based glucose biosensor, *Talanta*. 148 (2016) 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.024>.
- [39] I.M. Rust, J.M. Goran, K.J. Stevenson, Amperometric Detection of Aqueous Silver Ions by Inhibition of Glucose Oxidase Immobilized on Nitrogen-Doped Carbon Nanotube Electrodes, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7250–7257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01224>.
- [40] A. Attar, M.E. Ghica, A. Amine, C.M.A. Brett, Comparison of Cobalt Hexacyanoferrate and Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes for the Amperometric Detection of Heavy Metals Based on Glucose Oxidase Enzyme Inhibition, *Anal. Lett.* 48 (2015) 659–671. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.952372>.
- [41] M.E. Ghica, R.C. Carvalho, A. Amine, C.M.A. Brett, Glucose oxidase enzyme inhibition sensors for heavy metals at carbon film electrodes modified with cobalt or copper hexacyanoferrate, *Sensors Actuators, B Chem.* 178 (2013) 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.113>.
- [42] L. Liu, X. Kang, C. Chen, H. Zhang, C. Chen, Q. Xie, L-tyrosine polymerization-based ultrasensitive multi-analyte enzymatic biosensor, *Talanta*. 179 (2018) 803–809. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.014>.
- [43] T. Wang, R.D. Milton, S. Abdellaoui, D.P. Hickey, S.D. Minter, Laccase Inhibition by Arsenite/Arsenate: Determination of Inhibition Mechanism and Preliminary Application to a Self-Powered Biosensor, *Anal. Chem.* 88 (2016) 3243–3248. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04651>.
- [44] H.S. Magar, M.E. Ghica, M.N. Abbas, C.M.A. Brett, Highly Sensitive Choline Oxidase Enzyme Inhibition Biosensor for Lead Ions Based on Multiwalled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon

- Electrodes, *Electroanalysis*. 29 (2017) 1741–1748. <https://doi.org/10.1002/elan.201700111>.
- [45] M.B. Gumpu, M. Veerapandian, U.M. Krishnan, J.B.B. Rayappan, Amperometric determination of As(III) and Cd(II) using a platinum electrode modified with acetylcholinesterase, ruthenium(II)-tris(bipyridine) and graphene oxide, *Microchim. Acta*. 185 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2822-6>.
- [46] M. Moyo, J.O. Okonkwo, N.M. Agyei, An amperometric biosensor based on horseradish peroxidase immobilized onto maize tassel-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for determination of heavy metal ions in aqueous solution, *Enzyme Microb. Technol.* 56 (2014) 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.014>.
- [47] S.K. Pandey, S. Sachan, S.K. Singh, Electrochemically reduced graphene oxide modified with electrodeposited thionine and horseradish peroxidase for hydrogen peroxide sensing and inhibitive measurement of chromium, *Mater. Sci. Energy Technol.* 2 (2019) 676–686. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.08.001>.
- [48] B. Silwana, C. Van Der Horst, E. Iwuoha, V. Somerset, Amperometric determination of cadmium, lead, and mercury metal ions using a novel polymer immobilised horseradish peroxidase biosensor system, *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 49 (2014) 1501–1511. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.937169>.
- [49] A. Attar, M. Emilia Ghica, A. Amine, C.M.A. Brett, Poly(neutral red) based hydrogen peroxide biosensor for chromium determination by inhibition measurements, *J. Hazard. Mater.* 279 (2014) 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.019>.
- [50] M. Moyo, J.O. Okonkwo, Horseradish peroxidase biosensor based on maize tassel-MWCNTs composite for cadmium detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 193 (2014) 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.11.086>.
- [51] J.S. Do, K.H. Lin, Kinetics of urease inhibition-based amperometric biosensors for mercury and lead ions detection, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 63 (2016) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.011>.
- [52] M.B. Gumpu, U.M. Krishnan, J.B.B. Rayappan, Design and development of amperometric biosensor for the detection of lead and mercury ions in water matrix—a permeability approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 4257–4266. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0376-9>.
- [53] Q. Gui, T. Lawson, S. Shan, L. Yan, Y. Liu, The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.3390/s17071623>.
- [54] N. Kylilis, P. Riangrunroj, H.E. Lai, V. Salema, L.Á. Fernández, G.B. V. Stan, P.S. Freemont, K.M. Polizzi, Whole-cell biosensor with tunable limit of detection enables low-cost agglutination assays for medical diagnostic applications, *ACS Sensors*. 4 (2019) 370–378. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01163>.
- [55] E.Z. Ron, J. Rishpon, Electrochemical cell-based sensors, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 117 (2010) 77–84. [https://doi.org/10.1007/10\\_2009\\_17](https://doi.org/10.1007/10_2009_17).
- [56] A. Berepiki, R. Kent, L.F.M. MacHado, N. Dixon, Development of High-Performance Whole Cell Biosensors Aided by Statistical Modeling, *ACS Synth. Biol.* 9 (2020) 576–589. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00448>.
- [57] W.-X. Wang, *Bioaccumulation and Biomonitoring*, Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803371-5.00004-7>.
- [58] F.P.C. Silvas, D.C. Buzzi, D.C.R. Espinosa, J.A.S. Tenório, Biossorção de metais presentes na DAM utilizando rhodococcus opacus, *Rev. Esc. Minas*. 64 (2011) 487–492. <https://doi.org/10.1590/S0370-44672011000500014>.
- [59] R. Singh, *Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations*, *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*. 4 (2017). <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.04.00085>.
- [60] L.F. Bianchini, M.F.C. Arruda, S.R. Vieira, P.M.S. Campelo, A.M.T. Grégio, E.A.R. Rosa, Microbial biotransformation to obtain new antifungals, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01433>.
- [61] J. Bai, S. Beyer, D. Trau, *Conjugated polymers for biosensor devices*, Elsevier Ltd., 2011. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-055294-1.00121-5>.
- [62] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, Microbial biosensors, *Anal. Chim. Acta*. 568 (2006) 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.065>.
- [63] P. D’Orazio, Biosensors in clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*. 334 (2003) 41–69. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00241-9).
- [64] A. Chaubey, B.D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 441–456. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X).
- [65] E. Bakker, E. Pretsch, Potentiometric sensors for trace-level analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.01.003>.

- [66] C. Fernández-Sánchez, C.J. McNeil, K. Rawson, Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: Application to biosensor development, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.010>.
- [67] C. Sumner, A. Sabot, K. Turner, S. Krause, A transducer based on enzyme-induced degradation of thin polymer films monitored by surface plasmon resonance, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5225–5232. <https://doi.org/10.1021/ac000411y>.
- [68] M.S. Ibrahim, Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA, *Anal. Chim. Acta.* 443 (2001) 63–72. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01184-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01184-9).
- [69] N. Aristov, A. Habekost, Cyclic Voltammetry - A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes, *World J. Chem. Educ.* Vol. 3, 2015, Pages 115-119. 3 (2015) 115–119. <https://doi.org/10.12691/wjce-3-5-2>.
- [70] P.D. Sugiyono, Physical Science- Electrochemistry, *J. Chem. Inf. Model.* 53 (2016) 1689–1699.
- [71] J.O. Yeboah, G. Shi, W. Shi, Effect of Heavy Metal Contamination on Soil Enzymes Activities, *J. Geosci. Environ. Prot.* 09 (2021) 135–154. <https://doi.org/10.4236/gep.2021.96008>.

**CHAPITRE II : PREPARATION DU CAPTEUR A BASE  
D'E. COLI POUR LA DETECTION DES METAUX LOURDS  
: OPTIMISATION DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX.**

## II.1. Introduction

Les matériaux à base du carbone pour la préparation des capteurs électrochimiques sont largement utilisés en raison de leur faible coût, leur large disponibilité, et leur biocompatibilité et encore de leur aptitude à créer un microenvironnement très favorable pour le système électrochimique (réaction-diffusion) des espèces électroactifs [1] [2][3]. A titre d'exemple, l'utilisation du graphite, des nanotubes de carbone (CNT) [4], [5], [6], [7] ou le carbone noir (Carbon black) ou encore le graphène avec ses deux formes (oxydé ou réduit) est très réussie et de nombreux articles scientifiques ont discuté la performance de l'utilisation des matériaux à base de carbone sur la réponse analytique des capteurs électrochimiques.

Les propriétés catalytiques des nanocomposites à base de carbone sont améliorés considérablement par la combinaison des matériaux nobles comme les nanoparticule d'Or (AuNPs) [8]. Dans ce travail, les (AuNPs) sont combinés avec les nanotubes de carbone à paroi multiple (MWCNTs) piégés dans un film polymère à base de Polyfluorure de vinyle (PVDF) connus par son aptitude à former des films très mince sur la surface de l'électrode.

Le chapitre décrit les étapes de préparation du nanocomposite ainsi que la caractérisation physico-chimique par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la microscopie électronique à balayage (MEB) et aussi la caractérisation électrochimique comme les mesures d'impédance pour confirmer la conductivité du nanocomposite. L'application de ce nanocomposite est effectué après l'optimisation des paramètres expérimentaux comme la valeur optimale du pH, le potentiel adéquat appliqué et la vitesse de balayage nécessaire pour effectuer les mesures électrochimiques.

La procédure de la préparation de la bactérie *E.coli* ainsi que la méthode de son immobilisation sur la surface de l'électrode modifiée est détaillée pour construire le biocapteur à base d'*E.coli* pour la détection des métaux lourds.

## II.2. Matériels et Méthodes

### II.2.1. Réactifs

Une solution de tampon acétate 0,1 M a été préparée en mélangeant  $\text{CH}_3\text{COOH}$  et  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (ABS). *E. coli* ATCC 25 922 (acheté à partir de la collection de culture de type Américain). Le bovine sérum albumine (BSA) a été acheté auprès de Sigma (Chine). Le Glutaraldehyde (GA) en solution aqueuse à 50% a été achetée auprès de Tianjin Bodi Chemicals (Chine). Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a été utilisé comme substrat pour déterminer certaines enzymes. Le nitrate de plomb  $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$  a été acheté auprès de Tianjin Kermel Chemicals (Chine). Les nanotubes de carbone à paroi multiple (MWCNTs) de Merck

(Allemagne). Les nanoparticules d'Or (AuNPs) de Sigma Aldrich. Le poly vinylidène de fluorure (PVDF) était un produit de Solvay Solexis de Belgique. L'oxyde d'aluminium (0,5–0,02 $\mu$ m) est utilisé pour le polissage de la surface de l'électrode. Tous les réactifs utilisés dans ce travail étaient de qualité analytique.

### II.2.2. Appareillage

Les analyses électrochimiques ont été réalisées par Potentiostat Voltalab 301 PGZ avec un système à trois électrodes, un fil de platine comme contre-électrode, une électrode de platine (diamètre 2 mm) comme électrode de travail et une électrode de référence à base de Hg/HgCl (3,0 M KCl). La technique de la voltamètre cyclique (CV) est utilisée pour étudier l'effet du pH et la stabilité opérationnelle du capteur. La méthode des impédances spectroscopiques électrochimiques (EIS) a été utilisée pour confirmer la conductivité électrique de l'électrode modifiée. En outre, le voltamètre à onde carrée (SWV) est utilisé pour la détermination des ions de métaux lourds. La morphologie du nanocomposite est étudiée par l'analyse physico-chimique en utilisant un microscope à balayage électronique et la spectrophotométrie infrarouge.

Deux types de microscopes ont été utilisés, le premier est un microscope optique à champ large de marque Carl Zeiss qui sert compter les cellules et aussi pour la vérification de l'état des membranes sur les microélectrodes lors des mesures conductimétries. Le deuxième est un microscope à statif inversé de même marque qui sert à réaliser des photomicrographies des cellules algales. L'acquisition des images est réalisée directement avec un appareil photo numérique CANON.

### II.3. Dispositifs expérimentaux d'élaboration de la détection des métaux lourds

L'étude électrochimique a été réalisée au laboratoire de valorisation et promotion de ressources sahariennes de l'Université Kasdi-Merbah Ouargla à l'aide d'un Voltalab 40 (PGZ 301), piloté par un micro-ordinateur (Voltmaster 04 Software). En utilisant le montage à trois électrodes présentées sur la figure II.1.

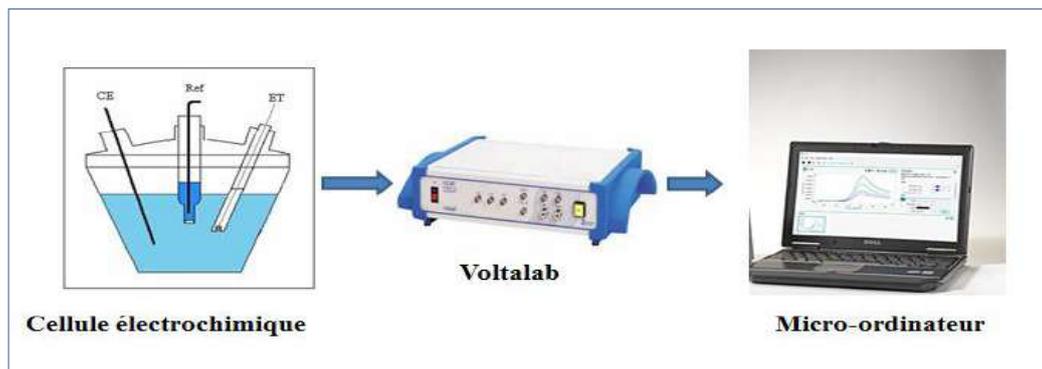


Fig II-1: Dispositif expérimental (la cellule et le Voltalab).

Dans toutes les expériences on a utilisé le montage à trois électrodes : une électrode de Référence, une électrode auxiliaire et une électrode de travail.

### **La cellule électrochimique**

La cellule utilisée est en verre (thermostatique), volume suffisant pour que la concentration en espèce électroactive reste constante pendant la manipulation. Cette dernière est munie d'une double paroi et d'un couvercle à 4 orifices pour faire passer les trois électrodes et le tube de dégazage.

**L'électrode de travail** est à base de platine de 2 mm

Il est intéressant de noter que la préparation de ces électrodes de travail joue un rôle très important sur les résultats obtenus. Les électrodes de travail courantes peuvent être fabriquées à partir de matériaux allant des métaux inertes tels que l'or, l'argent ou le platine au carbone inerte.

**L'électrode auxiliaire** (contre électrode) nous avons utilisé un disque de platine de 1 cm **comme contre électrode.**

**L'électrode de référence** toutes les mesures de potentiel sont effectués par rapport à l'électrode au calomel saturée (ECS) en chlorure de potassium KCl, constituée par le système calomel. Son potentiel par rapport à l'électrode normale à hydrogène est égal à +0.2444 V à 25°C.

## **II.4. Préparation des solutions**

La solution tampon est obtenue à partir de deux solutions, la première est de l'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) de concentration 0,1M ( $d=0,041$ ). La deuxième solution est de l'acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) d'une masse de 5,64g ( $M=80,03\text{g/mol}$ ). Puis on les dissout dans 250 mL d'eau distillée et on ajuste jusqu'à l'obtention de la valeur de pH à 5,0.

### **II.4.1. Préparation de solution du plomb**

On a préparé une solution de nitrate de plomb a masse molaire (331g/mol) en pesant une masse de 1 mg versés dans 1000 ml d'eau distillée. Le flacon est placé dans le bain à ultrasons pendant 10 minutes pour homogénéiser la solution. Ensuite, des solutions diluées de 0,2  $\mu\text{g/l}$  jusqu'à 80  $\mu\text{g/l}$  ont été préparée.

### **II.4.2. Préparation de solution du cadmium**

On prépare une solution de nitrate de cadmium a masse molaire (236,42g/mol) en pesant une masse de 1 mg versés dans 1000 ml d'eau distillée. Le flacon est placé dans le bain à ultrasons pendant 10 minutes pour homogénéiser la solution. Ensuite, des solutions diluées de 0,2  $\mu\text{g/l}$  jusqu'à 80  $\mu\text{g/l}$  ont été préparée.

### II.4.3. Préparation de l'analyte (mercure)

On a préparé une solution de nitrate de mercure a masse molaire (525,19g/mol) en pesant une masse de 1 mg versés dans 1000 ml d'eau distillée. Le flacon est placé dans le bain à ultrasons pendant 10 minutes pour homogénéiser la solution. Ensuite, des solutions diluées de 0,2 µg/l jusqu'à 80 µg/l ont été préparée.

### II.4.4. Préparation de solution d'oxyde d'aluminium

On a préparé une solution d'oxyde d'aluminium de 2 diamètres 0,5µm et 0,02 µm en pesant une masse de 1 mg versés dans 10 ml d'éthanol. Le flacon est placé dans le bain à ultrasons pendant 5 minutes pour homogénéiser la solution. Ensuite, les solutions utilisées pour le polissage d'électrode de platine

## II.5. Préparation de la plateforme de détection à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF/pt

Toutes les expériences ont été réalisées dans un électrolyte support de tampon acétate (0,1 M, pH 5,0) à température ambiante ( $25 \pm 1$  ° C). Des expériences de voltamétrie cyclique ont été réalisées avec une fréquence de balayage de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Pour la préparation de produit (1 mg) de nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNT) a été dispersé dans (1 ml) de DMF et soumis aux ultrasons pendant 1 h.

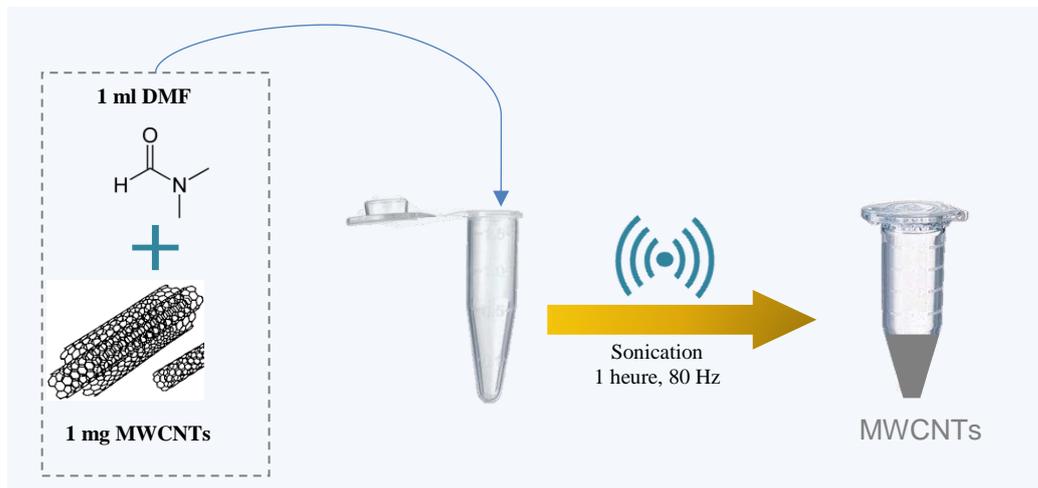
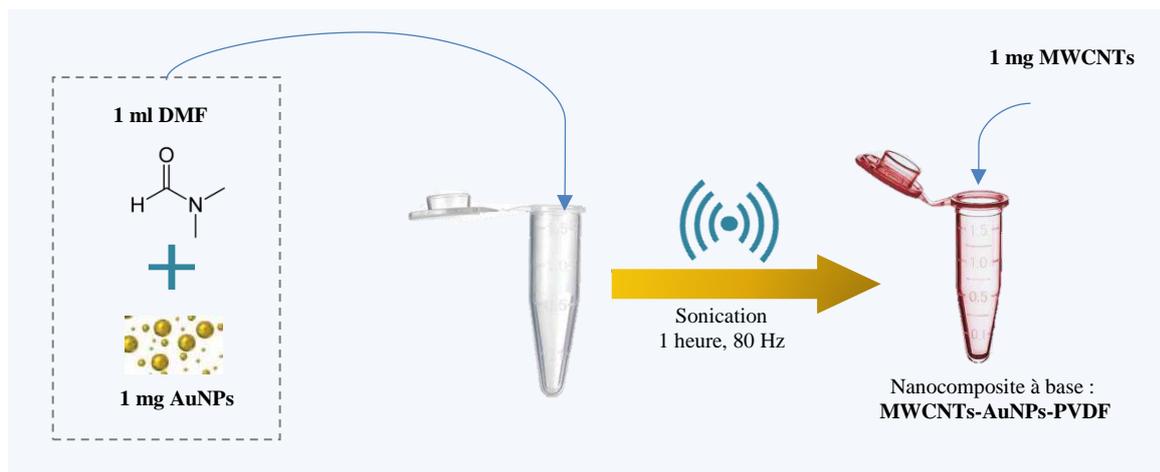


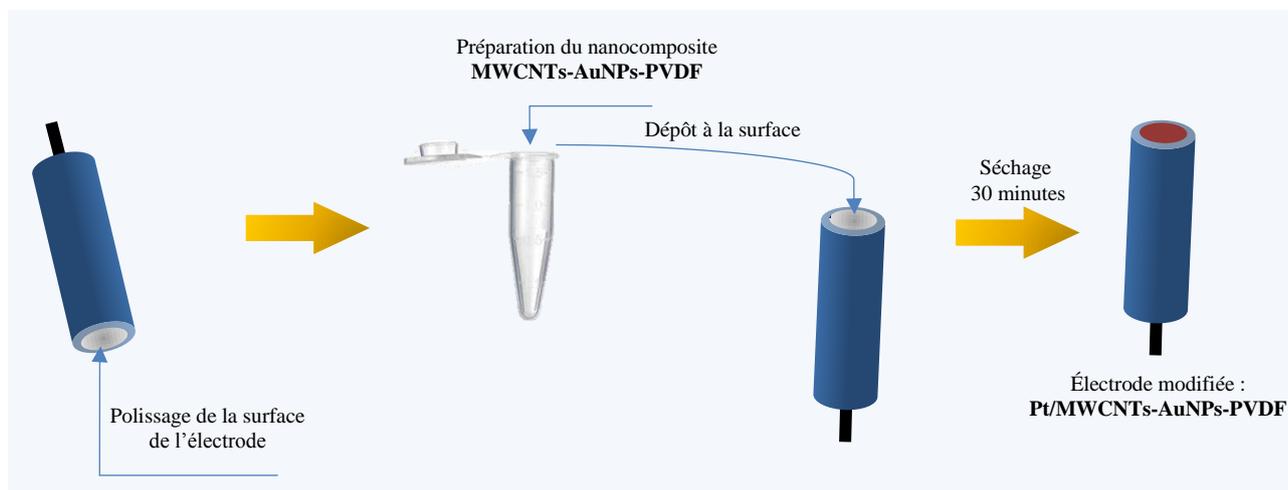
Schéma II-1: Procédé de préparation de solution du MWCNTs.

Ensuite, une quantité de 1 mg de nanoparticules d'or (AuNPs) est ajoutée dans 1 mL de DMF et ensuite mélangés avec des MWCNT. De plus, (1 mg) de PVDF ont été ajoutés au mélange MWCNTs-AuNPs et soumis aux ultrasons 1h à 80 ° C.



**Schéma II-2: Procédé de préparation du nanocomposite à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF.**

Un volume de 5  $\mu\text{l}$  de mélange de MWCNTs-AuNPs-PVDF est déposé à la surface de l'électrode en platine préalablement traitée par les particules d'oxyde d'aluminium de taille (0,5 à 0,02  $\mu\text{M}$ ) pendant 2 min. Après cela, l'électrode a été lavée aux ultrasons deux fois pendant 10 min par de l'éthanol et de l'eau distillée pour éliminer les particules d'oxyde d'aluminium retenues à la surface de l'électrode. Ensuite, la surface de l'électrode subit un traitement électrochimique par un balayage de potentiel de 0 à 0,8 V vs Hg/HgCl dans 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à une vitesse de 0,1  $\text{Vs}^{-1}$  puis rincée avec de l'eau d'ionisée sous ultrasons et laisser sécher pendant 30 min à température ambiante



**Schéma II-3: Étapes de préparation du capteur à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF pour la détection électrochimique.**

## II.6. Caractérisation du nanocomposite à base de MWCNTs-AuNPs-PVDF par FTIR

Les MWCNT ont été caractérisés par spectroscopie infra-rouge (IR) avant et après la combinaison avec PVDF afin d'identifier les groupements fonctionnels produits sur leurs surfaces. Les spectres IR obtenus sont représentés sur la figure 2.

On observe que les MWCNTs combinées avec PVDF présentent de nouvelles bandes par rapport aux MWCNTs seul, indiquant que de nouveaux groupes fonctionnels ont été incorporés à la surface. La bande apparaissant à  $1100\text{ cm}^{-1}$  confirme la présence de groupe C-F ce qui confirme la formation de MWCNTs-PVDF [9]. La bande apparaissant à  $3430\text{ cm}^{-1}$  confirme la présence de groupes hydroxyle ( $-\text{OH}$ ), tandis que les bandes d'adsorption apparaissant à  $2864$  et  $2927\text{ cm}^{-1}$  sont respectivement attribuées aux vibrations d'élongation symétriques et asymétriques de méthylène. Les bandes situées à  $2361\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux liaisons d'élongation du  $-\text{OH}$  liées aux groupes carboxyliques ( $-\text{COOH}$ ) [10].

La formation de groupes  $-\text{COOH}$  sur la surface de MWCNTs peut être confirmée par l'apparition d'une nouvelle bande à  $1641\text{ cm}^{-1}$ , en plus de la bande à  $1245\text{ cm}^{-1}$  qui sont respectivement attribués aux vibrations d'élongation de groupes carbonyle  $\text{C}=\text{O}$  et  $-\text{CO}$  présentés dans les groupes  $-\text{COOH}$  [11][12]. La bande d'absorption à  $1635\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à l'élongation conjuguée de la liaison  $\text{C}=\text{C}$  lié à la structure de MWCNTs. Ces résultats montrent clairement que les groupes  $-\text{COOH}$  ont été successivement créés sur la surface de MWCNTs traités et sont en bonne accord avec ceux rapportés dans la littérature [13].

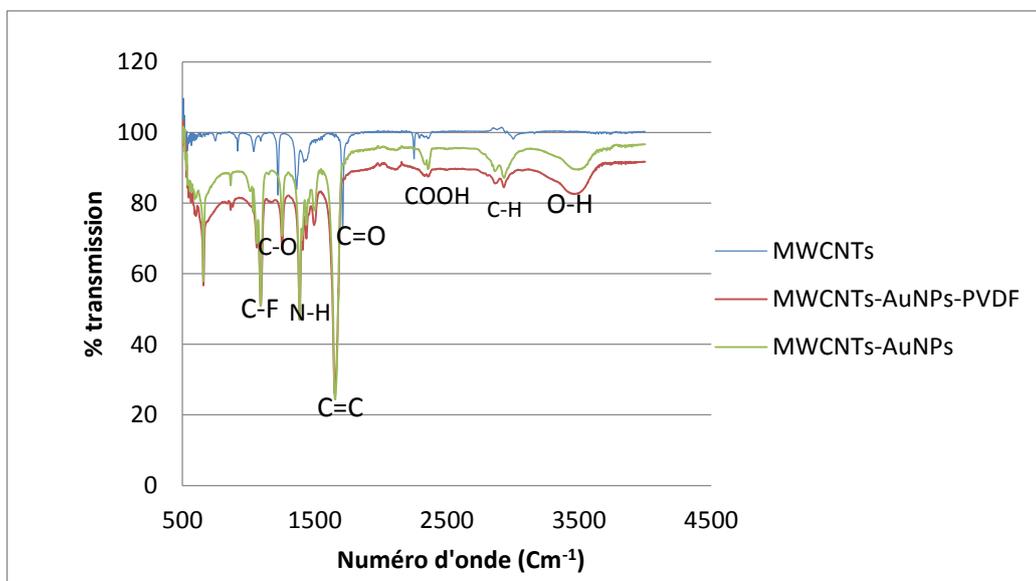


Fig II-2: Spectres FTIR de MWCNT dans DMF, MWCNTs-AuNPs et MWCNTs-AuNPs-PVDF.

## II.7. Analyse de la morphologie de nanocomposite MWCNTs-AuNPs-PVDF

La figure 3 montre la caractérisation de la morphologie du nanocomposite (MWCNTs-PVDF-AuNPs) qui a été réalisée par microscopie électronique à balayage (MEB) de type (ZEISS EVO15) avec un faisceau d'électrons de 12 kV. Le grossissement typique utilisé pour un microscope à balayage était compris entre 50x et 1Kx. Les figures démontrent que le nanocomposite à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs possède une texture ramifiée d'agglomérats. De plus, les nanotubes de carbone à multi-paroi sont parfois compacts à forme laine (fils entrelacés), bien intégrés et largement dispersés. En outre, le mélange de nanocomposite est d'une forme expansée très ramifiée avec des pores très nombreux de grande surface spécifique ce qui assure une répartition uniforme du polymère (PVDF).

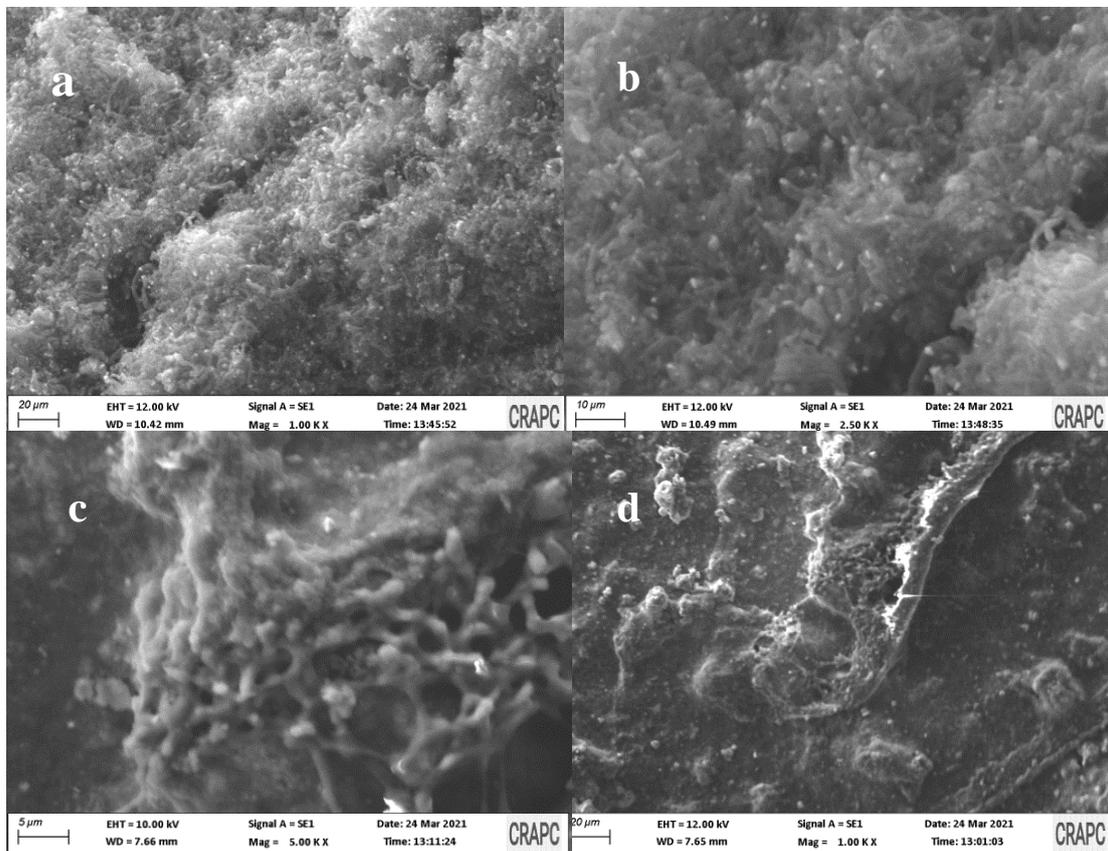


Fig II-3: Images MEB des MWCNT synthétisés (a, b) et (c, d) MWCNTs-AuNPs-PVDF.

Les analyses par EDX du microscope électronique à balayage confirment l'existence au sein de la matrice de MWCNTs sous forme C, la présence de la particule D'Or sous forme Au. la présence de Si en tient de la porte échantillon de verre et le Al le en tien de la porte échantillon de microscope.

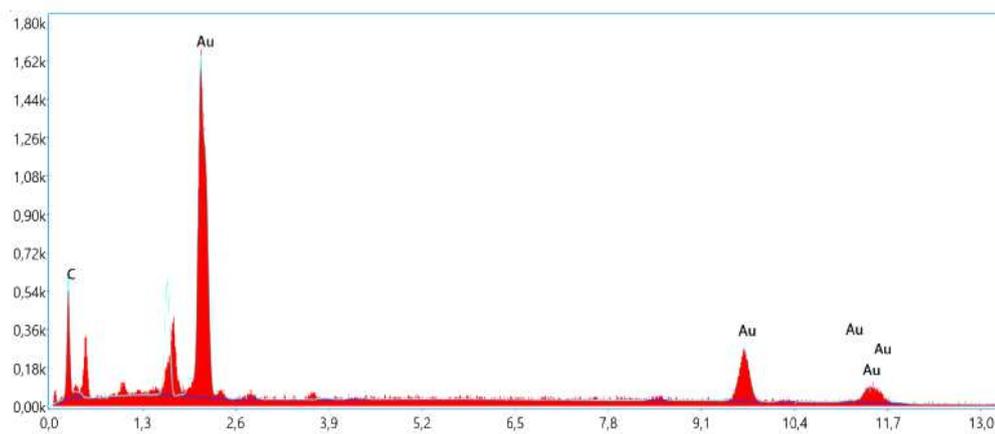


Fig II-4: analyse EDX de nanocomposite.

## II.8. Effet du pH sur la réponse électrochimique du nanocomposite

La réponse électrochimique du nanocomposite à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA est effectuée par la voltamétrie cyclique en présence de 10 µg/L des ions de plomb avec des valeurs croissantes de pH allant de 5 à 7. Le pic du courant atteint son maximum pour une valeur de pH est égal à 5,0 par conséquent, cette valeur a été fixée pour toutes les autres expériences électrochimiques (figure II.5).

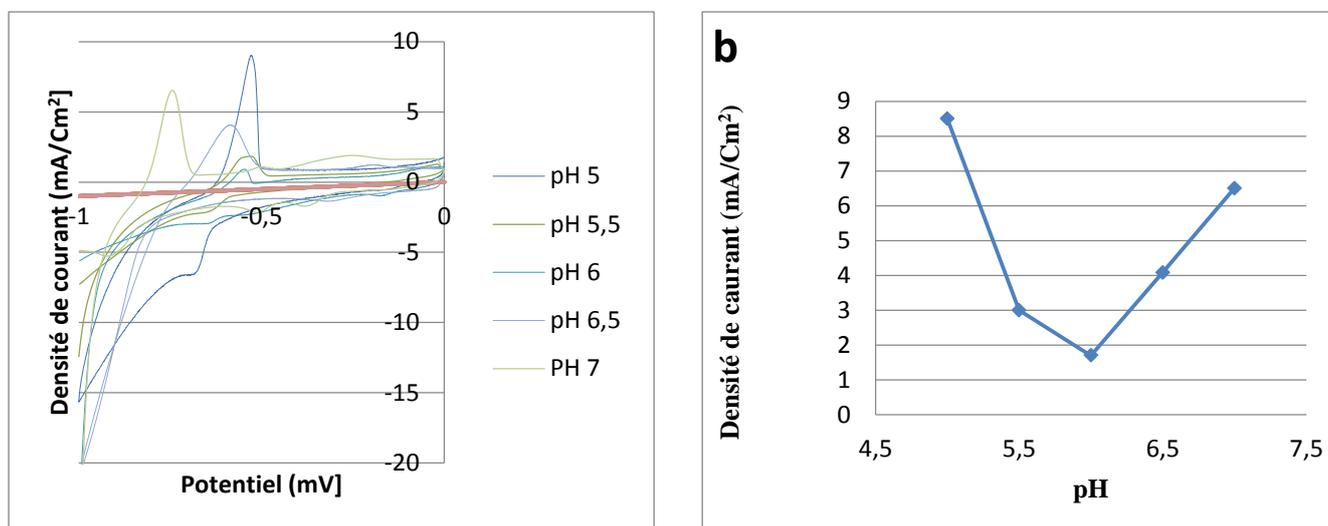


Fig II-5: Réponse de l'électrode modifiée pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA en présence de 10 µg/l de Pb<sup>2+</sup> pour des valeurs de pH allant de 5 à 7 avec (0,1 M ABS pH = 5,0) à une vitesse de balayage 100 mV/s. a) Voltammogramme cyclique, b) Variation de la réponse.

Les résultats ont montré que les potentiels cathodique et anodique de l'ion plomb sont décalés négativement avec l'augmentation de pH de 5 à 7. Les équations du potentiel avec le pH ont été obtenus, pour l'ion plomb sont  $E_{pa} = 0,047 \text{ pH} + 0,516$  (V,  $R = 0,9981$ ) et  $E_{pc} = -0,052 \text{ pH} + 0,378$  (V,  $R = 0,9975$ ) (Fig.1.b). Les pentes de potentiel par rapport au pH suggèrent que deux protons participent à la réaction oxydo-réduction à deux électrons de l'ion plomb. La solution tampon pH 5,0 a été sélectionné comme condition expérimentale optimale. Dans le cas d'une réaction de réduction, la meilleure valeur du courant cathodique correspond à un pH est égale à 5,0.

## II.9. Effet de la vitesse de balayage sur la réponse électrochimique du nanocomposite

Comme le montre la figure II.6, le courant des pics redox a augmenté progressivement avec l'augmentation de la vitesse de balayage et donnant une valeur maximale pour une vitesse de 100 mV. Les courants des pics d'oxydation ( $I_{pa}$ ) et de réduction ( $I_{pc}$ ) varient linéairement avec la racine carrée de la vitesse de balayage ( $v^{1/2}$ ) dans la gamme de 50 à 250  $\text{mVs}^{-1}$ , les droites  $I_p = f(v^{1/2})$  ne passe pas par l'origine ce qui signifie que le système réactionnel n'est pas rapide.

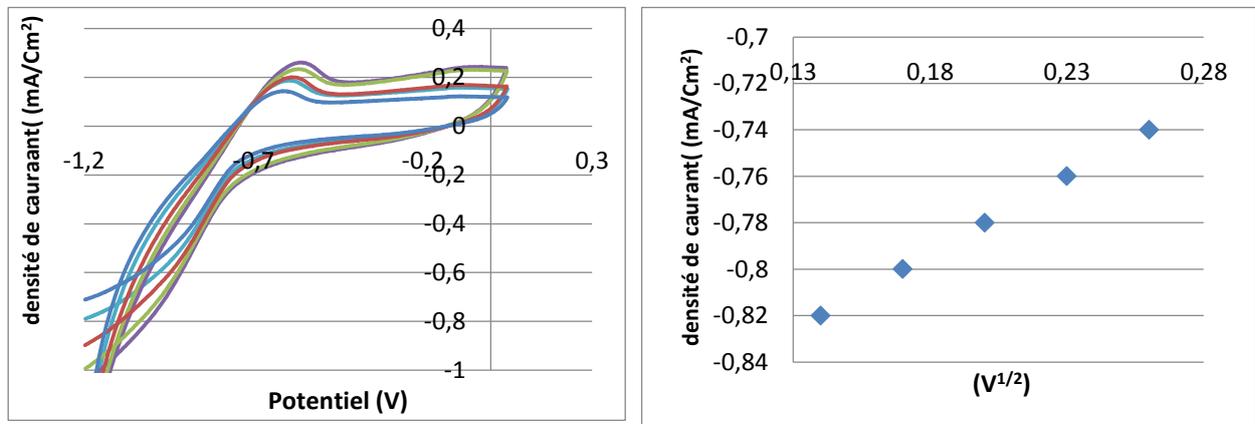


Fig II-6: Réponse de l'électrode à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA pour 50µg/l de plomb (a) Voltampérogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 V/s). (b) Relation entre le courant de pic redox ( $I_p$ ) et la racine car.

Les courbes sont linéaires par rapport à  $(\ln v)$  et les différences  $\Delta E_p$  sont supérieures à 60 mV ce qui montre qu'ils sont en accord avec la relation de LAVIRON [14].

L'intensité de courant des pics d'oxydation ( $I_{pa}$ ) pour une réaction quasi-réversible contrôlée par diffusion est calculé selon la formule de Randles – Sevcik [15]:

$$I_{pa} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \quad (1.II)$$

Où

D : est le coefficient de diffusion du réactif ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),

A : est la surface électroactive égale à  $0,314 \text{ cm}^2$ ,

n : est le nombre de transfert d'électrons,

v : est la vitesse de balayage égale à  $0,1 \text{ (V/s)}$ , C'est la concentration du réactif à  $10 \mu\text{g/l}$  et  $I_{pa}$  est le courant de pic anodique (A) remplacé par la valeur de la pente de  $E_{pc}$  en fonction de  $(\ln v)$ .

$$0,26 \cdot 10^{-3} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot (2)^{3/2} \cdot 0,314 \cdot D^{1/2} \cdot 10 \cdot (0,1)^{1/2} \quad (2.II)$$

La diffusion de plomb dans  $10 \mu\text{g/l}$  de ABS à pH 5.0 a été trouvée de valeur  $D = 1,38 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

## II.10. Étude de la conductivité du nanocomposite par spectroscopie d'impédance

La figure 7 montre que le nanocomposite préparé est très conducteur par rapport à l'électrode de platine non modifiée présentant une résistance au transfert très élevée ( $R_{et} = 201 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). L'ajout des nanotubes de carbone à paroi multiple (MWCNTs) diminue cette résistance à ( $R_{et} = 185,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) due la conductivité électrique.  $\text{pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs}$  montrent la résistance diminue par rapport au  $\text{pt/MWCNTs-PVDF}$ . Cependant, AuNPs ont amplifié davantage le signal en raison de la excellente conductivité considérablement diminue la résistance au transfert d'électrons ( $R_{et} = 52,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) à cause de la conductivité métallique. Par conséquent, ces résultats montrent le bon choix des nanomatériaux pour la préparation du capteur avant l'immobilisation de l'élément biologique pour la détection des métaux lourds.

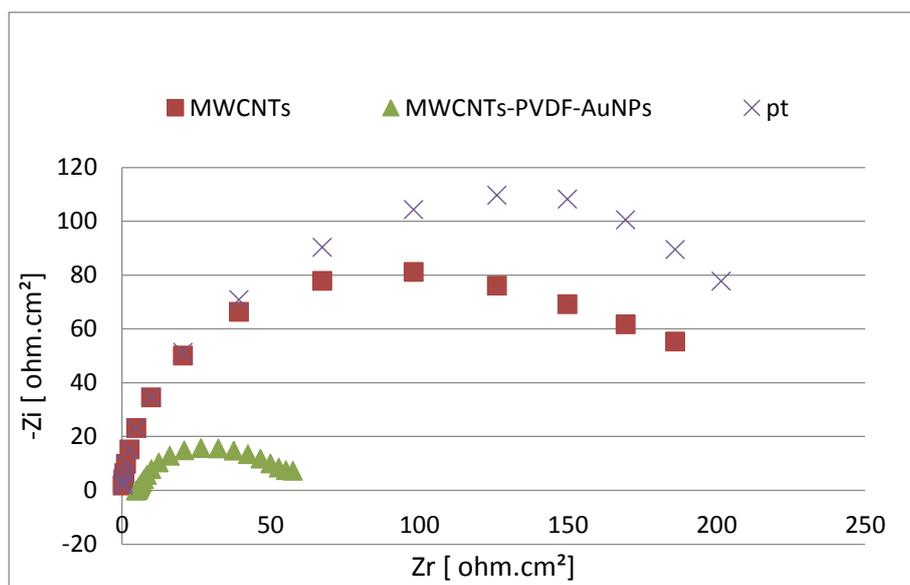


Fig II-7: Spectres d'impédance de l'électrode de platine Pt, Pt/MWCNTs, Pt/MWCNTs-PVDF, Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF, en ABS 0,1 M pH=5,0 en présence  $50 \mu\text{g/l Pb}^{2+}$

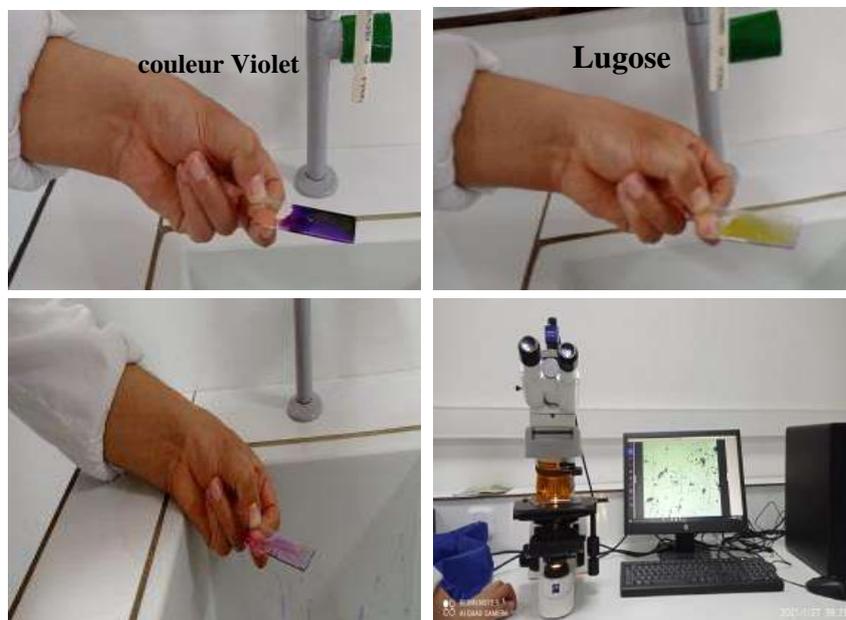
Tableau II -1 valeurs des résistances et conductivités des électrodes (pt, Pt/MWCNTs, Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF)

Matrice	Résistance	Conductivité
platine Pt	201 $\Omega$ .Cm <sup>2</sup>	0,0049 S.Cm <sup>2</sup>
Pt/MWCNTs	185,3 $\Omega$ .Cm <sup>2</sup>	0,0053 S.Cm <sup>2</sup>
Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF	52,7 $\Omega$ .Cm <sup>2</sup>	0,019 S.Cm <sup>2</sup>

## II.11. Préparation de la bactérie *E. coli*

La souche bactérienne estensemencée dans un milieu liquide (bouillon nutritif), suivi d'une centrifugation (4000 rpm) pendant 10 minutes. La bactérie pure est rincée avec un tampon de pH = 5,0 deux fois puis il est placé dans la centrifugation pour que la bactérie soit très pure.

La bactérie *E.coli* est étalée dans une lame très propre en utilisant de l'eau distillée puis séché en passant la lamme trois fois sur la flamme. Ensuite, le frotti est recouvert du violet de sentiamme (cristalial violet) pendant une minute et un rinçage avec de l'eau distillée est effectué puis on ajoute du lugose pour fixer la 1<sup>ière</sup> couleur pendant 30 secondes, la lame est rincée, le frottis est recouvert d'éthanol à 98° pendant 30 secondes. Ensuite, la lame doit être rincée à l'eau distillée pour éliminer les déchets et recouverte de la fonte pendant 1 min, la lame est rince et laisse pour séchage a l'air libre, Suivi de l'observation à la loupe de microscopie avec grossissement \*100 et recoupris avec la fusion pendant une minute.



### II.11.1. Inactivation de la bactérie *E. coli*

Pour l'objectif de libérer les enzymes de la bactérie *E. coli*., un traitement d'ultrason a été soigneusement appliquée. Ces éléments peuvent contribuer à la réaction catalytique avec l'analyte à détecter. La figure montre la bactérie *E.coli* avant et après le traitement à ultrasons pendant 25 min à 80 Hz. La figure.A. montre la forme de l'*E.coli* avant le traitement, tandis que l'*E.coli* traité par ultrasons prend une forme ovale et de cercle presque régulier ce qui prouve que le traitement est homogène. La figure B montre aussi que le traitement à ultrasons est très efficace pour inactiver la bactérie afin d'éliminer la membrane cellulaire et libérer les éléments biologiques de l'*E.coli* [16].

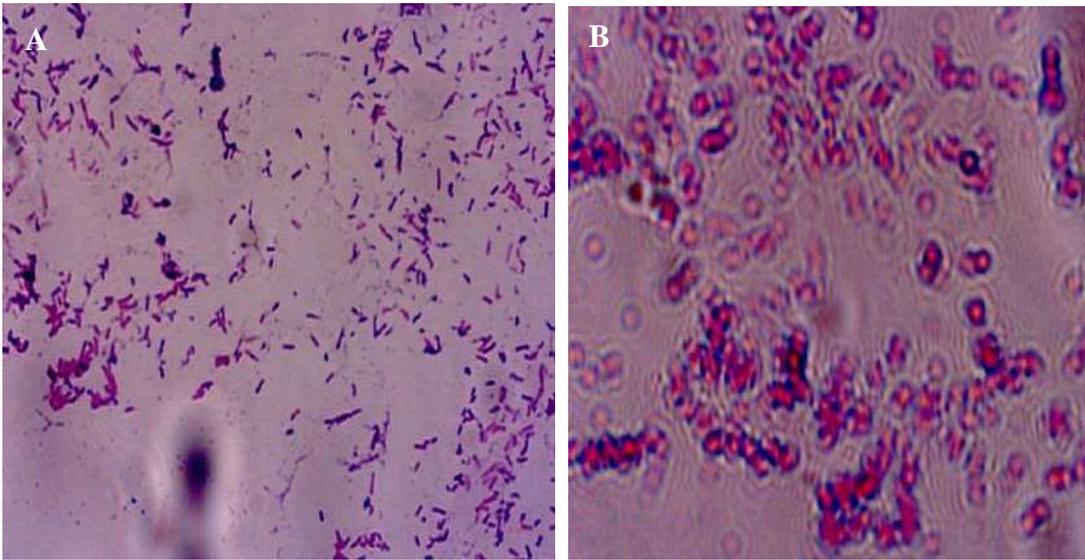
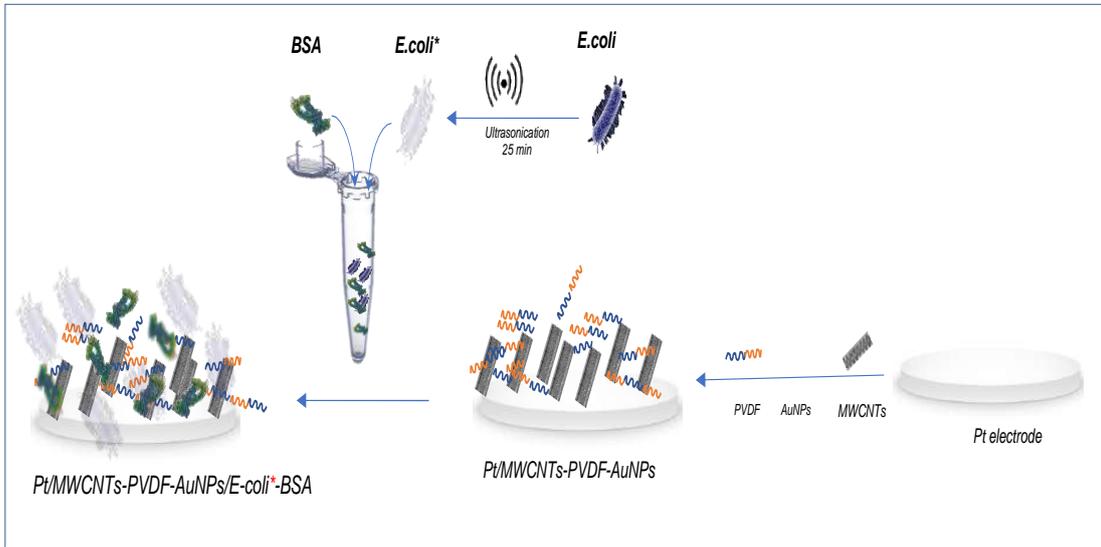


Fig II-9: Images de la bactérie *E. coli* avant (A) et après traitement (B) à ultrasons à 80 Hz à pendant 25 min.

### II.11.2. Immobilisation de la bactérie *E.coli*

L'immobilisation du biorécepteur est une étape primordiale pour construire le biocapteur. La meilleure technique est celle qui garde l'activité biologique de l'élément de biorecognition plus longtemps afin d'avoir une réponse du capteur très stable. Dans ce travail, l'immobilisation du nanocomposite à base (MWCNTs-AuNPs-PVDF) sur la surface de l'électrode de platine est effectuée par adsorption. La bactérie d'*E.coli* a été immobilisée sur la surface de l'électrode en utilisant le glutaraldehyde (GA) comme agent de réticulation. On dépose un volume de 5  $\mu$ l d'un mélange de solution de *E.coli* et le bovine sérum albumine (BSA) sur la surface de l'électrode de platine et on laisse sécher pendant 2 h à température ambiante (25 °C). Le capteur préparé a été stocké à 4°C.



**Schéma II-4: Représentation schématique de la fabrication du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli-BSA pour la détection des ions plomb.**

## **Conclusion**

Le comportement électrochimique de la surface de l'électrode, avant et après les différentes procédures de modification, a été analysé par des expériences d'impédance électrochimiques en présence de différentes résistances et d'une augmentation des performances du biocapteur électrochimique selon différentes procédures de modification de la surface de l'électrode. Grâce aux caractéristiques conductrices précédemment identifiées et aux propriétés catalytiques des nanomatériaux. Sur la base de ces résultats, les bénéfices attendus et le bon potentiel de la modification de la surface des électrodes avec des nanomatériaux pour le développement de biocapteurs électrochimiques ont été confirmés. La stratégie proposée pour la modification de l'électrode dans ce travail réalisé l'effet du pH et de la vitesse de balayage jouent un rôle important dans les performances du capteur où présentaient le pH optimal = 5 et la vitesse de balayage 100 mV/s

## Références

- [1] R. Antiochia, I. Lavagnini, Alcohol biosensor based on the immobilization of meldola blue and alcohol dehydrogenase into a carbon nanotube paste electrode, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1643–1655. <https://doi.org/10.1080/00032710600713537>.
- [2] R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, Amperometric mediated carbon nanotube paste biosensor for fructose determination, *Anal. Lett.* 37 (2004) 1657–1669. <https://doi.org/10.1081/AL-120037594>.
- [3] F. Tasca, M.N. Zafar, W. Harreither, G. Nöll, R. Ludwig, L. Gorton, A third generation glucose biosensor based on cellobiose dehydrogenase from *Corynascus thermophilus* and single-walled carbon nanotubes, *Analyst.* 136 (2011) 2033–2036. <https://doi.org/10.1039/c0an00311e>.
- [4] S. Chawla, R. Rawal, C.S. Pundir, Fabrication of polyphenol biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode, *J. Biotechnol.* 156 (2011) 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.008>.
- [5] M. Mn, F. Ti, S. Kumar, R. Prakash, H.K. Choi, B.H. Koo, J.I. Song, H. Chung, H. Jeong, C.G. Lee, Influence of Ti 4 + doping on hyperfine field parameters of, 4 (2010) 1139–1143. <https://doi.org/10.1007/s11771>.
- [6] R. Rawal, S. Chawla, C.S. Pundir, Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode, *Anal. Biochem.* 419 (2011) 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.07.028>.
- [7] F. Tasca, R. Ludwig, L. Gorton, R. Antiochia, Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* 177 (2013) 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.114>.
- [8] W. Song, D.W. Li, Y.T. Li, Y. Li, Y.T. Long, Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3181–3186. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.12.022>.
- [9] Y. Zhang, B. Yang, K. Li, D. Hou, C. Zhao, J. Wang, Electrospun porous poly(tetrafluoroethylene-: Co - hexafluoropropylene- co -vinylidene fluoride) membranes for membrane distillation, *RSC Adv.* 7 (2017) 56183–56193. <https://doi.org/10.1039/c7ra09932k>.
- [10] M.A. Atieh, O.Y. Bakather, B. Al-Tawbini, A.A. Bukhari, F.A. Abuilawi, M.B. Fettouhi, Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2010 (2010). <https://doi.org/10.1155/2010/603978>.
- [11] A.K. Baytak, S. Duzmen, T. Teker, M. Aslanoglu, Voltammetric determination of methylparaben and its DNA interaction using a novel platform based on carbon nanofibers and cobalt-nickel-palladium

- nanoparticles, *Sensors Actuators, B Chem.* 239 (2017) 330–337.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.029>.
- [12] Z. Dabaghian, A. Rahimpour, Carboxylated carbon nanofibers as hydrophilic porous material to modification of cellulosic membranes for forward osmosis desalination, *Chem. Eng. Res. Des.* 104 (2015) 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.10.008>.
- [13] Y. Yin, P. Zhang, X. Yue, X. Du, W. Li, Y. Yin, C. Yi, Y. Li, Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and *Bacillus subtilis* on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161 (2018) 755–762.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.056>.
- [14] E. Sequoia, O.N. Laboratoire, P. Organique, S. Gabriel, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, 101 (1979) 19–28.
- [15] R.G. Compton, Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide, (2005) 12–21. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3205-5>.
- [16] L. Lin, X. Wang, C. Li, H. Cui, Inactivation mechanism of *E. coli* O157:H7 under ultrasonic sterilization, *Ultrason. Sonochem.* 59 (2019) 104751. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104751>.

**CHAPITRE III :PERFORMANCE ANALYTIQUE D'UN  
CAPTEUR A BASE D'*E. COLI* POUR LA DÉTECTION DES  
METAUX LOURDS**

### III.1.Introduction

Les métaux lourds peuvent nuire à la santé de l'être vivant même à l'état de traces et altérer fortement les fonctions des organes et leur toxicité peut être chronique ou aiguë [1]. Par exemple, l'empoisonnement au plomb (Pb) dans les effluents liquides est l'un des plus grands risques environnementaux pour la santé des enfants et des adultes, qui peut facilement affecter le système immunitaire [2]. Par conséquent, le développement d'outils analytiques miniaturisés à faible coût pour la détection des composés chimiques nocifs est d'une importance cruciale [3]. Les biocapteurs électrochimiques sont des dispositifs dotés d'une grande capacité à détecter des polluants toxiques en temps réel. Actuellement, l'accent est désormais mis sur la préparation rapide des capteurs hautement sensibles par l'utilisation des matériaux biodégradables obtenus par des méthodes vertes sans recours aux agents chimiques agressives [4]. Variété des méthodes ont été efficacement appliquées pour la construction de nouvelles plates-formes ultra-sensibles utilisant des nanocomposites ce qui mène à détecter les métaux lourds de manière très sélective [5][6]. Récemment, plusieurs efforts explorent l'utilisation de différents types de nanomatériaux pour l'amélioration de la sensibilité des capteurs optiques et électrochimiques pour évaluer la contamination du plomb dans les effluents liquides [7] [8].

Les capteurs à base de nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNTs) sont les plus largement commercialisés en raison de leur faible coût et de leur reproductibilité pour la détection en temps réel des matières dangereuses [9]. La combinaison de matériaux carbonés avec des biopolymères peut fournir une matrice de détection biocompatible qui offre une excellente immobilisation des éléments de biorecognition [10]. Par exemple, le poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) est un polymère biocompatible qui possède des propriétés mécaniques excellentes [11] [12] [13]. De plus, les films PVDF sont très minces offrant une faible résistance et se lient fortement à la surface de l'électrode avec une distribution homogène, en particulier lorsqu'il est mélangé avec des particules de carbone [14] [15]. De plus, l'utilisation de nanocolloïdes comme les nanoparticules d'Or (AuNPs) pour la construction des plateformes électrochimiques améliore considérablement la sensibilité du capteur [16] [17] [18].

La bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*) est connue par son affinité envers les composés inorganiques. Par conséquent, l'utilisation de cette bactérie comme un élément de biorecognition est un bon choix pour construire des capteurs électrochimiques pour la détection des métaux lourds.

La méthode de sonication est l'une des techniques d'inactivation de la bactérie *E.coli* pour récupérer les enzymes qu'elle contient. Cette technique est couramment appliquée pour traiter l'eau sans avoir besoin d'équipement compliqué [19]. Cependant, certains paramètres opérationnels tels que le temps de sonication, la gamme de fréquences et l'intensité des ondes ultrasonores doivent être optimisés pour éviter la dégradation de l'enzyme libérée lors de la rupture de la membrane cellulaire [20][21]. La méthode de sonication a également été appliquée pour libérer l'ADN de *Bacillus cereus* afin de le détecter quantitativement [22].

Les biocapteurs enzymatiques pour la détection des métaux lourds souffrent de plusieurs inconvénients, notamment leur coût élevé, l'effet des conditions de stockage et l'instabilité. De plus, l'inhibition irréversible des sites catalytiques des enzymes coûteuses par les métaux lourds limite l'utilisation consécutive des capteurs enzymatiques [23][24]. D'autre part, la bactérie *E.coli* est largement disponible et peu coûteuse et possède une bonne spécificité envers les métaux lourds comme le plomb et le cadmium [25].

Dans ce chapitre, nous présentons la procédure de l'inactivation d'*E.coli* par la méthode de sonication afin de libérer les enzymes en tant qu'éléments de biorecognition à utiliser pour construire un biocapteur pour la détection des métaux lourds. La bactérie inactivée (*E\*. coli*) est mélangée avec le bovin sérum albumine (BSA) puis déposée à la surface d'une électrode de platine (Pt) modifiée avec du poly(fluorure de vinylidène) (PVDF)/nanotubes de carbone multiparois (MWCNT)-nanoparticules d'or MWCNTs-PVDF-AuNPs /*E.coli\**-BSA.

Ce chapitre présente l'avantage de l'utilisation la bactérie inactivée (*E\*. coli*) comme une source d'éléments de biorecognition pour la détection des ions de plomb. En outre, il décrit le mécanisme de l'inhibition et l'activité catalytique des enzymes par des mesures ampérométriques. Le capteur a été appliqué avec succès pour la détection des ions de plomb, cadmium et mercure dans des échantillons réels avec une meilleure performance analytique comme la sensibilité et la sélectivité.

### **III.2. Effet de l'ajout de l'*E.coli* sur (Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF)**

La figure III.1. montre les résultats de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) du capteur à base de l'électrode de platine. Contrairement à l'électrode de platine modifiée par le nanocomposite de MWCNTs-AuNPs-PVDF, la barre de platine montre une résistance élevée au transfert d'électrons ( $R_{et} = 201,3 \Omega.Cm^2$ ). Tandis que la résistance de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/*E.coli\**-BSA estimée à  $600 \Omega.Cm^2$

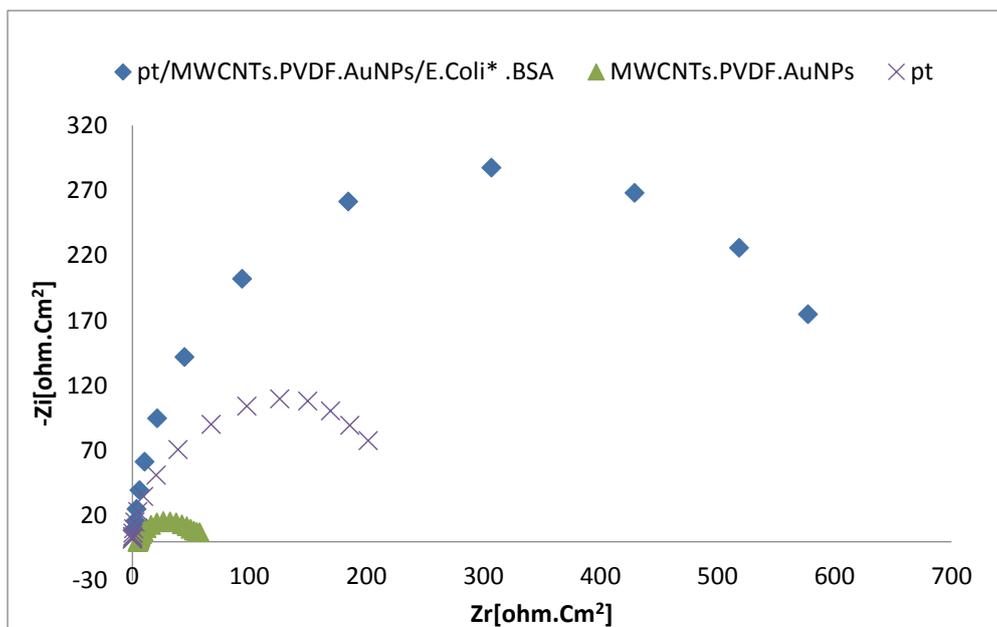


Fig III-1: Influence de la présence d'E. coli sur le transfert des électrons à travers l'électrode modifiée Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF. Conditions expérimentales : Solution tampon d'acétate (0,1 M pH=5,0) en présence 50 µg/l de Pb<sup>2+</sup>.

### III.3. Influence de la présence de Albumine de sérum bovine

La figure III.2. représente l'évolution de la réponse électrochimique de l'électrode modifiée à base de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF en présence et en absence de la protéine Albumine de sérum bovine (BSA). Cette protéine de BSA est utilisée pour augmenter les sites actifs des enzymes cédés par la bactérie *E.coli* ce qui augmente la réponse catalytique du capteur. Comme indiqué dans la figure, l'augmentation de la résistance en présence de BSA. La BSA peut aussi agir comme un biofilm hydrophile ce qui crée un microenvironnement favorable pour les éléments biologiques y compris les enzymes de la bactérie *E.coli* [26].

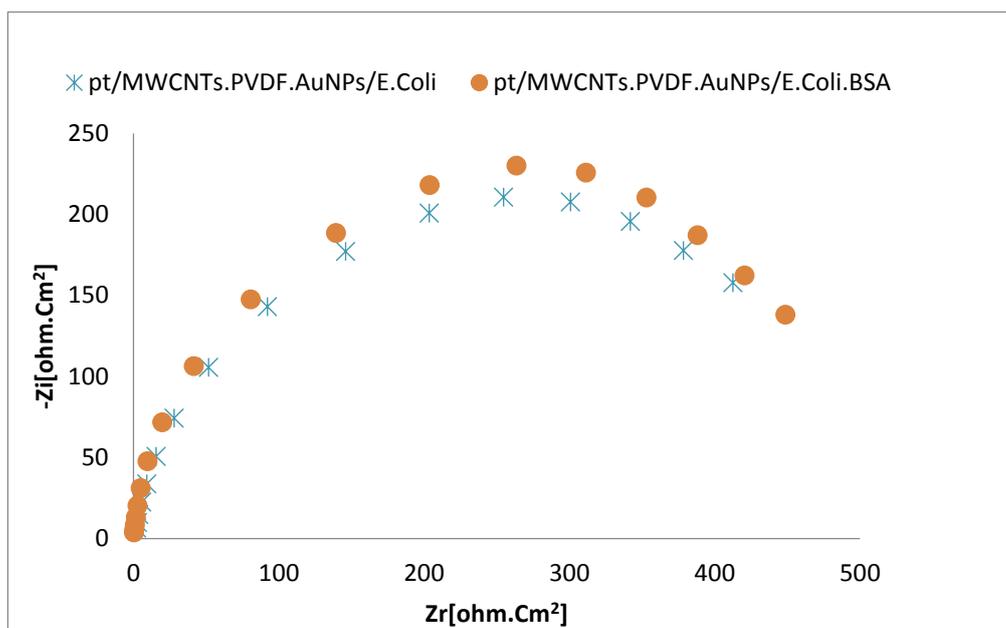


Fig III-2: Effet de l'ajout de protéine (BSA) sur la conductivité du nanocomposite à base de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/E.coli. Conditions expérimentales : Solution tampon d'acétate (0,1 M pH=5,0) en présence 50 µg/l Pb<sup>2+</sup>

### III.4. Détection électrochimique des ions de plomb

#### III.4.1. Réponse électrochimique du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs

La figure III.3. montre la réponse du capteur électrochimique à base de nanotube de carbone multiparois, les nanoparticules d'Or et le fluorure de polyvinyle (Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs) en présence des ions de plomb.

Le capteur répond à une concentration de plomb très faible ( $0,2 \mu\text{g/l}$ ) dans un intervalle de potentiel varie entre  $-0,8 \text{ V}$  et  $-0,3 \text{ V}$  (Figure III.3.a). Un courant maximal de  $0,17 \text{ mA/cm}^2$  est obtenu à un potentiel de  $-0,59 \text{ V}$ . La concentration de plomb varie de manière linéaire entre la gamme allant de  $0,2 \mu\text{g/l}$  à  $80 \mu\text{g/l}$  dans une solution tampon acétate de  $0,1 \text{ M}$  (pH 5.0). La figure III.3.b montre l'évolution linéaire de la densité de courant pour différentes concentrations du plomb par le capteur Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF.

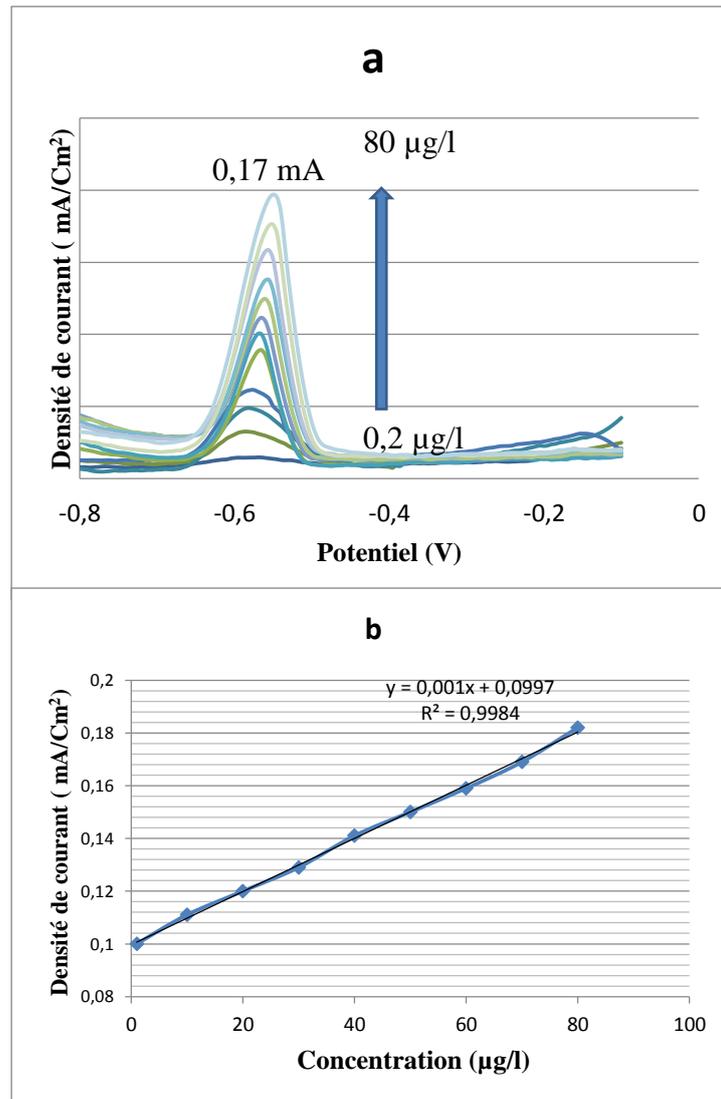


Fig III-3: Réponses électrochimiques du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection du plomb (a) Voltampérométrie linéaire pour différentes concentrations de  $\text{Pb}^{2+}$  ( $0,2$ - $80 \mu\text{g/l}$ ) (b) d'étalonnage : évolution linéaire de la densité de courant pour diff

### III.4.2. Effet de l'ajout de l'*E.coli* sur la détection du plomb

La figure III.4. représente l'effet de l'ajout de la bactérie d'*E.coli* sur la réponse du capteur (Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs) en présence des ions de plomb. Comme indiqué, la densité de courant à la même valeur du potentiel (-0,59 V) atteint une valeur maximale égale presque à 1,6 mA/cm<sup>2</sup> après une valeur de 0,17 mA/cm<sup>2</sup> en absence d'*E.coli*. Cette augmentation très considérable de la réponse en courant du capteur est due à l'effet catalytique de la bactérie *E.coli*.

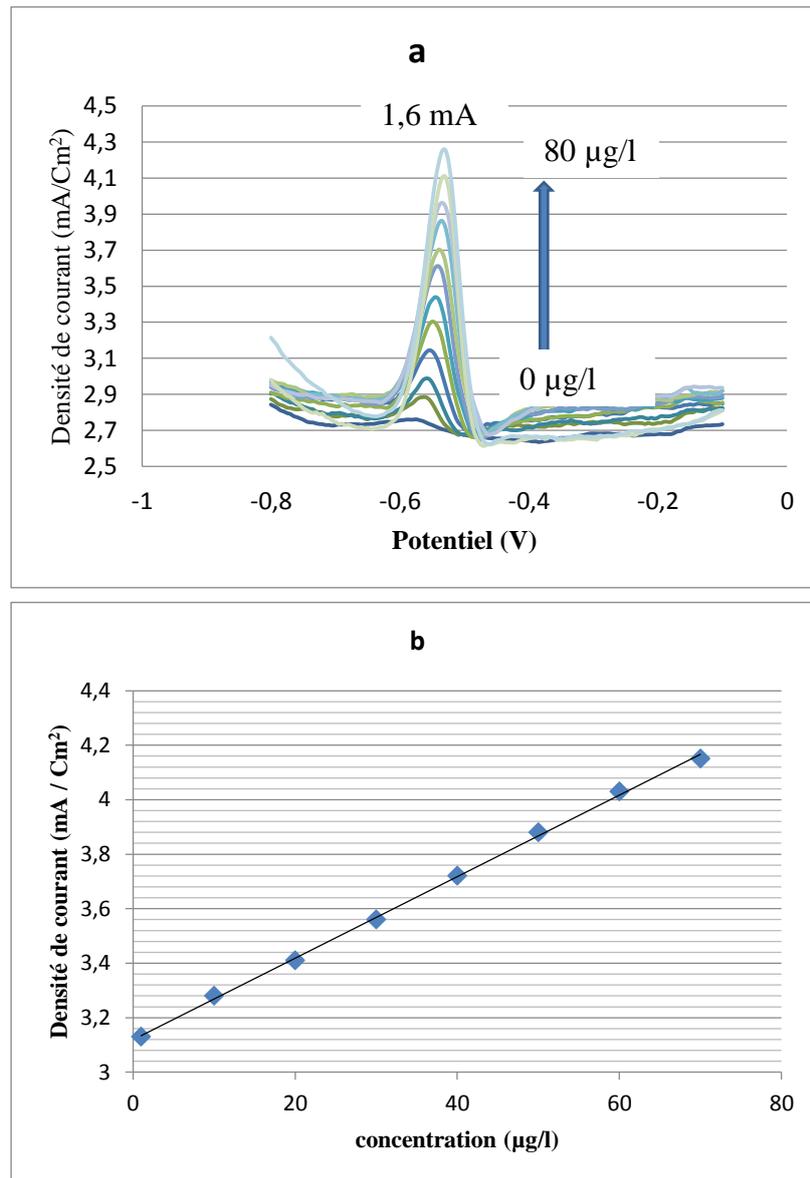


Fig III-4: Réponses électrochimiques du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli* pour la détection du plomb. (a) Voltampérométrie linéaire pour différentes concentrations de Pb<sup>2+</sup> + (0,2-80 µg / l) (b) Courbe d'étalonnage de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/*E.coli* Conditio

### III.4.3. Effet de l'inactivation de l'*E.coli*\* sur la détection de plomb

La figure III.5 montre l'effet catalytique de la bactérie inactivée *E.coli*\* par sonication pour libérer les enzymes. La densité de courant augmente à 3,1 mA/cm<sup>2</sup> en présence de la bactérie inactivée ce qui montre clairement l'effet électrocatalytique des enzymes libérés par sonication. Ces résultats prouvent l'efficacité de la méthode et montre que la bactérie *E.coli* est une source des enzymes qui peuvent être utilisés pour une application électrochimique.

La courbe de calibration indique une augmentation linéaire de la densité de courant en fonction de la concentration des ions de plomb dans la gamme de 0,2 à 80 µg/l (Figure III.5.b). L'équation de la linéarité est de  $I_{pa} (\mu A/cm^2) = 0,030Pb + 4,697$  avec un coefficient de corrélation est égale à  $R^2 = 0,995$ . La limite de détection (LOD) du capteur pour les ions de plomb est estimée égale à 0.13 ppb et la limite de quantification (LOQ) est égale à une valeur de 0.43 ppb.

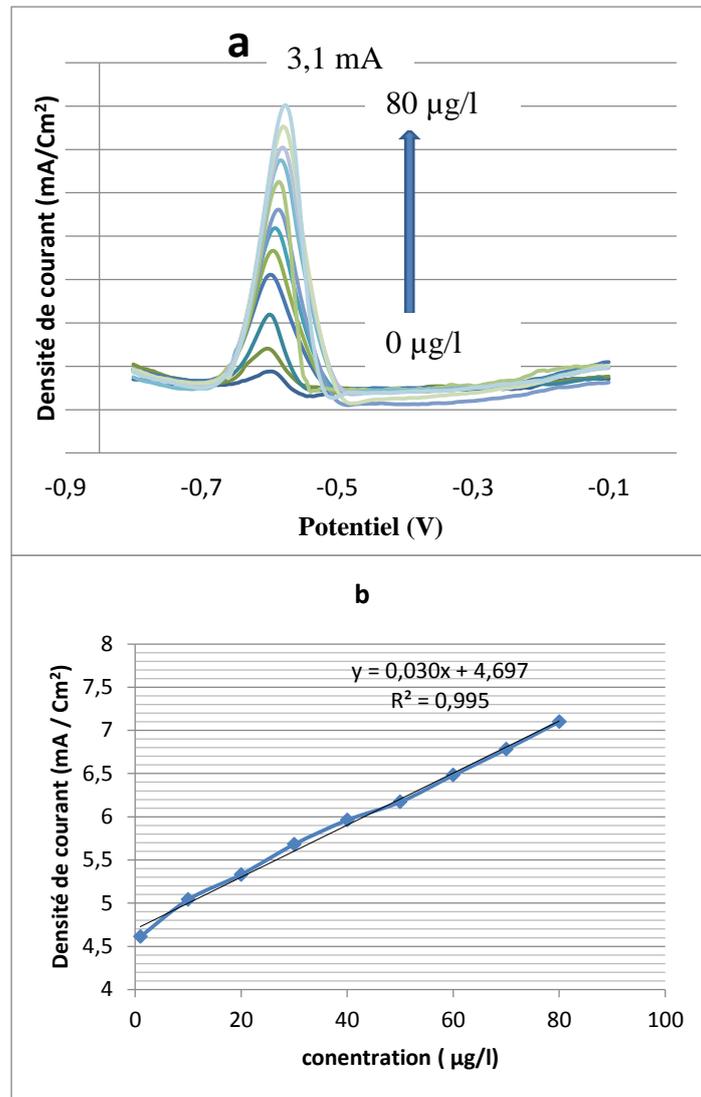


Fig III-5: Réponses électrochimiques du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA pour la détection du plomb. (a) Voltampèremètre linéaire pour différentes concentrations de Pb<sup>2+</sup> + (0,2-80 µg / l) (b) Courbe de calibration de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA

### III.5. Influence de l'ajout d'*E.coli* sur la détection du cadmium

Le capteur préparé à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA est aussi appliqué pour la détection des ions de cadmium (Figure III.6). Il est clairement montré que la présence des ions de cadmium influencent fortement sur l'activité des enzymes libérés par l'inactivation de la bactérie *E.coli*.

La densité de courant augmente avec des ajouts successifs de la concentration des ions de cadmium jusqu'à une valeur maximale est égale à 0,35 mA/cm<sup>2</sup> en absence de *E.coli*\* inactivée (Figure III.6.a). Cette valeur augmente à 0,45 mA/cm<sup>2</sup> en présence de *E.coli*\* ce qui montre l'effet catalytique des enzymes libérés (Figure III.6.c). Les deux courbes de calibration montrent la linéarité de l'évolution de la réponse du capteur en courant en fonction de la concentration du cadmium (Figures III.6.b,d). Le capteur Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/*E.coli*\*-BSA offre une limite de détection (LOD) est égale à 3,47 µg/l et une limite de quantification (LOQ) est égale à 18,9 µg/l.

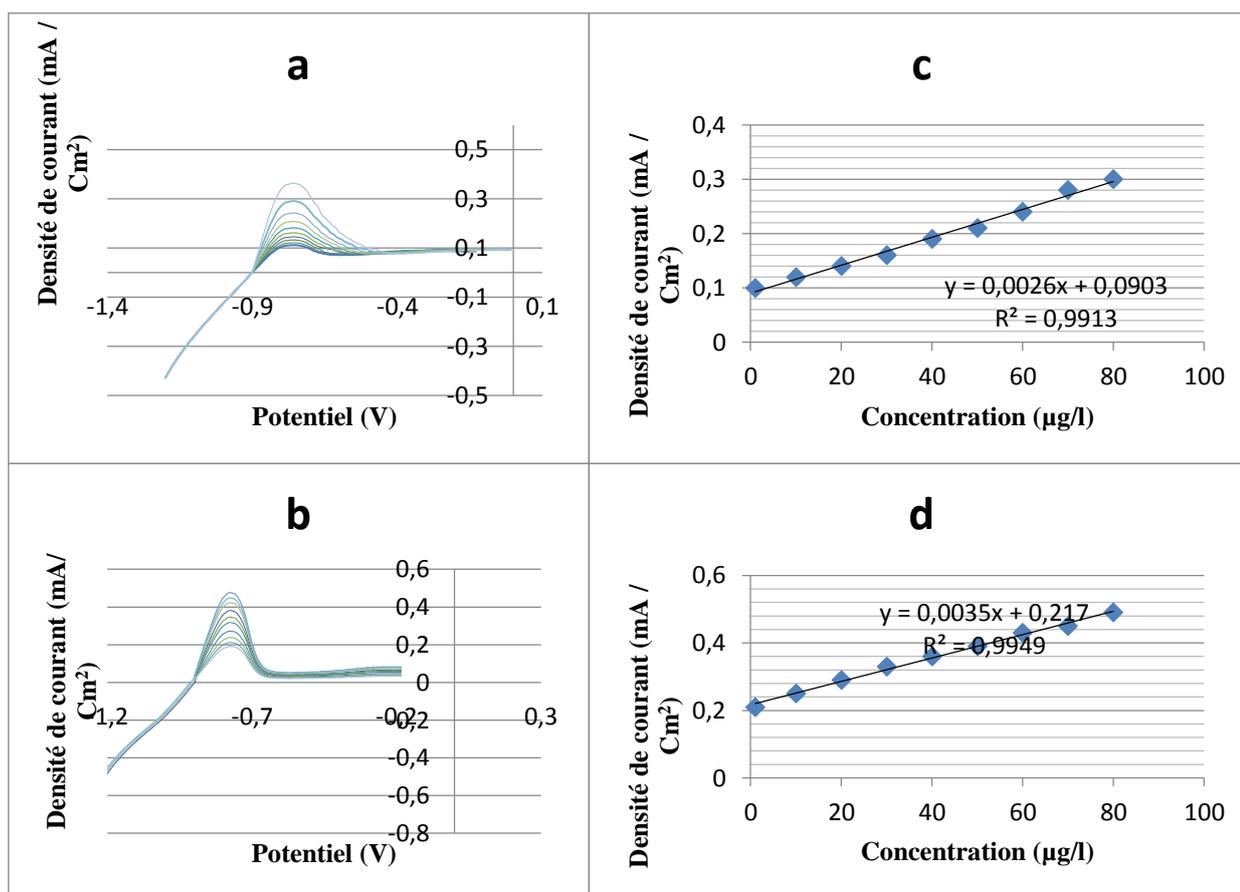


Fig III-6: Réponses électrochimiques du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection du cadmium (a) sans et (c) avec *E.coli*\*-BSA . (b,d) courbes de calibration correspondantes.

### III.6. Influence de l'ajout d'*E.coli* sur la détection des ions mercure

L'influence de la bactérie *E.coli*\* sur la détection des ions mercures  $Hg^{2+}$  est clairement observé sur la figure III.7. La détection électrochimique des ions de mercure a été réalisée dans un tampon acétate 0,1 M (pH 5.0) par la technique du voltamètre à onde carrée (SWV)

La réponse électrochimique du capteur Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection de  $Hg^{2+}$  où la réponse en courant atteint sa valeur maximale de  $2,35 \text{ mA/cm}^2$  puis elle augmente à  $2,5 \text{ mA/cm}^2$  en présence de la bactérie *E.coli*\* inactivée (figure III.7.c). Même cette augmentation n'est pas vraiment significative en comparant avec le cas de la détection du cadmium et du plomb mais les deux courbes de calibrations montrent une évolution linéaire de la réponse en courant du capteur dans la gamme des concentrations allant de  $1 \text{ } \mu\text{g/l}$  jusqu'à  $80 \text{ } \mu\text{g/l}$  avec une équation de régression de  $I_{pa} (\text{ } \mu\text{A/cm}^2) = 0,0037Hg + 2,176$  et un coefficient de corrélation est égale à  $R^2 = 0,9914$  (figure III.7.b, d). La limite de détection (LOD) des ions de mercure par le capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA est estimée est égale à  $5,09 \text{ } \mu\text{g/l}$  ( $0,016 \text{ } \mu\text{M}$ ) et celle de la quantification (LOQ) est égale à  $20,93 \text{ } \mu\text{g/l}$ .

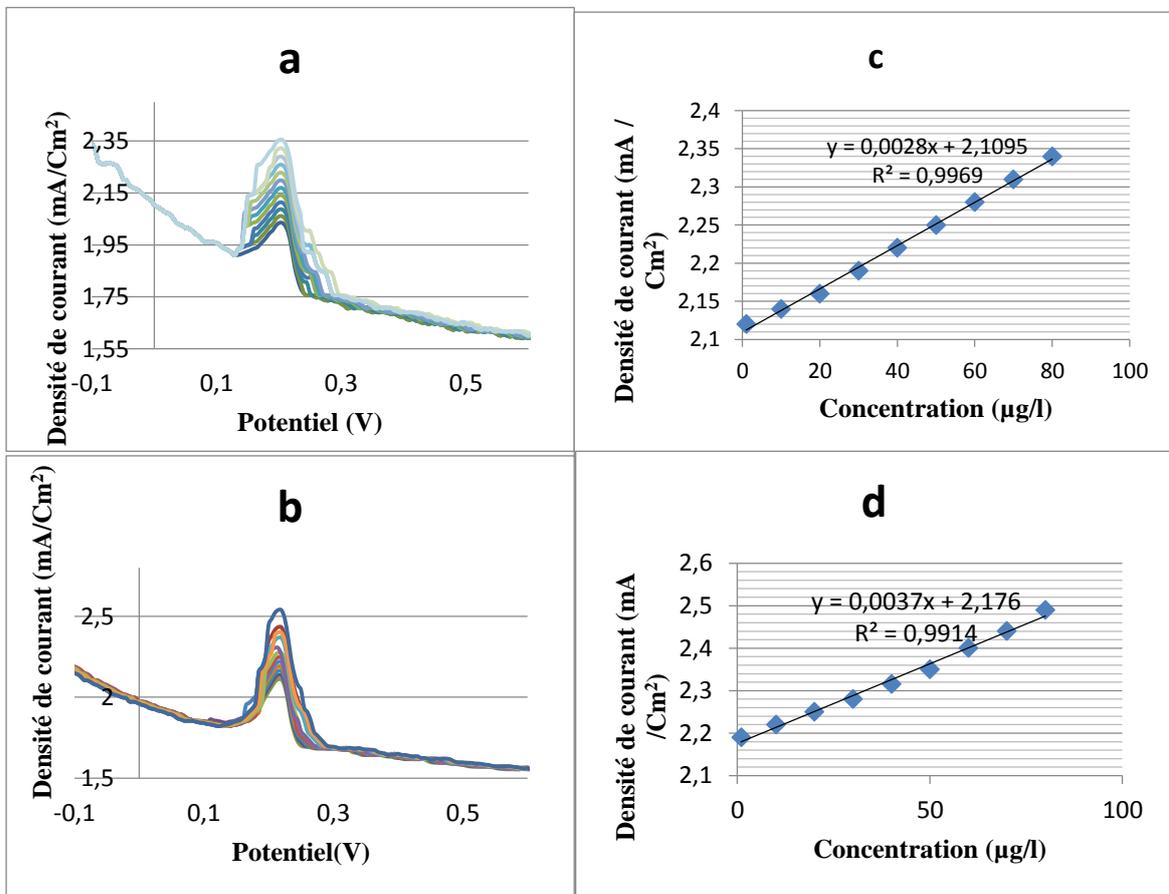


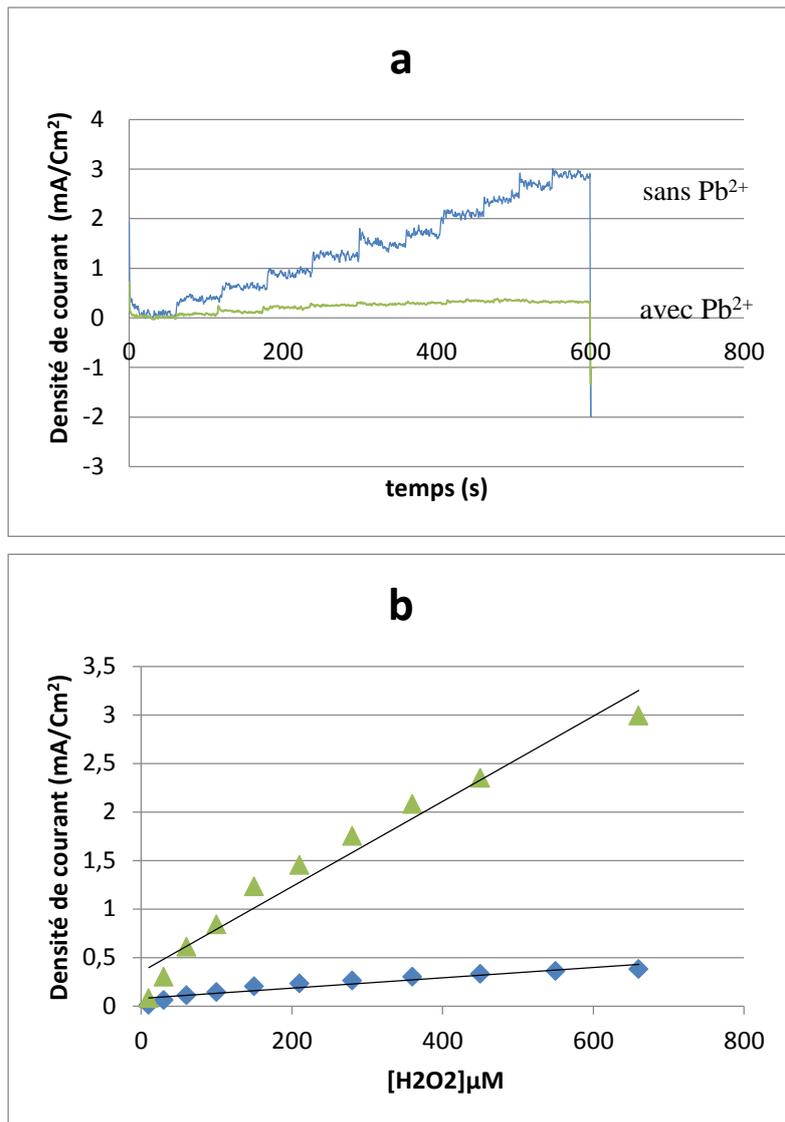
Fig III-7: Réponses électrochimiques du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs pour la détection des ions de mercure  $Hg^{2+}$  (a) sans et (c) avec *E.coli*\*-BSA . (b,d) courbes de calibration correspondantes. Conditions : Solution tampon d'acétate de 0,1 M-1, (pH=5).

### **III.7. Étude de l'inhibition enzymatique**

Le terme inhibition signifie ici une action de blocage du site actif du biorécepteur, autrement dit, une diminution de l'activité catalytique du biorécepteur par l'interaction d'un élément appelé « inhibiteur » qui est dans notre cas les métaux lourds. Le phénomène d'inhibition est appliqué pour montrer la présence d'un polluant. Pour cela, le biocapteur préparé est utilisé pour la détection d'un élément oxydant/réducteur qu'on appelle « substrat » le signal en courant «  $I_0$  » est enregistré. Ce signal diminue ( $I_1$ ) lorsque on refait la même expérience en injectant un polluant pour un temps bien déterminée « temps d'incubation » avant d'ajoute la même concentration du substrat. Dans ce qui suit, on montre l'inhibition des enzymes issus de la bactérie *E.coli* par les métaux lourds ( $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ). Cela confirme l'activité enzymatique et aussi la détection des métaux lourds.

#### **III.7.1. Inhibition par les ions du plomb**

La figure.III.8. présente la réponse ampérométrique du capteur à base de pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour la détection du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en absence et en présence des ions du plomb ( $Pb^{2+}$ ). On peut clairement constater la diminution de la réponse en courant du biocapteur en présence des ions du plomb, ce qui montre l'effet de l'inhibition des sites catalytiques des enzymes immobilisé à la surface de l'électrode. Les mesures d'inhibition sont effectuées dans une cellule électrochimique contenant une solution d'électrolyte ABS 0,1 M (pH 5,0), sous agitation continue à un potentiel appliqué de 640 V vs. Hg/HgCl. Avec concentration 10  $\mu$ g/l de plomb.

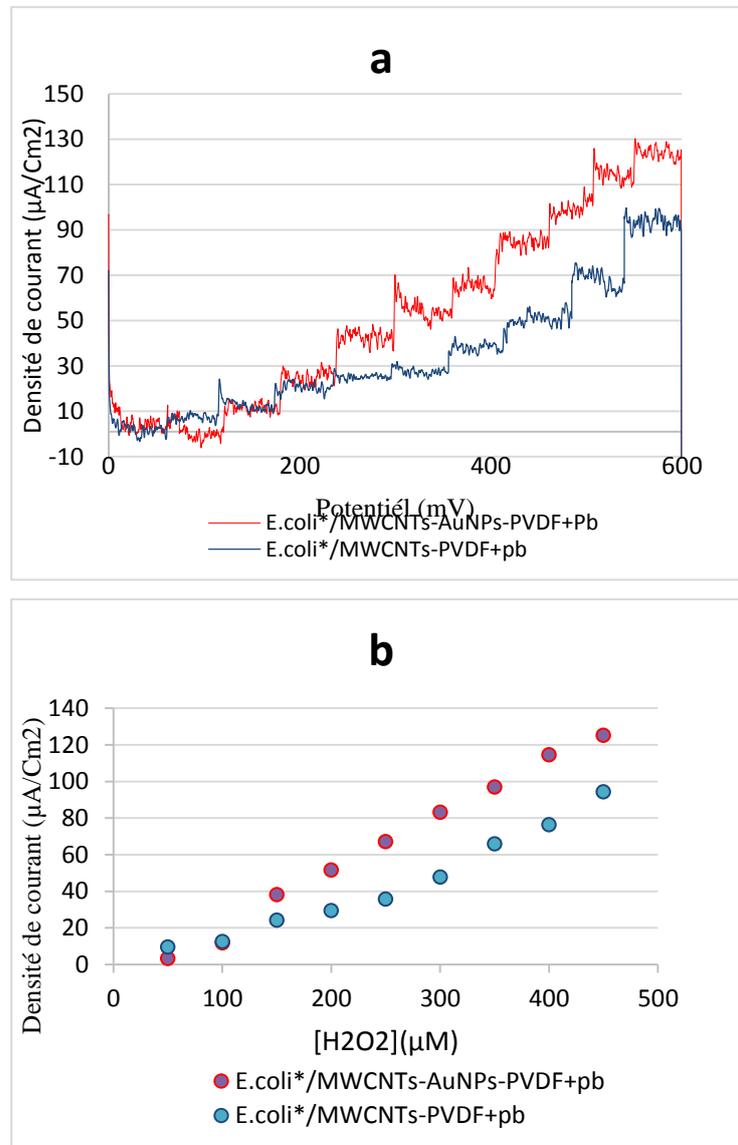


**Fig III-8:** Réponses ampérométriques du capteur pour la détection de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) Effet de l'ajout de plomb sur la réponse du capteur pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs /E.coli\*-BSA. Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate (pH 5,0,0,1M).(b) courbe d'étalonnage

### III.7.2. Influence de l'ajout de l'AuNPs

Nous avons réalisé une expérience pour vraiment dire qu'il s'agit bien d'une inhibition enzymatique. En effet, les nanoparticules d'or AuNPs permettent aussi la détection du plomb (par l'effet de l'accumulation), donc nous avons utilisé une électrode modifiée sans présence des nanoparticules (Pt/MWCNTs-PVDF). Le premier essai est réalisé sans présence des ions de plomb, seulement une concentration de 50 μM de peroxyde d'hydrogène est ajoutée dans la cellule électrochimique. Le deuxième essai est réalisé en présence de 10 μg/l des ions de plomb incubé dans la cellule électrochimique pendant un temps d'incubation de 10 minutes.

Comme on peut voir clairement la diminution de la réponse en courant est due uniquement à la présence des ions de plomb.



**Fig III-9:** Réponses ampérométriques du capteur pour la détection de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) Effet de l'ajout des nanoparticules d'Or (AuNPs) sur la réponse ampérométrique du capteur de MWCNTs-PVDF-AuNPs avec et sans incubation de Pb+2 Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; tempon

### III.7.3. Degré d'inhibition par les ions du plomb

La figure III.10. montre la variation du degré d'inhibition avec la concentration des ions de plomb. La bactérie *E.coli* inactivée est incubée avec des concentrations croissantes des ions de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 15  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) en présence de peroxyde d'hydrogène comme substrat. Les droites montrées dans la figure III.11 décrivent la variation du degré d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur et du temps d'incubation.

Les pentes de ces droites permettent la détermination des paramètres cinétiques de l'inhibition par les ions du plomb sur les sites catalytiques de l'enzyme.

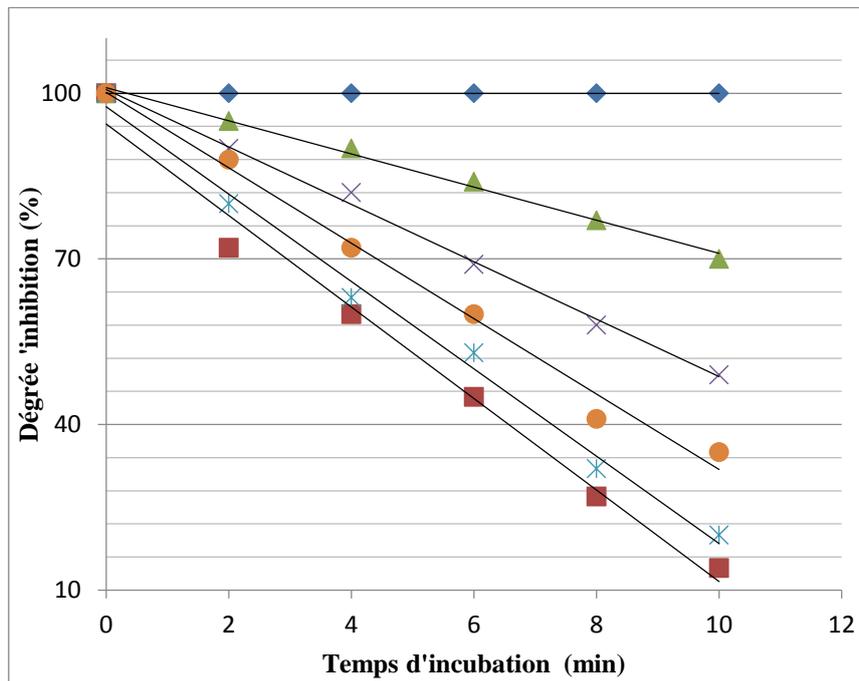


Fig III-10: Degré d'inhibition des enzymes par les ions du plomb en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur ( $Pb^{2+}$ ). Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate 0.1 M (pH=5)

Les valeurs de la constante observée ( $K_{obs}$ ) obtenues à partir de la pente des droites (Figure III.11) sont utilisées pour tracer la droite de la figure III.12 (tracé de  $1/K_{obs}$  en fonction de  $1/Pb^{2+}$ ). L'intersection de cette droite avec l'axe des « X » détermine la valeur de la constante d'inactivation ( $K_{inac}$ ) et l'intersection avec l'axe des « Y » détermine la constante ( $K_i$ ) qui est la concentration nécessaire pour inhiber l'enzyme (**Figure.III.11.**).

Une concentration différente en ions plomb a été utilisée pour calculer le degré d'inhibition du plomb ( $5\mu g/l$ ,  $10\mu g/l$ ,  $15\mu g/l$ ,  $20\mu g/l$ ,  $25\mu g/l$ ). Le capteur a été produit à 15% pour  $25\mu g/l$  de plomb. La valeur du rapport  $K_i$  et  $k_i$  était de 1,27 %, et les constantes d'inactivation

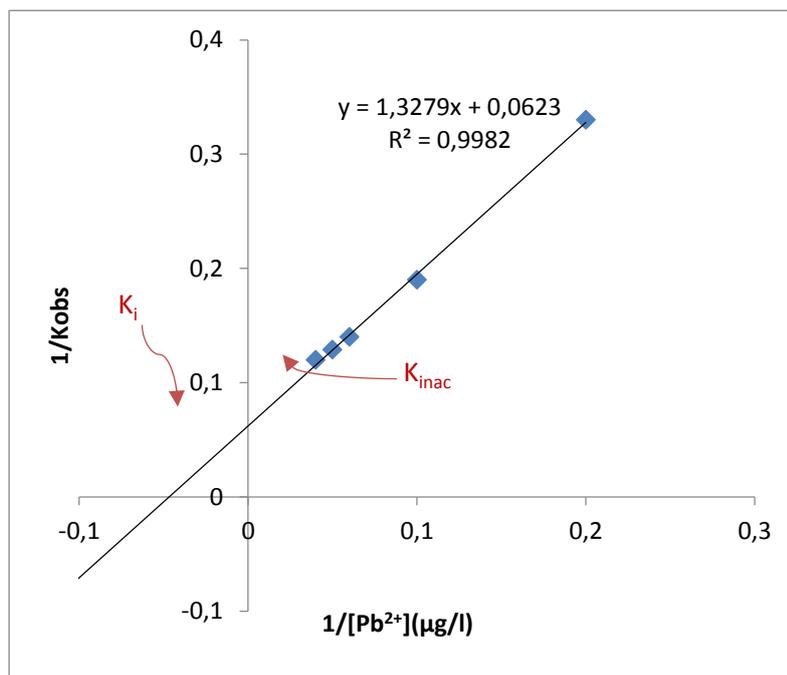


Fig III-11: Tracé de  $1/K_{obs}$  en fonction de  $1/[Pb^{2+}]$ . Détermination des constantes cinétiques de l'inhibition par les ions de Plomb.

Tracé de Inactivation du biocapteur comme sur  $(1/k_{obs})$  a été tracé par rapport à la concentration  $1/Pb^{2+}$  pour  $Pb(NO_3)_2$ .

### III.8. Degré d'inhibition par les ions du cadmium

La figure. III.12. présente l'effet d'inhibition de cadmium sur le capteur à base *E. coli* dans un cellule électrochimique contenant une solution d'électrolyte solution tampon a base acétate 0,1 M (pH 5,0), sous agitation continue à un potentiel appliqué de 640 V vs. Hg/HgCl en présence de  $H_2O_2$ .

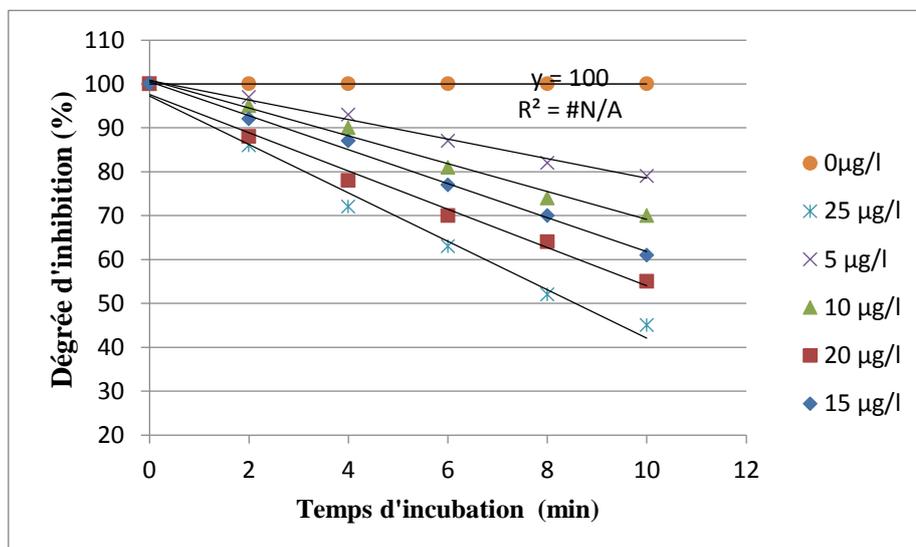


Fig III-12: Degré d'inhibition des enzymes par les ions du plomb en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur ( $Cd^{2+}$ ). Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate 0.1 M (pH=5).

Le degré d'inhibition de cadmium a été calculé pour une différente concentration Cd (5 µg / l, 10 µg / l, 15 µg / l, 20 µg / l, 25 µg / l), le capteur a été réalisé 45% pour 25 µg/l de cadmium. La valeur de rapport  $K_i$  et  $k_i$  ont été obtenues 1,27% et constants d'inactivation 18,4%.

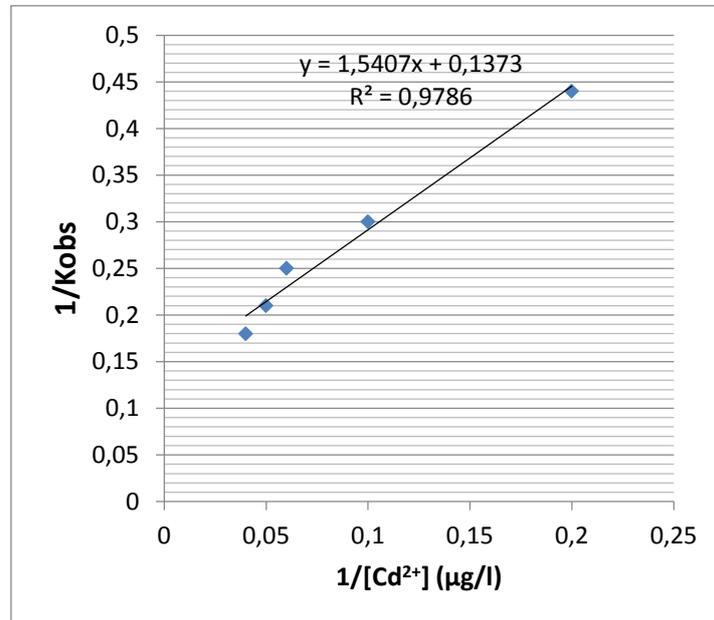


Fig III-13: Tracé de 1/K<sub>obs</sub> en fonction de 1/[Cd<sup>2+</sup>]. Détermination des constantes cinétiques de l'inhibition par les ions de Cadmium.

### III.9. Degré d'inhibition par les ions du mercure

Fig.III.14. montre l'effet inhibiteur du mercure sur le capteur à base d'*Escherichia coli* dans une cellule électrochimique contenant une solution d'électrolyte solution tampon de l'acétate 0,1 M (pH 5,0), sous agitation constante avec une tension appliquée de 640 V vs. Hg/HgCl en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le degré d'inhibition du mercure a été calculé pour différentes concentrations de mercure (5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L), le capteur a été produit à 25% versus 25 µg/ L. La valeur du rapport  $K_i$  et  $k_i$  de 0,82% et les constantes d'inactivation de 17,24 % ont été obtenues.

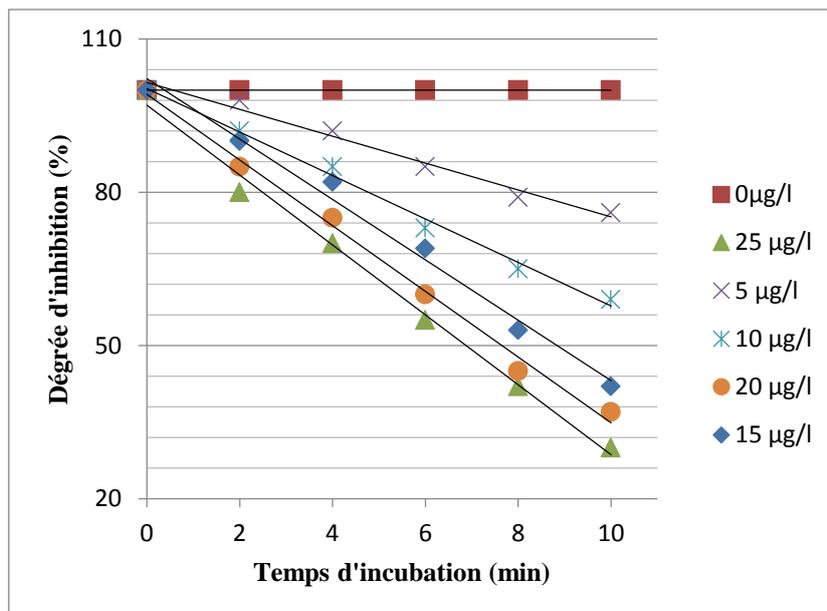


Fig III-14: Degré d'inhibition des enzymes par les ions du plomb en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur ( $Hg^{+2}$ ). Potentiel appliqué 640 mV vs Hg/HgCl; dans un tampon acétate 0.1 M (pH=5).

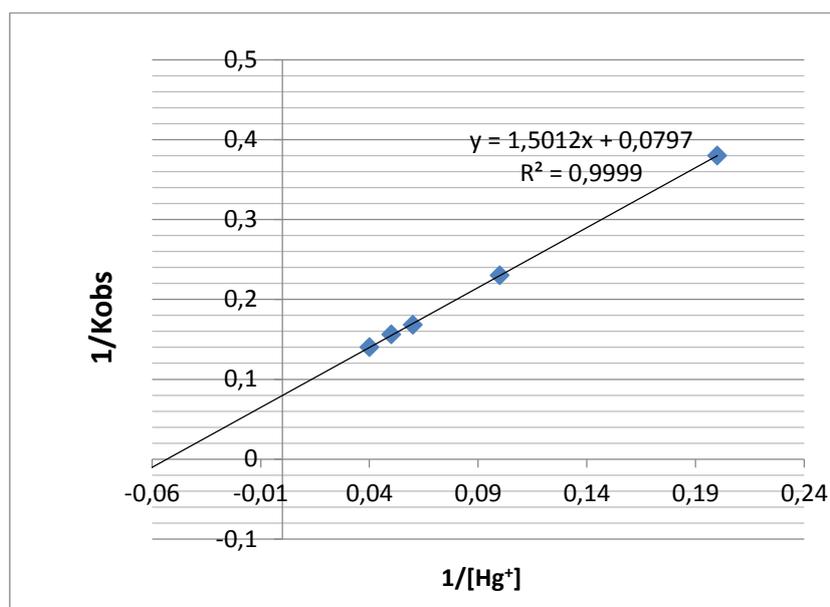


Fig III-15: Tracé de  $1/K_{obs}$  en fonction de  $1/[Hg^{2+}]$ . Détermination des constantes cinétiques de l'inhibition par les ions de mercure.

### III.10. Étude de la performance analytique du capteur

Pour évaluer la performance analytique du capteur préparé dans ce travail, des études ont été effectuées soigneusement pour confirmer la faisabilité du capteur pour la détection des métaux lourds à savoir les ions de plomb ( $Pb^{2+}$ ), les ions de cadmium ( $Cd^{2+}$ ) et les ions de mercure ( $Hg^{2+}$ ). Les paramètres analytiques étudiées sont, la stabilité, la reproductibilité, la sélectivité

### III.10.1. Étude de la reproductibilité

L'étude de la reproductibilité du biocapteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour la détection des métaux lourds ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) en utilisant cinq différentes électrodes. Pour chaque essais la concentration du métal est fixée à 10  $\mu\text{g/l}$  en gardant les mêmes conditions expérimentales. La méthode de la voltamétrie cycliques est appliquée, les résultats obtenus sont montrés dans les figures III.16, III.17 et III.18.

#### III.10.1.1. Reproductibilité du capteur pour la détection du plomb

La figure III.16 montre la reproductibilité du capteur en utilisant cinq différentes électrodes modifiées par le nanocomposite à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA en présence de 10  $\mu\text{g/l}$  des ions de plomb. Comme le montre la figure III.17, la réponse du biocapteur est pratiquement inchangée pour le même potentiel de (-0,56 V) donne le même signal de densité de courant 7,2  $\text{mA}/\text{Cm}^2$  ce qui prouve la reproductibilité du biocapteur pour la détection des ions du plomb.

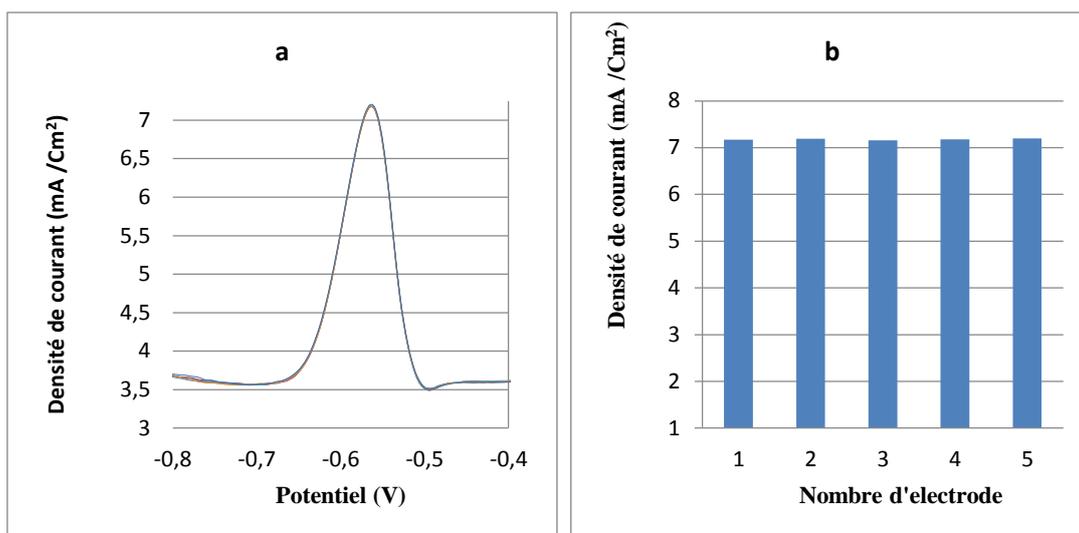


Fig III-16: Voltamogrammes cycliques à ondes carrées (SWV) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour cinq différentes électrodes en présence 10  $\mu\text{g/l}$  des ions de plomb ( $Pb^{2+}$ ).

#### III.10.1.2. Reproductibilité du capteur pour la détection de cadmium

La figure III.17 montre la reproductibilité du pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA étudiée en préparant cinq électrodes différentes. Dans des circonstances expérimentales identiques, des tests de répétabilité ont été effectués dans 0,1 M de solution tampon à base d'acétate contenant 50,0  $\mu\text{g/l}$  de cadmium. La réponse du capteur pour les cinq électrodes montre un pic de densité de courant 10  $\text{mA}/\text{Cm}^2$  dans le même potentiel de (-0,8 V), ce résultat montre que le capteur préparé est très reproductible.

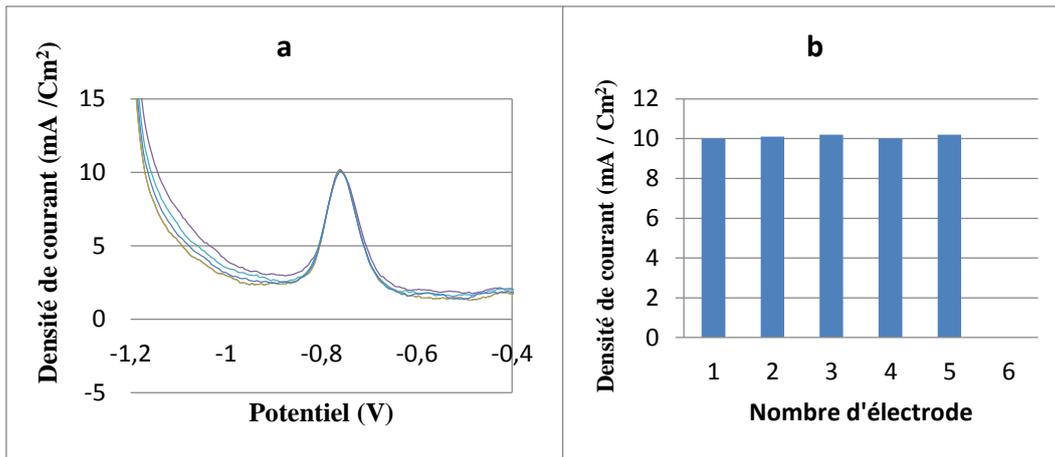


Fig III-17: Voltammogrammes cycliques à ondes carrées (SWV) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA pour cinq différentes électrodes

### III.10.1.3. Reproductibilité du capteur pour la détection de mercure

L'étude de la reproductibilité du capteur pour la détection de mercure s'est effectuée de la même manière, le capteur est préparé en utilisant cinq différentes électrodes. Comme le montre la figure III.18, la réponse reste presque stable et le pic d'oxydation se montre stable à 0,2 V ce qui confirme la reproductibilité du capteur pour la détection des ions de mercure.

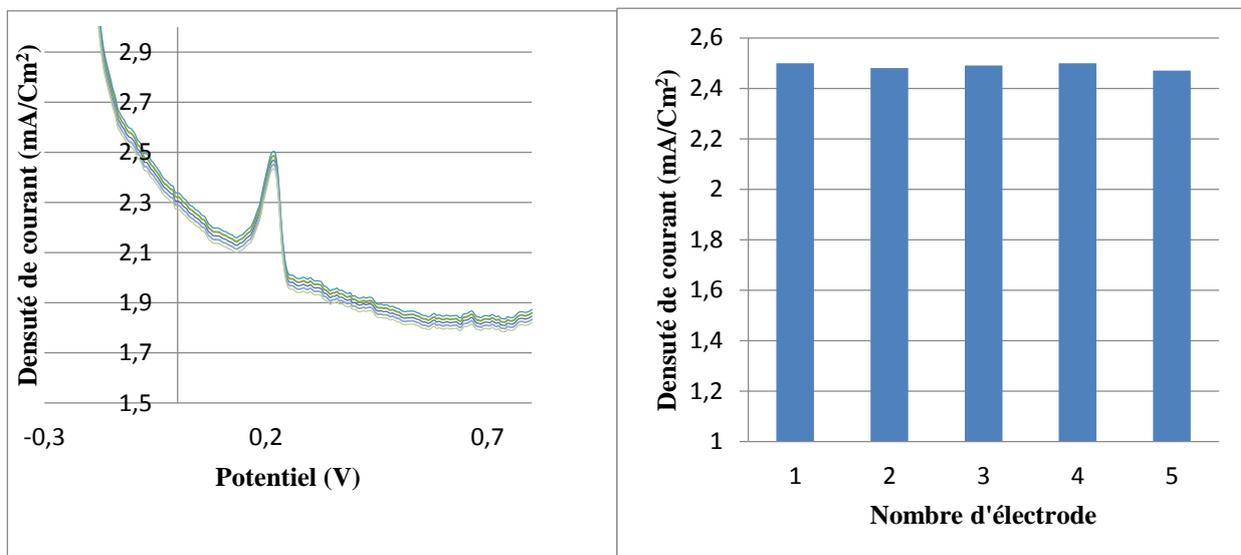


Fig III-18: Voltammogrammes cycliques à ondes carrées (SWV) du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA pour cinq électrodes différentes en présence de 10 µg/l de Hg<sup>2+</sup>.

### III.10.2. Étude de la stabilité du capteur

La stabilité du biocapteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA a également été étudiée et représentée sur la Fig.III.20.

Le biocapteur présente une stabilité de 90 %, 89 %, 92% pour les ions de plomb, de cadmium et du mercure, respectivement. La réponse de courant d'oxydation d'ions cadmium est obtenue pour une concentration de 10 µg/l dans un milieu tampon acétate 0,1 M (pH 5).

Aussi, la stabilité du biocapteur pour la détection des métaux lourds est étudiée par la méthode de la voltamétrie cyclique pour 25 cyclique consécutifs. Le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA présente une bonne stabilité, avec une légère diminution du courant a été observée avec l'augmentation du cycle de balayage. Cela indique que le nanocomposite offre une bonne matrice d'immobilisation pour les enzymes issus de la bactérie *E.coli*.

Cette stabilité du biocapteur est due à l'utilisation du film polymérique à base de de polyvinyle de fluorure (PVDF) combiné avec un matériau à base de carbone comme le nanotube de carbones à paroi multiple (MWCNTs).

### III.10.2.1. Étude de la stabilité du capteur pour la détection du plomb

De manière similaire, la méthode de la voltamétrie cyclique est appliquée de 25 cycles pour examiner la stabilité du capteur pour la détection du plomb. Comme montre la figure III.19, les courants des pics anodiques n'entraînent aucune diminution de l'intensité du pic d'oxydation du plomb qui est situé environ à -0,5V ce qui confirme la stabilité du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs /*E.coli*\*-BSA pour la détection du plomb.

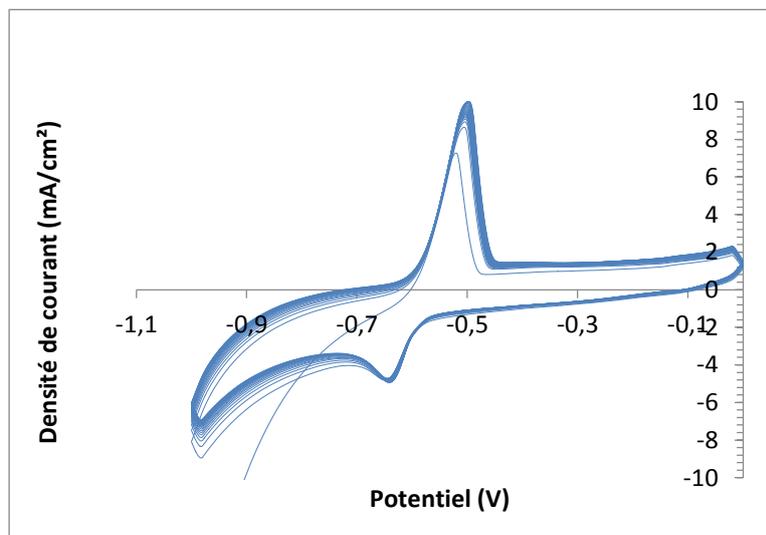


Fig III-19: Étude de la stabilité du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA par voltampérométrie cyclique pour 25 cycles consécutifs en présence 10 $\mu$ g/l Pb<sup>2+</sup>.

### III.10.2.2. Étude de la stabilité du capteur pour la détection du cadmium

La figure III.20 présente la réponse du capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour l'étude de la stabilité par voltamétrie cyclique. Après 25 cycle consécutif, la réponse du capteur diminue légèrement et la stabilité du capteur pour la détection cadmium est estimé à 89%.

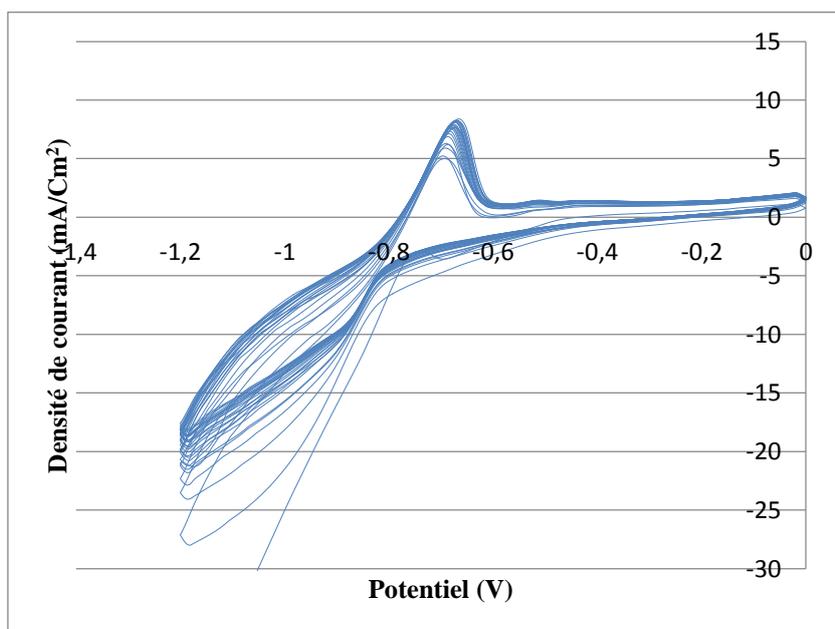


Fig III-20: Voltammogrammes cycliques de stabilité du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour 25 cycles consécutifs en présence de  $10\mu\text{g/l Cd}^{2+}$ .

### III.10.2.3. Étude de la stabilité du capteur pour la détection du $\text{Hg}^+$

La figure III.21 montre l'étude de la stabilité du capteur pour la détection du ions de mercure en appliquant un balayage cyclique dans l'intervalle (-800 – 500 V) pendant 25 fois dans les mêmes conditions expérimentales utilisées précédemment. Les Voltammogrammes cycliques sont presque superposées, ce qui montre que le capteur à base de Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA présente une bonne stabilité estimé de 92%.

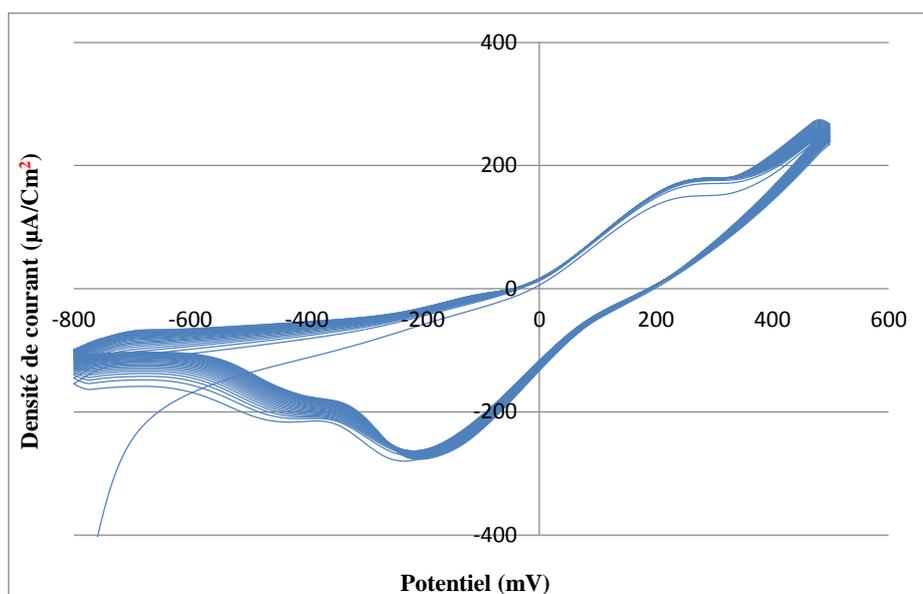


Fig III-21: Voltammogrammes cycliques de stabilité du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pendant 25 cycles consécutifs en présence de  $\text{Hg}^{2+}$ .

### III.10.3. Étude de la sélectivité du capteur

La sélectivité du capteur pour la détection des ions de plomb a été étudiée en présence des ions de plomb, de cadmium et de mercure dans une solution de tampon à base d'acétate de 0,1 M contenant 50,0 µg/l de chaque élément ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ). La figure III.22 montre clairement trois pics différents indiquant la présence de chaque élément présent dans la solution. Le premier pic est attribué aux ions de cadmium à -0,8 V, celui du plomb est apparu à -0,6 V, le pic des ions de mercure se montre à un potentiel de 0,2 V. Ce résultat montre que le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA détermine les métaux lourds de manière très sélective.

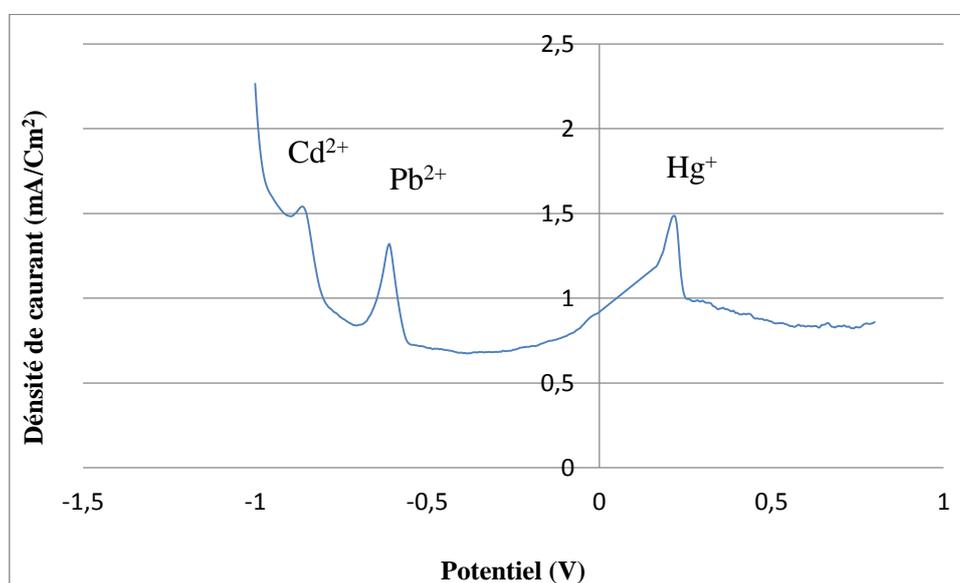


Fig III-22: Sélectivité de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ;  $Hg^{2+}$  dans solution tampon acétate (pH 5,0, 0,1M).

### III.11. Étude de l'applicabilité du capteur

Les tests électrochimiques qui déterminent la performance du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA sont faites dans une cellule électrochimique qui contient une solution tampon comme support électrolytique avec des concentrations connues des échantillons de Pb, Cd et de Hg trouvés dans le rouge à lèvres et l'eau usée. Les résultats obtenus sous forme des voltammogrammes sont enregistrés aux conditions améliorées auparavant en comparaison avec les échantillons de Pb, Cd, Hg préparés dans l'eau distillée.

Les résultats présentés dans le tableau III.1 ont montré un excellent accord avec les valeurs obtenues par le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA utilisé pour la détection de Pb, Cd, Hg par rapport aux résultats trouvés via les méthodes typiques des normes internationales. Des récupérations considérables de 120, 110, 105, respectivement ont

été enregistrées pour les échantillons des eaux usées. Donc, le capteur MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA est efficace pour la détection de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  dans l'environnement.

### III.11.1. Application du capteur pour la détection des ions de plomb aux eaux usées

L'applicabilité du capteur pour la détermination des métaux lourds est testée en utilisant un échantillon d'eau usée issu de l'industrie pétrochimique. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure III.23. On peut constater clairement les pics montrant la présence des ions de plomb, de cadmium et de mercure au potentiel appliqué.

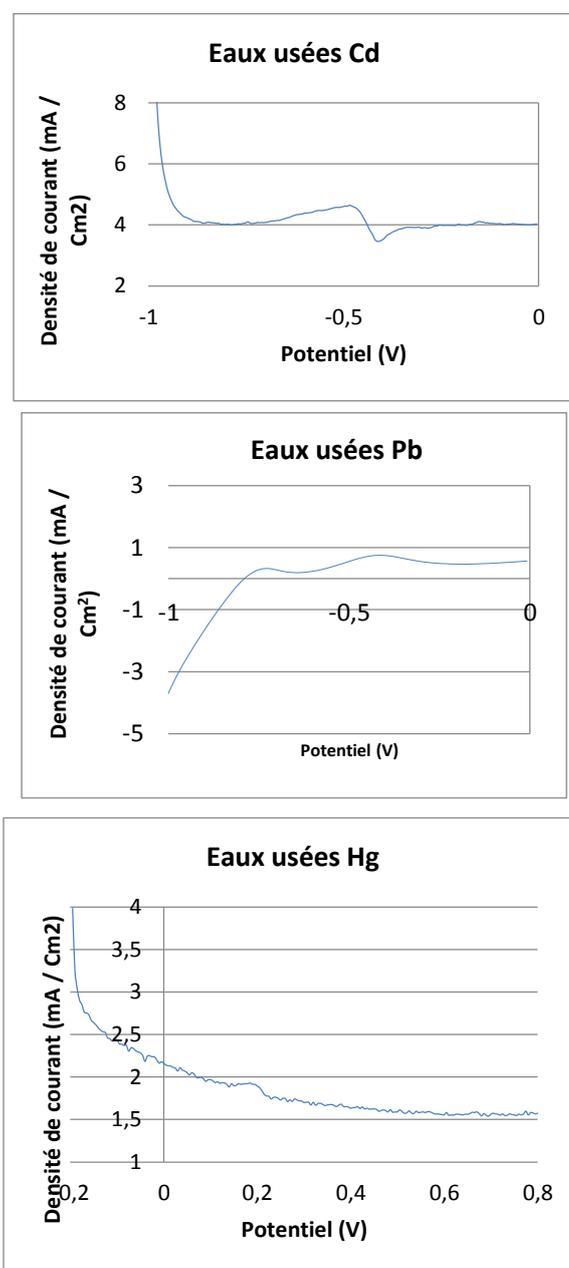


Fig III-23: Voltammogrammes à ondes carrées des échantillons de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , et  $\text{Hg}^{2+}$  de eaux usées par le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA dans un tampon d'acétate (pH 5.0),(0,1M)

### III.11.2. Application du capteur pour la détection des ions de plomb au rouge à lèvres

Pour tester l'applicabilité du capteur à détecter les ions de plomb dans au rouge à lèvres, une tranche de rouge à lèvres de 1g est versée dans 50 ml d'éthanol et homogénéisé par ultrason. Après filtration, l'échantillon est utilisé pour les mesures électrochimique par le capteur préparé (Figure III.24). Les réponses du capteur sont présentées dans la figure III.25.



**Mesure la masse de rouge à lèvres**



**Dilution de rouge à lèvres dans l'éthanol**



**Filtration du le mélange**



**Mélanger par ultrason**

**Fig III-24: Préparation de l'échantillon de rouge à lèvres.**

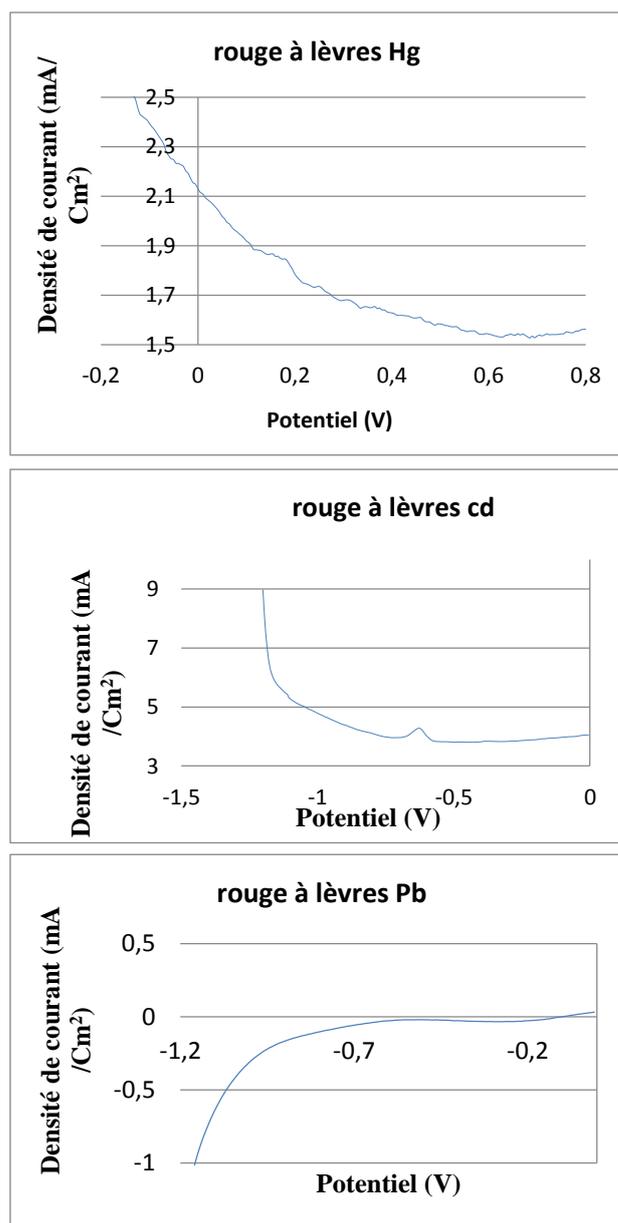


Fig III-25: Voltammogrammes à ondes carrées des échantillons de Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, et Hg<sup>2+</sup> de rouge à lèvres par le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA dans un tampon d'acétate (pH 5,0,0,1M).

Tableau III-1: Réponses électrochimiques du capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/E.coli\*-BSA pour la détection des métaux lourds dans les échantillons réels

Échantillons	Métaux	Ajouté	Trouvé	Récupéré
Rouge à lèvres	Pb <sup>2+</sup>	1 µg/l	0,3 µg/l	30%
	Cd <sup>2+</sup>		0,8 µg/l	80%
	Hg <sup>2+</sup>		0,5 µg/l	50%
Eaux usées	Pb <sup>2+</sup>	1 µg/l	1,2 µg/l	120%
	Cd <sup>2+</sup>		1,1 µg/l	110%
	Hg <sup>2+</sup>		0,5 µg/l	50%

Le tableau III.1. présente les résultats obtenus par le capteur à base de MWCNTs-PVDF-AuNPs/*E.coli*\*-BSA pour la détection de traces de métaux lourds. La bactérie inactivé *Escherichia coli*\* est utilisé dans ce travail comme une source des éléments de reconnaissance biologiques pour préparer un biocapteur pour la détection des métaux lourds. La détection est basée sur l'effet de l'inhibition enzymatique. La comparaison de la performance analytique des biocapteurs confirme l'avantage de l'utilisation d'*E.coli*, surtout avec la stratégie de la sonication qui peut libérer les enzymes contenant dans la bactérie *E.coli*.

Le tableau III.2. résume la performance analytique de la réponse des capteurs à base d'*E.coli* pour la détection des métaux lourds. Un biocapteur à base d'*E.coli* déposée directement sur la surface de l'électrode d'Or pour la détection de l'arsenic avec une limite de détection de 0.94  $\mu\text{M}$  [29]. Un autre capteur à base de bactérie de type *Trichoderma asperellum* est conçu pour la détection du plomb et de cadmium offre une limite de détection de 0.1  $\mu\text{M}$  pour le la détection du cadmium et dix fois moins pour la détection du plomb en utilisant les nanotubes de carbone comme matériau [30]. La plus basse limite de détection est obtenue par un biocapteur à base de la bactérie de *Hordeum vulgare L.* fabriqué en utilisant le carbonate de sodium avec une limite de détection de 0.069 nM pour la détection des ions de plomb [31].

Le capteur préparé dans ce travail à base de la bactérie *E.coli*\* inactivée par sonication et mélangée avec la protéine de BSA présente des réponses analytiques très satisfaisante pour la détection des métaux lourds. Les résultats montrent la capacité et la fiabilité du capteur développé dans ce travail pour la détection de faibles concentrations de plomb, de cadmium et du mercure. Afin de déterminer l'impact des métaux lourds les résultats obtenus à partir de nos travaux comparés aux résultats d'autres capteurs récemment publiés dans la littérature. On note que le capteur de détection du plomb, du cadmium et du mercure à une sensibilité très élevée par rapport à d'autres avec une limite de détection très basse.

**Tableau III-2: Comparaison des performances analytiques de la réponse des MWCNTs-PVDF -AuNPs/E.coli\*-BSA avec un autre capteur**

Capteur	Bactérie	Analyte	Limit de détection	Gamme linéaire	Référence
Pt / <i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	Hg <sup>2+</sup> As <sup>2+</sup>	0.1 ppb 1.5 ppb	- -	[32]
<i>E.Coli</i> -BSA/GCE	<i>E.coli</i>	Hg <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup>	0.0558 mM 0.51 mM	0.499 nM - 4.99 mM 0.889 nM - 8.89 mM	[33]
Au	<i>E.coli</i>	As <sup>2+</sup>	0.94 µM	0.94 - 3.75 mM	[29]
CHI-CNDs- <i>E.coli</i> @TH/GCE	<i>E.coli</i>	Cd <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup>	-	-	[27]
GCE/SWCNTs-CO	<i>Trichoderma asperellum</i>	Cd <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup>	0.1 µM 0.01 µM	-	[30]
3DrGO/GCE	<i>Klebsiella michiganensi</i>	Cd <sup>2+</sup>	1 µM	-	[34]
GCE	<i>Stenotrophomonas</i>	Cd <sup>2+</sup>	2 µM	5-20 µM	[35]
AuNPs-SPCE	<i>Alcaligenes faecalis</i>	As <sup>2+</sup>	6.61 µM	6.67 - 26.69 µM	[36]
HVW-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /CPE	<i>Hordeum vulgare L.</i>	Cd <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup> Hg <sup>2+</sup>	1.82 nM, 0.069 nM 0.237 nM	10 – 85 nM 0.2 - 14 nM 1 -11.5 nM	[31]
MWCNTs-PVDF-AuNPs/ <i>E.coli</i> *-BSA	<i>E. coli</i>	Pb <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup> Hg <sup>2+</sup>	0.13 µg/l 3,47 µg/l 5,09 µg/l	1-80 µg/l 1-80 µg/l 1-80 µg/l	Notre travail

## Conclusion

Ce chapitre présente les résultats expérimentaux du capteur préparé à base d'*E.coli* pour la détection des métaux lourds. Les mesures de la spectroscopie d'impédance électrochimique montrent que le nanocomposite est très performant en termes de signal par rapport à l'utilisation de l'électrode non-modifiée. L'optimisation du choix du nanomatériau pour la préparation de la plateforme de détection montre que le nanocomposite à base des nanotubes de carbone avec les nanoparticules d'Or (Pt/MWCNTs-PVDF-AuNPs) est très favorable pour la détection des métaux lourds et aussi, très compatible pour l'immobilisation de la bactérie *E.coli*.

La gamme de linéarité du biocapteur développé est comprise entre 1 et 80  $\mu\text{g/l}$  et une excellente sensibilité. La stabilité du biocapteur est estimée à 92 % pour la détection du mercure. L'étude comparative avec les réponses des capteurs développés précédemment montre la performance analytique du capteur à base de Pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/*E.coli*\*-BSA pour la détection des métaux lourds.

## Références

- [1] A. Goldberg, Lead Poisoning, *Br. Med. J.* 4 (1972) 230. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5834.230-a>.
- [2] Y. Yin, P. Zhang, X. Yue, X. Du, W. Li, Y. Yin, C. Yi, Y. Li, Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and *Bacillus subtilis* on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161 (2018) 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.056>.
- [3] R. Ding, Y.H. Cheong, A. Ahamed, G. Lisak, Heavy Metals Detection with Paper-Based Electrochemical Sensors, *Anal. Chem.* 93 (2021) 1880–1888. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04247>.
- [4] A. Fethi, Novel materials for electrochemical sensing platforms, *Sensors Int.* 1 (2020) 100035. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100035>.
- [5] G. Aragay, A. Merkoçi, Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals, *Electrochim. Acta.* 84 (2012) 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.04.044>.
- [6] C.I.L. Justino, A.C. Duarte, T.A.P. Rocha-Santos, Recent progress in biosensors for environmental monitoring: A review, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017). <https://doi.org/10.3390/s17122918>.
- [7] H. Singh, A. Bamrah, S.K. Bhardwaj, A. Deep, M. Khatri, K.H. Kim, N. Bhardwaj, Nanomaterial-based fluorescent sensors for the detection of lead ions, *J. Hazard. Mater.* 407 (2021) 124379. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124379>.
- [8] M. Ardalani, M. Shamsipur, A. Besharati-Seidani, A new generation of highly sensitive potentiometric sensors based on ion imprinted polymeric nanoparticles/multiwall carbon nanotubes/polyaniline/graphite electrode for sub-nanomolar detection of lead(II) ions, *J. Electroanal. Chem.* 879 (2020) 114788. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114788>.
- [9] A. Dehdashti, A. Babaei, Designing and characterization of a novel sensing platform based on Pt doped NiO/MWCNTs nanocomposite for enhanced electrochemical determination of epinephrine and tramadol simultaneously, *J. Electroanal. Chem.* 862 (2020) 113949. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113949>.
- [10] H.S. Magar, M.E. Ghica, M.N. Abbas, C.M.A. Brett, Highly Sensitive Choline Oxidase Enzyme Inhibition Biosensor for Lead Ions Based on Multiwalled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrodes, *Electroanalysis*. 29 (2017) 1741–1748. <https://doi.org/10.1002/elan.201700111>.

- [11] X. Bian, J. Liang, X. Tang, R. Li, L. Kang, A. Su, X. Su, Y. Wei, A boron nitride-polyvinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene composite gel polymer electrolyte for lithium metal batteries, *J. Alloys Compd.* 803 (2019) 1075–1081. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.06.321>.
- [12] N. Tabary, S. Lepretre, F. Boschin, N. Blanchemain, C. Neut, E. Delcourt-Debruyne, B. Martel, M. Morcellet, H.F. Hildebrand, Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidin, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.07.007>.
- [13] D. Silagy, P. Bussi, G. Marot, Technology and material design in PVDF protected thermoplastic substrates, *J. Fluor. Chem.* 104 (2000) 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(00\)00230-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(00)00230-X).
- [14] M. Yoo, C.W. Frank, S. Mori, S. Yamaguchi, Interaction of poly(vinylidene fluoride) with graphite particles. 2. Effect of solvent evaporation kinetics and chemical properties of PVDF on the surface morphology of a composite film and its relation to electrochemical performance, *Chem. Mater.* 16 (2004) 1945–1953. <https://doi.org/10.1021/cm0304593>.
- [15] M. Safarpour, A. Khataee, V. Vatanpour, Effect of reduced graphene oxide/TiO<sub>2</sub> nanocomposite with different molar ratios on the performance of PVDF ultrafiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.* 140 (2015) 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.11.010>.
- [16] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 5848–5866. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005>.
- [17] Y. Wang, G. Zhao, G. Zhang, Y. Zhang, H. Wang, W. Cao, T. Li, Q. Wei, An electrochemical aptasensor based on gold-modified MoS<sub>2</sub>/rGO nanocomposite and gold-palladium-modified Fe-MOFs for sensitive detection of lead ions, *Sensors Actuators, B Chem.* 319 (2020) 128313. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128313>.
- [18] W. Zhang, Q. Du, Z. Dou, S. Ning, Q. Wang, Y. Dong, Z. Yue, W. Ye, G. Liu, Ultrasensitive detection of lead (II) ion by dark-field spectroscopy and glutathione modified gold nanoparticles, *Sensors Actuators, B Chem.* 321 (2020) 128548. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128548>.
- [19] B. Özbek, K.Ö. Ülgen, The stability of enzymes after sonication, *Process Biochem.* 35 (2000) 1037–1043. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00141-2).
- [20] M.H. Dehghani, Effectiveness of Ultrasound on the Destruction of *E. coli*, *Am. J.*

- Environ. Sci. 1 (2005) 187–189. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2005.187.189>.
- [21] P. Foladori, B. Laura, A. Gianni, Z. Giuliano, Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-Fecal indicators, wastewater and activated sludge, *Water Res.* 41 (2007) 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.021>.
- [22] E.M. Fykse, J.S. Olsen, G. Skogan, Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR, *J. Microbiol. Methods.* 55 (2003) 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00091-5).
- [23] A. Attar, A. Amine, F. Achi, S.B. Bacha, M. Bourouina, L. Cubillana-Aguilera, J.M. Palacios-Santander, A. Baraket, A. Errachid, A novel amperometric inhibition biosensor based on HRP and gold sononanoparticles immobilised onto Sonogel-Carbon electrode for the determination of sulphides, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 96 (2016) 515–529. <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1172216>.
- [24] F. Achi, M. Bourouina, A. Amine, Ac ce p te d us cr ip t, *Sensors Actuators B. Chem.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.10.033>.
- [25] S. Tariyal, A. Majumdar, R. Singh, M. Vatsa, Deep Dictionary Learning, *IEEE Access.* 4 (2016) 10096–10109. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2016.2611583>.
- [26] E. Bulard, M.P. Fontaine-Aupart, H. Dubost, W. Zheng, M.N. Bellon-Fontaine, J.M. Herry, B. Bourguignon, Competition of bovine serum albumin adsorption and bacterial adhesion onto surface-grafted ODT: In situ study by vibrational SFG and fluorescence confocal microscopy, *Langmuir.* 28 (2012) 17001–17010. <https://doi.org/10.1021/la302976u>.
- [27] D. Fang, G. Gao, J. Shen, Y. Yu, J. Zhi, A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped *E. coli* and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity assessment, *Electrochim. Acta.* 222 (2016) 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.10.174>.
- [28] P.T. Wingfield, Preparation of soluble proteins from *Escherichia coli*, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2014 (2014) 6.2.1-6.2.22. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0602s78>.
- [29] F. Cortés-Salazar, S. Beggah, J.R. van der Meer, H.H. Girault, Electrochemical As(III) whole-cell based biochip sensor, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.011>.
- [30] M. Dali, K. Zinoubi, A. Chrouda, S. Abderrahmane, S. Cherrad, N. Jaffrezic-Renault, A biosensor based on fungal soil biomass for electrochemical detection of lead (II) and cadmium (II) by differential pulse anodic stripping voltammetry, *J. Electroanal. Chem.*

- 813 (2018) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.009>.
- [31] L.G. Djemmoe, E. Njanja, F.M.M. Tchieno, D.T. Ndinteh, P.G. Ndungu, I.K. Tonle, Activated *Hordeum vulgare* L. dust as carbon paste electrode modifier for the sensitive electrochemical detection of Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> ions, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 100 (2020) 1429–1445. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1655004>.
- [32] E.L. Sciuto, S. Petralia, J.R. van der Meer, S. Conoci, Miniaturized electrochemical biosensor based on whole-cell for heavy metal ions detection in water, *Biotechnol. Bioeng.* 118 (2021) 1456–1465. <https://doi.org/10.1002/bit.27646>.
- [33] X. Han, C. Li, D. Yong, Microbial electrode sensor for heavy-metal ions, *Sensors Mater.* 31 (2019) 4103–4111. <https://doi.org/10.18494/SAM.2019.2645>.
- [34] S. Mitra, T. Purkait, K. Pramanik, T.K. Maiti, R.S. Dey, Three-dimensional graphene for electrochemical detection of Cadmium in *Klebsiella michiganensis* to study the influence of Cadmium uptake in rice plant, *Mater. Sci. Eng. C.* 103 (2019) 109802. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109802>.
- [35] Y. Zhang, J. Wen, X. Chen, G. Huang, Y. Xu, Y. Yuan, J. Sun, G. Li, X. an Ning, X. Lu, Y. Wang, Inhibitory effect of cadmium(II) ion on anodic electrochemically active biofilms performance in bioelectrochemical systems, *Chemosphere.* 211 (2018) 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.169>.
- [36] C. Núñez, J.J. Triviño, V. Arancibia, A electrochemical biosensor for As(III) detection based on the catalytic activity of *Alcaligenes faecalis* immobilized on a gold nanoparticle–modified screen–printed carbon electrode, *Talanta.* 223 (2021) 121702. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121702>.

## Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons développé un nouveau biocapteur enzymatique pour la détection des polluants inorganiques dans un milieu aqueux en utilisant la bactérie *E.coli* comme une source des éléments de biorecognition.

A cet effet, nous avons mis la lumière sur les effets indésirables des métaux lourds sur la santé humaine, ainsi que les origines probables de ces contaminants. L'objectif principal est de préparer un outil analytique à base des enzymes en utilisant une source disponible et moins chère comme les bactéries. Par conséquent, la nouvelle approche proposée dans cette thèse consiste à exploiter la bactérie d'*E.coli* pour la préparation des instruments biocatalytiques pour la détection des polluants dans l'environnement comme les métaux lourds.

Les conditions expérimentales pour la préparation du biocapteur sont optimisées comme la nature de l'électrode utilisée, le pH du milieu et la vitesse de balayage. Pour les mesures électrochimiques, le pH optimisé est fixé à la valeur 5 tandis que la vitesse de balayage est maintenue à 100 mV/s.

Les résultats obtenus que ce soit pour les mesures d'impédance électrochimique ou les réponses de la voltamètres cycliques et/ou à ondes carrées, confirment tous la performance électrocatalytique du nanocomposite utilisée pour la fabrication du biocapteur proposé. En plus, la caractérisation physico-chimique montre l'efficacité du nanocomposite utilisé à base de nanotubes de carbone à paroi multiple combiné avec les nanoparticules d'Or et le polymère fluoré. La morphologie du nanocomposite MWCNTs-AuNPs-PVDF et les groupements fonctionnels sont caractérisés par la microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectroscopie infrarouge, respectivement.

Le biocapteur préparé offre une gamme de linéarité allant de 1 jusqu'à 80 µg/l pour la détermination des métaux lourds. Sa limite de détection est de 0.13 µg/l pour la détection des ions de plomb. Aussi, le capteur montre une bonne sélectivité envers la détection des métaux lourds.

Ce travail montre de la première fois, l'effet de l'inhibition des enzymes issus de la bactérie *E.coli* par les métaux lourds avec la détermination des constantes cinétiques de l'inhibition irréversible en utilisant l'approche de Ktitz-Wilson. Les mesures d'impédance montrent que la plateforme de détection est très conductrice même sous l'effet isolant d'*E.coli*. L'ajout de la protéine bovine sérum albumine (BSA) offre un microenvironnement favorable pour distribution homogène des enzymes issus de la bactérie *E.coli* en diminuant un peu la conductivité du nanocomposite. Le biocapteur à base de pt/MWCNTs-AuNPs-PVDF/*E.coli*\*-

BSA est très sensible ( $30,1 \mu\text{A/ppb.cm}^2$ ) avec une bonne stabilité et une reproductibilité fiable avec un écart type relatif égale à ( $\text{RSD} = 0,23\%$ ).

