



HAL
open science

Développement de micro(bio)capteurs électrochimiques en vue de leur intégration dans une plateforme microfluidique (Lab-On-Disc) pour le contrôle in situ de la qualité des eaux douces de surface

Camille Bene

► **To cite this version:**

Camille Bene. Développement de micro(bio)capteurs électrochimiques en vue de leur intégration dans une plateforme microfluidique (Lab-On-Disc) pour le contrôle in situ de la qualité des eaux douces de surface. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. UPS Toulouse - Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2023. Français. NNT : . tel-04499930

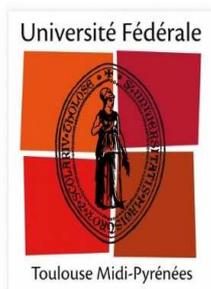
HAL Id: tel-04499930

<https://laas.hal.science/tel-04499930>

Submitted on 11 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Camille BENE

Le 15 décembre 2023

Développement de micro(bio)capteurs électrochimiques en vue de leur
intégration dans une plateforme microfluidique (Lab-On-Disc) pour le
contrôle *in situ* de la qualité des eaux douces de surface

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique, Télécommunications
et Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **MicroNano Systèmes**

Unité de recherche :

LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par

Jérôme LAUNAY et Pierre TEMPLE BOYER

Jury

Mme Anne-Claire SALAÛN, Rapporteur

M. Wojciech WRÓBLEWSKI, Rapporteur

Mme Marie-Louise TERCIER-WAEBER, Examinatrice

Mme Elisabeth LOJOU, Examinatrice

M. Arnaud ELGER, Président du jury

M. Jérôme LAUNAY, Directeur de thèse

M. Pierre TEMPLE-BOYER, Co-directeur de thèse

*« Le vrai succès consiste à atteindre notre potentiel
sans compromettre nos valeurs »*

Muhammad Ali

À ma Maman,

Remerciements

Je tiens, à travers ces quelques lignes, à exprimer ma plus profonde gratitude à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin, scientifiquement ou moralement, à la réalisation de ce projet.

Commençons par la fin, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ces travaux. **Wojciech Wroblewski** et **Anne-Claire Salaün** pour avoir pris le rôle de rapporteurs, **Arnaud Elger** pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse, ainsi que **Mary-Lou Tercier-Waeber** et **Elisabeth Lojou** en tant qu'examinatrices. Merci à tous pour les remarques pertinentes ainsi que les discussions enrichissantes qui s'en sont suivies.

Désormais je souhaite d'abord exprimer ma plus grande reconnaissance à mes directeurs de thèse **Jérôme Launay** et **Pierre Temple-Boyer** dont le soutien et l'accompagnement sans failles m'ont permis de réaliser avec succès le challenge scientifique qu'est la thèse. J'ai eu l'immense chance de former avec eux un trio professionnel de haute qualité. Merci à vous deux pour votre disponibilité, votre confiance et votre incroyable manière d'arriver à voir du positif dans toute chose. Je ne pensais pas le dire un jour mais je crois que nos réunions - discussions du vendredi soir à 18h vont me manquer...

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres du projet BELUGA avec qui ce fut un plaisir de travailler tout au long de ces trois ans. En particulier, je remercie **Claude Durrieu** et **Edwige Gautreau** pour m'avoir transmis l'art complexe qu'est la culture de microalgues ainsi qu'**Isabelle Séguy** et **Véronique Bardinal-Delagnes** pour m'avoir permis de participer à la partie optique du projet.

Enfin, merci à **Vincent Rimbault** pour toute son aide, sa disponibilité et sa rapidité, qui nous a permis de nous rapprocher au mieux de l'objectif final du projet. Je remercie également nos voisins du CIRIMAT, **Emmanuel Flahaut** et **Morgan Légnani** pour la fabrication des nanotubes de carbone.

J'ai eu la chance de réaliser mes travaux dans le grand laboratoire qu'est le LAAS. Je souhaite alors remercier l'ensemble de ses personnels techniques, sans qui la recherche avancerait sans doute beaucoup moins vite. **Adrian Laborde** grâce à qui j'ai appris l'art de déléguer mon travail de salle blanche, avec qui j'ai partagé la passion de l'azote liquide pour des expériences plus ou moins dangereuses, mais aussi avec qui j'ai beaucoup ri même lorsque j'étais sur les nerfs. Je remercie également **Benjamin Reig** pour les découpes de mes capteurs parfois complexes et les belles images MEB ainsi que **Samuel Charlot** pour le montage de centaines de composants. Côté carac, un immense merci à **Charline Blatché**, **Sandrine Assié-Souleille** et **Nicolas Mauran** pour leur aide et leur grande disponibilité,

à **Lionel Séguier** et **Julien Roul** pour la réalisation du banc optique rapide en toute fin de thèse, à **Bernard Franc** pour les logiciels, ainsi que tous ceux que je n'ai pas pu citer.

J'ai également rencontré des chercheurs et ingénieurs au LAAS qui, bien qu'ils n'aient pas participé scientifiquement à ce projet, ont contribué à tout le reste et grâce à qui mes années de thèse ont été enrichissantes sur pleins d'autres sujets. Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du conseil de laboratoire auquel j'ai siégé pendant presque trois ans, en particulier **Morgan Delarue** avec qui j'ai pu partager l'envie d'éveiller les consciences sur certains sujets (non sans mal), **Marido Cabanne**, **Anne Hemeryck**, **Hugues Granier** et **Laurent Mazenq** mais aussi l'équipe de direction **Liviu Nicu** puis **Mohamed Kaâniche**, **Pierre Lopez**, **Daniela Dragomirescu** (et encore **Pierre Temple-Boyer** bien évidemment) qui m'a fait confiance pour le conseil des doctorants et a su essayer de trouver des solutions à mes demandes. Équipe de direction à laquelle j'associe et n'oublie pas **Marie-Hélène Portet** que je remercie chaleureusement pour sa disponibilité et son aide extraordinaire tout au long du mandat. En parlant du conseil des doctorants, je remercie **Margot Gaetani-Liseo** pour nous avoir transmis ce rôle important et les clés pour le mener à bien mais aussi et surtout mon binôme **Olivia Peytral-Rieu** sans qui tout cela n'aurait pas été possible alors merci ma pote au rire communicatif pour tout ce qui a été fait et bon courage pour tout ce qu'il reste à faire. Bien que tu sois passée dans la cour des grands, je sais que tu n'oublieras pas d'où tu viens.

Côté permanents, j'ajoute également **Denis Arzelier** que je n'oublierai jamais pour son franc parler, ses mails hilarants, ses délicieux cocktails sans alcool lors des festivités mais surtout son côté Père-Noël grincheux.

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'équipe MICA et quelle équipe ! Parmi ceux que je n'ai pas encore cité **Philippe Menini** pour les cours de danses et les discussions jusque tard le soir en première année, **Thierry Camps** pour le côté rappel de formations pour l'école doctorale et les discussions parfois sans fin car il est l'encyclopédie de son domaine et de bien d'autres. **Aymen Sendi** (à qui j'associe la belle **Arij Cherif**) pour les conseils au cours de ma thèse bien que tu aies fini longtemps avant moi. Les stagiaires et en particulier ceux que j'ai eu l'occasion d'encadrer **Paulin Vacquié**, **Alexandre Cousin** et **Gauthier Sulce**.

Du côté des services je remercie bien évidemment le service logistique, **Eric Tasselli**, **Abdellaziz Elbeyad** et **Guillaume Tanneau** qui ont été contraints de me supporter pendant trois ans pour la réalisation du bureau de mes rêves (dont, il faut le reconnaître tout le monde était jaloux), pour mon harcèlement sur le chauffage en hiver et la clim en été, pour être venus retirer les araignées de mon bureau, me fournir un aquarium pour un peu de compagnie et pour tout le reste. D'autre part merci au binôme du service RCP **Alfreda Edoth** et **Dorian Walter**, peut-être rencontrés trop tard mais avec qui j'ai passé de superbes moments.

Que serait un laboratoire de recherche sans les doctorants ? J'ai fait la connaissance ici de personnes exceptionnelles qui ne seront peut-être plus jamais mes collègues de travail mais qui resteront pour toujours des amis. **Asma Eddarir** et **Elise Pierre**, deux personnes

tellement brillantes avec tant de valeurs et de générosité avec qui j'ai partagé probablement mes plus gros fous rires au laboratoire et surtout à l'extérieur, on se sait. **Ali Moscatiello** pour toutes ces promenades, m'avoir supporté de nombreuses heures en C211 quand j'avais décidé de déranger les gens qui essayaient de travailler et pour avoir finalement compris que je gagnerais toujours nos débats. **Benjamin Cerdan**, mon binôme des deux dernières années, je n'oublierai jamais ces dernières soirées de manips en C211 où l'on se demandait si le mieux ne serait pas d'arrêter... Finalement on a fini ensemble et on l'a fait notre feu de joie. **Maréva Calvet-Chautard**, mon associée en gossip et sache que je n'aurais pas trouvé mieux qu'une cantalou comme toi pour passer des heures à regarder l'amour est dans le pré au lieu de préparer ma soutenance et pour s'essayer à l'élevage de poussins... **Anne Calvel** et tes histoires interminables, qui n'écoute jamais mes conseils mais à qui je continuerai d'en donner si besoin. **Titouan Pineau**, l'enfant insupportable qu'on doit toujours ramener chez lui, qu'on est obligé de bannir de notre bureau pour ses propos, et qui triche aux jeux de sociétés mais qu'on apprécie quand même. **Eugénie Schütte**, un rayon de soleil partie trop tôt mais avec tellement de projets. **Valentin Saunier**, merci pour l'aide en électrochimie et notamment sur l'art de mélanger les polymères conducteurs aux matériaux carbonés. **Inès Muguet** pour le partage de la zone électrochimie (et la réalisation d'IrOx), toujours de bonne humeur.

Je n'oublie pas tous les autres que j'ai pu côtoyer au cours de mes années LAAS, doctorants, post-docs, ingénieurs, **Alexandra Rolland**, **Yegor Khozemyakin**, **Yuwei Li**, **Marco Boyer**, **Laura Maligne** et tous ceux que je n'ai pas pu citer.

Au passage je remercie **Minette**, le chat du LAAS, avec qui je pouvais rester longtemps dehors au lieu de travailler ainsi que mes trois poissons **Soop**, **Sensy** et **Silicium** qui m'ont tenu compagnie dans mon bureau pendant toute ma dernière année.

En dehors du LAAS, j'adresse également un remerciement sincère à mon professeur de master **Théo Tzedakis** sans qui je ne me serais peut-être jamais lancée dans l'aventure thèse. Merci d'avoir été là durant ces trois ans pour quelques discussions diverses mais toujours motivantes.

J'ai été très bien entourée dans le milieu professionnel, mais il n'en est pas moins de mon cercle personnel. Entre les deux, j'ai partagé mon bureau pendant trois ans avec une personne envers qui je souhaite exprimer mon amitié la plus profonde, **Sabah Zahaf**, qui a rempli pour moi pendant toutes ces années tous les rôles possibles et surtout grâce à qui j'ai compris que le lien de **sœurs** qui nous unit était éternel et immuable. De la L3 à la thèse notre complicité en a fait jalouser plus d'un et pourtant nous nous sommes toujours tirées vers le haut. Je t'ai déjà tout dit et tu sais ce que je pense, de simples mots ne suffiraient à décrire à combien je te suis reconnaissante mais quand même il est important de l'écrire alors, merci pour tout. Je n'oublierai jamais un seul instant de tous ceux que nous avons partagé et j'espère que nous aurons l'occasion d'en partager encore beaucoup dans les années à venir.

Dans le privé, je tiens également à remercier mon amie précieuse **Séverine Authier**, soutien au quotidien, qui connaissait les histoires du LAAS mieux que personne sans en faire partie et avec qui j'ai passé mes meilleures vacances aux quatre coins du monde au cours de ces dernières années. Je remercie également **Chloé Rascalou** ma jumelle sur à peu près tout, **Laurie Fancellu** mon amie au grand cœur sensible, **Anastasia Schliebach** ma beauté marseillaise et chef cuisto de qualité et **Yasmine Achour** la personne la plus vaillante et déterminée que je connaisse, pour tous les moments passés et pour l'incroyable team que nous formons. Sans vous, ces trois ans auraient été beaucoup moins drôles. Je souhaite également remercier **Carla De Marchi**, **Manon Girou** et **Amélie Dartigues** (sans oublier **Julien Garnier** et Naïa) qui sont là depuis de nombreuses années, mes amies de longue date **Amal Ait El Ghaz**, **Alycia Martin** et **Anaïs Auguste** et enfin mon amie d'enfance **Diana Pascal**.

Enfin, mon équilibre mental au cours de cette thèse est en grande partie due à ma pratique de la boxe alors je remercie chaleureusement le Toulouse Fight Club et ses membres pour m'avoir supporté quasiment tous les jours ces dernières années (et pour me supporter encore un nombre incalculable d'heures). En particulier mes coachs **David Dansoko** et **Rayan Daher** qui m'ont toujours encouragé et donné le goût du dépassement de soi.

Je remercie finalement ma famille **Khelifa-Mahdjoubi - El Bouroumi**, famille de cœur mais peu importe car les liens du sang ne définissent pas tout. **Mina** et **Kaddour**, mes deuxièmes parents à qui je dois énormément et ce depuis plus de 20 ans et tous mes frères **Kanaan**, **Adam** mon clown personnel toujours là pour moi et avec qui j'ai presque tout partagé, les jumeaux **Khamis** et **Jassem**, **Ismaël** notre champion et enfin ma petite sœur **Aliya** qui a grandi bien trop vite. Je n'oublie pas ma magnifique belle-sœur **Linda** et mes neveux **Diyana** et **Aylan**. Ils représentent ma définition du bonheur et du partage mais surtout des fous rires. Merci pour tout.

Bien évidemment je remercie mon **Papa**, qui m'a toujours poussé et accompagné dans les études et qui, je le sais, est et sera toujours fier de moi.

Et enfin, pour clore ces remerciements, je dédie ce manuscrit à ma **Maman**, partie trop tôt un soir de novembre 2015. J'aurais donné beaucoup pour pouvoir partager cette réussite avec toi, comme toutes les précédentes qui, à chaque fois, me laissent ce petit goût amer et me rappelle à combien tu me manques. Merci pour m'avoir laissée hériter de ta force de caractère et de m'avoir toujours appris à ne jamais abandonner.

Table des matières

Remerciements	7
Liste des abréviations	17
Introduction générale	19
1. Vers une plateforme multicateurs pour le contrôle in situ de la qualité de l'eau : État de l'art et problématique.....	23
I. Introduction	25
II. Les eaux de surfaces, des ressources précieuses.....	26
II. 1. Leur rôle et leur importance	26
II. 2. Les principaux polluants des eaux continentales	26
II. 3. Les réglementations autour de la qualité de l'eau.....	27
III. Le contrôle de la qualité des eaux	30
III. 1. Les méthodes classiques de laboratoire et leurs limites	31
III.1.1. Étapes préparatoires	31
III.1.1.i L'échantillonnage.....	31
III.1.1.ii Le stockage	32
III.1.1.iii Les prétraitements.....	33
III.1.2. Les analyses.....	33
III.1.2.i La spectrométrie électromagnétique atomique.....	33
III.1.2.ii La spectrométrie de masse.....	34
III.1.2.iii La spectrométrie de fluorescence X	34
III.1.2.iv La voltampérométrie à redissolution anodique.....	35
III.1.2.v La chromatographie.....	35
III. 2. Émergence de nouveaux systèmes pour un contrôle in situ.....	36
IV. Les objectifs de la thèse : le projet BELUGA	38
IV. 1. Une plateforme multicateurs comme système d'alarme.....	39
IV. 2. Intérêt de la mesure du pH	40
IV. 3. Intérêt de la détection des ions nitrates	42
IV. 4. Intérêt de la détection des pesticides et des métaux lourds.....	43
V. Conclusion	46
Bibliographie	48
2. Une microcellule électrochimique adaptable à différentes détections	53
I. Introduction	55
II. Les méthodes électrochimiques utilisées.....	56

II. 1. L'ampérométrie	56
II.1.1. La voltammétrie	57
II.1.1.i La voltammétrie linéaire.....	57
II.1.1.ii La voltammétrie cyclique	58
II.1.2. La chronoampérométrie.....	59
II.1.3. Cas particulier des microélectrodes	60
II.1.3.i Les ultramicroélectrodes (UME).....	60
II.1.3.ii Réseau d'ultramicroélectrodes	62
II. 2. La potentiométrie	63
II.2.1. La potentiométrie à courant nul.....	63
II.2.2. La chronopotentiométrie à courant constant.....	64
II. 3. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	65
III. « ElecCell » une cellule électrochimique miniaturisée	66
III. 1. Conception et géométrie	67
III. 2. Microfabrication	68
III.2.1. Préparation du substrat	68
III.2.1.i Nettoyage du substrat	68
III.2.1.i Oxydation du silicium	68
III.2.1. Formation des électrodes.....	68
III. 3. Différents packagings.....	72
III.3.1. Bâtonnets pour les pré-tests.....	72
III.3.2. Disques pour l'application finale	72
III. 4. Validation du microcapteur	74
III.4.1. L'électrode de travail (UMEA)	74
III.4.2. La contre-électrode.....	77
III.4.3. L'électrode de quasi-référence	78
IV. Conclusion	80
Bibliographie	81
3. Microcapteurs potentiométriques pour la mesure du pH et des ions nitrates	83
I. Introduction sur les capteurs potentiométriques	85
I. 1. Les électrodes spécifiques métalliques	85
I.1.1. Électrode de première espèce	85
I.1.2. Électrode de seconde espèce.....	85
I.1.3. Électrode de troisième espèce ou électrode inerte	86
I. 2. Les électrodes spécifiques à membranes	86
I.2.1. Les ISE à membranes polymérique conventionnelle	87
I.2.1.i Composition de la membrane ionosensible	87
I.2.1.ii Principe de la mesure potentiométrique.....	89
I.2.2. Les ISE à membrane polymérique « tout solide »	90
I.2.2.i Transduction ion-électron : polymères conducteurs	91
I.2.2.ii Transduction ion-électron : matériaux carbonés.....	92

II. La mesure du pH	93
II. 1. État de l'art sur les capteurs de pH.....	93
II.1.1. Les oxydes métalliques	93
II.1.2. L'oxyde d'Iridium IrO ₂	95
II. 3. Fonctionnalisation de l'UMEA : IrO ₂	96
II.3.1. Protocole de dépôt.....	96
II.3.2. Caractérisation du dépôt	97
II.3.2.i Microscopie.....	97
II.3.2.ii Voltammétrie cyclique.....	98
II. 4. Mesure du pH et performances du capteur	99
II.4.1. Sensibilité, stabilité et temps de réponse.....	99
II.4.2. Hystérésis	100
II.4.3. Dérive à long terme	102
II.5 Conclusion sur la détection du pH.....	102
III. La mesure des ions nitrates	103
III. 1. État de l'art sur les capteurs d'ions nitrates	103
III.1.1. Les capteurs ampérométriques	104
III.1.2. Les capteurs potentiométriques.....	104
III. 2. Fonctionnalisation de l'UMEA : membrane nitrato-sensible.....	105
III.2.1. Fabrication de la membrane	105
III.2.2. Dépôt de la membrane	106
III. 3. Ajout d'une couche de transduction	107
III.3.2. Préparation de la solution et électrodéposition	107
III.3.2.i PEDOT:PSS	107
III.3.2.ii PEDOT:DWCNT	108
III.3.2.iii PPy:DWCNT.....	108
III.3.3. Caractérisation des dépôts	108
III.3.3.i Microscopie	108
III.3.3.ii Spectroscopie d'impédance électrochimique	110
III. 4. Mesure des ions nitrates et performances des capteurs.....	111
III.4.1. Sensibilité, stabilité et temps de réponse.....	111
III.4.2. Sélectivité.....	113
III.4.3. Dérive à long terme et durée de vie	115
III.4.4. Hystérésis	117
III.5. Conclusion sur la détection des ions nitrates.....	117
IV. Conclusion	118
Bibliographie	119
4. Microbiocapteur à algues pour la détection des herbicides et des métaux lourds.....	125
I. Introduction	127
II. Des algues comme sonde ?	128

II. 1. Le métabolisme algal	128
II.1.1. La photosynthèse.....	128
II.1.1.i <i>La phase claire</i>	128
II.1.1.ii <i>La phase sombre</i>	130
II.1.2. La respiration	131
II. 2. L'effet des polluants sur ce métabolisme.....	132
II.2.1. Généralités.....	132
II.2.2. L'oxygène dissous comme indicateur	134
II.2.3. La fluorescence comme indicateur complémentaire	135
II.2.4. Les polluants choisis et leur mode d'action	136
II.2.4.i <i>Les herbicides</i>	136
II.2.4.ii <i>Les métaux lourds (ETM)</i>	138
II. 3. La microalgue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CR)	139
II.3.1. Généralités.....	139
II.3.2. Culture	140
III. La détection électrochimique.....	142
III. 1. Fonctionnalisation de l'UMEA (Pt-BI).....	142
III.1.1. Electrodepôt	142
III.1.2. Caractérisation du dépôt.....	143
III.1.2.i <i>Voltammétrie cyclique</i>	143
III.1.2.ii <i>Microscopie</i>	144
III. 2. Détection de l'oxygène consommé et produit par les algues.....	145
III. 3. Détection des herbicides	146
III.3.1. Diuron et Atrazine	147
III.3.1.i <i>Méthode de mesure</i>	147
III.3.1.ii <i>Résultats obtenus en macrovolume</i>	148
III.3.1.iii <i>Résultats obtenus en microvolume</i>	149
III.3.2. Glyphosate et S-métolachlore.....	150
III.3.2.i <i>Méthode de mesure</i>	150
III.3.2.ii <i>Résultats</i>	151
III. 4. La détection des métaux lourds (ETM).....	153
III. 5. Premiers tests en eau réelle	154
IV. La détection optique.....	155
IV. 1. Le montage et les composants utilisés	156
IV.1.1. La source d'excitation lumineuse	156
IV.1.1.i <i>La LED commerciale</i>	157
IV.1.1.ii <i>L'OLED et la MOLED du projet BELUGA</i>	157
IV.1.2. Le disque microfluidique	159
IV.1.3. La photodétecteur	160
IV.1.3.i <i>La photodiode silicium commerciale</i>	160
IV.1.3.ii <i>L'OPD du projet BELUGA</i>	160
IV.1.4. Les filtres	161
IV.1.4.i <i>Le filtre d'excitation</i>	162
IV.1.4.ii <i>Le filtre d'émission</i>	162

IV.1.5. Les différents montages utilisés.....	162
IV. 2. Premiers tests de détection d’herbicides.....	163
IV.2.1. Comparaison des différents montages	164
<i>IV.2.1.i Protocole de mesure.....</i>	<i>164</i>
<i>IV.2.1.i Comparaison PD Si et OPD.....</i>	<i>165</i>
<i>IV.2.1.ii Le Diuron comme polluant modèle</i>	<i>166</i>
IV.2.2. Étude des différents herbicides choisis	167
V. Conclusion	169
Bibliographie	171
Conclusion générale	175
Perspectives.....	178
Annexes	181
Table des figures.....	183
Table des tableaux.....	187
Résumé	189
Abstract.....	190

Liste des abréviations

AAS : Spectrométrie d'absorption atomique
Ag : Argent
AgCl : Chlorure d'argent
AES : Spectrométrie d'émission atomique
CVD : Dépôt chimique en phase vapeur
CCVD : Dépôt chimique catalytique en phase vapeur
Cd²⁺ : Ion cadmium
CO₂ : Dioxyde de carbone
CR : Chlamydomonas Reinhardtii
Cu²⁺ : Ion cuivre
CWE : Électrode fil enrobée
DCE : Directive cadre sur l'eau
DWCNT : Nanotubes de carbone à double paroi
ECS : Électrode au calomel saturé
ED : Dispersion en énergie
EDI : Eau désionisée
EDOT : Éthylènedioxythiophène
ETM : Éléments traces métalliques
FIB : Sonde ionique focalisée
FcMeOH : Ferroceneméthanol
FIM : Méthode à interférence fixe
FPSX : Fluoropolysiloxane
Hg : Mercure
Hg₂Cl₂ : Chlorure de mercure
H₃O⁺ : Ion hydronium
H₂SO₄ : Acide sulfurique
H⁺ : Proton
ICP : Plasma à couplage inductif
ICP-CVD : Dépôt chimique en phase vapeur avec plasma à couplage inductif
IrO_x - IrO₂ : Oxyde d'iridium
ISE : Électrode sélective d'ions
ISFET : Transistor à effet de champ sélectif d'ions
KCl : Chlorure de potassium
KNO₃ : Nitrate de potassium
KTFPB : Tetraphénylborate de potassium
LED : Diode électroluminescente
LOD : Laboratoire sur disque

MEB : Microscope électronique à balayage
MOLED : Diode électroluminescente organique à micro-cavité
MS : Spectrométrie de masse
NO₃⁻ : Ion nitrate
OCV : Potentiel en circuit ouvert
OLED : Diode électroluminescente organique
OPD : Photodiode organique
O₂ : Dioxygène
PAOT : Plan d'action opérationnel territorialisé
PCB : Circuit imprimé
PDM : Programme de mesures
PD Si : Photodiode silicium
PEDOT : Polyéthylènedioxythiophène
pH : Potentiel hydrogène
PMMA : Poly méthacrylate de méthyle acrylique
PRCE : Projet de recherche collaborative - entreprise
PSS : Polystyrène sulfonate
PSI : Photosystème I
PSII : Photosystème II
Pt : Platine
Pt-Bl : Noir de platine
PVC : Polychlorure de vinyle
PVD : Dépôt physique en phase vapeur
PPy : Polypyrrole
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SDAGE : Schéma directeur de gestion et d'aménagement de l'eau
SIE : Spectroscopie d'impédance électrochimique
SiO₂ : Oxyde de silicium
Si₃N₄ : Nitrure de silicium
TDDAN : Tetradodécylammonium nitrate
Ti : Titane
UME : Ultramicroélectrode
UMEA : Réseau d'ultramicroélectrodes
UV : Ultraviolet
WD : Dispersion en longueurs d'onde
XRF : Spectrométrie de fluorescence à rayons X

Introduction générale

« *L'eau est la source de toute vie et sa qualité reflète la santé de notre planète.* » - Jacques-Yves Cousteau

Ces paroles empreintes de vérité résonnent à travers les âges, rappelant l'importance vitale de l'eau et son lien inextricable avec la survie du monde. De l'Antiquité à l'ère industrielle, l'humanité a toujours convergé vers les rivières et les lacs pour leur vitalité et leur essence purificatrice. Cette fascination pour l'eau, fluide élémentaire de la vie, a défini des civilisations entières et a inspiré des explorations infatigables dans les profondeurs océaniques. Depuis les premiers récits historiques, les eaux douces ont été vénérées pour leur rôle nourricier et leur capacité à soutenir la vie. Des sociétés antiques qui établissaient des colonies le long des fleuves fertiles aux grandes villes portuaires prospérant grâce au commerce maritime, les cours d'eau ont été les artères vitales d'un monde en évolution constante. Au Moyen Âge, l'eau a irrigué les terres agricoles et a été un moteur essentiel de l'essor industriel naissant. Ces connexions entre l'homme et l'eau ont ainsi jeté les bases de la compréhension actuelle de l'importance cruciale des ressources hydriques.

Cependant, au fil du temps, les récits d'adulation ont cédé la place à des récits d'inquiétude. Les avancées industrielles et technologiques ont apporté prospérité et confort, mais ont également engendré des déversements toxiques et des pollutions insidieuses. Les mêmes eaux qui ont servi de voie de commerce et de lien culturel sont devenues le réceptacle des déchets de la modernité. La pollution, la dégradation des écosystèmes aquatiques et le dérèglement climatique ont des impacts tangibles et dévastateurs. Ils ont alors transformé l'eau en un reflet fragile de l'état de la planète.

Au cœur de cette réalité inquiétante se trouve alors un paradoxe captivant. Les avancées technologiques sont en partie responsables de la pollution actuelle de l'eau mais sont pourtant désormais aussi l'un des principaux espoirs pour restaurer sa pureté. Aujourd'hui, à l'aube d'une nouvelle ère scientifique, l'humain se tourne à nouveau vers l'eau, mais cette fois-ci avec une conscience aiguë des défis auxquels elle fait face. Des efforts considérables ont ainsi été déployés pour surveiller, évaluer et améliorer la qualité de l'eau. Des scientifiques, ingénieurs et chercheurs du monde entier s'efforcent de développer des outils avancés de surveillance et de protection de sa qualité.

L'Humanité est née avec un héritage de capteurs innés, les sens, qui incarnent une interface fondamentale avec l'environnement et constituent des facultés sensorielles naturelles. Ces capteurs naturels et innés sont indiscutablement précieux et constituent le socle initial de l'homme et des instruments primordiaux pour appréhender le monde. Toutefois, à mesure que l'ère contemporaine progresse, de nouvelles problématiques émergent et transcendent les capacités de la palette sensorielle naturelle humaine.

C'est ici que les capteurs artificiels, élaborés par l'Homme pour étendre ses facultés sensorielles, trouvent leur place. Ils sont électroniques, optiques, chimiques ou encore mécaniques et constituent des extensions des sens innés de l'être humain. Ainsi, ils permettent de sonder les profondeurs inaccessibles, de mesurer l'infiniment petit ou encore de détecter l'incroyablement rapide. Beaucoup utilisés à des fins environnementales, ils constituent les sentinelles surveillant pour l'homme la qualité de l'eau qu'il boit ou de l'air qu'il respire et révélant les subtilités des écosystèmes fragiles.

Les capteurs, bien que souvent associés aux technologies modernes, ont une histoire qui remonte à l'Antiquité. Les premiers capteurs étaient rudimentaires, conçus pour répondre à des besoins simples de détection et de mesure. Par exemple, les thermoscopes, des dispositifs primitifs pour la mesure de la température, étaient utilisés en Chine dès le III^e siècle avant cette ère. Ils se composaient de tiges de verres remplies d'eau et d'air, et les variations de température provoquaient des mouvements de liquide. L'essor de la science et de la technologie au cours de la Renaissance a marqué le début d'une période d'innovations dans le domaine des capteurs. Les scientifiques et les inventeurs ont commencé à développer des dispositifs plus sophistiqués pour mesurer diverses grandeurs physiques telles que la pression, la lumière, le son ou l'électricité. C'est à cette époque en 1644, que Galilée crée le premier baromètre pour mesurer la pression atmosphérique. Cependant, le véritable tournant dans l'histoire des capteurs est survenu à l'aube de XX^e siècle avec le développement de la technologie électronique. L'invention du transistor en 1947 par John Bardeen, Water Brattain et William Shockley a ouvert la voie à une nouvelle ère de capteurs électroniques. Les transistors ont permis la création de capteurs plus sensibles, plus rapides, plus polyvalents et capables de convertir diverses grandeurs physiques en signaux électriques mesurables. Enfin, l'essor de l'ère du numérique dans les années 1970 a été le catalyseur d'une révolution dans le domaine des capteurs. Ils ont commencé à être miniaturisés, devenant plus compacts et plus accessibles. L'avènement des semi-conducteurs a donné naissance à une pléthore de capteurs. Aujourd'hui, ils continuent d'évoluer rapidement avec des avancées dans la miniaturisation, la communication sans fil, l'intelligence etc. Ils jouent ainsi un rôle crucial dans la vie quotidienne, de la surveillance de l'environnement à la médecine de précision, en passant par l'automatisation industrielle.

Au sein de l'arsenal des capteurs, les capteurs électrochimiques se distinguent par leur aptitude à disséquer la composition complexe d'un échantillon. Ils fonctionnent en exploitant les réactions électrochimiques pour détecter et mesurer les espèces chimiques en phase liquide. Optimisés, ils sont capables d'offrir une mesure rapide et fiable des caractéristiques chimiques de l'eau fournissant ainsi des informations cruciales pour l'évaluation de sa qualité.

Facilement miniaturisables, ces capteurs permettent alors d'effectuer les analyses directement à l'endroit où l'eau est prélevée et, dans le domaine de la surveillance de la qualité de l'eau, l'importance des mesures sur site ne saurait être sous-estimée. Elle offre des avantages inestimables pour la préservation et la gestion de cette ressource essentielle. Alors que

les méthodes conventionnelles de laboratoires nécessitent un transport de l'échantillon pouvant le modifier ou l'altérer, les mesures sur site permettent l'obtention de données immédiates. Cela peut par ailleurs être particulièrement crucial dans des situations d'urgence telles que des déversements chimiques accidentels ou des contaminations microbiennes.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent l'ensemble de ces travaux de thèse. Depuis de nombreuses années, l'équipe de recherche MICA (pour MICRo-systèmes d'Analyse) développe des matériaux et des capteurs dédiés à l'analyse environnementale (en phase liquide ou en phase gazeuse). Pour l'analyse en phase liquide, des capteurs de type transistors (ISFET) ainsi que de type microcellules électrochimiques (ElecCell) ont pu être développés pour diverses applications.

Cette thèse se focalise ainsi sur le développement d'un microcapteur électrochimique (microcellule à trois électrodes) fonctionnalisé pour la détection de plusieurs espèces chimiques dans le but de donner plusieurs informations concernant la qualité de l'eau douce de surface. Ce capteur sera intégrable dans une plateforme de type laboratoire sur disque (Lab-On-Disc) qui, associé à un appareil de mesure électrochimique portable, permettra de rendre possible les mesures directement sur site.

L'évaluation des performances d'un capteur électrochimique est un processus rigoureux qui prend en compte plusieurs paramètres essentiels : la sensibilité, la stabilité, la sélectivité, le temps de réponse ou encore la durée de vie. D'autre part, dans le domaine de la surveillance de la qualité de l'eau, les normes gouvernementales imposent des règles extrêmement strictes en termes de performances quant aux méthodes utilisées pour quantifier les polluants. L'objectif principal de cette thèse est donc de développer un système de mesures portable utilisé comme moyen d'alerte précoce via des mesures sur sites. Les capteurs électrochimiques et bioélectrochimiques intégrés développés sur technologie silicium sont ainsi peu coûteux et peuvent être produits en masse sous forme de capteurs à usage unique, permettant ainsi de moins se soucier de leur durée de vie, point bloquant pour bon nombre de capteurs environnementaux.

Ainsi, ce manuscrit se décompose en quatre chapitres principaux.

Le premier chapitre est subdivisé en trois grandes parties. Il présente tout d'abord les eaux douces de surfaces, des ressources précieuses qu'il est aujourd'hui essentiel de préserver notamment en contrôlant leur qualité. Cette partie rappelle les principaux polluants de ces dernières ainsi que les réglementations gouvernementales nationales et internationales qui y sont liées. La seconde partie est dédiée à un état de l'art - non exhaustif - à la fois des méthodes actuelles de laboratoires utilisés pour cette surveillance ainsi que leur limite et des nouveaux systèmes développés pour un contrôle in situ. Enfin, la troisième et dernière partie se consacre au positionnement du projet dans lequel s'inscrivent les travaux de cette thèse en en précisant les objectifs.

Le second chapitre se consacre au développement du microcapteur électrochimique adaptable aux différentes détections. Dans un premier temps, l'ensemble des méthodes électrochimiques utilisées au cours de ces travaux et leurs principes sont rappelés. Ensuite, le procédé de microfabrication y est développé, étape par étape, et les différentes méthodes de conditionnement de ces capteurs sont présentées. Les électrodes du capteur sont par la suite caractérisées par différentes méthodes afin de s'assurer de leur bon fonctionnement de manière à valider le microdispositif initial.

Le troisième chapitre s'intéresse à la mesure du pH ainsi qu'à la détection des nitrates. Le capteur pH est fonctionnalisé à base d'un oxyde métallique, l'oxyde d'iridium IrO_x , tandis que le capteur d'ions nitrates NO_3^- est fonctionnalisé à base d'une membrane polymérique ionosensible mais ces deux types de détection fonctionnent sur le même principe : la détection potentiométrique. La fonctionnalisation de chacun des capteurs y est présentée ainsi que leurs performances respectives.

Le quatrième est dernier chapitre s'intéresse au développement d'un biocapteur électrochimique à algues. Les microalgues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii*) sont ici utilisées comme sondes. Organismes photosynthétiques dont le métabolisme peut être très sensible à divers polluants, en particulier les herbicides et les métaux lourds ou éléments traces métalliques (ETM), elles seront mélangées à l'échantillon d'eau à analyser. Par la suite en suivant leur taux de consommation et/ou leur production d'oxygène par électrochimie et étant donné que bon nombre de polluants sont capables de les inhiber, il est possible de déterminer d'éventuelles pollutions du milieu. Ainsi la fonctionnalisation de ce capteur par du noir de platine pour augmenter la surface active et le courant de détection y est présentée, suivi d'études menées pour quatre herbicides (Diuron, Atrazine, Glyphosate et S-Metolachlore) ainsi que trois métaux lourds (Cuivre, Cadmium et Mercure).

En parallèle, l'influence des polluants sur ce métabolisme algal peut entraîner des variations de fluorescence. Des premiers tests ont alors été menés avec les partenaire du projet en charge de la détection de fluorescence. Les montages utilisés ainsi que les résultats obtenus sont donc présentés en toute fin de ce chapitre.

Enfin, ce manuscrit sera clôturé par une conclusion générale sur l'ensemble des travaux réalisés ainsi que sur les perspectives potentielles d'amélioration pour de futurs travaux concernant la mise en œuvre de systèmes de détection sur site.

CHAPITRE 1

Vers une plateforme multicateurs pour le contrôle *in situ* de la qualité de l'eau : État de l'art et problématique

Sommaire

- I. Introduction
- II. Les eaux de surfaces, des ressources précieuses
 - II. 1. Leur rôle et leur importance
 - II. 2. Les principaux polluants des eaux continentales
 - II. 3. Les réglementations autour de la qualité de l'eau
- III. Le contrôle de la qualité des eaux
 - III. 1. Les méthodes classiques de laboratoire et leurs limites
 - II.1.1. Les étapes préparatoires
 - II.1.2. Les analyses
 - III. 2. Émergence de nouveaux systèmes pour un contrôle *in situ*
- IV. Les objectifs de la thèse : le projet BELUGA
 - IV. 1. Une plateforme multicateurs comme système d'alarme
 - IV. 2. Intérêt de la mesure du pH
 - IV. 3. Intérêt de la détection des ions nitrates
 - IV. 4. Intérêt de la détection des pesticides et des métaux lourds
- V. Conclusion

I. Introduction

La Terre est recouverte à 70% d'eau, ce qui lui vaut son nom de « Planète Bleue ». Depuis son apparition sur Terre il y a 3 milliards d'années, l'eau opère un circuit fermé (fig. 1.1). En suivant un cycle naturel, elle circule en permanence sur la planète sous ses différentes formes : liquide, solide (neige, grêle, ...) et gazeuse (vapeur d'eau).

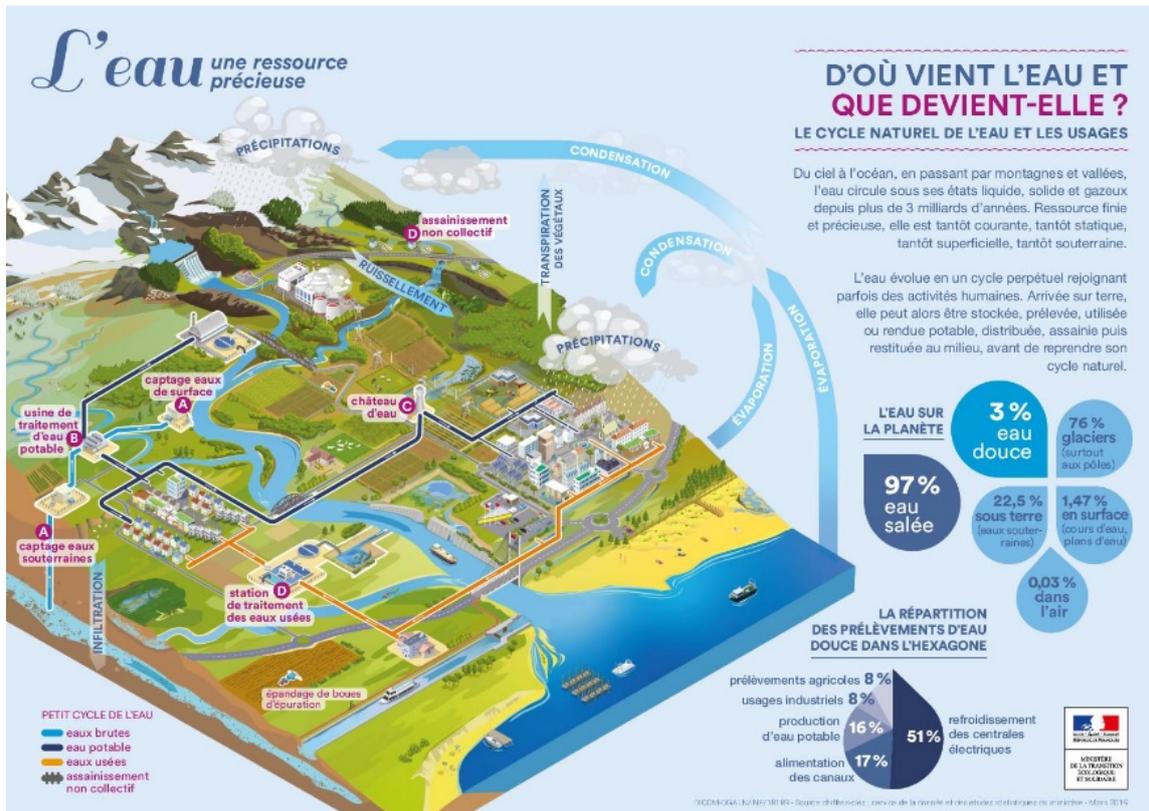


Figure 1.1 : Le cycle naturel de l'eau et ses usages [1]

Le volume total de l'hydrosphère, c'est-à-dire l'ensemble des réserves d'eau sur Terre, est estimé à $1,4 \times 10^{21}$ litres, et est contenu à 97% dans les mers et les océans sous forme d'eau salée.

L'eau douce représente quant à elle seulement 3% des eaux dont deux tiers sont souterraines ou gelées dans les glaciers, ainsi seulement 1% de l'eau est réellement disponible en surface. Le dessalement de l'eau de mer étant un procédé technologique complexe et onéreux, l'eau douce reste actuellement la seule ressource exploitable et utilisable par l'homme.

La consommation humaine mondiale d'eau s'élève à 24 millions de milliards de litres (24×10^{15} litres) et englobe l'eau de pluie utilisée pour les cultures et les pâturages, l'eau pompée, en profondeur dans les nappes phréatiques et en surface dans les fleuves et rivières, utilisée pour l'agriculture, l'industrie, la production d'énergie et l'eau potable ou potabilisée pour la consommation humaine.

Ce chapitre présente l'intérêt du contrôle de la qualité des eaux douces de surface ainsi que les principaux facteurs de pollution de celles-ci. Ensuite, il fait état des technologies actuelles pour ce contrôle et de l'enjeu autour du développement de systèmes adaptés aux mesures *in situ*. Enfin, le projet dans lequel s'inscrivent ces travaux est présenté.

II. Les eaux de surfaces, des ressources précieuses

II. 1. Leur rôle et leur importance

L'eau douce est indispensable à la vie. Tous les êtres vivants en ont besoin pour exister. L'être humain en est constitué à près de 60%. Elle régule la température du corps, favorise l'élimination des déchets et toxines et apporte les nutriments essentiels. Mais elle est également indispensable à l'environnement car c'est elle qui soutient les écosystèmes et régule le climat.

Les eaux douces de surface ou eaux douces continentales regroupent l'ensemble des masses d'eau douce courantes ou stagnantes contenues dans les cours d'eau (rivières, fleuves, canaux...) et les plans d'eau (lacs, étangs, réservoirs, ...). En France, 33,5 % de l'eau potable provient d'une eau de surface (les 66,5% restant proviennent d'une eau souterraine) [2].

Comme énoncé précédemment, ces eaux douces superficielles constituent seulement une petite partie de l'eau totale et sont pourtant la seule ressource exploitable facilement. Ainsi, au-delà des traitements et des contrôles de l'eau délivrée au robinet, il est indispensable d'avoir une meilleure protection des ressources naturelles utilisées pour la produire afin d'en garantir durablement la qualité. De ce fait, des actions préventives et curatives sont mises en place aux échelles européennes et nationales pour protéger ces ressources.

II. 2. Les principaux polluants des eaux continentales

La qualité des milieux aquatiques est caractérisée selon plusieurs paramètres qui sont physiques, chimiques et biologiques. Beaucoup de ces paramètres sont suivis notamment pour répondre à des obligations réglementaires ou pour améliorer la connaissance de l'état des milieux. Aujourd'hui en France, 3000 paramètres chimiques (suivi de la concentration en composés chimiques), 400 paramètres physiques (suivi de la température, turbidité et caractéristiques des matières en suspensions et sédiments) et 10 paramètres biologiques (composition et abondance de certaines espèces animales et végétales) sont suivis [3].

Les principaux polluants des eaux continentales sont variés. Néanmoins, la principale source de dégradation des eaux de surfaces et des eaux souterraines reste la pollution chimique qui se classe en quatre principales catégories :

- Les **nutriments azotés ou phosphorés** qui favorisent le développement d'algues dans les milieux, les appauvrissent en oxygène dissous et perturbent les équilibres

- biologiques. Ils sont d'origine agricole, industrielle ou urbaine et proviennent principalement de l'utilisation d'engrais minéraux, de rejets industriels ou domestiques.
- Les **pesticides** qui peuvent avoir des effets toxiques aigus ou chroniques autant sur les écosystèmes que sur l'Homme. Ils proviennent de produits utilisés en agriculture (herbicides, insecticides ou fongicides) et de produits industriels ou ménagers (peintures, désinfectants, ...)
 - Les **métaux** (plomb, cadmium, cuivre, ...) et leurs composés ionisés dont la dangerosité est variable selon leur nature. S'ils sont parfois d'origine naturelle, ils peuvent également provenir de rejets industriels, agricoles ou urbains.
 - D'autres **composés organiques et inorganiques** tels que les hydrocarbures aromatiques, les solvants chlorés ou encore les médicaments qui proviennent également de rejets d'industries ou d'activité de service.

Parmi ces paramètres, il est possible de distinguer les « micropolluants » qui ont des effets indésirables à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre, et les « macropolluants » qui eux agissent à des concentrations plus importantes.

II. 3. Les réglementations autour de la qualité de l'eau

Face aux enjeux sanitaires et environnementaux liés à la pollution de l'eau, les communautés nationales et internationales mettent en place des réglementations et des mesures visant à réduire les rejets de polluants dans les milieux aquatiques. Ainsi, la gestion durable de l'eau repose sur de nombreux textes internationaux, européens et nationaux (fig. 1.2).

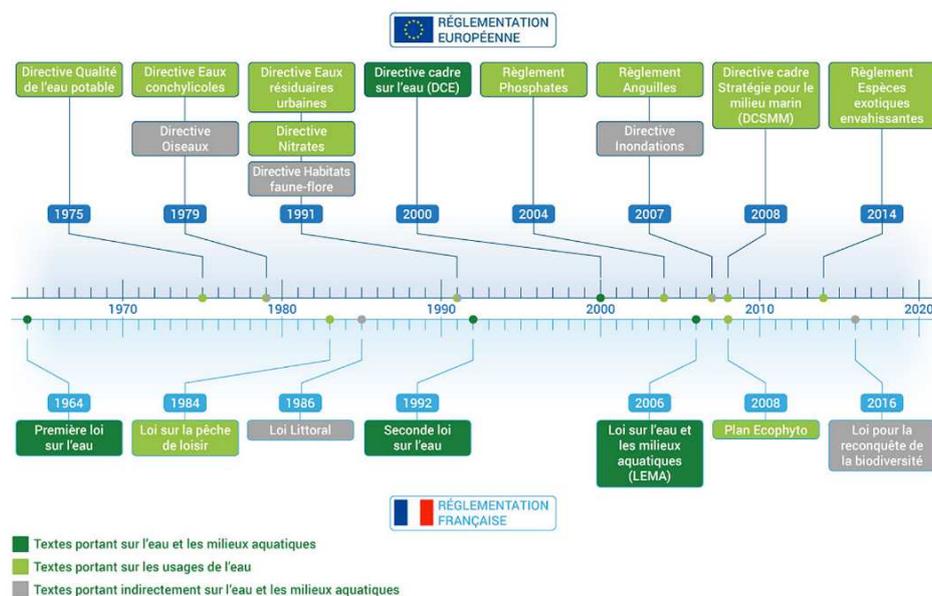


Figure 1.2 : Chronologie des réglementations européennes et françaises autour de l'eau, de ses usages et des milieux aquatiques [4]

La politique publique française est encadrée par la **directive cadre européenne sur l'eau** (DCE) [5] datant d'octobre 2000. Cette directive poursuit plusieurs objectifs à savoir : *(i)* la non-dégradation des ressources et des milieux, *(ii)* le bon état des masses d'eau, *(iii)* la réduction des pollutions liées aux substances, *(iv)* le respect de normes dans les zones protégées. Elle impose alors le suivi des milieux aquatiques sur le long terme, notamment pour évaluer les conséquences des modifications des conditions naturelles (changement climatique) et des activités anthropiques.

En France, les premiers textes concernant cette politique de l'eau datent des années soixante. Aujourd'hui, elle est structurée par quatre grandes lois :

- **La loi de 1964** [6], première loi concernant la protection des eaux, qui pose la gestion de l'eau par le principe de grands bassins versants. Avec cette loi sont également créées des instances publiques appelées les « Agences de l'Eau » en charge de la gestion des bassins hydrographiques.

- **La loi de 1992** [7], avec laquelle l'eau est désormais considérée comme patrimoine national. Elle planifie la création de schémas directeurs d'aménagement et de gestion de l'eau (SDAGE) de sorte à structurer les décisions administratives dans le domaine de l'eau pour chaque bassin et ainsi obtenir une gestion équilibrée des ressources en eau.

- **La loi de 2004** [8] qui transpose en droit français la DCE et donc poursuit les mêmes objectifs d'atteinte du bon état des eaux. Elle détermine alors un plan de gestion à partir de ces objectifs et des SDAGE, et met en œuvre des mesures adaptées.

- **La loi de 2006** [9] qui a pour ambition l'amélioration des conditions d'accès à l'eau pour tous, la transparence au fonctionnement du service public de l'eau et la rénovation de l'organisation de la pêche en eau douce. Elle prend par ailleurs en compte l'adaptation au changement climatique dans la gestion des ressources en eau. Enfin, elle apporte des outils complémentaires pour l'atteinte des objectifs poursuivis par la DCE.

La directive cadre sur l'eau a alors établi une liste de substances dites prioritaires qui doivent être surveillées dans les eaux superficielles et souterraines. Cette liste est mise à jour régulièrement et le nombre de substances répertoriées est passé de 33 en 2000 à 45 en 2013 (tab. 1.1).

De pair sont définies les normes de qualité environnementales (NQE) pour ces substances de sorte à chiffrer la « concentration maximale admissible » (CMA) de chaque polluant, soit la concentration qui ne doit pas être dépassée afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Parmi les polluants concernés, sont retrouvés des pesticides, des métaux lourds et leurs dérivés, des médicaments, ou encore des hydrocarbures.

Substances dangereuses prioritaires (SDP)	<ul style="list-style-type: none"> - Anthracène - Diphényléthers bromés - Cadmium et ses composés - Chloroalcanes - DEHP - Endosulfan - Hexachlorobenzène - Hexachlorobutadiène - Hexachlorocyclohexane - Mercure et ses composés - Nonylphénols 	<ul style="list-style-type: none"> - Pentachlorobenzène - HAP - Composés du tributylétain - Trifluraline - Dicofol - Acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés - Quinoxylène - Dioxines et ses composés - HBCDD - Heptachlore
Substances prioritaires (SP)	<ul style="list-style-type: none"> - Alachlore - Atrazine - Benzène - Chlorfenviphos - Chlorpyrifos - Dichloroéthane - Dichlorométhane - Diuron - Fluoranthène - Isoproturon - Plomb et ses composés - Naphtalène 	<ul style="list-style-type: none"> - Nickel et ses composés - Octylphénols - Pentalchlorophénol - Simazine - Trichlorobenzène - Trichlorométhane - Aclonifène - Bifénox - Cybutryne - Cyperméthrine - Dichlorvos - Terbutryne

Tableau 1.1 : Substances prioritaires définies par la DCE (2013/39/UE)

La DCE prévoit initialement trois cycles (2004-2015), (2016-2021) et (2022-2027) fixant ainsi une atteinte des objectifs environnementaux au plus tard en 2027. Elle définit une méthode de travail commune aux 27 états membres. Ainsi, en France, chaque cycle est construit de la même manière avec : un état des lieux, la mise en place de programmes de surveillance ainsi que par la suite la définition des objectifs des SDAGE et des programmes de mesures (PDM) associés (fig. 1.3). Leur mise en place est assurée au travers de plans d’actions opérationnels territorialisés (PAOT).

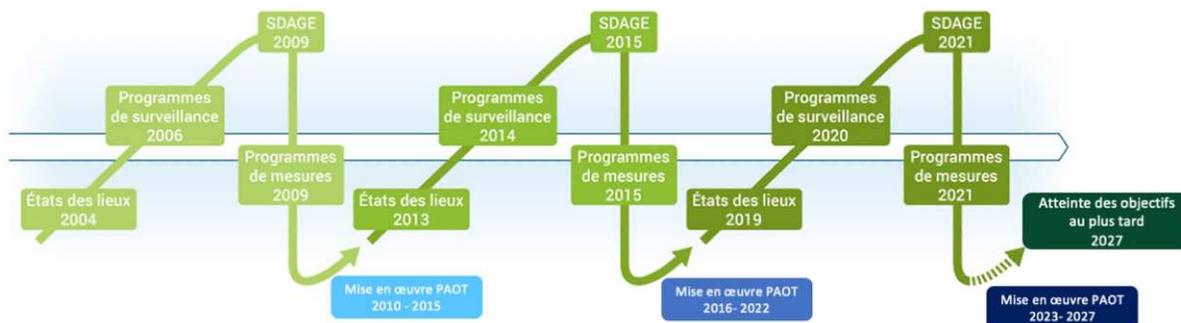


Figure 1.3 : Schéma représentatif des cycles pour la mise en place de la DCE (adapté de [4])

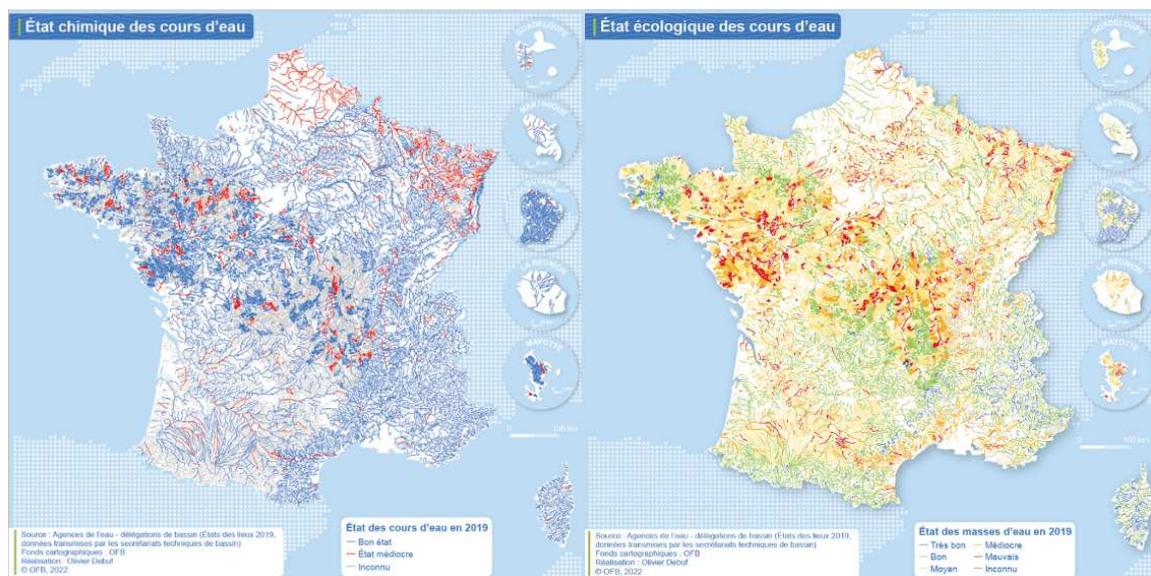
Finalement, c'est dans ce contexte de politiques de plus en plus restrictives que le suivi de la qualité de l'eau présente une importance essentielle.

A titre d'information, en 2015 en France, l'état chimique et l'état écologique des cours d'eau du territoire ont été évalués (fig. 1.4a et 1.4b).

Concernant l'état chimique, pour lequel sont mesurées les concentrations de certains polluants prédéfinis en fonction des normes de qualité environnementales, les résultats obtenus indiquent que 62% des cours d'eau étaient en bon état, 16,2% en état médiocre et les 21,8% restants étaient en état « indéterminé » par manque d'information et de mesures.

Concernant l'état écologique, pour lequel sont mesurés l'abondance de certaines espèces (faune et flore), des paramètres physico-chimiques (température, pH, oxygène dissous, nutriments), ainsi que des paramètres hydromorphologiques, les résultats ont montré que 44,8% étaient en bon état, 39,2% en état moyen, 15,9% en état médiocre ou mauvais, et seulement 0,1% en état indéterminé.

Ces résultats soulignent alors une plus importante difficulté à mesurer l'état chimique des eaux de surface en comparaison à l'état écologique. Cela provient essentiellement du fait que la mesure de l'état chimique et notamment de bons nombres de substances, imposent le respect de méthodes strictes et complexes.



III. Le contrôle de la qualité des eaux

A la suite des réglementations mises en place, il a fallu décider des moyens et méthodes adaptées au contrôle de la qualité de l'eau. Ce sont ces analyses qui vont entraîner la mise en place d'actions, souvent onéreuses, pour remédier à la dégradation des masses d'eau concernées. Ainsi il est primordial qu'elles soient fiables et précises.

III. 1. Les méthodes classiques de laboratoire et leurs limites

Comme énoncé précédemment, ce sont les méthodes d'analyses utilisées qui conditionnent directement la qualité et la fiabilité des données obtenues. Les méthodes d'analyses en laboratoire sont les plus utilisées car elles permettent, notamment grâce à l'utilisation d'appareils fiables et très sensibles mais aussi onéreux, d'obtenir des résultats très précis et d'atteindre des limites de détection très basses. Elles permettent donc de mesurer des polluants à l'état de traces. Les méthodes d'analyses utilisées doivent pouvoir atteindre les limites de détection et respecter les normes (NF, ISO) fixées par l'arrêté du 11 janvier 2019 [11]. Chaque matrice ou substance à contrôler doit avoir un protocole adapté. En effet, aucun protocole et aucune méthode d'analyse ne convient à tous les composés à analyser. Ainsi, chaque laboratoire choisit et valide ses méthodes de sorte à répondre aux exigences fixées.

En France, l'arrêté du 27 octobre 2011 met alors en vigueur un agrément des laboratoires qui permet d'encadrer ces analyses qu'elles soient physico-chimiques, chimiques, hydrobiologiques ou écotoxicologiques. L'agrément est délivré par le ministère chargé de l'environnement et sa durée de validité ne peut excéder 5 ans. Aujourd'hui, 167 laboratoires disposent de cet agrément [12].

Cependant, il est important de noter que ces méthodes de laboratoire nécessitent différentes étapes avant l'obtention des résultats, étapes pouvant être cruciales pour que les analyses ne soient pas faussées.

III.1.1. Étapes préparatoires

III.1.1.i L'échantillonnage

Les méthodes d'analyses en laboratoires nécessitent une première étape d'échantillonnage [13]. En plus d'être de qualité, il doit être suffisamment représentatif de la masse d'eau à analyser.

La plupart du temps, il s'agit d'un **échantillonnage ponctuel** car les prélèvements sont effectués de manière espacée dans le temps. L'eau est un lieu d'échanges complexes. Il faut donc respecter des règles strictes de conditionnement, conservation, stockage et transport de l'échantillon dès le terrain et jusqu'au laboratoire afin de limiter sa possible évolution et d'obtenir des résultats significatifs.

Ainsi, au moment de l'échantillonnage, de nombreux paramètres sont à déterminer tels que la date et l'heure du prélèvement, sa fréquence, sa position exacte (position géographique de la masse d'eau considérée mais également position exacte du prélèvement dans cette masse d'eau), sa profondeur, ainsi que les éventuels facteurs environnementaux (ensoleillement, évènement pluvieux, température...).

Par ailleurs, il est également essentiel de prendre des précautions concernant les outils utilisés, les matériaux de flaconnage doivent être adaptés. Enfin, prélever un échantillon d'eau et le séparer de son milieu naturel peut entraîner des modifications de ce dernier plus ou moins importantes. De ce fait, il est nécessaire d'adapter le transport et le conditionnement jusqu'au laboratoire.

Une autre méthode d'échantillonnage appelé **échantillonnage passif** existe. Dans ce cas, un outil nommé « échantillonneur » est placé dans la masse d'eau à analyser sur une période de temps pouvant varier de quelques jours à quelques mois. Cet outil est constitué d'une membrane sur laquelle vont s'accumuler les composés contaminants. Une fois la période d'échantillonnage atteinte, l'outil est envoyé au laboratoire de sorte à extraire les composés de cette membrane et pouvoir effectuer les analyses. Bien qu'il soit possible que les composés se dégradent au cours de leur stockage dans l'échantillonneur, cette méthode présente l'avantage de pouvoir intégrer les éventuels pics de contamination contrairement à l'échantillonnage ponctuel [14,15].

Comme le montre le schéma de la fig. 1.5, l'échantillonnage passif présente un avantage important dans le cas de fréquence de mesures faibles (mensuelles ou bimensuelles). Afin de rivaliser avec ce type d'échantillonnage, l'échantillonnage ponctuel doit être effectué à des fréquences beaucoup plus élevées (hebdomadaire voire journalière) afin d'avoir une représentativité correcte de l'état de la masse d'eau.

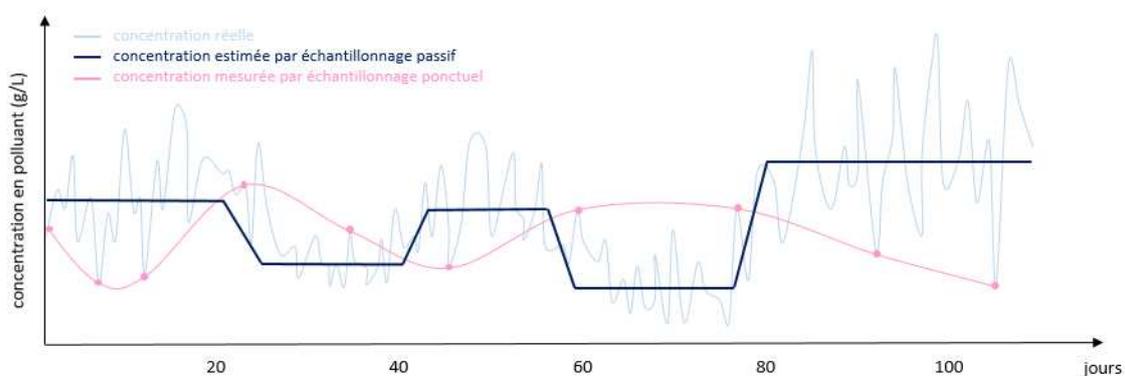


Figure 1.5 : Évolution de la concentration en polluant par différents types d'échantillonnage

III.1.1.ii Le stockage

En fonction du type de composés à analyser, certains échantillons devront être analysés immédiatement à leur arrivée au laboratoire. D'autres, quant à eux, pourront être stockés selon certaines conditions. Durant le stockage, de nombreuses réactions chimiques (oxydation, hydrolyse, photolyse, précipitations et co-précipitations, volatilisations ou encore

adsorption) peuvent avoir lieu et ainsi entraîner des pertes ou des transformations de certaines substances d'intérêts. Il est alors essentiel d'éviter un maximum à ces réactions d'avoir lieu.

La plupart du temps, une simple réfrigération et un stockage de l'échantillon à l'abri de la lumière permettent de préserver suffisamment l'échantillon, dans l'idéal une congélation à une température inférieure à -20°C favorise une durée de conservation plus longue.

Dans d'autres cas, une filtration peut être envisagée afin d'éliminer les matières en suspension ou les microorganismes et ainsi prolonger la conservation de l'échantillon. Néanmoins cette filtration n'est pas applicable si les composés recherchés sont susceptibles d'être adsorbés sur les éventuelles matières en suspensions, ce qui est souvent le cas.

III.1.1.iii Les prétraitements

Une fois prélevés, les échantillons avant d'être analysés doivent le plus souvent subir des prétraitements adaptés aux méthodes utilisées [16]. En effet, en l'absence de traitement, il est possible que certains composés s'adsorbent sur des particules en suspensions ou même sur les parois du contenant, ce qui peut alors poser problème lors de mesures quantitatives devant être précises et fiables. Ainsi, filtration, centrifugation, concentration, minéralisation ou encore homogénéisation font souvent partie intégrante du processus d'analyse. Parfois, il est aussi nécessaire d'ajouter des produits chimiques, une étape complexe qui doit se faire sans prendre le risque d'altérer l'échantillon. Ces étapes de prétraitement, des plus simples aux plus complexes, ajoutent un délai supplémentaire à l'analyse.

Toutes ces étapes préparatoires sont primordiales car elles conditionnent la pertinence des analyses. Elles ne doivent en aucun cas être négligées car elles sont aujourd'hui responsables de la majorité des erreurs analytiques.

III.1.2. Les analyses

Il existe un grand nombre de techniques d'analyses effectuées en laboratoire. Ces techniques disposent, comme les laboratoires, d'un agrément. Elles doivent être suffisamment sensibles de sorte à présenter des limites de détection des éléments cibles compatibles aux normes en vigueur. Les plus utilisées sont des techniques de spectrométrie couplée ou non en amont à une technique chromatographique permettant la spéciation des différentes formes d'un élément cible avant leur détection. Les principales sont résumées dans les paragraphes qui suivent [17].

III.1.2.i La spectrométrie électromagnétique atomique

Les techniques de spectrométrie atomique regroupent à la fois la spectrométrie d'absorption et la spectrométrie d'émission. Lorsqu'une énergie est fournie à un atome, ses électrons passent sur des niveaux d'énergie plus élevés. Après excitation, l'atome revient à son

état fondamental, des photons sont émis. C'est sur ces deux phénomènes que sont basés respectivement la spectrométrie d'absorption et d'émission atomique.

La **spectrométrie d'absorption atomique (AAS)** est utilisée essentiellement pour déterminer la concentration en éléments métalliques ou métalloïdes dans un échantillon. Elle consiste à mesurer la quantité de lumière (UV-visible) absorbée par élément. Pour pouvoir absorber la lumière, l'échantillon liquide doit être transformé à l'état d'atomes libre. Pour cela, une flamme ou un four est utilisé de sorte à atomiser l'échantillon. Chaque élément absorbant à une longueur d'onde précise, il est alors possible, en mesurant la quantité de lumière absorbée à la longueur d'onde définie, de connaître la concentration en élément cible. L'énergie lumineuse est fournie par une source appelée lampe à cathode creuse. Il existe des centaines de lampes à cathodes creuses dont l'émission est adaptée à un type d'élément à détecter. [18]

La **spectrométrie d'émission atomique (AES)**, souvent avec plasma à couplage inductif (ICP-AES) comme source d'excitation, consiste à exciter l'atome d'un élément cible qui va alors, lors de son retour à l'état fondamental, émettre de la lumière. L'intensité de lumière émise à une longueur d'onde caractéristique de l'élément cible est mesurée et est directement liée à la concentration de celui-ci dans l'échantillon. Cette méthode permet alors d'éviter l'utilisation de lampes adaptées à chaque élément.

III.1.2.ii La spectrométrie de masse

La **spectrométrie de masse (MS)** souvent avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une méthode qui consiste à ioniser un échantillon à l'aide d'une source plasma. Le plasma résultant est analysé et chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge (m/z). L'appareil utilisé est capable de les séparer et de les caractériser. Cette méthode permet la quantification de métaux et non-métaux dans des gammes de concentrations très faibles.

III.1.2.iii La spectrométrie de fluorescence X

La **spectrométrie de fluorescence des rayons X (XRF)** consiste à exciter les éléments de l'échantillon avec des rayons X à partir de tubes. Du fait de leur énergie importante, les rayons X émis vont arracher des électrons proches du noyau de ce dernier et donc provoquer son ionisation. L'atome ionisé va alors se réorganiser afin d'atteindre un état dit « moins instable » en venant combler les lacunes proches du noyau avec des électrons issus de ses couches plus externes. Ce transfert d'électrons s'accompagne d'une libération d'énergie sous la forme de photons X. Il s'agit du phénomène de fluorescence. Ces photons X émis sont caractéristiques des atomes constitutifs de l'échantillon. Par analyse de ce rayonnement, il est alors possible de connaître les atomes constitutifs de l'échantillon ainsi que leur concentration massique. Il existe deux principaux moyens d'analyse de ce rayonnement qui sont les

spectromètres à dispersion en longueur d'onde (WD-XRF) et les spectromètres à dispersion en énergie (ED-XRF).

III.1.2.iv La voltampérométrie à redissolution anodique

La **voltampérométrie à redissolution anodique (ASV)** est une méthode électrochimique initialement utilisée pour la détection de certains métaux à l'état de traces. Le processus consiste à venir réduire un métal (capable de former un amalgame) sur une électrode de mercure, puis de laisser s'homogénéiser la concentration du métal au niveau de la goutte pour enfin appliquer un balayage de potentiel entraînant la réoxydation de l'amalgame formé tout en mesurant le courant résultant. Ce courant est alors proportionnel à la concentration du métal initialement amalgamé et donc représentatif de la concentration de ce métal dans l'échantillon initial. Cette méthode permet de doser des quantités plus faibles d'élément cible, cependant elle repose sur l'utilisation d'électrode de mercure et ne sont pour la plupart pas agréées. Néanmoins, des études sont menées afin d'adapter cette méthode à des matériaux d'électrodes plus respectueux de l'environnement tels que le bismuth [19].

III.1.2.v La chromatographie

Ces méthodes sont souvent couplées à des méthodes de chromatographie comme étape de préparation des échantillons. La **chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)** est la plus utilisée. Elle consiste à faire passer l'échantillon (« phase mobile ») au sein d'une colonne dans laquelle un matériau de remplissage appelé « phase stationnaire » dont la composition va permettre de retenir plus ou moins longtemps certains composés en fonction de leurs interactions. Ainsi, en sortie de colonne, il sera possible de repérer les composants séparément et ainsi de faciliter les détections par spectrométrie. Souvent utilisée avec un détecteur type spectromètre UV-visible, IR ou de fluorescence, elle peut aussi être associée à un spectromètre atomique, un spectromètre de masse ou encore un détecteur électrochimique.

Les caractéristiques de ces différentes méthodes d'analyse de l'eau sont finalement résumées au sein du tableau 1.2

	AAS	ICP-AES	ICP-MS	EDXRF	ASV
Coût du matériel (k€)	25 - 40	60 - 90	185 - 275	135	7 - 25
Limite de détection (µg/L)	0,1	0,1 - 1	0,001	1 - 5	0,1
Durée d'analyse	Longue	Moyenne	Longue	Moyenne	Très rapide
Gamme d'analytes	Restreinte	Large	Très large	Large	Très restreinte
Sélectivité	Mono-élémen- taire	Multi-élémen- taire	Multi-élémen- taire	Multi-élémen- taire	Mono/Multi-élé- mentaire
Préparation de l'échantillon	Simple	Simple	Complexe	Complexe	Très simple
Niveau de compétence requis pour l'opérateur	Moyen	Faible	Haut	Haut	Moyen

Tableau 1.2 : Récapitulatif des caractéristiques des principales méthodes d'analyses de l'eau en laboratoire (informations issues de [20])

III. 2. Émergence de nouveaux systèmes pour un contrôle *in situ*

Certains paramètres varient très rapidement et peuvent entraîner l'obtention de résultats non significatifs, c'est le cas de la température, du pH, de la conductivité, des gaz dissous mais également des nitrates et des sulfates. Il est pourtant indispensable que ces variations soient donc les plus faibles possibles et c'est la raison pour laquelle se développent de plus en plus de méthodes d'analyse dites *in situ* afin de s'affranchir de cet éventuel problème. En plus des réglementations demandant de plus en plus de surveillance, il apparaît chaque année de nouvelles substances polluantes dites émergentes qu'il faudrait contrôler tels que les antibiotiques, les médicaments ou d'autres composés issus des eaux usées.

Il paraît alors important voire essentiel de développer des méthodes alternatives complémentaires aux méthodes classiques d'analyse de laboratoire.

La mesure *in situ* permettrait alors de mesurer au plus près de la réalité du terrain en limitant les artefacts liés au prélèvement et à la manipulation des échantillons environnementaux mais également de démultiplier le nombre de mesures. Cela permettrait alors de détecter plus facilement des événements polluants épisodiques et donc de gérer encore mieux la surveillance des milieux. De plus, en développant un maximum les performances des outils de détection *in situ*, cela permettrait de réduire le nombre d'échantillons envoyés pour analyse en laboratoire et donc le coût de la surveillance en serait amoindri. Enfin, ce type de mesures permettrait également d'optimiser la connaissance des milieux.

Il existe aujourd'hui différents types d'analyseurs capables d'effectuer de la détection sur site. Ils sont basés sur différents principes à savoir chimiques, optiques, électrochimiques ou encore biologiques. Ces méthodes permettent alors de fournir des informations qualitatives mais également quantitatives sur certains paramètres des eaux considérées.

Ces analyseurs sont divisés en trois types : in situ, en ligne et hors ligne (fig. 1.6) [21–23].

- **Analyseurs in situ** : un capteur est directement immergé dans l'eau et récolte les données de manière automatique (avec ou sans transmission à distance). Ils sont souvent associés à des méthodes électrochimiques [24].
- **Analyseurs en ligne** : un analyseur est placé sur le bord de la masse d'eau à analyser, l'échantillon est prélevé avec une pompe en continu. Ils sont souvent associés à des méthodes optiques [25,26].
- **Analyseurs hors ligne** : un système portable est placé sur le bord de la masse d'eau et un prélèvement d'échantillon est réalisé par l'utilisateur puis analysé instantanément. Ils sont compatibles avec toutes les méthodes de transduction : chimiques, optiques, électrochimiques ou biologiques [27,28].

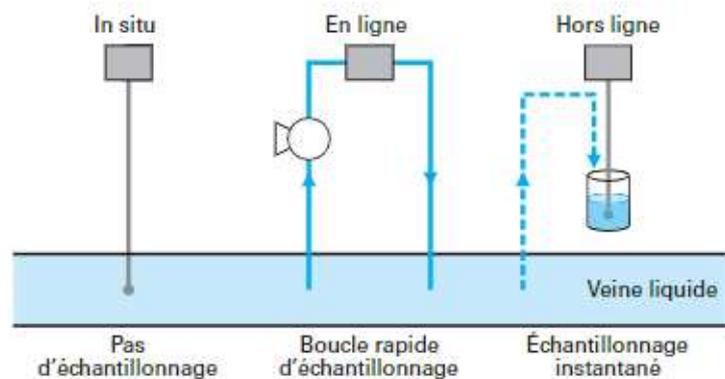


Figure 1.6 : Différents types d'analyseurs in situ [21]

Ces nouvelles méthodes permettant l'analyse rapide et directement sur site sont en cours de développement mais leur utilisation est limitée du fait des réglementations très strictes imposées à l'échelle nationale et internationale pour le contrôle et la surveillance de la qualité des eaux. En effet, les méthodes de laboratoires utilisées depuis plusieurs décennies ont été reconnues fiables, robustes et très performantes, si bien qu'elles sont normalisées (AFNOR pour la France, CEN pour l'Europe ou encore ISO à l'international) et sont les seules à pouvoir être utilisées dans le cadre réglementaire.

Aucune des méthodes de mesures *in situ* ne dispose encore d'un tel agrément pour agir dans ce cadre. Cela est principalement dû au fait qu'elles ne produisent pas de résultats comparables aux méthodes classiques en termes de qualité et de fiabilité.

Pourtant, elles n'ont pas vocation à remplacer les méthodes de laboratoire mais plutôt à agir comme complément puisqu'elles sont capables de fournir des données plus rapidement et à des fréquences plus élevées.

Le principal verrou de ces méthodes est qu'elles sont le plus souvent beaucoup moins sensibles que les méthodes conventionnelles. Dans le cas des eaux usées, il se peut que les concentrations en polluants (organiques ou inorganiques) soient suffisantes pour être détectées par de telles méthodes. En revanche, ce n'est plus forcément vrai dans le cas des eaux naturelles où les concentrations en polluants spécifiques sont souvent de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ au ng/L (proches du seuil réglementaire). Il est donc essentiel d'optimiser ces méthodes afin de les rendre plus sensibles. Néanmoins, il n'est pas rare de retrouver des pics de pollution plus importants suivant les zones d'analyses (proche d'anciens sites miniers, d'industries ou de zones agricoles).

IV. Les objectifs de la thèse : le projet BELUGA

Le projet ANR BELUGA (ANR-18-CE04-0007) dans lequel ces travaux de thèse s'inscrivent est un projet PRCE dans lequel collaborent quatre laboratoires et une entreprise que sont :

- Le LAAS-CNRS (Laboratoire d'Analyses et Architecture des Systèmes) en charge du développement de microcapteurs électrochimiques et de sources lumineuses organiques
- Le CINaM (Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille) en charge du développement de photodétecteurs organiques
- L'INL (Institut des Nanotechnologies de Lyon) en charge du développement de disques microfluidiques
- Le LEHNA (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels Anthropisés) en charge de l'étude des interactions algues/polluants
- La société Origalys Electrochem SAS en charge de l'intégration du dispositif et la mise en œuvre du prototype final

L'objectif du projet est de développer un laboratoire sur disque (LOD pour « *Lab-On-Disc* » en anglais) pour la surveillance *in situ* de la qualité des eaux de surface par biocapteurs à algues et capteurs physico-chimiques optiques et électrochimiques.

IV. 1. Une plateforme multicateurs comme système d'alarme

Comme mentionné précédemment la surveillance des écosystèmes aquatiques est une préoccupation environnementale majeure. Au vu des problématiques posées par les techniques conventionnelles conduisant à un manque de résultats en temps réel afin de promouvoir une réponse proactive à la contamination des eaux, l'idée est de développer un système portable à bas coût constituant un système d'alerte précoce fiable et robuste et ne nécessitant aucune infrastructure autre. Ainsi, il sera possible de démultiplier le nombre de mesures, le nombre de lieux de prélèvements et d'aider à l'orientation vers des mesures complémentaires en laboratoire.

Le laboratoire sur disques développé consistera en une plateforme microfluidique architecturée en un empilement de disques (fig. 1.7a). Chaque disque intégrera une partie des éléments nécessaires aux types de détections prévues. Il a ainsi été décidé dans le cadre du projet de développer le LOD de sorte à être capable de mesurer le pH, la conductivité, la turbidité mais également de détecter la quantité d'ions nitrates, certains pesticides voire des métaux lourds. Pour cela, des moyens électrochimiques et optiques sont utilisés. L'architecture prévue est donc un empilement de disques tel que :

- un disque contenant des sources lumineuses qui seront des diodes électroluminescentes organiques (OLED pour « *Organic Light-Emitting Diode* » en anglais) utiles à l'excitation pour certaines détections optiques et électrochimiques photo-initiées (cf. IV.4),
- un disque contenant les capteurs électrochimiques ainsi qu'un réseau de canaux microfluidiques permettant l'amenée et l'éventuel mélange des échantillons mais également des cuves adaptées,
- un dernier disque contenant les photo-détecteurs organiques (OPD pour « *Organic Photo-Detector* » en anglais) adaptés aux mesures optiques,
- éventuellement un disque contenant des filtres optiques adaptés si nécessaire,

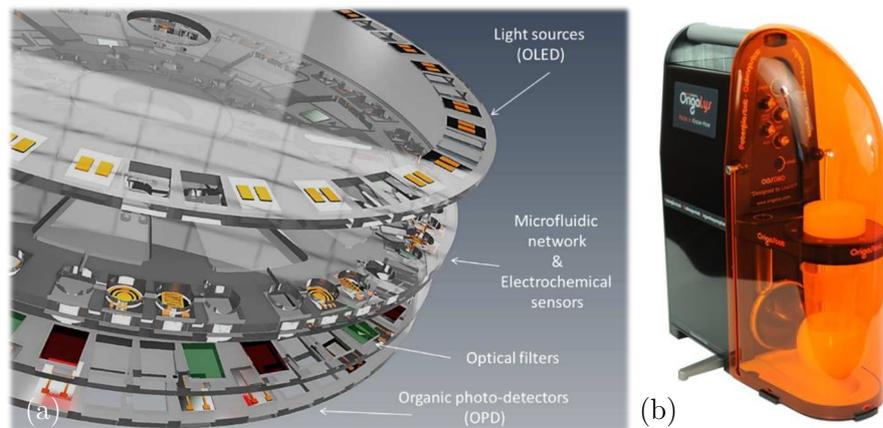


Figure 1.7 : (a) Schéma de l'architecture du Lab-On-Disc du projet BELUGA et (b) photographie du potentiostat portable Origastat

Ce LOD est prévu pour être pluggable sur un potentiostat portable (fig. 1.7b) produit par la société Origalys rendant possible les mesures électrochimiques et optiques sur site. L'architecture sous forme de disques permettra la mise en rotation et ainsi l'amenée des fluides vers les cuves ainsi que les mélanges et les éventuelles centrifugations d'algues si nécessaire.

Les travaux de thèse se focalisent sur le développement des capteurs électrochimiques et bio-électrochimiques du projet pour la mesure du pH, la détection des ions nitrates et la détection de certains pesticides voire de métaux lourds. Concernant la détection des pesticides, les mesures optiques sont menées conjointement aux mesures électrochimiques de manière à obtenir des résultats complémentaires.

IV. 2. Intérêt de la mesure du pH

Le pH d'une eau traduit son acidité ($\text{pH} < 7$) ou sa basicité ($\text{pH} > 7$). Il est un paramètre important lors du contrôle de sa qualité. Les activités anthropiques peuvent générer d'importants changements de pH en eau douce que ce soit dans les lacs, les étangs, les rivières ou encore les fleuves. Les recommandations mondiales, européennes et françaises indiquent que le pH en eau douce doit idéalement être compris entre 6,5 et 9 [11,29,30].

Cependant, deux phénomènes, résultant souvent des activités humaines peuvent entraîner des effets néfastes sur les écosystèmes présents : l'acidification (diminution importante du pH) [31] et l'alcalinisation (augmentation importante du pH) [32]. En effet, au-delà des risques pour la santé humaine, un pH trop faible ou trop important entraîne une dangerosité pour les êtres vivants présents (fig. 1.8).

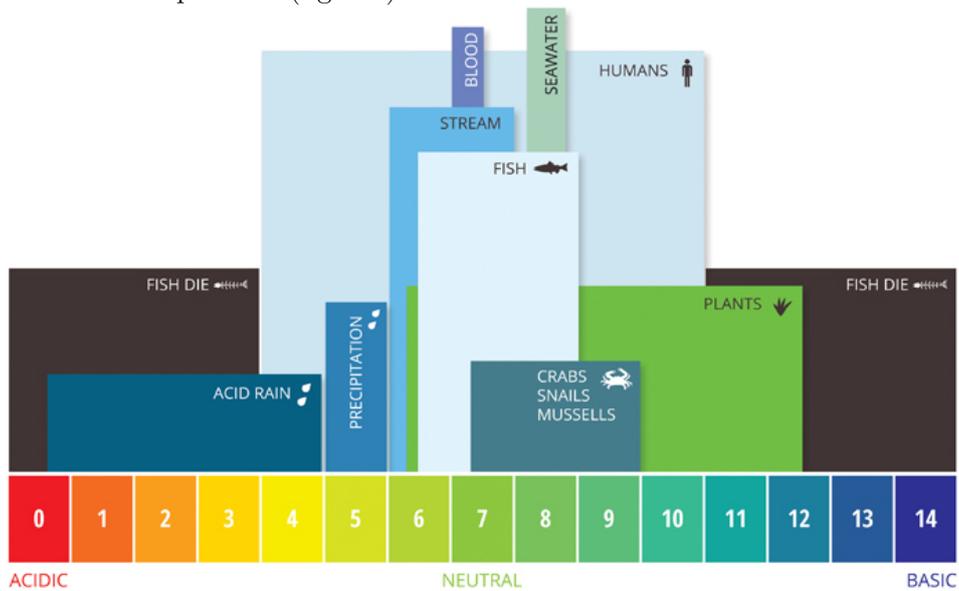


Figure 1.8 : Echelle de pH [33]

A titre d'illustration, le lac Natron en Tanzanie est connu pour être un lac naturellement alcalin du fait de son importante concentration en carbonate et bicarbonate de sodium. Cela fait de lui un environnement hostile pour de nombreuses espèces en présence. Nick Brandt, un photographe a publié d'impressionnantes images mettant en scène des cadavres d'animaux morts près de ce lac et dont les corps ont été pétrifiés par la calcification due à la forte teneur en minéraux du lac (fig. 1.9a).

À l'opposé, le lac Dallol en Éthiopie est un lac naturellement acide, dû à la présence d'un volcan à proximité. Avec son pH inférieur à 5 et sa forte concentration en acide sulfurique, ce lac peut émettre d'importantes vapeurs toxiques dangereuses pour l'être humain et les espèces environnantes (fig. 1.9b).

Ces deux cas naturels sont des extrêmes mais traduisent néanmoins que l'acidité ou l'alcalinité d'une eau peut être néfaste pour les écosystèmes. Les activités humaines et notamment industrielles peuvent avoir pour conséquence de modifier le pH des eaux douces. Les pluies acides notamment issues de la présence de certains gaz dans l'atmosphère provenant d'activités anthropogéniques illustrent très bien le phénomène d'acidification. Les rejets industriels peuvent également alcaliniser les milieux notamment avec l'utilisation intensive de détergents ou de savons.



Figure 1.9 : Photographie par Nick Brandt d'un corps d'oiseau calcifié par l'eau alcaline du lac Natron [34] et (b) Photographie du lac d'acide sulfurique de Dallol [35]

Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes pour effectuer cette mesure. La plus précise consistant en l'utilisation d'un pH-mètre basé sur une mesure électrochimique à l'aide d'une électrode de verre permettant l'obtention de mesure précise et très fiable mais n'étant pas optimale pour effectuer des mesures directement sur site. Pour pallier ce problème, d'autres méthodes ont été développées notamment des méthodes colorimétriques telles que le « papier pH » consistant simplement à tremper un papier spécial imbibé d'un indicateur coloré universel, ce dernier change alors de couleur en fonction du pH de la solution. Ces méthodes colorimétriques sont très pratiques mais beaucoup plus approximatives. Elles permettent d'obtenir une indication mais pas une réelle mesure.

Ainsi, l'objectif ici est de développer un capteur pH miniaturisable et intégrable dans le prototype LOD final afin d'être capable d'effectuer des mesures précises directement sur

site. Le développement de ce capteur basé sur une mesure électrochimique en potentiométrie est détaillé dans le chapitre 3.

IV. 3. Intérêt de la détection des ions nitrates

Les nitrates constituent un polluant majeur des eaux douces de surface ou souterraines. Présents naturellement dans l'environnement à raison d'1 mg/L au maximum, cette concentration a aujourd'hui largement augmenté. Pour cause, les activités anthropiques et notamment l'agriculture intensive avec l'épandage d'engrais azotés et de lisiers. Une quantité trop importante de nitrates dans l'eau pose des risques importants pour la santé humaine mais également pour les écosystèmes en modifiant les équilibres biologiques entraînant des phénomènes d'eutrophisation (prolifération d'algues - fig. 1.10a).

Les normes mondiales, européennes et françaises ont fixé la concentration en ions nitrates maximale à 50 mg/L pour l'eau potable. Aujourd'hui cette concentration est encore dépassée dans certains cours d'eau (fig. 1.10b). Cependant, le phénomène d'eutrophisation, lui, peut survenir dès 1 mg/L notamment dans les eaux stagnantes.

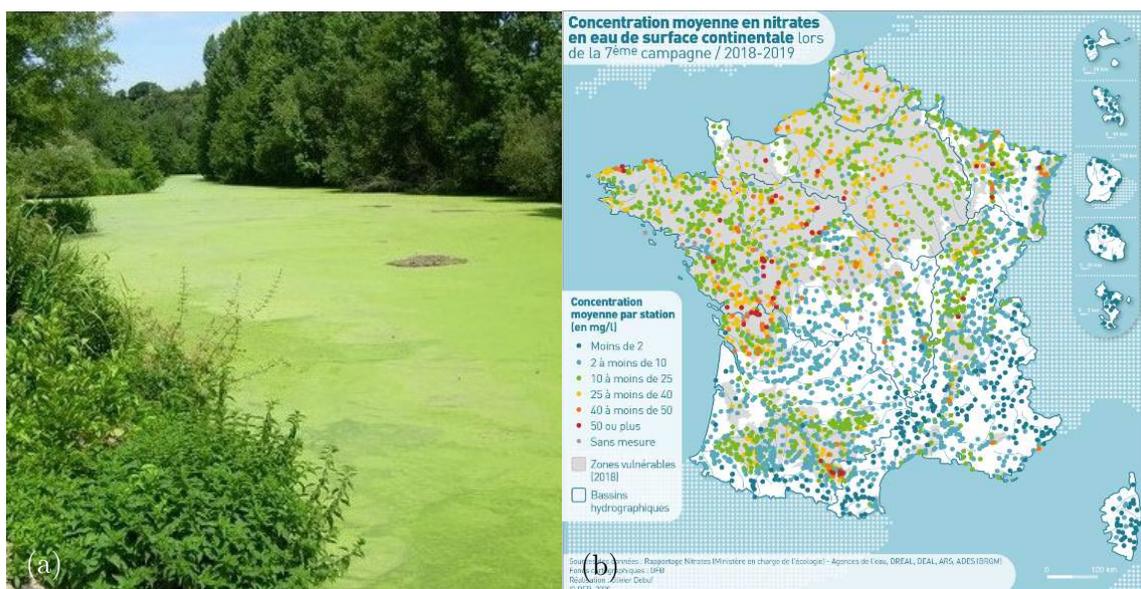


Figure 1.10 : (a) phénomène d'eutrophisation provoqué par une surconcentration en nitrates [36] et (b) Concentration moyenne en nitrates en France en 2018-2019 [37]

Tout comme pour le pH, il existe différentes méthodes pour mesurer la quantité d'ions nitrates. En dehors des méthodes de laboratoire, et pour les mesures directement sur site, des bandelettes tests sont souvent utilisées. À la manière du papier pH, elles vont changer de couleur en fonction de la concentration en nitrates. Encore une fois, les mesures obtenues avec ce type de dispositif ne sont qu'approximatives d'où l'intérêt de développer des méthodes précises et fiables mais réalisables sur site.

Ainsi, c'est dans cet objectif qu'un capteur d'ions nitrates adapté aussi à une intégration dans le LOD final sera réalisé. Il se base également sur une mesure électrochimique potentiométrique et son développement est détaillé au chapitre 3.

IV. 4. Intérêt de la détection des pesticides et des métaux lourds

Les pesticides et les métaux lourds représentent une bonne partie des espèces chimiques suivies lors du contrôle de la qualité de l'eau. En effet, ces importants polluants engendrent une dégradation de la biodiversité à court terme comme à long terme.

o Les pesticides

Encore aujourd'hui, les pesticides sont utilisés partout dans le monde et en grande quantité (fig. 1.11). Utilisés pour leur toxicité vis-à-vis de certains organismes vivants (plantes ou insectes), ils présentent en réalité des risques pour les organismes non-cibles et plus généralement pour la stabilité des écosystèmes. De plus, certaines études ont montré un risque d'apparition de certaines pathologies humaines liées à l'exposition aux pesticides. Bien que cela concerne principalement les milieux professionnels, toute les populations humaines sont susceptibles d'être exposées notamment via l'eau. Chaque année, plus de 300 millions de personnes sont victimes d'empoisonnement aux pesticides dans le monde (fig. 1.11b)

Des études montrent que la quantité de pesticides utilisés dans le monde a augmenté de 80% entre 1990 et 2020. Ainsi, alors que la réduction de leur utilisation est un objectif international, il apparaît qu'il n'y a pas encore de diminution effective à l'échelle mondiale. En juin 2023, le tribunal administratif de Paris a par ailleurs condamné l'Etat pour « fautes » suite à son échec à respecter ses engagements concernant la diminution de l'usage de pesticides et pour son incapacité à protéger les eaux, notamment souterraines, de la pollution induite par ces substances [38].

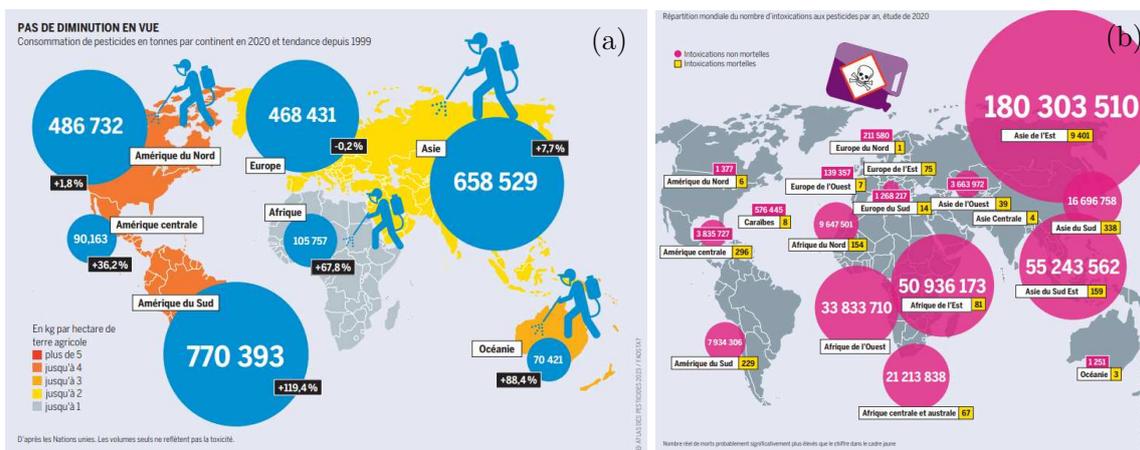


Figure 1.11 : Illustrations en chiffres de (a) l'utilisation de pesticides dans le monde et de (b) la contamination humaine aux pesticides mondiale [39]

L'Atlas des pesticides [39] paru en mai 2023 fait également état dans une étude que, dans 65% des cas, de résidus de pesticides trouvés dans les cheveux des habitants de l'Europe. Des pesticides, souvent pulvérisés en agriculture sont emportés par le vent et se retrouvent également dans 79% des aires de jeux, des cours d'écoles ou des lieux publics analysés. Bien que ces études ne permettent pas de conclure quant à la dangerosité, elle fait néanmoins état de l'omniprésence des pesticides dans l'environnement en dehors de là où ils devraient être.

De nombreuses masses d'eau sont également en mauvais état écologique et cela est en partie dû aux pesticides. Ainsi, un grand nombre d'entre eux font partie de la liste des substances prioritaires établie par le DCE. Dans le cadre de ces travaux de thèse, la détection de plusieurs d'entre eux, plus précisément des herbicides, a été testée. Leurs concentrations limites imposées par les directives nationales et internationales pour l'eau brute ou l'eau potable sont reportées sur le tableau 1.3.

	Monde*	Europe**	France***
Atrazine	2 µg/L	2 µg/L	0,1 µg/L
Diuron	<i>n.r</i>	1,8 µg/L	0,1 µg/L
Glyphosate	900 µg/L	<i>n.r</i>	0,1 µg/L
S-métolachlore	10 µg/L	<i>n.r</i>	0,1 µg/L

Tableau 1.3 : Réglementations nationales et internationales pour quelques pesticides

* recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé pour l'eau de consommation [30]

** normes de qualité environnementale en concentration maximale admissible définie par la Directive européenne cadre sur l'eau pour les eaux intérieures de surface [40]

*** limites de qualité des eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine définies par l'arrêté du 11 janvier 2007 [11]

Alors que l'Atrazine et le Diuron sont interdits d'utilisation en France depuis respectivement 2003 et 2008, ils sont encore retrouvés fréquemment dans les cours d'eau à des concentrations supérieures aux limites imposées [41–43]. Le glyphosate a failli faire l'objet d'une éventuelle interdiction en 2020 qui finalement n'a pas eu lieu. Le S-métolachlore quant à lui a fait l'objet de récentes controverses en France. Tout d'abord il a été retrouvé en quantité supérieure aux limites imposées dans l'eau de consommation délivrée, puis sa dangerosité a été revue à la baisse par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de sorte à rendre l'eau finalement conforme. Néanmoins, son utilisation a été finalement interdite, avec une application au 20 octobre 2023 [44]. Ainsi, les pesticides, leurs usages et leurs dangers sont au cœur de l'actualité nationale et internationale.

○ Les métaux lourds

Les métaux lourds ou plus précisément nommés « éléments traces métalliques » (ETM) polluent également les eaux de manière considérable. En plus des sources naturelles

de pollution que sont l'érosion des roches dans lesquels ils sont présents naturellement ou encore les prélèvements d'eau dans des nappes phréatiques de plus en plus profondes pouvant être contaminées par des roches chargées en minerais, des sources anthropiques s'ajoutent. Les activités humaines notamment l'activité métallurgique et minière ainsi que le ruissellement (toits, chaussées) participent à la pollution de l'eau et de l'environnement.

Ces métaux sont pour la plupart dangereux, même à l'état de traces, ils ont des effets néfastes sur les organismes vivants même à très faibles concentrations. Dans l'eau, les polluants s'accumulent dans les sédiments rendant la pollution métallique durable et peuvent par ailleurs s'accumuler également dans les tissus vivants provoquant une contamination de la chaîne alimentaire.

En France, l'arrêté du 2 février 1998 [45] impose des contraintes environnementales sur l'émission dans l'eau de douze métaux : aluminium, arsenic, cadmium, chrome, nickel, cuivre, étain, fer, manganèse, mercure, plomb et zinc.

	Monde	Europe	France
Cadmium	3 µg/L	1,5 µg/L	5 µg/L
Mercure	6 µg/L	0,07 µg/L	1 µg/L
Cuivre	<i>n.r</i>	<i>n.r</i>	1,7 µg/L

Tableau 1.4 : Réglementations nationales et internationales pour quelques métaux lourds

* recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé pour l'eau de consommation [30]

** normes de qualité environnementale en concentration maximale admissible définie par la Directive européenne cadre sur l'eau pour les eaux intérieures de surface [40]

*** limites de qualité des eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine définies par l'arrêté du 11 janvier 2007 [11]

Les limites imposées sont très basses, particulièrement en France où elles sont par exemple souvent 20 fois plus sévères que celles de l'OMS et jusqu'à 200 fois plus sévères qu'en Australie. Il est encore fréquent que les limites soient dépassées dans certaines zones notamment proches de sites industriels comme c'est le cas par exemple en zones agricoles pour les pesticides [46] et proches d'anciens sites miniers pour les métaux lourds [47,48].

o Synthèse

Le grand nombre d'éléments à détecter complique l'analyse des pesticides, ceci avec l'apparition d'effets cocktails. En ce qui concerne les ETM, les difficultés résident principalement dans le fait que ces éléments vont exister sous différentes formes : ions, oxydes ou encore sels. Ainsi, en fonction des conditions de température, de salinité ou encore d'oxygénation de l'eau, le métal peut prendre différentes formes et être ainsi plus ou moins toxique. C'est par exemple le cas du mercure qui peut se transformer en méthylmercure (forme la plus toxique pour l'homme) lorsque l'eau est stagnante et en présence de matières organiques en décomposition [49]. Par ailleurs, certains composés sont peu solubles et restent donc absorbés

dans les sédiments rendant la concentration inhomogène dans l'eau et induisant la présence de zones d'accumulation. Tous ces éléments associés aux problématiques d'échantillonnage, de stockage et de pré-traitement rendent difficile les analyses.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a donc été décidé de développer un biocapteur se basant sur le métabolisme algal. En effet, certaines microalgues, en tant qu'être vivants, sont directement sensibles à la présence de polluants. L'étude de leur métabolisme doit donc permettre de rendre état de la pollution écotoxique globale du milieu. Pour cela, l'échantillon d'eau à analyser sera mélangé à une solution contenant des microalgues. La mesure électrochimique consiste ensuite en la détection ampérométrique de l'oxygène dissous consommé et produit par les algues au cours des phases de respiration et de photosynthèse, métabolismes possiblement affectés par la présence de pesticides et ou d'ETM. Ce capteur, comme les autres, s'intégrera à la plateforme LOD prévue pour les mesures directement sur site. Son développement et son principe de fonctionnement sont détaillés dans le chapitre 4. Enfin, des premières mesures complémentaires de fluorescence algale ont été menées et les résultats obtenus sont également présentés dans le chapitre 4.

V. Conclusion

En conclusion, la surveillance de la qualité de l'eau est un enjeu essentiel actuel. Les eaux douces de surface constituent une ressource précieuse. Elles représentent l'habitat de nombreuses espèces animales et végétales et sont également une source importante pour la production d'eau potable. Pendant des siècles entiers, les industries ont privilégié leurs installations proches de fleuves, de rivières ou de lacs afin de faciliter à la fois leur alimentation en eau mais également leurs rejets. Aujourd'hui la plupart des industries sont dotées de stations d'épurations afin de traiter leurs effluents avant de les rejeter dans l'environnement. Malheureusement, encore trop de polluants se retrouvent dans les eaux, dépassant fréquemment les limites imposées par les réglementations. L'épuration effectuée par les stations n'est pas parfaite et d'autres sources de pollution ne sont pas traitables via cette méthode, c'est le cas par exemple des pesticides pulvérisés en agriculture qui, soit ruissellent à travers les sols et atteignent les cours d'eau environnants, soit sont emportés par l'atmosphère et se retrouvent dans l'environnement.

Les méthodes actuelles impliquent de nombreuses contraintes. Effectuées en laboratoire, ces moyens coûteux et complexes impliquent souvent des étapes de prétraitement et de stockage strictes. De plus, elles nécessitent le transport de l'échantillon du site jusqu'au laboratoire, un trajet pouvant modifier voire altérer l'échantillon et entraîner des erreurs de mesures. Ainsi, de nouvelles méthodes d'analyse sur site se développent et c'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de cette thèse. Le développement d'un appareil multicapteur permettant la mesure de plusieurs paramètres physico-chimiques et la détection de certains

polluants est prévue. L'objectif étant d'aboutir à un système d'alerte précoce peu coûteux et utilisable facilement afin de démultiplier le nombre de mesures tout en palliant les problématiques des méthodes actuelles de laboratoire.

Bibliographie

- [1] Assises de l'eau. <https://www.ecologie.gouv.fr/assises-leau> (Accessed Feb 7, **2023**).
- [2] Les eaux de surface : des ressources protégées, contrôlées et de bonne qualité | Centre d'information sur l'eau, **2020**.
- [3] notre-environnement. Trois groupes de paramètres pour suivre la qualité des milieux aquatiques. <http://www.notre-environnement.gouv.fr/themes/sante/la-pollution-de-l-eau-douce-ressources/article/trois-groupes-de-parametres-pour-suivre-la-qualite-des-milieux-aquatiques> (Accessed Jun 23, **2023**).
- [4] Vers le bon état des milieux aquatiques. <https://www.eaufrance.fr/vers-le-bon-etat-des-milieux-aquatiques> (Accessed Feb 7, **2023**).
- [5] *Directive 2000/60/CE Du Parlement Européen et Du Conseil Du 23 Octobre 2000 Établissant Un Cadre Pour Une Politique Communautaire Dans Le Domaine de l'eau.*
- [6] Loi n° 64-1245 du 16 décembre 1964 relative au régime et à la répartition des eaux et à la lutte contre leur pollution - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006068236> (Accessed Feb 7, **2023**).
- [7] Loi n° 92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000173995> (Accessed Feb 7, **2023**).
- [8] LOI n° 2004-338 du 21 avril 2004 portant transposition de la directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (1) - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000418424> (Accessed Feb 7, **2023**).
- [9] *Loi N° 2006-1772 Du 30 Décembre 2006 Sur l'eau et Les Milieux Aquatiques (1).*
- [10] La qualité des rivières. <https://www.eaufrance.fr/la-qualite-des-rivieres> (Accessed Jul 3, **2023**).
- [11] Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000465574> (Accessed Jun 19, **2023**).
- [12] *Arrêté Du 27 Octobre 2011 Portant Modalités d'agrément Des Laboratoires Effectuant Des Analyses Dans Le Domaine de l'eau et Des Milieux Aquatiques Au Titre Du Code de l'environnement.*
- [13] Stratégies d'échantillonnage pour les analyses d'eau. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/analyses-dans-l-environnement-eau-et-air-42831210/strategies-d-echantillonnage-pour-les-analyses-d-eau-p3852/> (Accessed Jun 23, **2023**).
- [14] Vrana, B.; Mills, G.; Greenwood, R.; Knutsson, J.; Svensson, K.; Morrison, G. Performance Optimisation of a Passive Sampler for Monitoring Hydrophobic Organic Pollutants in Water. *J. Environ. Monit.*, **2005**, 7, 612.
- [15] Namieśnik, J.; Zabiegała, B.; Kot-Wasik, A.; Partyka, M.; Wasik, A. Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review. <https://mostwiedzy.pl/pl/publication/passive-sampling-and-or-extraction-techniques-in-environmental-analysis-a-review,94843-1> (Accessed Jun 27, **2023**).
- [16] Quevauviller, P. *Quality Assurance in Environmental Monitoring: Sampling and Sample Pre-treatment*; John Wiley & Sons, **2008**.

- [17] Djingova, R.; Kuleff, I. Chapter 5 Instrumental Techniques for Trace Analysis. In: *Trace Metals in the Environment*; Markert, B.; Friese, K., Eds.; Trace Elements — Their Distribution and Effects in the Environment; Elsevier, **2000**; Vol. 4, pp. 137–185.
- [18] Spectrométrie d'absorption atomique. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/spectrometrie-atomique-et-spectrometrie-moleculaire-42707210/spectrometrie-d-absorption-atomique-p2825/> (Accessed Aug 25, **2023**).
- [19] Švancara, I.; Prior, C.; Hočevár, S.B.; Wang, J. A Decade with Bismuth-Based Electrodes in Electroanalysis. *Electroanalysis*, **2010**, *22*, 1405–1420.
- [20] Analyse de traces et d'ultra-traces d'éléments. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-techniques-d-analyse-tiata/archive-3/analyse-de-traces-et-d-ultra-traces-d-elements-p3860/> (Accessed Jun 26, **2023**).
- [21] Mesure sur site pour analyse rapide de la qualité des eaux. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/analyses-dans-l-environnement-eau-et-air-42831210/mesure-sur-site-pour-analyse-rapide-de-la-qualite-des-eaux-p3900/> (Accessed Jun 27, **2023**).
- [22] Gantois, F.; Guigues, N.; Raveau, S.; Lepot, B.; Gal, F. PANORAMA DE L'EXISTANT SUR LES CAPTEURS ET ANALYSEURS EN LIGNE POUR LA MESURE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DANS L'EAU - 2016.
- [23] Silva, G.M. e; Campos, D.F.; Brasil, J.A.T.; Tremblay, M.; Mendiondo, E.M.; Ghiglieno, F. Advances in Technological Research for Online and In Situ Water Quality Monitoring—A Review. *Sustainability*, **2022**, *14*, 5059.
- [24] Hongpin, L.; Guanglin, L.; Weifeng, P.; Jie, S.; Qiuwei, B. Real-Time Remote Monitoring System for Aquaculture Water Quality. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, **2015**, *8*, 136–143.
- [25] Shi, Z.; Chow, C.W.K.; Fabris, R.; Liu, J.; Jin, B. Applications of Online UV-Vis Spectrophotometer for Drinking Water Quality Monitoring and Process Control: A Review. *Sensors (Basel)*, **2022**, *22*, 2987.
- [26] Wang, Y.; Rajib, S.S.M.; Collins, C.; Grieve, B. Low-Cost Turbidity Sensor for Low-Power Wireless Monitoring of Fresh-Water Courses. *IEEE Sensors Journal*, **2018**, *18*, 4689–4696.
- [27] Srivastava, S.; Sharma, V. Ultra-Portable, Smartphone-Based Spectrometer for Heavy Metal Concentration Measurement in Drinking Water Samples. *Appl Water Sci*, **2021**, *11*, 177.
- [28] Grossi, M.; Lazzarini, R.; Lanzoni, M.; Pompei, A.; Matteuzzi, D.; Riccò, B. A Portable Sensor With Disposable Electrodes for Water Bacterial Quality Assessment. *IEEE Sensors Journal*, **2013**, *13*, 1775–1782.
- [29] *Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau*, **2000**; Vol. OJ L.
- [30] Who. Guidelines for Drinking-Water Quality, Volume 2: Health Criteria and Other Supporting Information. *Science of The Total Environment*, **1987**, *61*, 274.
- [31] Migaszewski, A.G., Zdzistaw M. Rivers and Lakes: Acidification. In: *Managing Water Resources and Hydrological Systems*; CRC Press, **2020**.
- [32] Le pH monte dans les rivières. https://plus.lapresse.ca/screens/f79dd7ae-3e06-4a90-9919-0823f7276b58|_0.html (Accessed Jul 3, **2023**).
- [33] pH of Water. <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/ph/> (Accessed Jul 4, **2023**).

- [34] Nick Brandt. [https://www.nickbrandt.com/on-this-earth-trilogy/across-the-ravaged-land-\(2010-2012\)](https://www.nickbrandt.com/on-this-earth-trilogy/across-the-ravaged-land-(2010-2012)) (Accessed Jul 4, **2023**).
- [35] Boegli, P. Ethiopie - Lacs d'acide sur le volcan Dallol. *PascalBoegli.com - Récits de voyages et photos du monde*.
- [36] L'eutrophisation des milieux aquatiques - Site des SAMU de l'environnement. <https://www.samudelenvironnement.org/2020/11/17/l-eutrophisation-des-milieux-aquatiques/> (Accessed Jul 3, **2023**).
- [37] L'azote est un élément indispensable à l'agriculture, mais il peut entraîner des pollutions. <https://programme-nitrate.gouv.fr/lazote-est-element-indispensable-a-lagriculture-il-peut-entraîner-pollutions.html> (Accessed Jul 3, **2023**).
- [38] Pesticides : l'Etat condamné pour fautes en matière de protection de la biodiversité. https://www.lemonde.fr/planete/article/2023/06/29/pesticides-l-etat-condamne-pour-fautes-en-matiere-de-protection-de-la-biodiversite_6179776_3244.html (Accessed Jul 5, **2023**).
- [39] Heinrich-Böll-Stiftung. Atlas Des Pesticides, Faits et Chiffres Sur Les Substances Chimiques Toxiques Dans l'agriculture, **2023**.
- [40] *Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE*; **2008**; Vol. 348.
- [41] Eau potable. Pollution au diuron à Kervoallic. <https://www.letelegramme.fr/finistere/pluguffan-29700/spaneau-potablespan-pollution-au-diuron-a-kervoallic-1115711.php> (Accessed Jul 5, **2023**).
- [42] CARTES. Pesticides dans l'eau du robinet : doit-on s'inquiéter de la situation en Centre-Val de Loire ? <https://france3-regions.francetvinfo.fr/centre-val-de-loire/cher/cartes-pesticides-dans-l-eau-du-robinet-doit-on-s-inquieter-de-la-situation-en-centre-val-de-loire-2777866.html> (Accessed Jul 5, **2023**).
- [43] P, J. Eau potable : un herbicide interdit depuis 20 ans oblige à prendre des dérogations, **2022**.
- [44] S-métolachlore : vers l'interdiction des principaux usages pour préserver la qualité des eaux souterraines. <https://www.anses.fr/fr/content/s-metolachlor-preserver-qualite-eaux> (Accessed Jul 5, **2023**).
- [45] Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000005625281> (Accessed Jul 5, **2023**).
- [46] INFOGRAPHIES. Ce que l'on sait des résidus de pesticides dans l'eau du robinet de milliers de communes (et des incertitudes sur leur toxicité). https://www.francetvinfo.fr/sante/environnement-et-sante/infographies-ce-que-l-on-sait-des-residus-de-pesticides-dans-l-eau-du-robinet-de-milliers-de-communes-et-des-incertitudes-sur-leur-toxicite_5360212.html (Accessed Jul 4, **2023**).
- [47] Reporterre. Exclusif : la liste des sites miniers empoisonnés que l'État dissimule. <https://reporterre.net/Exclusif-la-liste-des-sites-miniers-empoisonnes-que-l-Etat-dissimule> (Accessed Jul 4, **2023**).

- [48] Pollution minière : les habitants vivant à proximité de milliers de sites s'inquiètent face à un possible scandale sanitaire. https://www.francetvinfo.fr/sante/environnement-et-sante/pollutions-de-3-500-anciens-sites-miniers-francais-enquete-sur-un-scandale-sanitaire_2176625.html (Accessed Jul 4, **2023**).
- [49] Horvat, M.; Nolde, N.; Fajon, V.; Jereb, V.; Logar, M.; Lojen, S.; Jacimovic, R.; Falnoga, I.; Liya, Q.; Faganeli, J. Total Mercury, Methylmercury and Selenium in Mercury Polluted Areas in the Province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, **2003**, *304*, 231–256.

Une microcellule électrochimique adaptable à différentes détections

Sommaire

- I. Introduction**
- II. Méthodes électrochimiques utilisées : principes et rappels**
 - II. 1. Ampérométrie**
 - II. 1. 1. La voltammétrie
 - II. 1. 2. La chronoampérométrie
 - II. 2. Potentiométrie**
 - II. 2. 1. La potentiométrie à courant nul
 - II. 2. 2. La chronopotentimétrie à courant constant
 - II. 3. Spectroscopie d'impédance électrochimique**
- III. « ElecCell » une cellule électrochimique miniaturisée sur puce**
 - III. 1. Conception et géométrie**
 - III. 2. Microfabrication**
 - III. 2. 1. Préparation du substrat
 - III. 2. 2. Formation des électrodes
 - III. 3. Différents packagings**
 - III. 3. 1. « Bâtonnets » pour les pré-tests
 - III. 3. 2. Disques pour l'application finale
 - III. 4. Validation du microcapteur**
 - III. 4. 1. L'électrode de travail (UMEA)
 - III. 4. 2. La contre-électrode
 - III. 4. 3. L'électrode de quasi-référence
- IV. Conclusion**

I. Introduction

L'électrochimie, discipline scientifique qui explore les liens entre l'électricité et les réactions chimiques, a joué un rôle essentiel dans de nombreuses avancées technologiques et scientifiques. Son histoire remonte à plus de deux siècles, et depuis son invention, elle a révolutionné la compréhension des réactions électrochimiques mais également trouvé de vastes applications pratiques. L'électrochimie trouve ses racines dans les travaux pionniers d'Alessandro Volta, de Luigi Galvani et d'Humphry Davy, qui ont tous contribué à poser les bases de cette discipline au tournant du XIX^e siècle.

En 1800, Alessandro Volta a inventé la première pile voltaïque, également connue sous le nom de pile électrique (fig. 2.1a), qui était capable de générer un courant électrique continu en utilisant des réactions chimiques [1]. Cette invention a marqué le début de l'ère électrochimique, ouvrant la voie à de nombreuses découvertes et applications futures. Au fil des décennies, les scientifiques ont approfondi leurs connaissances sur les réactions d'oxydo-réduction (redox), les équilibres électrochimiques et les mécanismes de transfert d'électrons. Des concepts fondamentaux ont alors été établis.

L'électrochimie trouve alors depuis des applications dans divers domaines. Elle est à la base de nombreuses technologies clés, telles que les piles et batteries, qui alimentent aujourd'hui une multitude d'appareils électroniques et de véhicules électriques. Mais elle est aussi cruciale dans des domaines tels que l'électrosynthèse qui permet la fabrication de produits chimiques, de métaux et de matériaux avancés de manière plus efficace et respectueuse de l'environnement. Elle joue un rôle clé dans la compréhension et le contrôle des processus de corrosion, qui affectent la durabilité des métaux et d'autres matériaux exposés à des environnements agressifs. En étudiant les mécanismes de corrosion et en développant des techniques de protection, l'électrochimie contribue à prolonger la durée de vie des infrastructures, des véhicules et d'autres objets. Enfin, elle est beaucoup utilisée dans le cadre de dispositifs d'analyse pour l'environnement, la santé ou l'agroalimentaire avec le développement de capteurs chimiques.

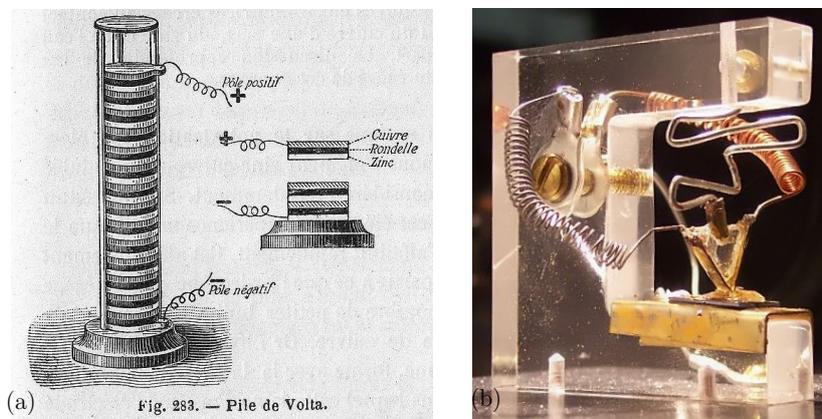


Figure 2.1 : (a) Schéma de la première pile électrique [2] et (b) réplique du premier transistor [3]

En parallèle, les microtechnologies comprennent un ensemble de procédés de fabrication, issus de la microélectronique et utilisés pour créer des structures et des dispositifs à l'échelle microscopique voire nanoscopique. Ces techniques permettent de manipuler et de traiter des matériaux à des dimensions très réduites, généralement de l'ordre du micromètre.

L'histoire des microtechnologies remonte, elle, à plusieurs décennies et est étroitement liée aux progrès dans les domaines des matériaux, de l'électronique et de la fabrication de dispositifs miniaturisés. Les prémices des microtechnologies remontent aux années 1950 lorsque des chercheurs ont commencé à explorer les possibilités de miniaturisation des composants électroniques. La création des premiers transistors à semi-conducteurs (fig. 2.1b) a été une étape décisive dans cette évolution [4]. Ces dispositifs miniatures ont ouvert la voie à la fabrication de circuits intégrés où de nombreux composants électroniques pouvaient être intégrés sur une unique puce silicium.

Ainsi, aujourd'hui l'utilisation de techniques de microtechnologie dans la fabrication de capteurs électrochimiques offre de nombreux avantages, notamment une miniaturisation accrue, de bonnes performances et une intégration plus facile dans des systèmes complexes. Ces avancées ouvrent donc la voie à de nouvelles applications dans des domaines tels que la surveillance environnementale, les agro-industries, la santé, la pharmaceutique, la cosmétique et bien d'autres [5].

Ce chapitre présente dans un premier temps les méthodes électrochimiques utilisées pour la fabrication des capteurs et pour leur utilisation à des fins de suivi environnementaux. Puis, il présente le procédé microtechnologique de fabrication du microcapteur « ElecCell » adaptable aux détections souhaitées et les plateformes dans lesquelles il a été conditionné dans le cadre de pré-tests ainsi que pour l'application finale du projet.

II. Les méthodes électrochimiques utilisées

Il existe une multitude de méthodes électrochimiques. Elles offrent un large éventail d'applications et permettent de comprendre et de contrôler les processus électrochimiques, de réaliser des mesures précises, d'analyser les réactions, de caractériser les interfaces et de fabriquer des matériaux fonctionnels par dépôt électrochimique. Dans le cadre de ces travaux, plusieurs méthodes électrochimiques ont été utilisées, à la fois pour la détection des espèces d'intérêt mais également pour les dépôts électrochimiques de certaines espèces afin d'améliorer les propriétés de sensibilité et/ou de sélectivité des électrodes.

II. 1. L'ampérométrie

L'ampérométrie désigne l'ensemble des techniques électrochimiques dans lesquelles un courant électrique est mesuré en fonction d'une variable donnée. Cette variable est le plus

souvent le temps (chronoampérométrie) ou le potentiel (voltammétrie). En pratique, ces méthodes nécessitent l'utilisation de trois électrodes formant alors la cellule électrochimique. Sa composition est la suivante :

- **l'électrode de travail** à la surface de laquelle a lieu la réaction électrochimique d'intérêt,
- **l'électrode de référence** qui, ayant théoriquement un potentiel fixe, permet de mesurer ou d'imposer la différence de potentiel par rapport à l'électrode de travail,
- **l'électrode auxiliaire** ou **contre-électrode** qui sert à transporter le courant traversant la cellule.

Dans le cadre de ces travaux, plusieurs méthodes ampérométriques ont été utilisées : la voltammétrie (linéaire et cyclique) et la chronoampérométrie. Ces méthodes ont été utilisées à des fins de dépôts et de caractérisations de matériaux d'électrode ainsi qu'à des fins de détection analytique. Les principes de ces deux techniques sont rappelés dans les parties suivantes.

II.1.1. La voltammétrie

La voltammétrie (ou voltampérométrie) est une technique couramment utilisée en chimie analytique afin d'étudier les réactions redox à l'interface électrode/électrolyte mais également de déterminer des concentrations d'espèces en solution. Elle est également parfois utilisée pour effectuer certains dépôts électrochimiques. Elle repose sur l'enregistrement du courant électrique en fonction du potentiel linéairement appliqué à une électrode de travail.

II.1.1.i La voltammétrie linéaire

Dans le cas de la voltammétrie linéaire, le potentiel est progressivement modifié de manière linéaire d'une valeur initiale à une valeur finale et le plus généralement à vitesse constante. Cela permet d'obtenir un profil de courant caractéristique comprenant des pics ou des vagues représentatives de chaque réaction redox ayant lieu en solution. L'intensité d'un pic ou d'un palier est proportionnelle à la concentration de l'espèce concernée. C'est ainsi qu'il est possible, en analysant ces courbes, de déterminer les concentrations des espèces étudiées.

$$E = E_i + vt$$

avec E_i le potentiel initial (souvent choisi égal au potentiel à intensité nulle), v la vitesse de balayage des potentiels et t le temps.

La voltammétrie linéaire a été utilisée dans ces travaux de thèse pour déterminer la surface active des électrodes microfabriquées ainsi que pour oxyder l'argent en chlorure d'argent afin de former l'électrode de quasi-référence finale.

II.1.1.ii La voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique est une variante de la voltammétrie linéaire. Ici, l'électrode de travail est soumise à des cycles de potentiel qui progressent linéairement entre un potentiel initial et un potentiel final puis reviennent au potentiel initial, formant ainsi une boucle (fig. 2.2a). Le potentiel est alors fonction de la vitesse de balayage tel que :

$$E = E_i \pm vt$$

avec E_i le potentiel initial (souvent choisi égal au potentiel à intensité nulle), v la vitesse de balayage des potentiels et t le temps.

De cette manière, les espèces formées lors du balayage aller peuvent être à leur tour détectées lors du balayage retour. Cette méthode permet notamment d'étudier la réversibilité des systèmes électrochimiques. Le balayage cyclique génère d'autres courbes voltammétriques comprenant également des pics ou des vagues caractéristiques des réactions redox. De ces courbes sont extraits les valeurs de courant (intensité) de pics I_{pa} pour une réaction d'oxydation (anodique) et I_{pc} pour une réaction de réduction (cathodique) ainsi que leurs potentiels respectifs. Comme pour la voltammétrie linéaire, l'intensité des pics est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce mise en jeu dans la réaction.

Dans le cas d'une électrode de taille macroscopique et d'une solution non-agitée, chaque réaction redox prend la forme d'un pic. En effet, après avoir atteint une valeur maximale, le courant diminue (fig. 2.2b). Cela s'explique par le fait que, le balayage étant rapide et l'électrode étant immobile au sein d'une solution non-agitée, la diffusion ne compense que partiellement la consommation du substrat à l'électrode. Ceci n'est plus vrai dans le cas d'électrodes microscopiques où les réactions redox se traduiraient par des vagues et non plus des pics (cf. II.1.4).

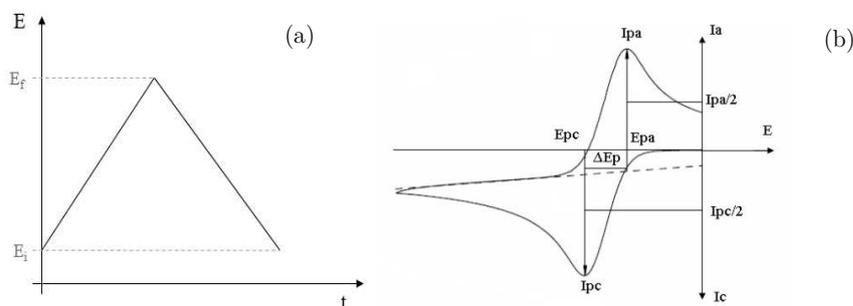


Figure 2.2 : Voltammétrie cyclique avec (a) la variation du potentiel en fonction du temps et (b) la variation du courant en fonction du potentiel [6]

La voltammétrie cyclique a été utilisée pour le nettoyage électrochimique des électrodes ainsi que pour caractériser les divers dépôts électrochimiques réalisés (noir de platine pour la détection de l'oxygène, oxyde d'iridium pour la détection du pH).

II.1.2. La chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une méthode qui consiste à appliquer, via un saut, un potentiel fixe à l'électrode et à enregistrer le courant résultant. Ce potentiel est déterminé en fonction du potentiel où se produit la réaction d'intérêt. Dans le cas où la réaction n'est pas limitée par la diffusion, la variation du courant en fonction du temps suit la loi de Cottrell telle que :

$$I = \frac{nFS D^{1/2} C^{sol}}{\pi^{1/2} t^{1/2}}$$

avec n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday ($C.mol^{-1}$), S la surface de l'électrode (cm^2), D le coefficient de diffusion de l'espèce, C^{sol} la concentration de l'espèce dans la solution ($mol.cm^{-3}$) et t le temps (s)

La courbe obtenue présente une forme spécifique avec deux à trois zones caractéristiques (fig. 2.3) :

- Zone I : temps nécessaire à la charge de la double-couche et à la formation des premiers cristaux en cas d'électrodépôt
- Zone II : croissance du courant en parallèle avec la croissance des cristaux qui recouvrent peu à peu la surface de l'électrode jusqu'à une valeur maximale. En cas d'absence de formation de cristaux ou dans le cas d'une cinétique de formation très rapide, cette zone n'existe pas forcément.
- Zone III : limitation du courant par la diffusion des espèces électroactives à l'électrode

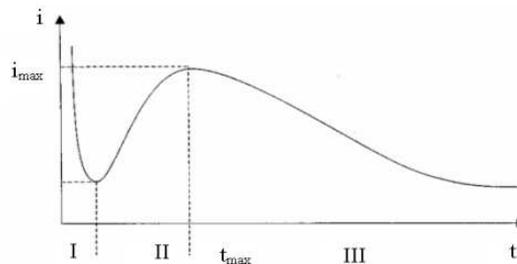


Figure 2.3 : Courbe caractéristique de chronoampérométrie [6]

L'aire sous la courbe $I = f(t)$ correspond à la quantité totale d'électricité ou charge (Q) passant à travers l'interface telle que :

$$Q = \int_0^t I. dt$$

Cette charge est directement reliée à la quantité d'espèce consommée au cours de la réaction par la loi de Faraday :

$$N = \frac{Q}{nF}$$

avec N la quantité de matière consommée ou produite (mol), Q la charge (C), n le nombre d'électrons échangés et F la constante de Faraday ($C.mol^{-1}$).

Pour ces travaux, la chronoampérométrie a été utilisée pour réaliser des dépôts électrochimiques de noir de platine (Pt-BI pour « *Platinum Black* » en anglais) et d'oxyde d'iridium IrO_x , respectivement dans le cadre de la détection de l'oxygène dissous O_2 et du pH. Elle a par ailleurs été également utilisée pour la détection de l'oxygène dissous produit et consommé par les microalgues lors de la détection des pesticides et des ETM.

II.1.3. Cas particulier des microélectrodes

II.1.3.i Les ultramicroélectrodes (UME)

L'introduction d'électrode miniaturisée remonte aux années 1980. Ces électrodes ont su repousser les limites expérimentales de l'électrochimie. Leur petite taille leur confère des propriétés très intéressantes telles qu'une sensibilité accrue et la capacité d'être utilisées dans des volumes restreints tout en ne modifiant quasiment pas la composition de l'analyte. Elles ont d'ailleurs grandement contribué à l'étude de processus *in situ* et *in vivo* [7].

En réalité, il n'existe pas dans la littérature de définition unique et universelle d'une micro ou ultramicroélectrode. Dans ce manuscrit, il sera considéré qu'une ultramicroélectrode (UME) est une électrode de dimension critique inférieure à $25\mu m$ [8]. Il en existe différents types mais les plus utilisées sont les électrodes disque plan.

Le principal avantage entre une électrode macroscopique et une UME réside dans la modification du régime de diffusion. En effet, alors qu'une électrode plane macroscopique admet une diffusion linéaire (composante plane seulement), une UME admet une diffusion hémisphérique (composante radiale principalement). Ce phénomène est issu de sa petite taille, qui conduit à donner les prépondérances (fig. 2.4a et 2.4b). Ainsi, le transport de matière vers une UME prend place en deux dimensions contrairement aux électrodes de taille conventionnelles où seule la diffusion planaire est considérée. De cette manière, la densité de courant

mesurée est plus importante sur UME que sur une électrode de taille classique, le rapport signal sur bruit est amélioré [9].

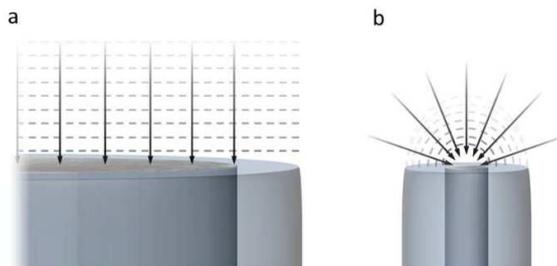


Figure 2.4 : Schéma de la diffusion (a) planaire sur une électrode disque macroscopique et (b) hémisphérique sur une UME disque [10]

Cela se traduit en voltammétrie où l'allure des voltammogrammes obtenus à des vitesses usuelles de balayage (jusqu'à 500 mV/s) sur UME immobile est comparable à celle obtenue sur des électrodes macroscopiques où le régime de convection est contrôlé (électrode tournante ou en présence d'agitation). Ceci est encore une fois dû à la diffusion hémisphérique entraînant une atteinte plus rapide de l'état stationnaire. Les voltammogrammes présentent alors des vagues plutôt que des pics dont la hauteur du palier est directement liée à la concentration de l'espèce étudiée (fig. 2.5) [11]. Ce courant limite est alors défini par l'équation de Saito [12] tel que :

$$I_{\text{lim}} = 4nFDC_{\text{sol}}r_d$$

avec I_{lim} le courant limite au niveau du palier (A), n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$), D le coefficient de diffusion de l'espèce considérée ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), C_{sol} la concentration de l'espèce étudiée en solution ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$) et r_d le rayon de l'électrode (m).

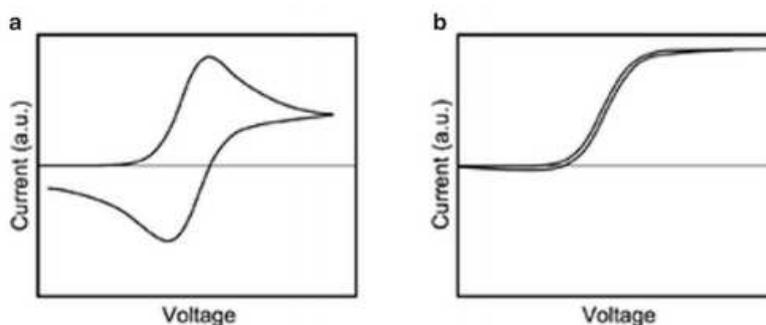


Figure 2.5 : Voltammogrammes schématiques pour (a) une électrode macroscopique immobile sans agitation et (b) une UME [13]

D'autre part, lorsqu'une électrode est placée en solution, l'interface peut être assimilée à un condensateur. Les espèces chargées forment à la surface du métal une couche appelée « double-couche » électrique qui est elle-même caractérisée par sa capacité de double couche. Le courant mesuré en électrochimie correspond à la somme du courant faradique (courant associé au transfert de charge à l'interface métal | solution) et de ce courant capacitif (courant associé à la charge/décharge de la double-couche électrique). Le courant capacitif est lié à la géométrie et à la surface de l'électrode. Ainsi, avec la diminution de la taille de l'électrode, le courant faradique, proportionnel à son rayon, est privilégié par rapport au courant capacitif, proportionnel à la surface et donc à r^2 . Cela est donc un réel avantage lors de la détection d'espèces à de faibles concentrations, puisque le rapport signal sur bruit ainsi que, par conséquent, la sensibilité sont améliorés.

Enfin, la chute ohmique peut être minimisée voire négligée. En effet, cette dernière est égale au produit de la résistance de l'électrolyte et du courant mesuré. Les courants mesurés sur UME étant très faibles, la chute ohmique est diminuée. Cela permet d'effectuer des mesures dans des milieux plus résistants, peu conducteurs et ce sans ajout d'électrolyte support [14,15].

II.1.3.ii Réseau d'ultramicroélectrodes

Malgré leurs nombreux avantages, les UME présente un désavantage majeur qui n'est autre que le courant mesuré finalement très faible, nécessitant ainsi une instrumentation plus complexe. Afin de pallier ce problème, les UME sont souvent interconnectées en parallèle sous forme de réseaux [16]. Cela permet alors de mesurer un courant plus important tout en conservant les propriétés avantageuses des microélectrodes.

Pour cela, des règles sont à respecter quant à la disposition des électrodes dans l'espace : ces dernières doivent être suffisamment espacées de sorte à ce que leurs couches de diffusion ne se recouvrent pas entre elles (fig. 2.6). En effet, un recouvrement trop important induirait une diffusion linéaire comparable à celle d'une macroélectrode et ferait ainsi perdre tous les avantages de la diffusion hémisphérique des UME [17].

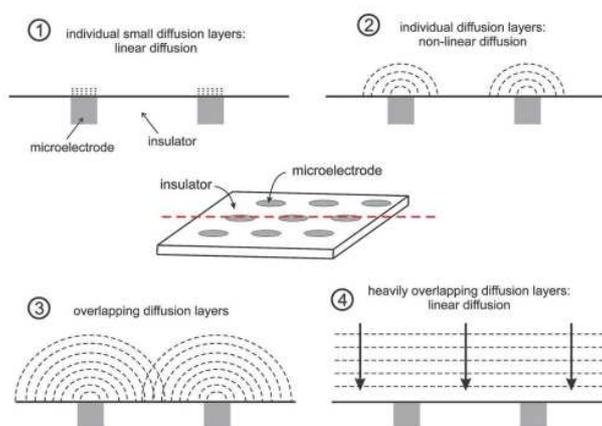


Figure 2.6 : Schémas des types de profil de diffusion pour un réseau de microélectrodes [17]

Pour un réseau d'UME, le courant mesuré en ampérométrie est alors défini par l'équation suivante basée sur l'équation de Saito :

$$I_{\text{lim}} = 4nFDC_{\text{sol}}r_dz$$

avec I_{lim} le courant limite au niveau du palier (A), n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$), D le coefficient de diffusion de l'espèce considérée ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), C_{sol} la concentration de l'espèce étudiée en solution ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$), r_d le rayon de l'électrode (m) et z le nombre de microélectrodes du réseau connectées en parallèle.

Ainsi, pour de fortes valeurs de z , il est finalement possible d'accroître les courants électriques mesurés à des dimensions de l'ordre du nanoampère (par exemple) et de pouvoir utiliser des systèmes électriques de mesures, encore appelés potentiostats, classiques.

II. 2. La potentiométrie

A l'opposé de l'ampérométrie, la potentiométrie désigne l'ensemble des méthodes électrochimiques pour lesquelles un potentiel est mesuré. Le potentiel est mesuré en fonction du temps avec (chronopotentiométrie) ou sans (potentiométrie à courant nul) imposition d'un courant. Cette technique est largement utilisée à des fins d'analyses mais également de caractérisation d'électrode ou de dépôts.

Comme pour l'ampérométrie, la potentiométrie nécessite une cellule électrochimique à trois électrodes, excepté dans le cas de la potentiométrie à courant nul où la contre-électrode n'a pas d'intérêt puisque la cellule n'est traversée par aucun courant.

Dans le cadre de ces travaux, la chronopotentiométrie à courant constant a été utilisée afin de réaliser des dépôts électrochimiques tandis que la potentiométrie a été utilisée pour la détections de certaines espèces chimiques.

II.2.1. La potentiométrie à courant nul

La potentiométrie à courant nul ou potentiométrie en circuit ouvert consiste à mesurer la différence de potentiel entre une électrode dite « indicatrice » et une électrode de référence. Le potentiel de l'électrode indicatrice adopte une valeur dépendante de la concentration d'une ou plusieurs espèces en solution, généralement un couple redox. En effet, en l'absence de courant, la réaction ayant lieu à l'électrode est en fait à l'équilibre. De cette manière, le potentiel est lié aux concentrations des espèces par la relation de Nernst telle que :

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{ox})^{v_{ox}}}{(a_{red})^{v_{red}}}$$

avec E_{eq} le potentiel d'équilibre, E^0 le potentiel standard par rapport à l'électrode normale à hydrogène, R la constante des gaz parfaits ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T la température (K), n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$), a_{ox} et a_{red} les activités respectives de l'oxydant et du réducteur et v_{ox} et v_{red} les coefficients stœchiométriques respectifs de l'oxydant et du réducteurs.

En considérant que les solutions sont suffisamment diluées, les activités sont égales aux concentrations des espèces puisque par définition $a_i = \gamma_i C_i$ avec γ_i le coefficient d'activité de l'espèce i ($\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$) égal à 1 en solutions diluées et C_i la concentration de l'espèce i ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$). L'équation devient donc :

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(C_{ox})^{v_{ox}}}{(C_{red})^{v_{red}}}$$

Pour ces travaux de thèse, la potentiométrie à courant nul a été utilisée pour la mesure du pH ainsi que pour la détection des ions nitrates NO_3^- .

II.2.2. La chronopotentiométrie à courant constant

La chronopotentiométrie à courant imposé constant (mode galvanostatique) consiste à appliquer, via un saut, un courant constant et mesurer l'évolution du potentiel en fonction du temps. Le passage du courant entraîne l'oxydation ou la réduction à vitesse constante des espèces électroactives présentes en solution au voisinage de l'électrode. Ainsi, le potentiel est porté à une valeur caractéristique du système redox considéré. La forme caractéristique de la courbe $E = f(t)$ ainsi obtenue donne des informations qualitatives et quantitatives dans le cadre d'analyses.

Par ailleurs, cette méthode est parfois utilisée pour effectuer des dépôts électrochimiques car elle présente l'avantage de garantir une durée de dépôt identique pour chacun d'entre eux du fait de l'imposition d'un courant et d'une charge constante. Cette voie est plutôt adaptée pour les dépôts où la valeur du potentiel ne joue pas un rôle majeur, l'importance étant que le potentiel de réduction ou d'oxydation soit atteint.

Dans le cadre de cette thèse, la chronopotentiométrie à courant constant a été utilisée pour effectuer les dépôts de polymères conducteurs dopés de type polyéthylènedioxythiophène (PEDOT) et polypyrrole (PPy) dans le cadre de la réalisation d'électrodes spécifiques ioniques sensibles aux ions nitrates.

II. 3. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une technique très utilisée pour l'étude des mécanismes réactionnels qui se déroulent à une interface électrode | électrolyte. Elle consiste à étudier la réponse d'un système en fonction de la fréquence d'un signal perturbateur de faible amplitude. Les phénomènes rapides se produisent à hautes fréquences tandis que les phénomènes lents ont lieu à basses fréquences. Cette technique permet alors de déterminer les paramètres constituant le processus électrochimique (transport de matière, transfert de charge, adsorption et désorption...)

En pratique, elle consiste à appliquer un signal sinusoïdal ΔE (V) de pulsation ω (définie pour chaque fréquence par $\omega = 2\pi f$ (rad.s⁻¹)) et de faible amplitude autour d'un potentiel donné E_0 . Le signal obtenu en réponse ΔI (A) est alors une sinusoïde de même fréquence mais avec un décalage de phase φ exprimé en degrés par rapport au potentiel imposé.

L'impédance est alors définie comme une fonction de transfert résultant du rapport entre le signal de perturbation $\Delta E(\omega)$ et la réponse associée en courant $\Delta I(\omega)$. La théorie démontre alors que l'impédance est représentée par un nombre complexe selon la relation suivante :

$$Z(\omega) = \frac{|\Delta E| \exp(j\omega t)}{|\Delta I| \exp(j(\omega t - \varphi))} = |Z| \exp(j\varphi)$$

Ce nombre complexe peut également se décomposer en partie réelle et partie imaginaire tel que :

$$Z(\omega) = Z_r(\omega) + jZ_i(\omega)$$

Et de cette manière sont alors définis le module et la phase qui seront utilisés pour tracer les graphiques couramment tracés dans l'emploi de cette méthode :

$$|Z| = \sqrt{Z_r^2 + Z_j^2}$$

$$\varphi = \tan^{-1}\left(\frac{Z_j}{Z_r}\right)$$

Deux types de graphiques sont alors usuellement utilisés :

- **Le diagramme de Nyquist** qui représente la partie imaginaire de l'impédance en fonction de sa partie réelle (fig. 2.7a)
- **Le diagramme de Bode** qui se décompose en réalité en deux graphiques à savoir d'une part le module de l'impédance en fonction de la fréquence et d'autre part la phase en fonction de la fréquence (fig. 2.7b)

A l'interface entre un matériau d'électrode et un électrolyte, une accumulation de charge se produit à la surface de l'électrode : c'est la double-couche électrique. Cette dernière est assimilable à un condensateur électrique de capacité C_{dc} . Dans certains cas, cette capacité peut être associée à une résistance R correspondant à un transfert de charge (cas d'une réaction électrochimique) ou au transfert ionique (cas d'une couche).

La spectroscopie d'impédance électrochimique est alors souvent utilisée dans le cadre de développement de matériaux pour déterminer la capacité de cette double-couche qui est inversement proportionnelle à la valeur de l'impédance telle que :

$$Z(\omega) = R_t + \frac{1}{jC_{dc}\omega}$$

avec Z l'impédance, R_t la résistance (ohm) et C_{dc} la capacité de double couche (F).

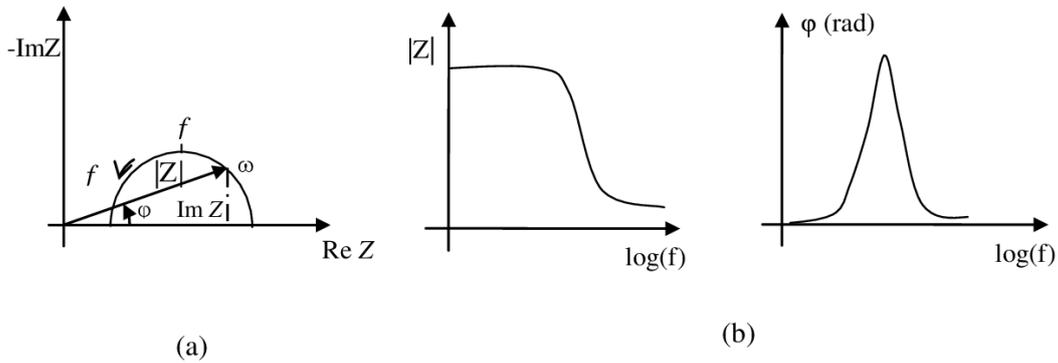


Figure 2.7 : Représentation schématique des diagrammes de (a) Nyquist et (b) Bode en SIE [18]

Dans le cadre de cette thèse, la spectroscopie d'impédance électrochimique a été utilisée pour caractériser les dépôts de couche de transduction à base de polymères dopés dans le cadre du développement d'électrodes spécifiques ioniques sensibles aux ions nitrates afin de rendre compte de l'éventuelle augmentation de la capacité de double-couche.

III. « ElecCell » une cellule électrochimique miniaturisée

L'essor des microélectrodes associé au développement de procédés technologiques issus de la microélectronique a permis le développement de capteurs miniaturisés de manière aisée et maîtrisée. De plus, la fabrication collective permet la diminution des coûts de production. Ainsi, certains procédés ont été développés de manière générique, c'est le cas de la microcellule électrochimique à trois électrodes nommée « ElecCell » utilisée dans le cadre de ce projet.

La fabrication d'un tel dispositif repose sur trois éléments que sont le substrat, les matériaux d'électrodes et les différentes techniques utilisées pour sa mise en œuvre.

III. 1. Conception et géométrie

La puce « ElecCell », fabriquée collectivement sur une puce silicium (dimensions typiques : de 5 x 6 à 10 x 11 mm²), consiste en une cellule électrochimique à trois électrodes qui sont (fig. 2.8) :

- l'électrode de travail, un réseau de 25 UME (5 x 5) interconnectées en platine et fonctionnalisable post-process pour le type de détection souhaitée,
- l'électrode de quasi-référence, une électrode concentrique en argent oxydée post-process par du chlorure d'argent de manière à obtenir une électrode Ag/AgCl,
- la contre-électrode ou électrode auxiliaire, une électrode également concentrique en platine.

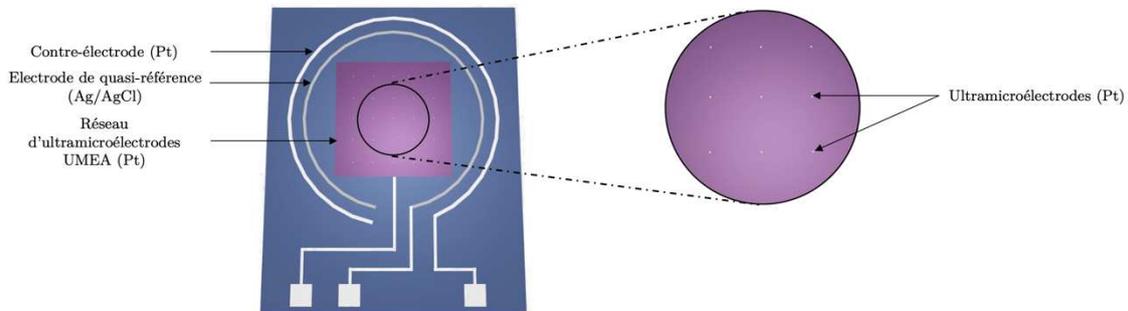


Figure 2.8 : Schéma de la géométrie du microcapteur "ElecCell"

La géométrie adoptée a été choisie suite aux travaux antérieurs menés au sein de l'équipe ayant démontré les avantages à la fois de l'utilisation d'un réseau plutôt que d'une électrode de travail seule mais également de la disposition concentrique des électrodes de quasi-référence et auxiliaire autour de ce réseau [19,20]. Les avantages du réseau d'UME ont été préalablement présentés et l'adoption d'une géométrie concentrique permet une meilleure symétrie et homogénéité des lignes de champs.

Le réseau d'UME (UMEA pour « *UltraMicroElectrodes Array* » en anglais) est donc constitué de 25 UME (5 x 5) de 5 µm de rayon chacune et séparées d'une distance de 500 µm afin de s'assurer du non-recouvrement des profils de diffusion comme expliqué précédemment. Bien que dans la littérature, certains travaux rapportent qu'une distance de 33 fois [21], voire 10 fois [22,23] la taille du diamètre serait suffisante, il a été décidé ici de prendre une très large distance inter-électrodes étant donné qu'il n'y avait pas de réelles limitations de taille du capteur. Finalement, la surface de l'UMEA est approximativement de 2.10³ µm².

Les électrodes de quasi-référence et auxiliaire ont quant à elles des surfaces respectivement de $6.10^5 \mu\text{m}^2$ et $7.10^5 \mu\text{m}^2$, soit plus de 300 fois supérieure à la surface de l'UMEA afin que le courant ne soit pas limité par la surface de la contre-électrode.

III. 2. Microfabrication

La fabrication de ce capteur a été réalisée en salle blanche via des outils et des méthodes de microtechnologie. Le procédé mis en œuvre se décompose en plusieurs étapes qui sont décrites ici de la préparation du substrat à la formation des microélectrodes en couches minces.

III.2.1. Préparation du substrat

III.2.1.i Nettoyage du substrat

Les capteurs sont réalisés sur des substrats de silicium de taille 4 pouces et d'épaisseur $525 \mu\text{m}$. Le silicium constitue ainsi le support mécanique du capteur. Il s'agit de substrats de type P à orientation cristallographique (100) car ils sont peu coûteux et compatibles avec de nombreux procédés. La première étape consiste à effectuer une étape de nettoyage afin de retirer toutes les éventuelles impuretés de surface. Pour cela, les substrats sont placés dans une solution d'acide sulfurique concentré (96%) et de peroxyde d'hydrogène (30%) à volumes équivalents. De cette manière, une fine couche d'oxyde se forme à la surface du silicium. Par la suite, ils sont immergés dans une solution d'acide fluorhydrique (10%) de sorte à retirer à la fois la couche d'oxyde formée à l'étape précédents ainsi que toutes les impuretés.

III.2.1.i Oxydation du silicium

Le silicium étant un semi-conducteur, la première étape est de l'isoler électriquement en formant une couche diélectrique à sa surface. Cela permet d'isoler les électrodes entre elles mais également du substrat qui sinon pourrait réagir avec le milieu d'étude. Pour se faire, le silicium est placé sous oxygène à haute température ($1070 \text{ }^\circ\text{C}$) afin d'obtenir la croissance thermique d'un film d'oxyde de silicium SiO_2 d'environ $1 \mu\text{m}$, épaisseur suffisante pour garantir l'isolation électrique du silicium.

III.2.1. Formation des électrodes

La structuration des différentes électrodes (travail, référence et auxiliaire) ainsi que des pistes et des plots de contacts a été réalisée par photolithographie en utilisant successivement les étapes suivantes [24] :

- dépôt de résine photosensible,
- insolation UV à travers un masque adapté,

- développement de cette résine de sorte à éliminer la résine insolée (dans le cas d'une résine positive) ou non-insolée (dans le cas d'une résine négative) et ainsi créer les motifs,
- métallisation consistant à déposer le métal par dépôt physique en phase vapeur (PVD pour « *Physical Vapor Deposition* » en anglais) ou dépôt chimique en phase vapeur (CVD pour « *Chemical Vapor Deposition* » en anglais),
- procédé « lift-off » consistant à dissoudre la résine dans une solution décapante et ainsi éliminer le métal hors des zones d'intérêt (soit sur la résine restante hors des motifs préalablement formés).

La première étape du procédé consiste à déposer une couche de titane (Ti, 20 nm) et une couche de platine (Pt, 200 nm) construisant ainsi les électrodes, les pistes et les plots de contact. La fine couche de titane de 20 nm sert de couche d'accroche pour le platine car ce dernier ne présente pas une excellente adhésion sur l'oxyde de silicium SiO_2 .

Pour cela les motifs sont tout d'abord réalisés via un procédé dit bicouche. Une première résine (LOR 3A) est déposée par spin-coating à la surface du substrat, celle-ci n'est pas photosensible mais peut être dissoute dans la solution de développeur utilisée. Par-dessus, une seconde résine (AZ NLOF), cette fois-ci photosensible, est déposée. Il s'agit d'une résine négative, ce qui signifie que seuls les endroits où la résine a été insolée aux UV resteront après passage dans la solution de développeur. L'utilisation du procédé bicouche permet d'obtenir une meilleure définition des motifs.

Une fois les motifs réalisés, les métallisations de titane puis de platine sont réalisés par PVD. Enfin, un lift-off est réalisé consistant à éliminer la résine restante ainsi que le métal qui s'est déposée au-dessus. Cela permet donc d'obtenir les trois électrodes ainsi que les pistes et les plots de contact.

La seconde étape consiste à former la couche d'argent afin de réaliser l'électrode de quasi-référence. Le processus mis en œuvre est identique à celui décrit précédemment pour le dépôt de titane/platine. La métallisation est menée de sorte à obtenir une couche de 400 nm d'argent (Ag). L'argent est déposé par-dessus le platine afin d'éviter la possible diffusion du titane dans la couche d'argent pouvant conduire à des problèmes de stabilité de l'électrode. Le platine sert donc maintenant ici de couche barrière. Il est important de noter que l'argent est très sensible aux hautes températures ou au plasma oxygène. Ainsi, une fois cette étape effectuée, plus aucun de ces traitements ne peuvent être effectués.

La dernière étape consiste à déposer une couche de passivation en nitrure de silicium Si_3N_4 partout excepté au niveau des électrodes et des plots de contact. La couche de passivation permet par ailleurs de définir précisément la surface active des UME, paramètre essentiel pour la fonctionnalisation post-process étant donné que la quantité d'espèce oxydée ou réduite à l'électrode est proportionnelle à la surface.

Cette couche de nitrure de silicium de 200 nm est déposée par un procédé à basse température par dépôt chimique en phase vapeur avec plasma à couplage inductif (ICP-CVD pour « *Inductively Coupled Plasma - Chemical Vapor Deposition* » en anglais). Cette procédure permet un dépôt de haute qualité et entraîne un dépôt y compris sur les parties latérales des couches métalliques sans discontinuités. Cela peut rendre le lift-off plus complexe, c'est pourquoi une procédure de lift-off double-couche spécifique est utilisée. Cette fois-ci, la LOR 3A est utilisée surmontée d'AZ ECI 3012, une résine positive. Ainsi, avec la création d'un profil de résine en forme de « T », le nitrure de silicium ne se dépose pas sur la partie inférieure, ce qui permet au lift-off d'être réalisé plus facilement [25].

L'ensemble des étapes du procédé de microfabrication sont représentées en vue de coupe sur la figure 2.9.

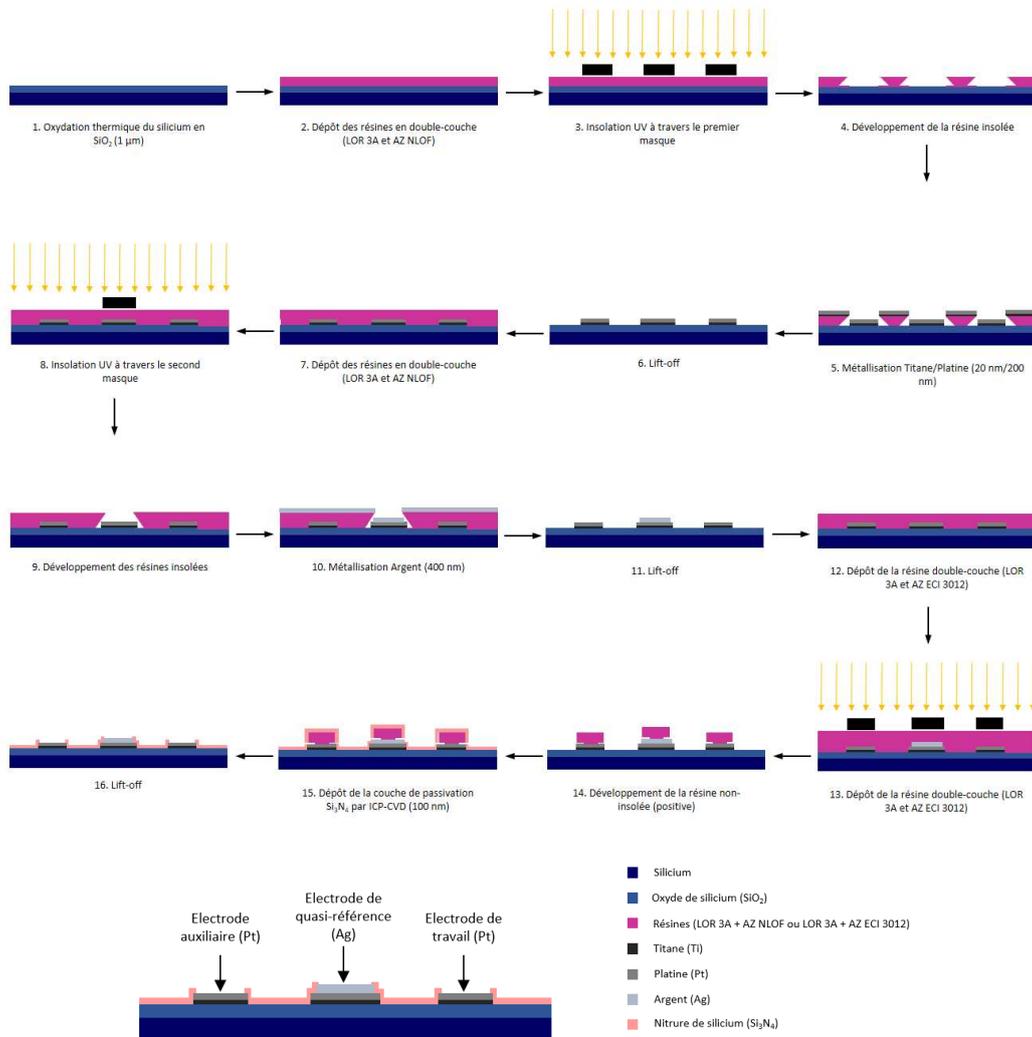


Figure 2.9 : Schéma des étapes du procédé photolithographique de la microfabrication "ElecCell"

En vue des différents procédés de conditionnement/encapsulation (« *Packaging* » en anglais), deux tailles de capteurs ont été réalisées. Dans les deux cas, les tailles des électrodes sont toutes identiques, seule la partie externe en silicium est de taille plus (10 x 11 mm²) ou moins (5 x 6 mm²) importante (fig. 2.10) et les pistes conduisant aux plots de contact sont plus ou moins longues. Ces différences n'induisent donc pas de modifications quant aux performances des capteurs.

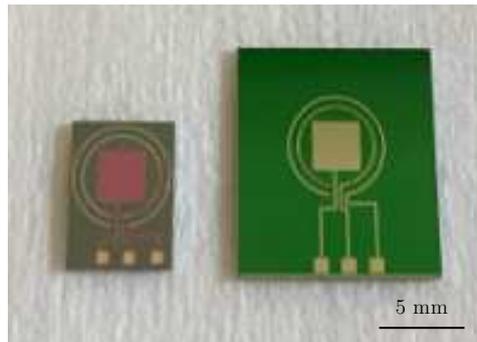


Figure 2.10 : Photographie des capteurs ElecCell réalisés en deux tailles différentes pour (a) le packaging bâtonnets des pré-tests et (b) le packaging disque de l'application finale

L'un des gros avantages de la microtechnologie est également la fabrication des capteurs en masse. Sur un seul substrat silicium, il est ainsi possible de réaliser 152 capteurs « 5 x 6 mm² » ou 46 capteurs « 10 x 11 mm² » en un seul process (fig. 2.11).

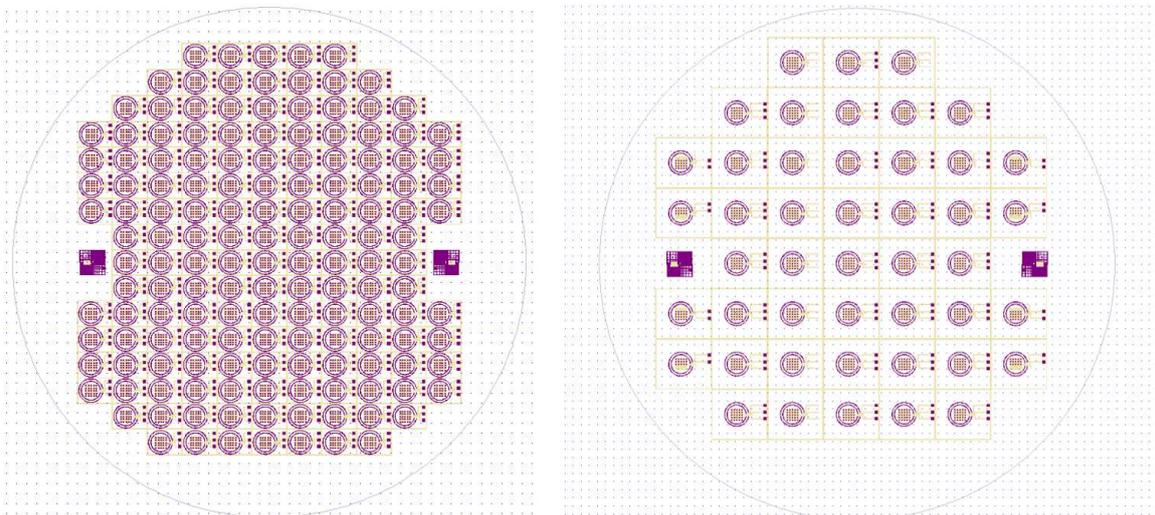


Figure 2.11 : Schéma des deux tailles de capteurs sur un substrat de silicium

III. 3. Différents packagings

Après la fabrication et pour pouvoir être utilisés, les capteurs doivent être montés et connectés sur des plateformes adaptées. Dans le cadre de ces travaux, deux types de packagings ont été utilisés : l'un pour les pré-tests et l'autre en vue de l'application finale.

III.3.1. Bâtonnets pour les pré-tests

En vue des pré-tests et afin de simplifier la réalisation des expérimentations, il a été décidé de monter les capteurs sur circuits imprimés (PCB pour « *Printed Circuit Boards* » en anglais). Pour cela, des micro-soudures par fils d'or ont été réalisées entre le plot de contact et le PCB puis encapsuler par un « glob-top » en silicone de sorte à assurer la protection et la tenue mécanique des soudures ainsi que d'éviter les court-circuits. Ce packaging « bâtonnet » a été utilisé dans la majorité des tests effectués au cours de cette thèse permettant alors de plonger directement dans un contenant type béccher et de récupérer facilement les contacts par le haut du circuit imprimé (fig. 2.12).

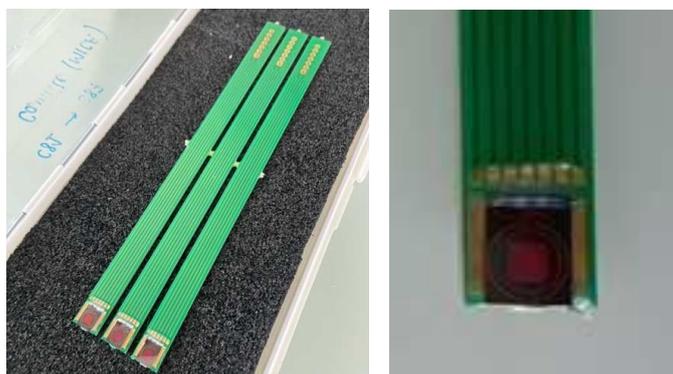


Figure 2.12 : Photographies des capteurs montés sur PCB bâtonnets en vue des pré-tests

III.3.2. Disques pour l'application finale

Comme mentionné dans le chapitre 1, l'objectif final du projet est de produire un laboratoire sur disque intégrable sur un appareil de terrain. Les capteurs doivent donc être intégrés sur un disque. Initialement, ces disques en copolymère oléfine cyclique (COC) devaient être réalisés par l'INL. De tous premiers prototypes (fig. 2.13) avaient été réalisés par micro-usinage de canaux microfluidique adaptables à différents mélanges d'échantillons et d'un total de 27 cuves de 85 μL prêtes à accueillir les capteurs électrochimiques ou à être simplement refermées dans le but de pouvoir réaliser des mesures optiques. De premières tentatives d'intégration des capteurs électrochimiques avaient été effectuées, malheureusement, ces prototypes n'ont pas pu être aboutis avant la fin de ces travaux de thèse et aucune mesure n'a pu être réalisée avec.



Figure 2.13 : Photographie des capteurs montés sur disque en vue de l'application finale

Afin tout de même de se rapprocher de l'application finale en fin de thèse, un disque a été réalisé au LAAS par d'autres méthodes. Le prototype réalisé présente 21 cuves dont 15 sont prévues pour accueillir les capteurs électrochimiques et 6 sont prévues pour effectuer de la détection optique de fluorescence algale (fig. 2.14). Les cuves ont été réalisées en formant des ouvertures par gravure laser dans un des disques. La cavité est fermée d'un côté par le second disque et de l'autre côté soit par un capot (également en PMMA) de sorte à obtenir une profondeur de cuve suffisamment importante, soit, dans le cas des mesures électrochimiques par le capteur silicium en lui-même. Entre les deux disques, des canaux microfluidiques sont réalisés à l'aide de double-face découpé, ce qui permet l'amenée des fluides de la même manière que ce qui était prévu pour le prototype initial. La forme des canaux est bien évidemment adaptable suivant si des mélanges sont souhaités tels que des dilutions d'échantillon.

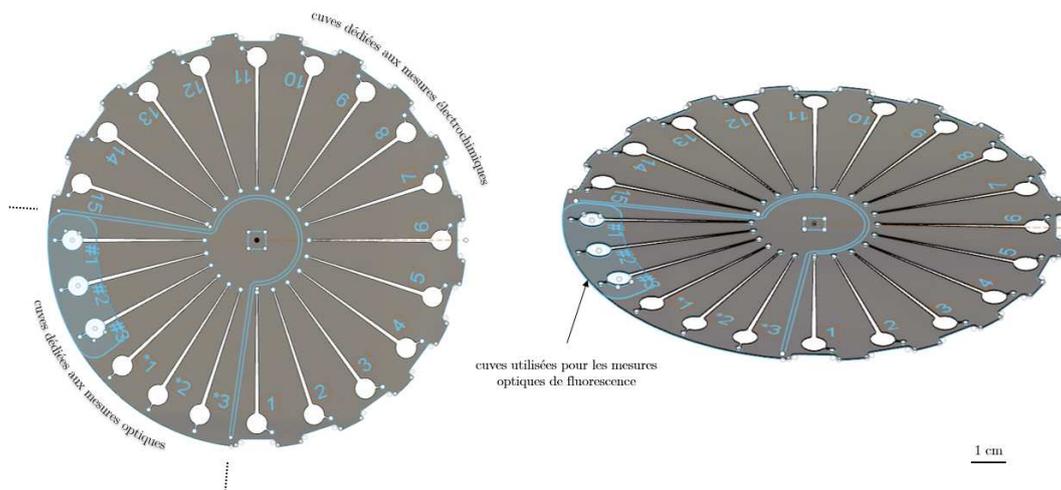


Figure 2.14 : Schéma 3D des disques réalisés au LAAS en vue de s'approcher de l'application finale

Ce prototype ayant été réalisé en toute fin de thèse, il n'a été utilisé que pour les mesures optiques de fluorescence. Les capteurs électrochimiques sont actuellement en cours d'intégration afin de faire face à certaines problématiques d'étanchéité.

III. 4. Validation du microcapteur

Une fois les capteurs réalisés et montés, la première étape est de tester chacune des électrodes afin de s'assurer qu'elles soient toutes bien fonctionnelles. Pour cela, des caractérisations par voltammétrie cyclique ont été réalisées. Il a fallu également dans un second temps former l'électrode de quasi-référence en oxydant l'argent en chlorure d'argent afin d'avoir un capteur totalement intégré pour pouvoir procéder par la suite à la fonctionnalisation de l'UMEA de travail en fonction des différents types de détections qui seront présentés dans les chapitres suivants.

III.4.1. L'électrode de travail (UMEA)

Comme mentionné précédemment, l'électrode de travail est un réseau de 25 ultramicroélectrodes (5 x 5) interconnectées. Afin de s'assurer que les électrodes étaient bien ouvertes à la suite du procédé photolithographique, des voltammétries cycliques dans l'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ont été tracées entre $-0,2$ et $1,4 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$. En effet, le platine présente en milieu sulfurique une signature caractéristique en voltammétrie cyclique (fig. 2.15). Ainsi il est possible par cette méthode de s'assurer de la conformité des électrodes.

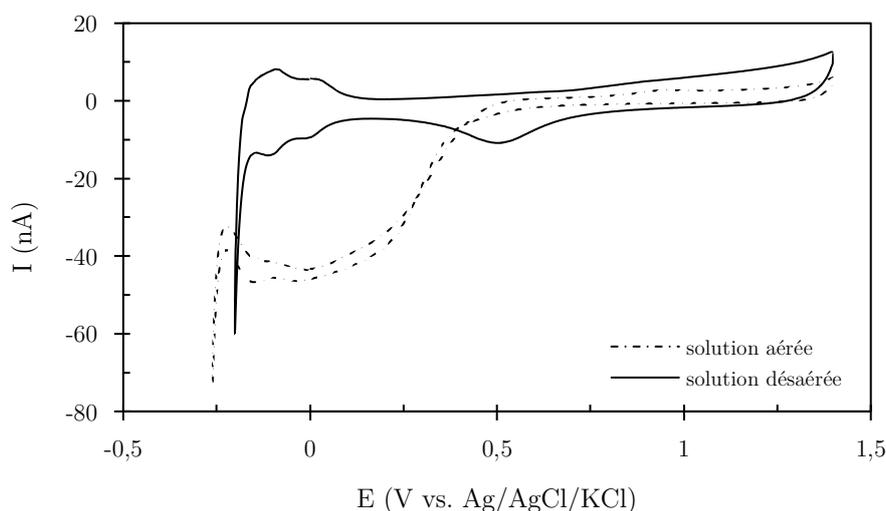


Figure 2.15 : Voltammétries cycliques réalisées sur UMEA en platine dans une solution d' H_2SO_4 à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ à une vitesse de balayage de 200 mV/s avec et sans désaération

En solution désaérée (bullage d'azote pendant 15 minutes dans la solution), la courbe montre un comportement de l'électrode caractéristique du platine tout comme celle observée sur des macroélectrodes type fil de platine classiquement utilisée. Autour de 0,6 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} en oxydation, la formation des oxydes de platine se traduit par une vague suivie, lors du scan retour, par un pic autour de 0,5 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} traduisant la réduction des oxydes préalablement formés. Enfin, les pics en réduction puis en oxydation entre 0,1 et -0,2 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} correspondent aux phénomènes d'adsorption et désorption des protons.

Sans désaération, une importante vague est détectée en réduction à partir de 0,5 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}. Cette vague n'apparaissant pas en solution désaérée, elle traduit le fait que l'UMEA détecte le courant de réduction de l'oxygène. Ce courant est négligeable dans le cas d'électrode de taille plus importante (macroélectrode) et n'apparaît donc pas sur les tracés voltammétriques habituels.

Dans un second temps, il a été nécessaire de s'assurer de la surface active des électrodes. Dans un premier temps, des observations au microscope optique ainsi qu'au microscope électronique à balayage ont permis de mesurer la surface apparente des électrodes (fig. 2.16). Alors que les masques utilisés lors de la photolithographie prévoyaient des UME de 5 µm de rayon, les images révèlent un rayon plus petit de 3,6 µm environ. Cette différence peut s'expliquer par la résolution limitée des équipements d'alignement utilisés lors de la formation des motifs par insolation UV de la résine au cours du procédé de microfabrication en salle blanche.

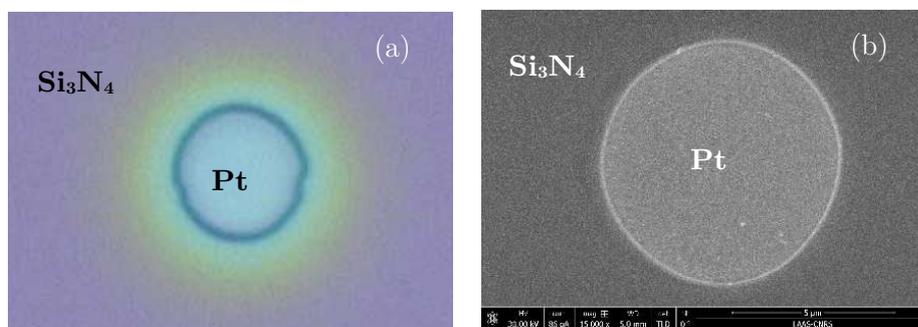


Figure 2.16 : Image (a) au microscope optique et (b) au microscope électronique à balayage d'une électrode de l'UMEA

Par la suite, la surface électroactive a été mesurée par électrochimie à l'aide d'une méthode classiquement utilisée qui consiste à effectuer une voltammétrie linéaire à 10 mV/s dans une solution de ferrocène-méthanol (FcMeOH) à 1.10^{-3} mol.L⁻¹. Sur microélectrode, le voltammogramme obtenu présente une vague dont la hauteur est directement proportionnelle à la surface de l'UMEA (et donc au rayon de chaque UME) selon l'équation de Saito :

$$I_{\text{lim}} = 4nFDC_{\text{sol}}r_dz$$

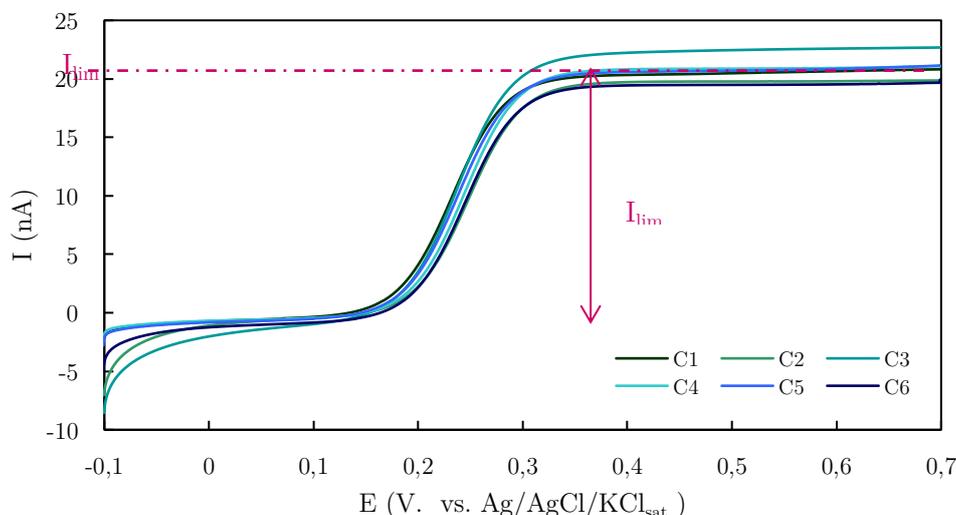


Figure 2.17 : Voltammétrie linéaire sur l'UMEA en platine dans FcMeOH à 1.10^{-3} mol.L⁻¹ à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} pour différents capteurs

Les courbes obtenues (fig. 2.17) ont permis de mesurer le courant limite pour différents capteurs et d'en déduire les rayons correspondants en sachant que $D_{FcMeOH} = 7,8.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats sont reportés dans le tableau 2.1 et montrent que le rayon moyen de chaque UME du réseau est de $2,8 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{m}$. Cette valeur de rayon moyen inférieure à celui mesuré par les observations au microscope électronique à balayage s'explique par le nécessaire débordement de la couche de passivation en nitrure de silicium sur les bords de l'électrode lors du procédé photolithographique. Cette différence de rayon n'est pas bloquante, l'important étant de connaître sa valeur pour adapter les procédés de dépôts électrochimiques qui seront utilisés pour fonctionnaliser l'UMEA dans le cadre des diverses détections (cf. chapitres 3 et 4).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
I_{lim} (nA)	205	198	225	209	207	195
r_{UME} (μm)	2,72	2,63	2,99	2,77	2,59	2,75

Tableau 2.1 : Valeurs de courant mesurés en voltammétrie linéaire dans FcMeOH et rayon d'UME correspondant pour différents capteurs

En conclusion, les résultats obtenus lors de la caractérisation de l'UMEA en platine assurent une bonne conformité. Ce dernier pourra donc être fonctionnalisé par la suite pour les détections souhaitées à savoir détection de l'oxygène dissous, du pH et des ions nitrates.

III.4.2. La contre-électrode

Tout comme l'UMEA de travail, la contre-électrode est en platine. Ainsi, de la même façon, une voltammétrie cyclique dans l'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ a été réalisée de sorte à observer la signature caractéristique du platine. Les résultats montrent (fig. 2.18), comme pour l'UMEA, une bonne conformité de l'électrode de platine.

La surface d'électrode étant largement plus importante que celle de l'UMEA, le courant mesuré est plus grand. De ce fait, le phénomène de réduction n'est pas observable et il n'est pas nécessaire de désaérer la solution. Afin de s'assurer de la surface de la contre-électrode, en sachant que le rapport des surfaces d'électrodes (UMEA et contre-électrode) doit être équivalent au rapport des valeurs de courant obtenus pour le pic de réduction des oxydes de platine observé à $0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$, la surface de la contre électrode a pu être calculée simplement par la relation suivante :

$$S_{CE} = S_{UMEA} * \frac{I_{CE}^{red}}{I_{UMEA}^{red}}$$

avec S_{CE} la surface de la contre-électrode (m^2), S_{UMEA} la surface de l'UMEA (m^2), I_{CE}^{red} le courant du pic de réduction des oxydes de platine sur la contre-électrode (nA) et I_{UMEA}^{red} le courant du pic de réduction des oxydes de platine sur l'UMEA (nA).

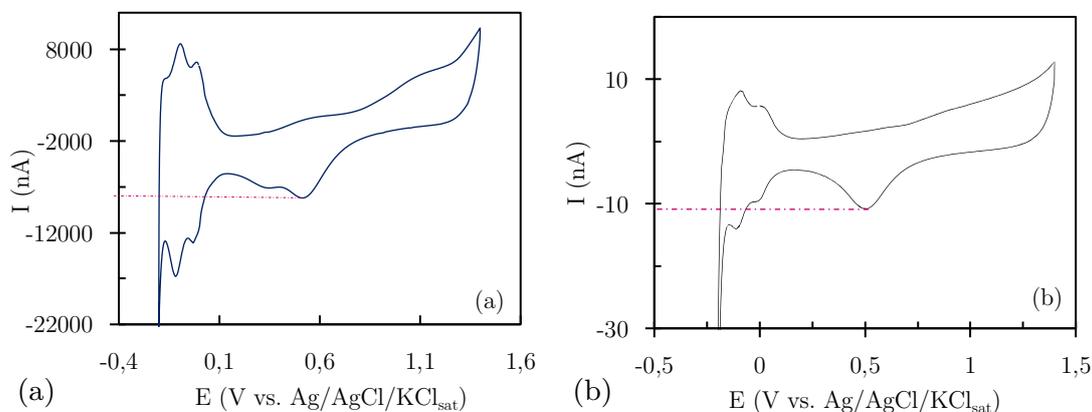


Figure 2.18 : Voltammétries cycliques sur (a) la contre-électrode en Pt et (b) l'UMEA de travail en platine dans H_2SO_4 $0,5 \text{ M}$ à une vitesse de balayage de 200 mV.s^{-1}

Ainsi, la surface de la contre-électrode calculée est d'environ $6,9.10^5 \text{ } \mu\text{m}^2$ ce qui correspond à la valeur prévue par les masques de photolithographie à savoir $7.10^5 \text{ } \mu\text{m}^2$. Ces résultats démontrent donc que la contre-électrode est bien fonctionnelle.

III.4.3. L'électrode de quasi-référence

A la fin du procédé photolithographique, l'électrode censée être l'électrode de quasi-référence n'est qu'une simple électrode en argent. Il est alors nécessaire de l'oxyder afin de former du chlorure d'argent à sa surface et ainsi obtenir une électrode de type Ag/AgCl.

Dans un premier temps, une voltammétrie cyclique dans une solution de nitrate de potassium (KNO_3) à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ est effectuée entre $-1,1$ et $0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ durant deux cycles. Cette étape permet à la fois de s'assurer que l'électrode d'argent est fonctionnelle mais également de retirer les éventuelles impuretés à sa surface. Un grand nombre de cycles peut altérer la surface de l'argent et deux cycles suffisent à l'obtention d'un voltammogramme conforme et semblable à celui obtenu sur électrode d'argent macroscopique (fig. 2.19). Contrairement au platine, les voltammétries cycliques ne sont ici pas effectuées dans l'acide sulfurique afin d'éviter la formation de sulfate d'argent Ag_2SO_4 .

Les phénomènes caractéristiques visibles sur les voltammogrammes sont l'oxydation de l'argent sous forme d'une augmentation exponentielle du courant à partir de $0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ ainsi que la réduction du proton à partir de $-0,7 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$.

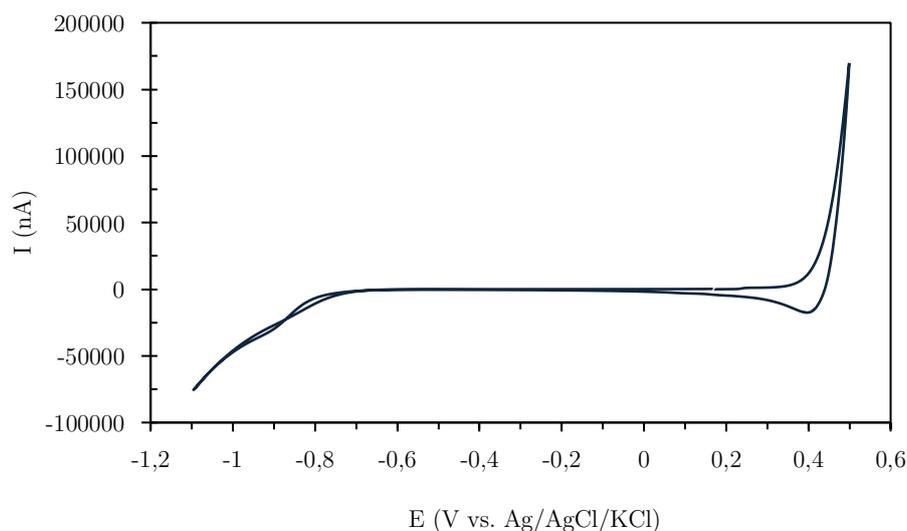


Figure 2.19 : Voltammétrie cyclique sur l'électrode d'argent du capteur dans une solution de KNO_3 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1}

Des images au microscope électronique à balayage ont également été réalisées avant et après nettoyage électrochimique de l'argent. Les images montrent une surface plus claire de l'argent après nettoyage traduisant moins d'impuretés à sa surface (fig. 2.20).

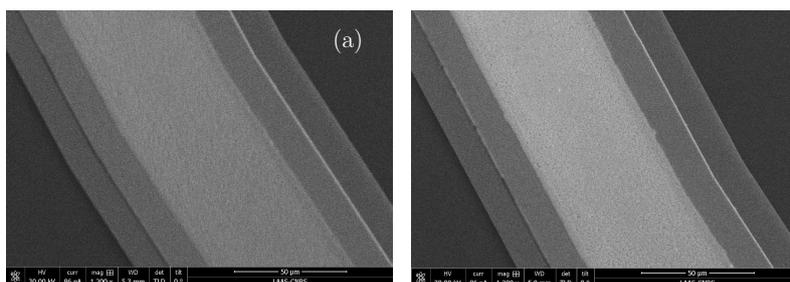


Figure 2.20 : Images MEB de l'électrode d'argent du capteur ElecCell (a) avant nettoyage électrochimique et (b) après

Ensuite, la seconde étape consiste à oxyder l'argent par voltammétrie linéaire dans une solution de chlorure de potassium (KCl) à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de 0 à $0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ à une vitesse de 1 mV.s^{-1} . Cette méthode d'oxydation à vitesse lente permet l'obtention d'une structure Ag/AgCl stable et homogène. Des images ont été réalisées au microscope électronique à balayage afin de s'assurer de la présence de chlorure d'argent à la surface de l'électrode. Les images montrent bien la présence de cristaux de sel après le dépôt (fig. 2.21).

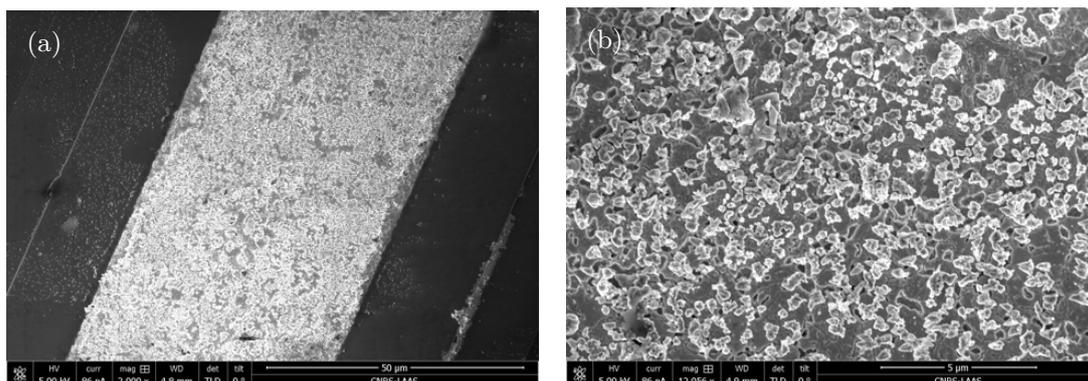


Figure 2.21 : Images MEB de l'électrode d'argent après oxydation en chlorure d'argent

Une fois l'électrode de quasi-référence réalisée, elle a été testée dans une solution de tampon phosphate à $\text{pH} = 7$ pendant 24 heures afin de s'assurer de sa stabilité tout en sachant que les mesures prévues n'excéderont pas les 10 minutes. Les résultats montrent que l'électrode reste stable. Une légère dérive linéaire de $-0,06 \text{ mV/min}$ est observée ce qui reste très acceptable au vu des temps de mesures prévus (fig. 2.22). Ces résultats sont en accord avec la bibliographie [26].

Néanmoins, il est important de noter que les capteurs ont été réalisés en masse en début de travaux de thèse puis utilisés au fur et à mesure. La fine couche d'argent s'est oxydée naturellement au cours du temps et il n'a pas été possible de la faire revenir totalement à son état initial lors de cette étude menée sur l'électrode de quasi-référence. Cela a rendu l'oxydation dans KCl plus ou moins homogène et uniforme ce qui peut expliquer l'importante

dérive observée. Cette dérive pourrait être amoindrie d'une part en effectuant l'oxydation directement après la microfabrication des capteurs.

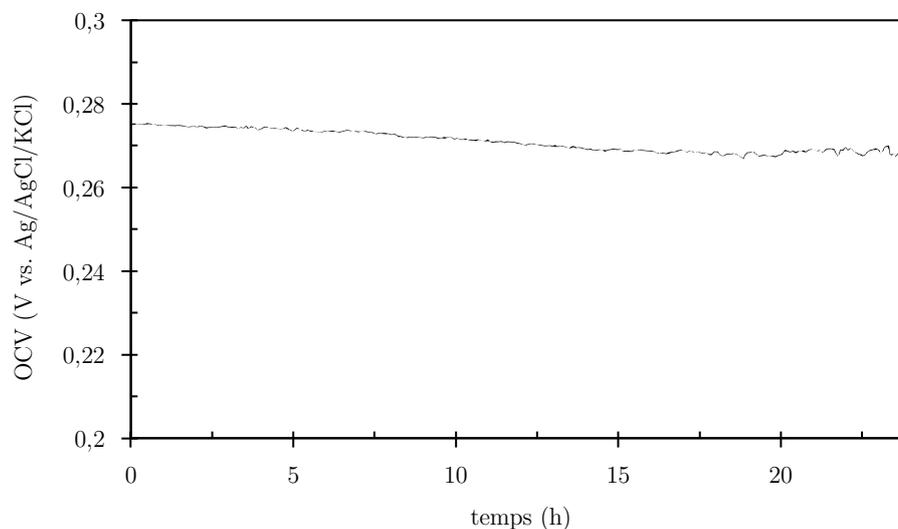


Figure 2.22 : Évolution du potentiel en circuit ouvert en fonction du temps dans une solution de tampon phosphate (pH = 7) pour une électrode de quasi-référence Ag/AgCl du capteur ElecCell

IV. Conclusion

En conclusion, ce chapitre a présenté les différentes méthodes électrochimiques qui seront utilisées à la fois pour la fonctionnalisation, la caractérisation et la validation des microcapteurs électrochimiques du projet. Il a également présenté la conception et le procédé microtechnologique de fabrication du microcapteur « ElecCell ».

Ce microcapteur comprend trois électrodes miniaturisées sur puce démontrées fonctionnelles qui sont : une électrode de travail mise sous la forme d'un réseau d'ultramicroélectrodes et qui sera fonctionnalisée en fonction du type de détection souhaitée (cf. chapitre 3 et 4), une électrode de quasi-référence Ag/AgCl qui a démontré de bonnes performances en termes de stabilité pour l'application visée et enfin une contre électrode en platine.

Les capteurs peuvent être produits en quantité, à moindre coûts et avec une très bonne reproductibilité tout en profitant de tous les avantages de la miniaturisation.

Bibliographie

- [1] Volta, A. XVII. On the Electricity Excited by the Mere Contact of Conducting Substances of Different Kinds. In a Letter from Mr. Alexander Volta, FRS Professor of Natural Philosophy in the University of Pavia, to the Rt. Hon. Sir Joseph Banks, Bart. KBPR S. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **1800**, 403–431.
- [2] Alessandro Volta (1745-1827), l'inventeur de la pile électrique ! <https://sciencepost.fr/alessandro-volta-1745-1827-linventeur-de-la-pile-electrique/> (accessed Jul 18, 2023).
- [3] Il y a 70 ans, naissait le transistor <https://www.elektormagazine.fr/news/il-y-a-70-ans-naissait-le-transistor> (accessed Jul 18, 2023).
- [4] Bardeen, J.; Brattain, W.H. The Transistor, a Semi-Conductor Triode. *Physical Review*, **1948**, *74*, 230.
- [5] L'évolution de l'électrochimie : de la pile de Volta aux nanotechnologies - p10 - N°327-328 - L'Actualité Chimique, le journal de la SCF <https://new.societechimiquedefrance.fr/numero/levolution-de-lelectrochimie-de-la-pile-de-volta-aux-nanotechnologies-p10-n327-328/> (accessed Jul 17, 2023).
- [6] ROUAHNA, Y. CROISSANCE ET CARACTÉRISATION DES FILMS DE NICKEL OBTENUS PAR ELECTRODEPOSITION. masters, Université Mohamed Khider - Biskra, **2007**.
- [7] Cahill, P.S.; Walker, Q.D.; Finnegan, J.M.; Mickelson, G.E.; Travis, E.R.; Wightman, R.M. Microelectrodes for the Measurement of Catecholamines in Biological Systems. *Analytical chemistry*, **1996**, *68*, 3180–3186.
- [8] Bard, A.J.; Faulkner, L.R.; White, H.S. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, **2022**.
- [9] Aoki, K. Theory of Ultramicroelectrodes. *Electroanalysis*, **1993**, *5*, 627–639.
- [10] Rahman, M. In Situ Induction Heating of Electrodes and Applications In Situ Induction Heating of Electrodes and Applications. **2018**.
- [11] Voltampérométrie aux ultramicroélectrodes <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-techniques-d-analyse-tiata/archive-1/voltamperometrie-aux-ultramicroelectrodes-p2130/> (accessed Jul 25, 2023).
- [12] Saito, Y. A Theoretical Study on the Diffusion Current at the Stationary Electrodes of Circular and Narrow Band Types. *Review of Polarography*, **1968**, *15*, 177–187.
- [13] Gokhale, A.; Lu, J.; Lee, I. Recent Progress in the Development of Novel Nanostructured Biosensors for Detection of Waterborne Contaminants. In; **2013**; Vol. 19, pp. 1–34.
- [14] Forster, R.J. Microelectrodes: New Dimensions in Electrochemistry. *Chemical Society Reviews*, **1994**, *23*, 289–297.
- [15] Stulik, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W. Microelectrodes. Definitions, Characterization, and Applications (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **2000**, *72*, 1483–1492.
- [16] Huang, X.-J.; O'Mahony, A.M.; Compton, R.G. Microelectrode Arrays for Electrochemistry: Approaches to Fabrication. *Small*, **2009**, *5*, 776–788.

- [17] Davies, T.J.; Compton, R.G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular and Random Arrays of Microdisc Electrodes: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2005**, *585*, 63–82.
- [18] Ho, T.H. Etude de Matériaux Conducteurs Par Couplages de Mesures d'impédance Electrochimique, de Gravimétrie et d'angle de Contact.
- [19] Christophe, C. Intégration de Microcapteurs Electrochimiques En Technologies Silicium et Polymères Pour l'étude Du Stress Oxydant : Application à La Biochimie Cutanée. thesis, Toulouse 3, **2010**.
- [20] Tsopela, A.T. Development of a Lab-on-Chip Platform Integrating Electrochemical Microsensors for the Detection of Water Contaminants Based on Algal Physiology Monitoring. phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, **2015**.
- [21] Berduque, A.; Lanyon, Y.H.; Beni, V.; Herzog, G.; Watson, Y.E.; Rodgers, K.; Stam, F.; Alderman, J.; Arrigan, D.W.M. Voltammetric Characterisation of Silicon-Based Microelectrode Arrays and Their Application to Mercury-Free Stripping Voltammetry of Copper Ions. *Talanta*, **2007**, *71*, 1022–1030.
- [22] Wittkamp, M.; Cammann, K.; Amrein, M.; Reichelt, R. Characterization of Microelectrode Arrays by Means of Electrochemical and Surface Analysis Methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1997**, *40*, 79–84.
- [23] Gardner, R.D.; Zhou, A.; Zufelt, N.A. Development of a Microelectrode Array Sensing Platform for Combination Electrochemical and Spectrochemical Aqueous Ion Testing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2009**, *136*, 177–185.
- [24] Suzuki, H. Microfabrication of Chemical Sensors and Biosensors for Environmental Monitoring. *Materials Science and Engineering: C*, **2000**, *12*, 55–61.
- [25] Vanhove, E.; Tsopéla, A.; Bouscayrol, L.; Desmoulin, A.; Launay, J.; Temple-Boyer, P. Final Capping Passivation Layers for Long-Life Microsensors in Real Fluids. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2013**, *178*, 350–358.
- [26] Shinwari, M.W.; Zhitomirsky, D.; Deen, I.A.; Selvaganapathy, P.R.; Deen, M.J.; Landheer, D. Microfabricated Reference Electrodes and Their Biosensing Applications. *Sensors*, **2010**, *10*, 1679–1715.

Microcapteurs potentiométriques pour la mesure du pH et des ions nitrates

Sommaire

V. Introduction sur les capteurs potentiométriques

I. 1. Les électrodes métalliques

- I. 1. 1. Électrode de première espèce
- I. 1. 2. Électrode de seconde espèce
- I. 1. 2. Électrode de troisième espèce

I. 2. Les électrodes spécifiques à membrane

- I. 2. 1. Les ISE à membrane polymérique conventionnelle
- I. 2. 2. Les ISE à membrane polymérique "tout solide"

VI. La mesure du pH

II. 1. État de l'art sur les capteurs pH

- II. 1. 1. Les oxydes métalliques
- II. 1. 2. L'oxyde d'Iridium IrO₂

II. 2. Fonctionnalisation de l'UMEA : IrOx

- II. 2. 1. Protocole de dépôt
- II. 2. 2. Caractérisation du dépôt

II. 3. Mesures de pH et performances du capteur

- II. 3. 1. Sensibilité, stabilité et temps de réponse
- II. 3. 2. Hystérésis
- II. 3. 2. Dérive à long terme

II. 4. Conclusion sur la détection du pH

VII. La mesure des ions nitrates (NO₃⁻)

III. 1. État de l'art sur les capteurs d'ions nitrates

- III. 1. 1. Les capteurs ampérométriques
- III. 1. 2. Les capteurs potentiométriques

III. 2. Fonctionnalisation de l'UMEA : membrane nitrato-sensible

- III. 2. 1. Fabrication de la membrane
- III. 2. 2. Dépôt de la membrane

III. 3. Optimisation par ajout d'une couche de transduction

- III. 3. 1. Préparations des solutions et électrodépositions
- III. 3. 2. Caractérisations des dépôts

III. 4. Mesures d'ions nitrates et performances des capteurs

- III. 4. 1. Sensibilité, stabilité et temps de réponse
- III. 4. 2. Sélectivité
- III. 4. 2. Dérive à long terme
- III. 4. 2. Hystérésis

III. 5. Conclusion sur la détection des ions nitrates

VIII. Conclusion

I. Introduction sur les capteurs potentiométriques

Comme expliqué au chapitre 2, le principe de mesure d'un capteur potentiométrique repose sur un équilibre thermodynamique associé à des échanges réversibles au niveau de la structure de détection/transduction. Il est soit basé sur la mesure de la tension de seuil d'un transistor à effet de champ (ISFET), soit sur la mesure **à courant nul** de la différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de travail (combinée ou non). C'est le second cas qui sera développé ici. Ainsi, cette variation de potentiel est induite par la simple mise en contact du matériau d'électrode constitutif du capteur avec une ou des espèces du milieu à analyser. Un important avantage de ce type de capteur est qu'il ne consomme pas de matière et ne perturbe que très peu le milieu analysé.

Ce chapitre a pour but de présenter les deux capteurs potentiométriques qui ont été développés au cours de ce projet pour la détection *(i)* du pH et *(ii)* des ions nitrates. Ainsi, il se décompose en une partie introductive sur les différents types d'électrodes utilisées en potentiométrie, puis est suivi d'une partie sur la mesure du pH, et enfin d'une partie sur la détection des ions nitrates NO_3^- , toutes deux développant la mise en œuvre des capteurs, de leur fonctionnalisation à leur caractérisation en phase liquide.

I. 1. Les électrodes spécifiques métalliques

Certains capteurs potentiométriques reposent sur l'utilisation d'électrodes métalliques qui sont divisées en trois types et dites respectivement : de première, de seconde ou de troisième espèce.

I.1.1. Électrode de première espèce

Une électrode dite de première espèce est constituée d'un métal plongeant dans une solution de l'un de ses sels à l'exemple d'une électrode d'argent plongeant dans une solution de nitrate d'argent. Dans ce cas une réaction se produit à l'électrode entre le métal et son ion en solution, ce qui provoque la différence de potentiel mesurable.



Le gros désavantage de ces électrodes réside dans leur manque de sélectivité. En effet, le métal peut tout à fait réagir prioritairement avec d'autres ions en solutions.

I.1.2. Électrode de seconde espèce

Une électrode dite de seconde espèce est constituée d'un métal en contact avec l'un de ses sels peu solubles et plongeant dans une solution contenant un anion commun. Ce type d'électrode fait souvent office de référence électrochimique à l'exemple de l'électrode au calomel saturé ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$) ou de l'électrode au chlorure d'argent ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$).

I.1.3. Électrode de troisième espèce ou électrode inerte

Une électrode de troisième espèce est constituée d'un métal inerte (inattaquable) plongeant dans une solution contenant un couple oxydant/réducteur. Ce type d'électrode est alors sensible au pouvoir oxydant ou réducteur du couple considéré. Cependant, si plusieurs couples sont présents en solution, le potentiel de l'électrode sera à une valeur intermédiaire. Ce type d'électrode n'est donc pas non plus sélectif.

Ainsi, les électrodes métalliques, bien qu'elles trouvent certaines applications en potentiométrie, ne permettent pas aisément la détection d'une espèce en particulier tel qu'un ion spécifique. Pour atteindre un tel objectif, un autre type d'électrode a été développé, basé sur l'utilisation d'une membrane sélective.

I. 2. Les électrodes spécifiques à membranes

Il y a plus de 100 ans était introduite la notion de potentiel hydrogène d'une solution ou pH... Les premières mesures électriques de l'acidité des liquides ont débutées en 1906 avec les découvertes de Max Cremer [1], un biologiste ayant découvert la sensibilité aux ions hydrogène d'une fine membrane de verre soufflée.

Ce concept est repris trois ans plus tard par Fritz Haber [2] qui met alors au point en 1909 la plus connue et encore utilisée à ce jour des électrodes spécifiques : l'électrode de verre sensible au pH. Elle est composée d'une électrode, le plus souvent un fil d'argent recouvert par du chlorure d'argent, plongeant dans un liquide déterminé (le plus souvent de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L⁻¹), le tout contenu dans un tube en verre dont l'extrémité possède une épaisseur de l'ordre de 0,1 mm appelée membrane. Du fait de la différence de concentration en ion d'intérêt (ici l'ion hydronium), une réaction d'échange entre les ions sodium Na⁺ présents à la surface du verre et les ions hydronium H₃O⁺ de la solution à analyser va se produire. De cette manière, une différence de potentiel s'établit à travers cette membrane qui est mesurée en fonction d'une électrode de référence (Ag/AgCl/KCl ou ECS) dont le potentiel ne varie pas. Démonstré par la théorie, cette différence de potentiel établie suit alors une fonction logarithmique dépendant de la concentration en ions hydronium dans la solution selon la loi de Nernst (Chap. 2, II.2.1) telle que :

$$E = cste + \frac{RT}{zF} \ln(a_{H_3O^+}) = cste + \frac{2,3 RT}{F} \log(a_{H^+})$$

où E représente le potentiel de l'électrode (V) (différence de potentiel entre l'électrode de verre et l'électrode de référence), z la charge de l'ion hydronium (égale à 1), R la constante des gaz parfaits (J.mol⁻¹.K⁻¹), T la température (K), F la constante de Faraday (C.mol⁻¹).

A 298 K, en considérant que l'activité de l'ion hydronium H₃O⁺ correspond ici à sa concentration et en sachant que pH = -log[H₃O⁺], la loi peut alors s'écrire de la manière suivante :

$$E = cste - 0,059 \text{ pH}$$

Cette valeur de pente de 59 mV/pH est définie comme la valeur d'une pente dite « nernstienne ». Celle-ci peut varier car elle va en réalité dépendre de la qualité de l'électrode et de son vieillissement.

Bien qu'inventées il y a plus d'une centaine d'année, les électrodes pH ne commenceront à être réellement utilisées que vingt ans plus tard à partir de 1930. C'est au cours des années soixante-dix qu'émerge alors le concept d'électrodes sélectives d'ions (ISEs pour « *Ion-Selective Electrodes* » en anglais) basé sur ce principe de membrane sélective. Comme leur nom l'indique, elles permettent la détection spécifique de l'activité d'un ion en présence d'autres espèces, qu'elles soient neutres ou chargées. Les membranes utilisées jusqu'alors étaient des membranes de verre (détection du pH) ou de composés cristallins (détection du fluorure avec une membrane de trifluorure de lanthane LaF_3). Malheureusement, ce type de membranes induisait des limitations en termes d'applications puisqu'il était relativement difficile de trouver des composés cristallins sensibles sélectivement à un ion en particulier.

En 1960, Moore et Pressman observent que l'antibiotique valinomycine provoque l'absorption d'ions K^+ et la libération d'ions H_3O^+ dans les mitochondries [3]. Ainsi, en 1966 Simon et Stefanac ont montré que des films minces de solvants organiques immiscibles à l'eau et dopés avec des antibiotiques donnaient des réponses à certains cations avec des sélectivités similaires à celles observées en biologie [4]. C'est ainsi qu'émerge un nouveau type de membranes, il s'agit des membranes polymériques contenant des ionophores, molécules agissant comme *transporteurs* d'ions à travers la membrane, et permettant, via un choix adapté de ces derniers, la détection sélective d'un ion donné.

I.2.1. Les ISE à membranes polymérique conventionnelle

Basées sur le même principe que l'électrode pH à membrane de verre, de nombreuses électrodes spécifiques ont été développées pour la détection de différents ions. Celles-ci ont alors la même structure qu'une électrode pH : elles sont composées d'un compartiment interne de solution contenant l'ion cible à une concentration fixe et d'une membrane sélective dite « ionosensible ». Seule la composition de la membrane diffère puisqu'il s'agit ici, comme mentionné précédemment, d'une membrane polymère contenant des ionophores. Diverses compositions de membranes ont alors été étudiées afin d'en améliorer les propriétés.

I.2.1.i Composition de la membrane ionosensible

La membrane est l'élément principal de l'ISE puisque c'est elle qui lui confère sa sélectivité; c'est grâce à elle que l'électrode peut détecter un ion cible en particulier. Elle est constituée d'une matrice polymérique contenant des ionophores ainsi qu'éventuellement des additifs ioniques.

○ La matrice polymérique

La matrice polymérique permet à la membrane d'être dans un état dit "pseudo-liquide" de sorte à ce que les ionophores dans leur forme libre ou complexée à l'ion cible puissent s'y déplacer librement. Pour cela, le matériau choisi doit avoir une température de transition vitreuse (T_g) suffisamment basse par rapport à la température ambiante afin que les chaînes polymériques soient suffisamment mobiles et facilitent ainsi le passage des ions. D'autre part, le polymère choisi doit avoir une constante diélectrique relativement élevée (idéalement comprise entre 4 et 15) afin de faciliter la dissociation des espèces au sein du réseau membranaire [5].

Le polymère le plus utilisé pour la formation de telles membranes est le polychlorure de vinyle (PVC) [6,7]. Pourtant, étonnamment, ce matériau ne répond pas aux critères énoncés précédemment. Il a une température de transition vitreuse de l'ordre de 80°C, soit largement supérieure à la température ambiante, ce qui le rend très rigide voir cassant, et il possède une constante diélectrique de l'ordre de 3,2. En réalité, le PVC est systématiquement mélangé à un plastifiant.

Le plastifiant, totalement miscible au PVC et de poids moléculaire inférieur, permet à la fois la diminution de la température de transition vitreuse mais également d'augmenter sa constante diélectrique et ainsi de répondre aux deux critères principaux d'une bonne matrice de membrane ionosensible [8]. Les plastifiants les plus couramment utilisés sont le 2-nitrophenyl octyl éther (o-NPOE) et le dioctyl sebacate (DOS).

Malheureusement et bien que ces membranes à matrice PVC permettent l'obtention de bons résultats de détection pour différents ions, elles souffrent d'une durée de vie limitée due à leur fragilité. D'autres polymères ont alors été étudiés pour la réalisation de telles membranes afin de pallier les problèmes posés par l'utilisation du PVC. Parmi eux, les silicones (polysiloxane vulcanisés), les polyuréthanes, les acrylates ou encore les perfluoropolymères [9].

Les silicones ont particulièrement souvent été choisis dans le cadre de réalisation d'ISE "tout solide" (cf. I.2.2) du fait de leur bonne adhésion sur différents types de substrats.

○ Les ionophores

Les membranes polymériques sont initialement des matériaux sans aucune sélectivité ionique. Cette sélectivité est rendue possible par l'incorporation en leur sein de composés organiques appelés **transporteurs** d'ions (« *ion carriers* » en anglais). Ces composés peuvent être soit des échangeurs d'ions (plus utilisés pour la détection des anions), soit des ionophores (plus utilisés pour la détection des cations). Les échangeurs d'ions ne sont pas des ionophores à proprement parler mais sont souvent dénommés comme tels dans la littérature.

Les ionophores (qui peuvent être chargés ou neutres) sont généralement des composés macrocycliques (fig. 3.1) à cavités ou semi-cavités capables de former des complexes de manière réversible avec un ion cible [10]. Ce sont des composés lipophiles dont la structure interne est hydrophile et la structure externe hydrophobe ce qui leur permet de transporter facilement les ions au travers de la membrane polymérique elle-même hydrophobe. Il en existe une multitude et cela permet alors la détection spécifique d'un grand nombre de cations et de certains anions.

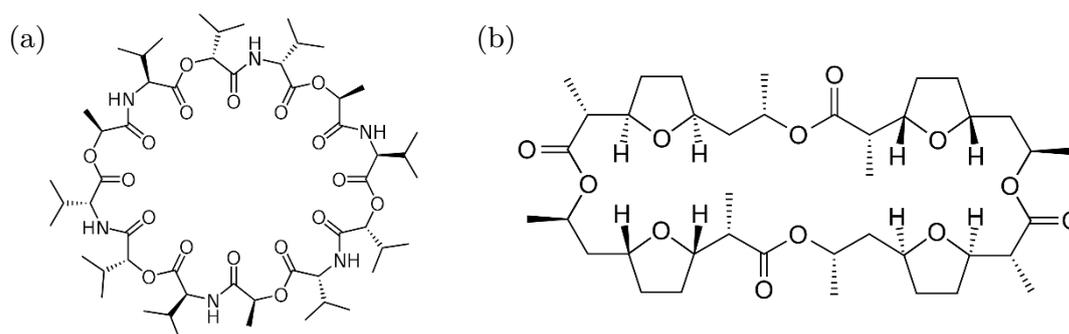


Figure 3.1 : Exemples d'ionophores neutres macrocycliques (a) valinomycine et (b) nonactine

○ Les additifs (ou sites) ioniques

Le dernier composant souvent essentiel de la membrane ionosensible est l'additif ionique. Il s'agit d'échangeurs d'ions lipophiles, souvent un sel constitué d'un ion hydrophobe et d'un contre-ion hydrophile échangeable. Ce composé permet d'assurer l'électroneutralité de la membrane dans le cas de l'utilisation d'ionophores neutres. Le plus souvent utilisés dans le cadre de la détection de cations, leur premier rôle est d'éviter la migration d'éventuels anions de l'ion cible au sein de la membrane.

Par ailleurs, il a été prouvé que l'ajout d'un additif permettait également de réduire la résistivité électrique de la membrane et par conséquent d'améliorer le temps de réponse [11]. Enfin, ils semblent abaisser la barrière d'activation relative à l'échange cationique ce qui entraîne une augmentation de la sensibilité [12]. C'est pourquoi il est vivement recommandé d'en utiliser, y compris pour les membranes contenant des ionophores chargés.

Par ailleurs, il est aussi important de ne pas incorporer une quantité trop importante de ces sites ioniques au risque de perdre la sélectivité de la membrane à l'ion cible. Il en existe plusieurs mais les plus utilisés sont le tétraphénylborate de potassium et ses dérivés dans le cadre de la détection de cations.

1.2.1.ii Principe de la mesure potentiométrique

Dans le cas des ISE conventionnelles, la membrane est en équilibre entre une solution interne dite "de remplissage" et l'analyte (fig. 3.2). Comme mentionné précédemment, un

potentiel provoqué par la conduction ionique s'établit au travers de cette membrane, il s'agit du potentiel de membrane. La théorie montre qu'il est relié à la différence d'activité de l'ion cible dans la solution de remplissage $(a_i)_r$ et l'analyte $(a_i)_a$ tel que :

$$\Delta E_M = cste + \frac{2,3 RT}{z_i F} \log \frac{(a_i)_r}{(a_i)_a}$$

où ΔE_M représente le potentiel de membrane (V) (différence de potentiel entre l'ISE et une électrode de référence), z_i la charge de l'ion i , R la constante des gaz parfaits ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T la température (K) et F la constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$).

L'activité de l'ion i au sein de la solution de remplissage étant maintenue constante, la réponse suit alors une loi de type nernstienne dépendant uniquement de l'activité de l'ion i dans l'analyte telle que :

$$\Delta E_M = cste + \frac{2,3 RT}{z_i F} \log (a_i)_a$$

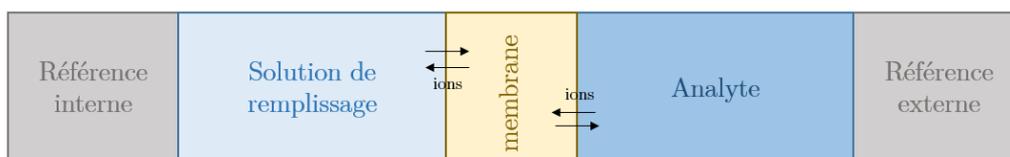


Figure 3.2 : Chaîne électrochimique dans le cadre d'une ISE conventionnelle

Ce type d'électrodes nécessitant la présence d'un compartiment interne de liquide, elles sont généralement fragiles et difficilement miniaturisables donc inadaptées à certaines applications. Ainsi, dans les années quatre-vingt-dix ont commencé à se développer des ISE dites « tout solide » consistant en une membrane ionosensible déposée directement sur l'électrode métallique.

I.2.2. Les ISE à membrane polymérique « tout solide »

Les premières ISE « tout solide » ou ISE à contact solide étaient des électrodes (le plus souvent métalliques) couvertes directement d'une membrane polymérique (CWE pour « *Coated Wire Electrode* » en anglais). Ce type d'électrode a été très utilisé car il présentait au départ de multiples avantages à savoir leur faible coût, leur facilité de mise en œuvre et leur très bonne tenue mécanique en comparaison aux ISEs conventionnelles [13–16].

Bien qu'innovantes, ces premières ISE à contact solide étaient loin de rivaliser avec les performances des ISE conventionnelles à compartiment liquide. En effet, elles souffraient

d'importants problèmes de stabilité et de bruits qui ont été attribués à des problèmes de contact à l'interface membrane (conducteur ionique)/métal (conducteur électronique) [17]. D'autre part, il a été expliqué que ces dérives pouvaient également être en partie liées à l'apparition d'une couche d'eau intercalée entre la membrane et l'électrode, couche d'eau dont la composition dépendrait de celle de l'analyte et impliquerait une instabilité importante du signal mesuré (fig. 3.3) [18–20].

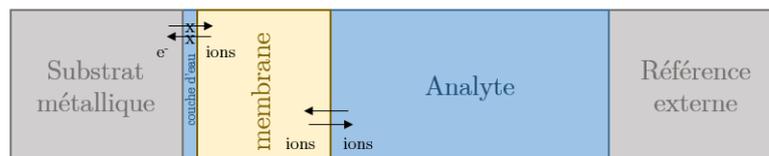


Figure 3.3 : Chaîne électrochimique d'une ISE à contact solide

La solution a donc été d'ajouter une couche permettant la transduction ion-électron entre la membrane et l'électrode métallique. Divers matériaux ont été étudiés pour la constitution d'une telle couche. Deux principales voies d'amélioration ont permis l'obtention de réponses plus stables à savoir : (i) l'utilisation de polymères conducteurs présentant une bonne conductivité à la fois ionique et électrique (ii) ou l'utilisation de matériaux nanostructurés permettant d'augmenter la capacité de double-couche.

1.2.2.i Transduction ion-électron : polymères conducteurs

Les polymères conducteurs se trouvaient faire office de bon candidat pour la transduction "ion-électron" au sein des ISE à contact solide. En effet, ce sont des matériaux ayant une capacité redox importante : ils sont à la fois conducteurs électriques et capables d'être conducteurs ioniques notamment lorsqu'ils sont dopés. Ils ont été utilisés pour la première fois à ces fins au début des années quatre-vingt-dix pour différentes raisons [21]:

- ils sont des matériaux conducteurs pouvant former un contact ohmique avec les matériaux d'électrodes les plus utilisés (carbone, or ou platine),
- ils peuvent être facilement déposés par électropolymérisation de leur monomère,
- ils sont électroactifs avec à la fois une bonne conductivité électronique et ionique donc sont capables d'assurer la transduction d'un signal ionique en signal électronique.

Les polymères conducteurs les plus utilisés pour ce type d'application sont le polyéthylènedioxythiophène (PEDOT), le polypyrrole (PPy), la polyaniline (PANI) ou encore le poly(3-octylthiophène) (POT) (fig. 3.4). [22]

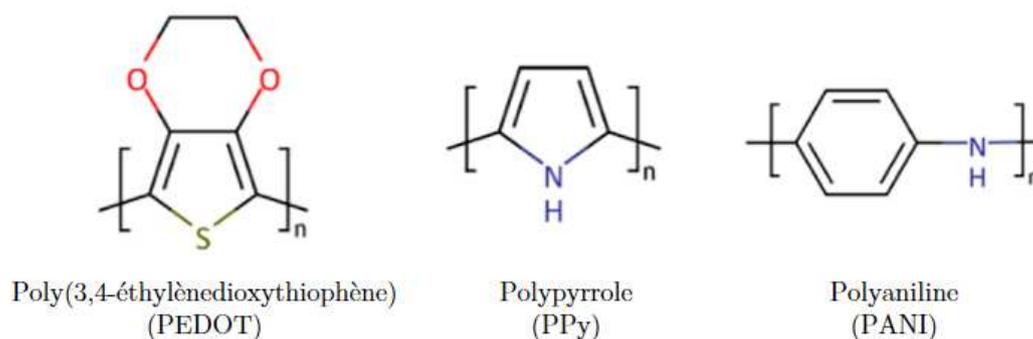


Figure 3.4 : Structures chimiques des principaux polymères conducteurs utilisés pour les ISEs à contact solide [19]

Ces polymères sont utilisés dopés par un contre-ion tel que le perfluorooctanesulfonate (PFOS⁻) [23] ou encore le polystyrène sulfonate (PSS⁻) [21] qui permet à la fois d'assurer la bonne conduction ionique du polymère et également permet d'augmenter son hydrophobicité et donc d'éviter la formation de la couche d'eau.

Cependant, l'utilisation de ces polymères comme couche de transduction entraîne parfois des manques de stabilité pour différentes raisons :

- certaines réactions redox parasites peuvent survenir [21],
- ils présentent une sensibilité à la lumière, au dioxygène et au dioxyde de carbone [24,25],
- l'utilisation simple d'un polymère conducteur ne suffit pas toujours à éliminer la couche d'eau intercalée entre l'électrode métallique et la membrane [23].

1.2.2.ii Transduction ion-électron : matériaux carbonés

Dans le cas des électrodes métalliques directement couvertes par la membrane polymère et comme expliqué précédemment, le transfert ionique est "bloqué". En effet, il y a lieu ici d'une répartition asymétrique des charges assimilable à un condensateur portant d'un côté une charge sous forme ionique (ions) et de l'autre une charge sous forme électrique (électrons). Ainsi, les dérives du signal observées sont en partie liées (en plus du fait de la présence de la couche d'eau) à cette interface purement capacitive et à la faible zone de contact entre les deux [15,26].

Une solution consisterait donc à augmenter cette capacité de double-couche en augmentant la zone de contact interfaciale entre la membrane et le contact solide. Le but étant d'augmenter la zone de contact sans augmenter la surface géométrique d'électrode, la stratégie est d'utiliser des matériaux poreux.

Ainsi, de nouveaux types de matériaux pouvant faire office de couche de transduction ont alors émergé : il s'agit des matériaux carbonés. Qu'ils soient sous forme de nanotubes [27], de noir de carbone [28], de graphène [29,30] ou encore de sphères poreuses [31], ils représentent

alors une voie intéressante dans cette stratégie puisqu'ils sont très stables chimiquement, totalement inertes vis à vis des espèces redox mais également de la lumière ou du gaz. Ils présentent de plus une très grande surface de contact du fait de leur structure et sont de plus des matériaux plutôt hydrophobes, ce qui permet de s'affranchir du problème de la couche d'eau.

II. La mesure du pH

Comme expliqué au chapitre 1, la mesure du pH correspond à la mesure de l'acidité ou de l'alcalinité d'un échantillon liquide. Il est un paramètre déterminant de la qualité de l'eau. Dans les eaux douces de surface, le pH varie généralement entre 5 et 9. Il définit les conditions de disponibilité des nutriments et la facilité avec laquelle peuvent se dissoudre certains éléments toxiques tels que les ETM. Un pH trop acide ou trop basique peut donc engendrer une certaine dangerosité pour les écosystèmes aquatiques [32] .

Les pluies acides, le ruissellement minier, les feux de forêts mais également et surtout les activités humaines via des déversements peuvent entraîner des modifications des niveaux de pH et des quantités de nutriments disponibles. Lors d'un excès de nutriments, d'importantes proliférations d'algues (nuisibles) peuvent avoir lieu et ainsi augmenter drastiquement le pH de l'eau, parfois à des valeurs supérieures à 10 très dangereuses pour les (macro)organismes vivants. Un pH trop acide quant à lui peut empêcher l'éclosion d'œufs de poissons ou être dangereux pour les amphibiens dont la peau est très sensible. Enfin, un pH trop acide ou trop basique est dangereux pour la santé humaine, que cela soit pour la consommation ou pour la baignade (risques de brûlures).

Ainsi, il y a un important intérêt à connaître la valeur du pH dans le cadre d'opérations de contrôle de la qualité de l'eau. Il existe aujourd'hui diverses méthodes pour mesurer le pH, néanmoins les méthodes potentiométriques restent les plus utilisées du fait de leur précision. Dans le cadre de ces travaux l'intérêt est porté sur le développement d'un capteur pH basé sur une ISE à base d'oxyde métallique.

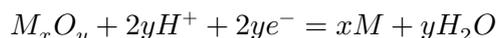
II. 1. État de l'art sur les capteurs de pH

II.1.1. Les oxydes métalliques

Depuis 100 ans, la mesure du pH est rendue possible grâce à l'électrode de verre (cf. I.2) [2]. Cependant, cette électrode bien que très performante, présente certaines limites. Celle-ci est tout d'abord fragile de par sa composition (en verre) et sa constitution (solution liquide interne) ne lui permet pas d'être facilement miniaturisée et donc d'offrir la possibilité d'effectuer des mesures dans de faibles volumes. Par ailleurs, elle n'est également pas très

adaptée à la mesure dans des milieux très corrosifs. Pour pallier ces problèmes, de nouveaux types d'électrodes (tout solide) ont été développées.

Dans le cas particulier de la détection du pH, il ne s'agit pas d'électrodes à membranes mais bien d'électrodes métalliques qui ont été développées à partir de l'utilisation d'un **métal oxydé ou d'un métal recouvert par son oxyde**. En effet, pour un métal recouvert par son oxyde M/M_xO_y , la relation suivante peut être établie :



De cette manière, le potentiel de l'électrode varie en fonction de la concentration en ions hydronium H_3O^+ selon la loi de Nernst, ce qui les rend sélectives au pH. En plus d'être utilisables en milieux agressifs, ces électrodes présentent une stabilité intrinsèque vis-à-vis de la température et de la pression. Cependant, il est important de souligner que ce cas particulier n'est pas valable pour l'ensemble des électrodes de types métal/métal oxydé. C'est D. Ives qui, en 1961, définit quelques propriétés du couple métal/oxyde nécessaires à l'obtention d'une telle électrode sensible au pH fonctionnelle. Les critères qu'il décrit sont les suivants [33] :

- (1) le métal doit être suffisamment noble, c'est-à-dire inattaquable sur une large gamme de pH et dans les différentes solutions dans lesquelles il sera utilisé,
- (2) l'oxyde de ce métal doit être stable, ce qui peut être contradictoire avec (1) puisque plus un métal est noble, moins son oxyde est stable,
- (3) il doit être possible d'obtenir le métal et son oxyde de manière reproductible,
- (4) l'oxyde doit être très peu soluble et pouvoir participer à la réaction d'équilibre.

De cette manière, plusieurs oxydes métalliques ont été étudiés pour la réalisation de ce type de capteurs. Le plus ancien, et également le plus étudié étant l'antimoine (Sb_2O_3) reconnu pour sa bonne sensibilité au pH mais parfois controversé par rapport à sa stabilité.

Par la suite ont émergé d'autres types d'oxydes tels que le dioxyde de platine (PtO_2), de titane (TiO_2), d'étain (SnO_2), de ruthénium (RuO_2), d'iridium (IrO_2) ou encore les oxydes de tungstène (WO_3) ou de tantale (Ta_2O_5). Ces oxydes métalliques ont démontré globalement une bonne fiabilité des mesures pH avec quelques instabilités sur de très longues périodes ou dans le cas de pH très alcalins. La réalisation de telles électrodes peut se faire par différentes méthodes (électrodépôt, pulvérisation cathodique, sérigraphie...) et suivant la méthode utilisée, la sensibilité du dépôt peut en être affectée (fig. 3.5).

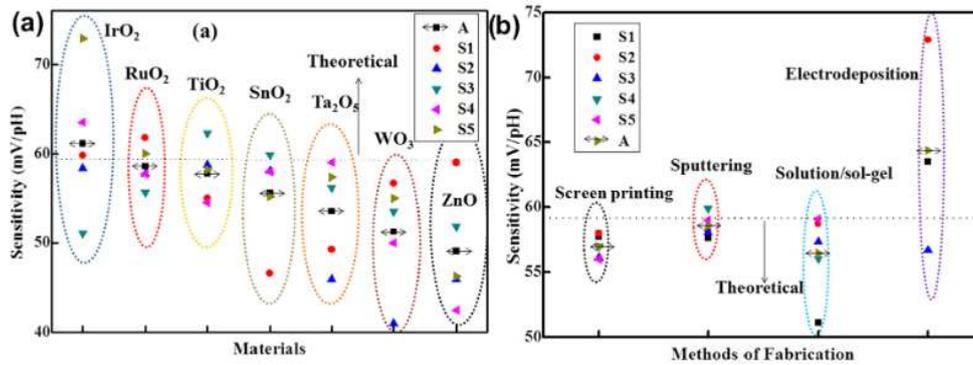
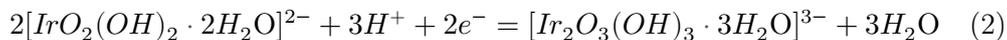
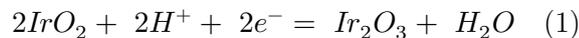


Figure 3.5 : Valeurs de sensibilité des capteurs pH pour différents oxydes métalliques (a) et pour différentes méthodes de fabrication (b) dans différents échantillons S1 à S5 avec A la valeur moyenne [34]

II.1.2. L'oxyde d'Iridium IrO₂

Chaque oxyde métallique présente des avantages et des limitations. Il a été choisi dans le cadre de ces travaux de travailler avec l'oxyde d'iridium (IrO₂) en raison de sa stabilité chimique, sa bonne conductivité électrique et sa réponse linéaire sur une large gamme de pH mais également parce qu'il est compatible avec de nombreuses techniques de dépôts liées aux microtechnologies facilitant sa mise en œuvre.

L'oxyde d'iridium peut être déposé par voie humide (électrodéposition EIROF, oxydation anodique AIROF) comme par voie sèche (pulvérisation cathodique SIROF ou dépôt thermique TIROF), chacune pouvant conduire à des dépôts de morphologies différentes et par conséquent à des réponses différentes. En effet, il est reporté que les méthodes de dépôt par voie sèche conduisent à un oxyde d'iridium cristallin (dit anhydre) [35,36], tandis que les méthodes de dépôt par voie humide conduisent à un oxyde d'iridium amorphe (dit hydraté voire poreux) [36,37]. Ces différences dans la structuration de l'oxyde peuvent alors impacter à la fois la stabilité et la sensibilité du matériau aux mesures de pH. Les réactions de l'oxyde d'iridium avec les ions hydroniums suggérées dans la littérature suivant le type de film (anhydre (1) ou hydraté (2)) sont les suivantes :



Alors que l'oxyde d'iridium anhydre conduit à une sensibilité au pH de type nernstienne (≈ 59 mV/pH), il est fréquent d'obtenir des réponses dites super-nernstienne (jusqu'à ≈ 90 mV/pH) avec l'oxyde d'iridium hydraté de par le mécanisme réactionnel (2) où un électron est transféré pour 1,5 ion hydrogène [38].

Suite aux travaux antérieurs menés dans l'équipe [39,40], la méthode de dépôt choisie est l'électrodéposition (EIROF) car elle peut être réalisée sur substrat métalliques divers tels

que le platine ici et qu'elle a permis l'obtention de bons résultats en termes de sensibilité et robustesse. Cette méthode, relativement simple à mettre en œuvre et peu coûteuse (contrairement à la pulvérisation cathodique qui nécessite un équipement plus complexe), permet d'avoir un contrôle précis de l'épaisseur de la couche d'oxyde. Il existe trois grands types de dépôt électrochimique pour l'oxyde d'iridium qui sont couramment utilisés : le dépôt par chronopotentiométrie (à courant constant), par chronoampérométrie (à potentiel constant) et par voltammétrie cyclique (balayage de potentiel). L'ensemble de ces méthodes conduisent à l'obtention d'un dépôt (nommé EIROF pour « *Electrodeposited Iridium Oxide Film* » en anglais) uniforme, localisé sur les électrodes et dont l'épaisseur peut être contrôlée.

II. 3. Fonctionnalisation de l'UMEA : IrO₂

II.3.1. Protocole de dépôt

Dans le cadre de ces travaux, les dépôts d'oxyde d'iridium ont été effectués par chronoampérométrie (à potentiel constant) du fait de sa grande facilité de mise en œuvre puisqu'elle nécessite uniquement de définir la charge (directement reliée à la quantité d'oxyde d'iridium déposé). Il est également reporté dans la bibliographie que les méthodes d'électrodéposition à potentiel constant permettent l'obtention de films d'oxydes plus fins, plus uniformes et présentant une meilleure adhérence les rendant ainsi moins fragiles en comparaison aux films d'oxydes obtenus par dépôt à courant constant (galvanostatique). [41]

Ce dépôt est réalisé à partir d'une solution à base de sel d'iridium. Le protocole de préparation de la solution de dépôt a été mis en place par Yamanaka [42] et est le suivant :

- 0,075 g de chlorure d'iridium (IrCl₄) sont dissous dans 50 mL d'eau désionisée (EDI) et placé sous agitation magnétique pendant 10 minutes,
- 0,5 mL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont ajoutés à la solution précédente,
- 0,25 g d'acide oxalique (C₂O₄H₂) sont enfin dissous dans la solution qui est à nouveau placée sous agitation magnétique pendant 10 minutes,
- le pH est ajusté à 10,5 par ajout de carbonate de potassium (K₂CO₃).

La solution ainsi préparée est laissée au repos pendant 72h afin d'être stabilisée. Sa couleur passe alors du vert-brun au bleu-violet. Cette solution sera conservée au frigo pour une utilisation au maximum dans le mois suivant sa préparation. En effet, il a été démontré dans la littérature que l'utilisation d'une solution préparée plus d'un mois auparavant entraînait une diminution de la sensibilité du dépôt ainsi qu'un temps de réponse plus lent [38].

Afin d'effectuer l'électrodéposition, le microcapteur à trois électrodes est placé dans la solution de dépôt (à température ambiante) et connecté à un potentiostat. Un potentiel constant de 0,6 V vs. Ag/AgCl est appliqué jusqu'à obtention d'une charge de 0,5 C/cm² [41].

II.3.2. Caractérisation du dépôt

Afin de s'assurer de la présence du dépôt d'IrO₂ à la surface des microélectrodes du réseau (UMEA), des caractérisations par électrochimie et par microscopie ont été effectuées.

II.3.2.i Microscopie

Comme le montre les images réalisées au microscope optique (Hirox HRX-01) avant (fig. 3.6a) et après (fig 3.6b) dépôt, un film de dépôt obtenu de couleur grise uniforme et localisé sur les microélectrodes apparaît. De la même manière, les images au microscope électronique à balayage (FEI Helios 600i SEM/FIB) montrent un dépôt d'IrO₂ rugueux bien localisé sur les microélectrodes (fig. 3.7). Ces résultats sont caractéristiques d'un dépôt réalisé par chronoampérométrie.

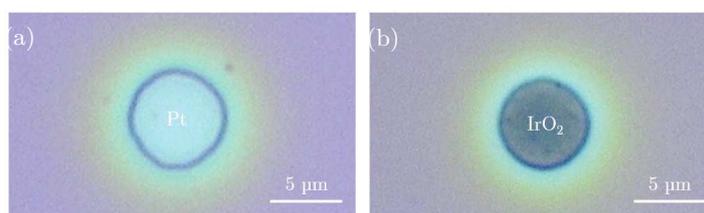


Figure 3.6 : Images au microscope optique d'une microélectrode de l'UMEA (a) avant et (b) après dépôt d'IrO₂

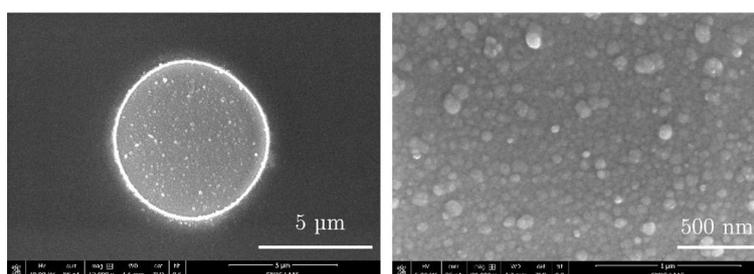


Figure 3.7 : Images MEB d'une microélectrode de l'UMEA fonctionnalisée par de l'IrO₂

Enfin, il est important de préciser que ce dépôt électrochimique se réalise parfaitement sur les 25 ultramicroélectrodes de l'UMEA et cela de manière très reproductible bien que débordant légèrement.

Une découpe à la sonde ionique focalisée (FIB pour « *Focus Ion Beam* » en anglais) ainsi que des observations au MEB (FEI Helios 600i SEM/FIB) ont permis d'estimer l'épaisseur de la couche d'oxyde déposée, soit environ 15 ± 2 nm. Le film obtenu est donc très fin (fig. 3.8), ce qui est plutôt positif puisqu'il est reporté dans la bibliographie que l'augmentation de l'épaisseur de dépôt résulte en une moins bonne uniformité et des dépôts ainsi plus fragiles. [41]

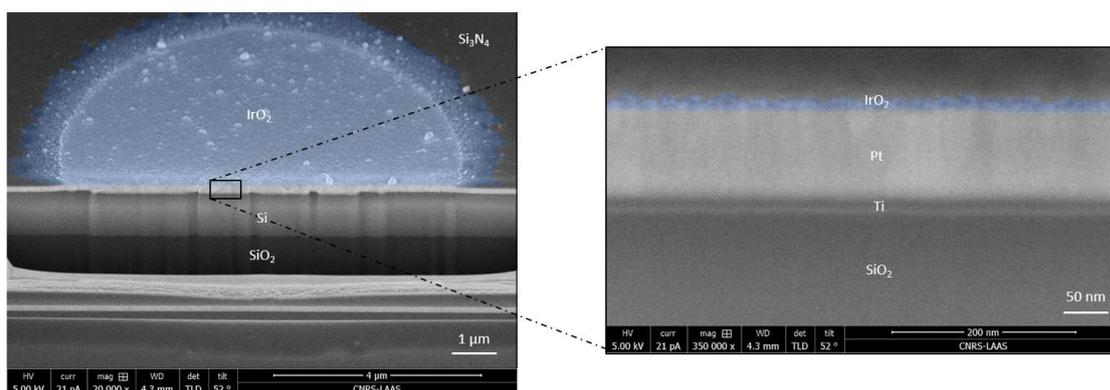


Figure 3.8 : Images MEB d'une électrode de l'UMEA fonctionnalisée par un dépôt d'IrO₂ après découpe verticale (FIB)

III.3.2.ii Voltammétrie cyclique

L'oxyde d'iridium peut être également caractérisé par voltammétrie cyclique afin de s'assurer de l'obtention de la signature caractéristique de cet oxyde entre -0,3 et 0,8 V vs. Ag/AgCl (fig. 3.9). Il a été décidé d'effectuer cette caractérisation dans une solution de tampon phosphate afin d'éviter le cyclage dans une solution corrosive telle que l'acide sulfurique (H₂SO₄) qui a tendance à provoquer des craquellements sur la surface de l'oxyde entraînant des problèmes lors des mesures de pH par la suite. Les deux pics caractéristiques correspondants aux couples Ir(OH)_x^(III)/IrO₂^(IV) et Ir^(V)/Ir^(IV) sont bien présents en oxydation (à 0,2 V vs. Ag/AgCl et 0,55 V vs. Ag/AgCl respectivement) et en réduction (à 0,05 V vs. Ag/AgCl et 0,45 V vs. Ag/AgCl respectivement).

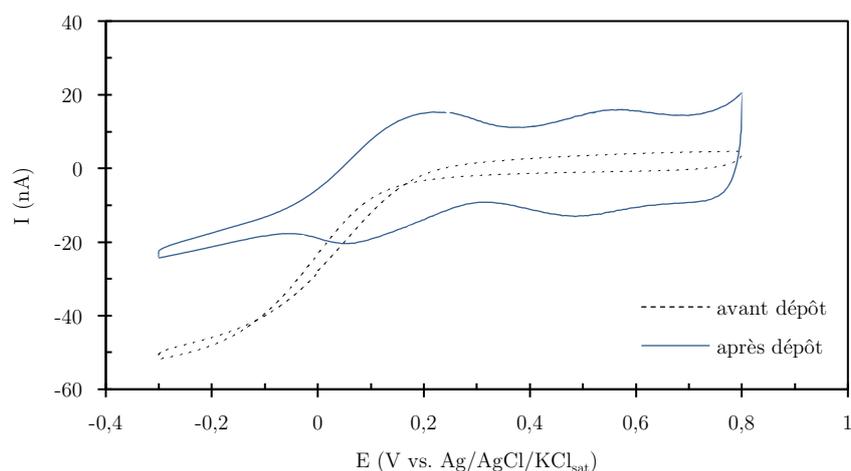


Figure 3.9 : Voltammétrie cyclique réalisée dans un tampon phosphate (pH = 7) à 50 mV/s sur l'UMEA avec et sans dépôt d'IrO₂

II. 4. Mesure du pH et performances du capteur

II.4.1. Sensibilité, stabilité et temps de réponse

Les mesures de pH ont été réalisées dans un premier temps dans des solutions à différents pH compris entre 4 et 10. Avant toute mesure, le capteur a été conditionné dans une solution tampon à $\text{pH} = 7$ durant 24 heures minimum afin que le film d' IrO_2 s'hydrate et ainsi de s'affranchir de l'éventuelle dérive pouvant avoir lieu en début de mesure [43].

Les premiers résultats montrent une très bonne réponse du capteur de manière quasi-instantanée et sans hystérésis (fig. 3.10). La sensibilité mesurée étant de l'ordre de $61,8 \text{ mV/pH}$ (fig. 3.11) soit une réponse légèrement super-nernstienne mais comme mentionné précédemment, ce résultat était attendu d'après la bibliographie étant donné le dépôt humide de l' IrO_2 .

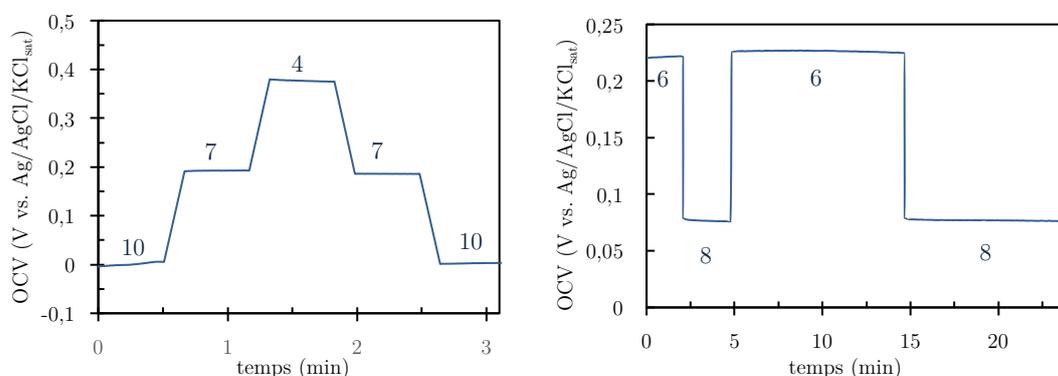


Figure 3.10 : Potentiel en circuit ouvert mesuré sur UMEA fonctionnalisé par IrO_2 à différents pH en fonction du temps

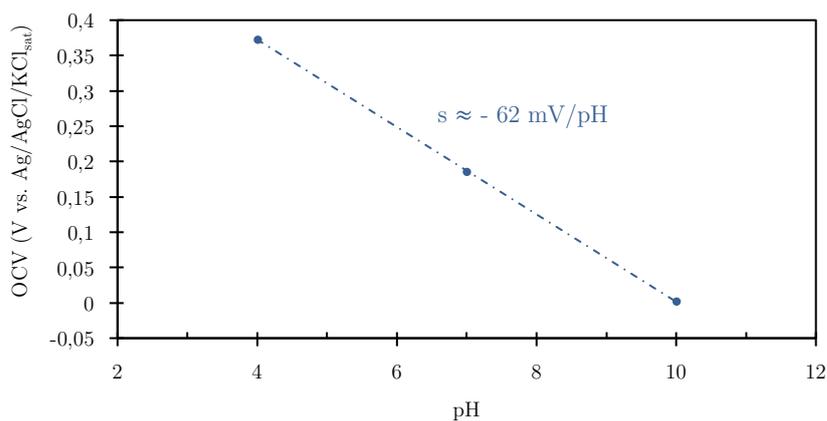


Figure 3.11 : Valeurs moyennes du potentiel en circuit ouvert en fonction du pH sur UMEA fonctionnalisé par IrO_2

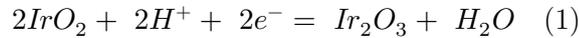
II.4.2. Hystérésis

Pour une étude plus complète, la même expérience a été réalisée avec plus de solutions et pour des pH cette fois-ci compris entre 2 et 12 (fig. 3.10). Plusieurs phénomènes ont été observés.

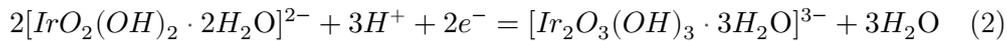
Dans un premier temps, concernant la sensibilité, elle a été mesurée à une valeur d'en moyenne 67 mV/pH, soit supérieure à celle obtenue lors de l'expérience précédente (62 mV/pH). De plus, une dérive à pH 12 a été observée semblant s'accompagner par la suite d'une augmentation de la sensibilité qui passe de 66 mV/pH lors de l'augmentation du pH à 69 mV/pH lors de sa diminution, ce qui laisse apparaître un phénomène d'hystérésis (fig. 3.12 et 3.13).

D'après d'autres travaux menés sur l'IrO₂, la différence de sensibilité entre les deux capteurs peut s'expliquer en fonction du moment où ils ont été utilisés. En effet, il a été mis en évidence qu'un dépôt d'IrO₂ pouvait présenter une décroissance de sa sensibilité avec le temps, notamment dans le cas d'un stockage à sec [38,44]. Lors de la première expérience effectuée (cf. II.4.1), le capteur avait été stocké à sec après dépôt plusieurs jours avant d'effectuer les mesures. A l'inverse, lors de la seconde expérience, le dépôt d'IrO₂ venait d'avoir été fait avant les mesures.

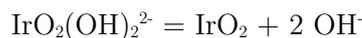
Scientifiquement, dans la bibliographie, il est reporté qu'un dépôt d'IrO₂ par voie sèche conduit à un film anhydre dont la sensibilité est quasi-nernstienne et d'environ 59 mV/pH. Pour rappel l'équation de réaction d'un tel dépôt avec les protons est la suivante :



A l'inverse, dans le cas d'un dépôt par voie humide, le film d'IrO₂ est dit hydraté et sa sensibilité est super-nernstienne pouvant théoriquement atteindre jusqu'à 90 mV/pH. Son équation de réaction avec les ions hydronium est la suivante :



Ce qui est notable ici, est que l'IrO₂ formé est sous la forme $[IrO_2(OH)_2 \cdot 2H_2O]^{2-}$ et dépend potentiellement de la concentration en ions hydroxyde OH⁻ de la solution, donc du pH. La sensibilité légèrement super-nernstienne obtenue suggère la coexistence des deux formes d'IrO₂ dans le film de dépôt formé avec légère prédominance de la forme hydratée. Si l'équilibre considéré est le suivant :



il serait alors possible qu'en milieu très basique (pH = 12) et donc fortement concentré en ions OH⁻, l'équilibre soit déplacé vers la formation de l'IrO₂ hydraté et qu'ainsi la sensibilité

augmente, ce qui expliquerait la dérive à $\text{pH} = 12$ et l'augmentation de sensibilité qui s'en accompagne.

Dans le cadre de l'application finale de ce projet et en sachant qu'il est très peu probable qu'une eau douce de surface atteigne des pH supérieurs à 10, ce point ne sera pas bloquant. Il est néanmoins intéressant de connaître les limites du capteur pour éventuellement pouvoir l'améliorer à postériori.

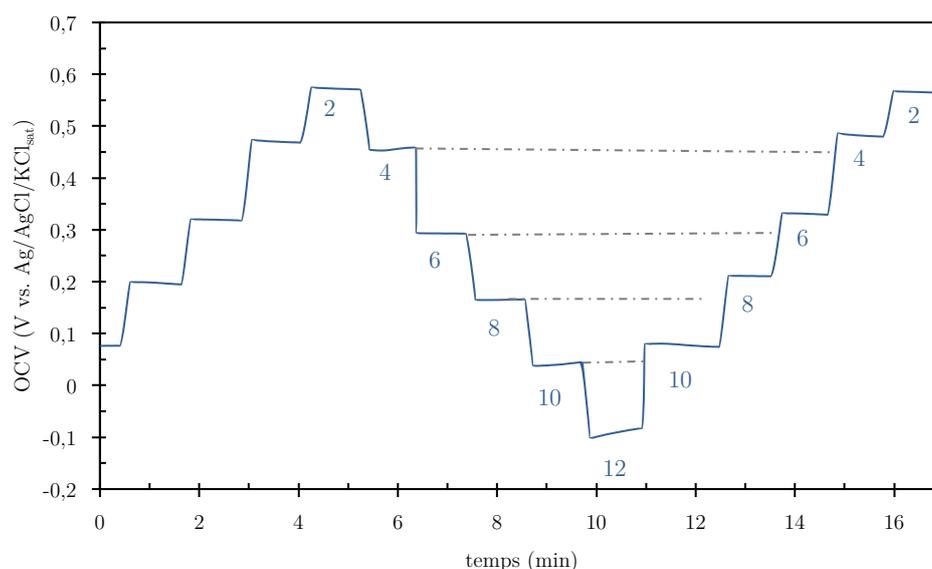


Figure 3.12 : Évolution du potentiel en circuit ouvert pour un capteur fonctionnalisé par IrO₂ dans des solutions de différents pH

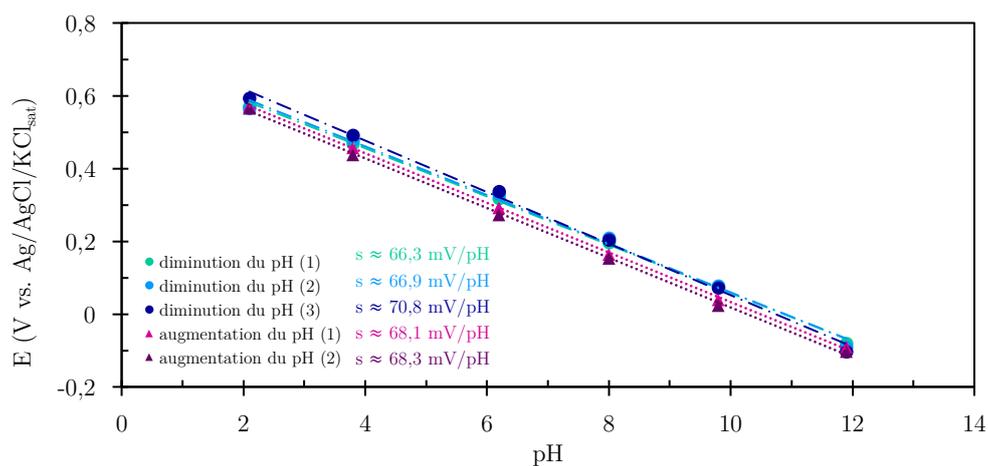


Figure 3.13 : Évolution du potentiel en circuit ouvert en fonction du pH pour plusieurs augmentations et diminutions de pH successives

II.4.3. Dérive à long terme

Afin d'étudier la durée de vie du capteur et l'éventuelle dérive à long terme bien que l'application ne prévoit pas de mesures en continu, un capteur a été placé 6 jours dans une solution de tampon phosphate à $\text{pH} = 6$. Les résultats (fig. 3.14) montrent une faible dérive sur les 6 jours. Dans les premières heures, un phénomène semble avoir lieu avant la véritable stabilisation du potentiel au bout de 36h.

La dérive mesurée par la suite en continu est d'environ 3 mV/jour . Cette dérive pourrait être problématique pour des mesures à long terme. Dans le cadre de ce projet, l'objectif étant d'avoir des capteurs à usage unique, cette dérive semble tout à fait acceptable pour l'application prévue. Néanmoins, cette dérive pourrait éventuellement être diminuée notamment en optimisant le dépôt d'oxyde d'iridium (épaisseur, méthode de dépôt...).

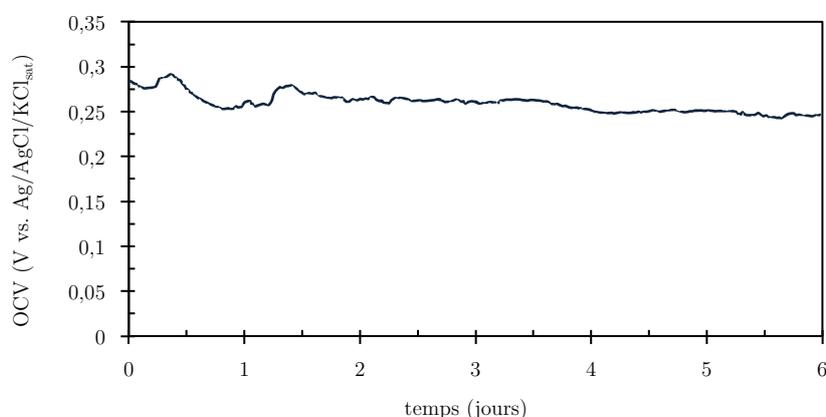


Figure 3.14 : Évolution du potentiel en circuit ouvert dans une solution de tampon phosphate à $\text{pH} = 6$ pendant 6 jours

II.5 Conclusion sur la détection du pH

L'utilisation de l'oxyde d'iridium dans le cadre de la détection pH a fourni des résultats tout à fait convenables pour l'application prévue. Le capteur ainsi formé permettra des mesures fiables à court terme et sur une gamme supérieure à celle attendue pour l'eau douce de surface. La sensibilité super-nernstienne obtenue est en accord avec la bibliographie pour ce type de dépôt par voie humide. Ce type de dépôt peut néanmoins souffrir de problèmes de stabilité à long terme probablement dus à son vieillissement.

Cependant, il est toujours envisageable d'améliorer ses propriétés car il existe diverses méthodes pour obtenir un dépôt d'oxyde d'iridium, méthodes plus ou moins complexes et conduisant à un matériau IrO_2 plus ou moins stable et sensible au pH.

III. La mesure des ions nitrates

Les nitrates sont un élément essentiel du cycle de l'azote et donc au développement des plantes. Lors de ce cycle, les plantes assimilent l'azote sous forme de nitrates, nitrites et ammonium et le transforment en matière organique par photosynthèse. C'est la décomposition de ces matières organiques qui entraîne la restitution d'ammoniaque qui est alors lui-même oxydé par les bactéries présentes et reproduit ainsi des nitrates et des nitrites.

Avec le développement de l'agriculture intensive et l'utilisation massive d'engrais azotés et de lisiers, des surplus de nitrates contenus dans les sols soit atteignent les eaux souterraines par lixiviation, soit ruissellent vers les cours d'eau environnants et constituent une pollution majeure [34],[35].

En effet, en trop grande quantité, les nitrates peuvent causer divers problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation (proliférations de masses algales dans les cours d'eau), dangereux pour les écosystèmes. Ils sont également connus pour être dangereux s'ils se retrouvent dans une eau destinée à la consommation humaine car ils engendrent la formation de nitrites pouvant provoquer une oxydation de l'hémoglobine en « méthémoglobine » incapable de transporter l'oxygène et pouvant donc entraîner la mort [45]. Ce risque est nettement accru chez le nourrisson. En effet, chez l'adulte, l'acidité gastrique permet de réduire le risque de formation de nitrites mais ce n'est pas le cas chez le nourrisson car son système digestif n'est pas encore totalement développé. De plus, le nourrisson de moins de 6 mois est incapable de retransformer la méthémoglobine en hémoglobine. Enfin, en interagissant avec les acides aminés, les nitrites sont susceptibles de former des composés azotés soupçonnés d'être cancérigènes et reprotoxiques [46].

En France, la présence de nitrates dans les eaux de surface et souterraines provient à 66% de l'agriculture intensive. La législation fixe la limite de qualité pour les nitrates dans l'eau distribuée à 50 mg/L [47]. Pourtant, encore aujourd'hui dans certaines zones de captage la concentration en nitrates dépasse cette limite [48]. D'autre part, pour éviter le phénomène d'eutrophisation, il serait en plus nécessaire que la quantité en nitrates dans les milieux aquatiques concernés ne dépasse pas les 15 mg/L.

III. 1. État de l'art sur les capteurs d'ions nitrates

Afin de déterminer la quantité de nitrates dans l'eau, les sols ou la nourriture, diverses méthodes peuvent être utilisées telles que la spectroscopie UV [49,50], la chromatographie [51] ou encore l'électrophorèse capillaire [52]. Encore une fois, la plupart de ces méthodes nécessitent un équipement coûteux et une préparation complexe et minutieuse des échantillons.

Ainsi, les méthodes électrochimiques se développent de plus en plus car elles présentent de nombreux avantages. En effet, il s'agit de méthodes non-destructives pour l'échantillon, elles sont facilement miniaturisables, peu coûteuses, simples, rapides et présentent de bonnes performances en termes de sensibilité et sélectivité. Elles peuvent être utilisées pour

des échantillons colorés ou troubles [53]. Ainsi, deux grands types de méthodes électrochimiques sont très utilisées pour la détection des nitrates : ampérométrie et potentiométrie.

III.1.1. Les capteurs ampérométriques

Les capteurs ampérométriques d'ions nitrates utilisent en général des métaux tels que le cuivre, le diamant dopé au bore ou le platine, ou bien des réductases en tant que matériaux sensibles. Ces matériaux sont capables, par application d'un potentiel, de réduire les ions nitrates en nitrites ou autres espèces et il est ainsi possible de connaître la quantité d'ions nitrates présents dans l'échantillon. En général, ces méthodes voltammétriques [54,55] fournissent de meilleures sensibilité et des limites de détection plus basses que les capteurs potentiométriques [56,57].

III.1.2. Les capteurs potentiométriques

Comme expliqué en introduction de ce chapitre, la méthode potentiométrique est basée sur l'utilisation d'électrodes sélectives ioniques (ISE). Dans le cas de la détection des ions nitrates, les ISE conventionnelles ont démontré d'excellentes performances dans différentes applications en termes de résistance, stabilité, durée de vie et de sensibilité aux interférences. Cependant, dû aux multiples désavantages de leur configuration (notamment la présence d'un compartiment de solution interne) les rendant fragiles, inadaptées à certaines applications (mesures dans de faibles volumes par exemple) et difficiles à miniaturiser, il a été nécessaire de développer des ISE à contact solide. Comme mentionné dans la partie I.2 de ce chapitre, les premières ISE « tout solide » développées consistant en un simple fil « enrobé » par la membrane ionosensible souffraient d'un grand manque de stabilité due à la présence d'une couche d'eau intercalée entre l'électrode métallique et la membrane.

Ainsi, les travaux de recherches menés sur le développement de telles ISE ont rapidement intégré l'ajout d'un transducteur « ion-électron » entre le métal et la membrane, ayant pour objectif de faciliter le transfert électronique entre l'analyte et la surface de l'électrode. Finalement, les derniers travaux de recherches concernant la détection potentiométrique des ions nitrates par ISE à contact solide se concentrent principalement sur des matériaux carbonés nanostructurés, des polymères conducteurs ou encore des nanoparticules métalliques. Le tableau III.1 résume les derniers résultats obtenus dans la bibliographie pour des électrodes de ce type.

Membrane	Ionophore	Transducteur ion-électron	Matériau d'électrode	Sensibilité (mV/pNO ₃)	Limite de détection (M)	Domaine de linéarité (M)	Ref
PVC, o-NPOE, MTPB	TDMAN	Graphene	Graphene	-58,2	6,0.10 ⁻⁶	1.10 ⁻³⁵ - 1.10 ⁻¹	Hjort et al. (2022) [58]
PVC, o-NPOE, TDMAC	Nitrate ionophore VI	TRGO	Or (Au)	-60,0	4,0.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵ - 1.10 ⁻¹	Liu et al. (2020) [59]
PVC, o-NPOE, ETH500	Ni ⁺ /NO ₃ ⁻	MWCNTs	Carbone vitreux (GC)	-55,1	2,8.10 ⁻⁸	5.10 ⁻⁶ - 1.10 ⁻¹	Hassan et al. (2019) [60]
PVC	Co(Bphen) ₂ (NO ₃) ₂	MWCNTs nano-composite	Carbone vitreux (GC)	-57,1	5,0.10 ⁻⁷	1.10 ⁻⁶ - 1.10 ⁻¹	Pietrzak et al. (2021) [61]
PVC, dibutylphthalate	TDMAN	Polypyrrole	Carbone vitreux (GC)	-52	1,6.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵ - 1.10 ⁻¹	Schwarz et al. (2018) [62]
PVC, o-NPOE, nitrocellulose, MTPPB	TDMAN	Graphene	Graphene	-54,8	2,1.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵ - 1.10 ⁻¹	Garland et al. (2018) [63]
PMMA-PDMA, ETH500	TDMAN	MWCNTs	Carbone vitreux (GC)	-55,4	0,9.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁵ - 1.10 ⁻²	Cuartero et al. (2018) [64]
PVC, o-NPOE	THTDPCI	Ag/AgCl	Argent (Ag)	-60,1	2,8.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵ - 1.10 ⁻¹	Wardak et al. (2016) [65]

Tableau 3.1 : Travaux de recherche récents sur l'élaboration d'ISE à contact solide pour la détection des ions nitrates

III. 2. Fonctionnalisation de l'UMEA : membrane nitrato-sensible

Dans le cadre de ces travaux, il a donc été décidé de développer un capteur potentiométrique d'ions nitrates à partir de la microcellule électrochimique sur puce (ElecCell) fabriquée préalablement (Chapitre 2).

III.2.1. Fabrication de la membrane

Le choix des composants de la membrane a été décidé suite aux résultats obtenus lors de travaux antérieurs menés dans l'équipe sur le développement de transistors à effet de champ (ISFET) sensibles à différents ions dans le cadre de mesures menées dans le sol durant lesquelles plusieurs compositions de membranes ont été étudiées. Celle offrant les meilleures performances a été retenue ici [66,67]. La membrane est fabriquée par trois composés (polymère constituant la matrice, ionophore et additif ionique) dissous dans du tétrahydrofur (THF) afin d'être déposée par goutte à l'aide d'une seringue à la surface du réseau d'ultramicroélectrodes (UMEA).

Concernant la matrice polymérique, il a été choisi de travailler avec un fluoropolysiloxane (FPSX). Bien que le PVC soit le constituant le plus étudié dans la réalisation de ce type de membranes, ce dernier semble présenter une moins bonne adhésion sur certains matériaux tels que le nitrure de silicium (Si₃N₄) en comparaison au FPSX. Or, bien que les électrodes de l'UMEA soient en platine, il est important de noter que la majeure partie de ce réseau (hors des ouvertures d'électrodes) est passivée par une couche de nitrure de silicium.

Ainsi, étant donné que la membrane sensible est déposée par « drop-casting » sur l'ensemble du réseau, il était plus judicieux d'utiliser le FPSX pour assurer une meilleure adhésion.

L'ionophore choisi pour rendre cette membrane polymérique sélective aux ions nitrates est le tridodécylammonium nitrate (TDDAN).

Enfin, afin d'améliorer les propriétés de la membrane notamment en termes de sélectivité, un additif ionique est ajouté en moindre mesure: le potassium tetrakis[3,5-bis(trifluorométhyl)phényl]borate (KTFPB). L'ionophore choisi étant en réalité un échangeur d'ions, il n'est pas censé nécessiter d'additif ionique, cependant les travaux antérieurs ont démontré une amélioration des performances de détection avec l'ajout de ce composé, c'est pourquoi il a été conservé ici.

Le fluoropolysiloxane est obtenu à partir d'un fluorosilicone commercial (Dow Corning 730FS). Ce silicone est dans un premier temps dissous dans du THF à raison de 133 mg/mL, ce mélange est ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes afin d'éliminer le durcisseur. Le surnageant contenant le FPSX dissous dans le THF est extrait et constituera le mélange dans lequel seront dissous les ionophores et additifs ioniques.

Le TDDAN ainsi que le KTFPB sont fournis par Sigma-Aldrich. Ils sont pesés et incorporés dans le précédent mélange de manière à obtenir les pourcentages massiques optimisés mentionnés dans le tableau 3.2. Le mélange est passé au vortex pendant 5 minutes puis au bain à ultrasons pendant 30 minutes afin d'assurer l'obtention d'un mélange bien homogène. La membrane est ainsi prête à être déposée.

FPSX (% _m)	TDDAN (% _m)	KTFPB (% _m)
93,3	4,2	2,5

Tableau 3.2 : Pourcentages massiques des constituants de la membrane sensible aux ions nitrates

III.2.2. Dépôt de la membrane

La méthode qui a été choisie pour effectuer le dépôt de cette membrane liquide à la surface de l'UMEA est le dépôt manuel par goutte (« *drop-casting* » en anglais) à l'aide d'une micro-seringue. La micro-seringue utilisée de 5 μ L provient du fabricant Hamilton. La goutte déposée doit recouvrir l'ensemble des électrodes du réseau, c'est à dire le carré central mesurant 2340 μ m² (fig. 3.15). Ainsi le volume de membrane déposée pour obtenir un tel recouvrement est de 1,5 μ L minimum. Lorsque la goutte est déposée, le THF s'évapore quasi instantanément et un film de membrane solide reste en place.

Des mesures effectuées au profilomètre optique (Sensofar SNEOX 3D) ainsi qu'une découpe à la sonde ionique focalisée (FEI Helios 600i SEM/FIB) ont permis de déterminer qu'un dépôt de 1,5 μ L initial conduisait alors à une épaisseur de membrane avoisinant les 12 \pm 3 μ m environ. Cette méthode de dépôt manuelle, bien que très pratique, n'est pas optimale

pour la répétabilité du dépôt. Il pourrait ainsi être envisagé à posteriori d'effectuer ces mêmes dépôts par voie semi-automatisée, voire automatisée.

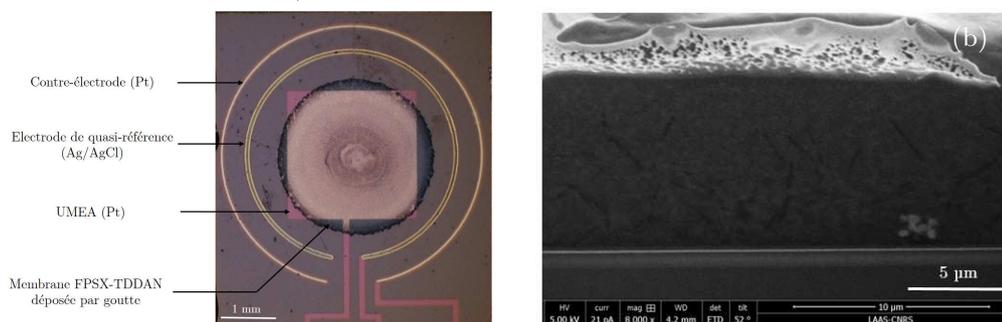


Figure 3.15 : Images du dépôt d'une goutte de membrane sensible (a) en vue de haut au microscope optique et (b) en découpe verticale au MEB

III. 3. Ajout d'une couche de transduction

Comme énoncé précédemment, le simple dépôt de la membrane sensible directement sur l'électrode métallique ne permet pas l'obtention d'une réponse rapide, stable et reproductible. Il a donc été décidé d'étudier différentes couches de transduction. Au vu de la popularité des polymères conducteurs dopés ces dernières années ainsi que de celles des matériaux carbonés nanostructurés, ces travaux se concentrent sur l'étude de trois couches basées sur un polymère conducteur dopé :

- (1) le polyéthylènedioxythiophène (PEDOT) dopé par du polystyrène sulfonate de sodium (NaPSS),
- (2) le polyéthylènedioxythiophène (PEDOT) dopé par des nanotubes de carbone à double paroi,
- (3) le polypyrrole (PPy) dopé par des nanotubes de carbone à double paroi.

Ces couches sont toutes déposées par voie électrochimique. L'éthylènedioxythiophène (EDOT), le polystyrènesulfonate de sodium (NaPSS) et le pyrrole (Py) proviennent de Sigma-Aldrich. Les solutions de dépôts sont préparées selon les protocoles suivants.

III.3.2. Préparation de la solution et électrodéposition

III.3.2.i PEDOT:PSS

Une solution de dépôt contenant 10mM d'EDOT et 34mM de NaPSS est préparée. Pour cela, une masse de 0,35g de NaPSS est dissoute dans 50 mL d'eau désionisée (EDI) sous agitation pendant une nuit. A cette solution est ajoutée 54,54 µL d'EDOT, et le mélange est placé sous agitation pendant au minimum 4h pour assurer un mélange homogène. Cette solution se conserve trois semaines maximum au réfrigérateur.

L'électrodépôt est réalisé selon des paramètres optimisés, par chronopotentiométrie à un courant de $10 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ pendant 360 secondes.

III.3.2.ii PEDOT:DWCNT

Une solution de dépôt contenant 10 mM d'EDOT et 1 mg/mL de nanotubes de carbones à double paroi oxydés est préparée.

Les nanotubes de carbone à double-paroi (DWCNT pour « *Double-Walled Carbon Nanotubes* » en anglais) fournis par le CIRIMAT ont été synthétisés par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD pour « *Chemical Catalytic Vapor Deposition* » en anglais) [68]. Immédiatement après synthèse, ils sont oxydés dans un bain d'acide nitrique à 3 mol.L^{-1} durant 24h à reflux à $120 \text{ }^\circ\text{C}$ [69]. Par la suite, les nanotubes sont filtrés et lavés à l'EDI à pH neutre. Ils sont conservés humides après filtration afin de les redisperser plus facilement. De cette manière, une dispersion de DWCNT à 2 mg/mL dans de l'EDI est préparée.

La solution de dépôt est préparée par ajout de $10,9 \text{ }\mu\text{L}$ d'EDOT dans 5 mL d'EDI. Cette solution est passée au vortex pendant 2h. A cette solution sont ajoutés 5 mL de la dispersion de DWCNT à 2 mg/mL préalablement préparée et passée aux ultrasons 30 minutes. La solution obtenue (contenant donc 10 mM d'EDOT et 1 mg/mL de DWCNT) est à nouveau passée au vortex pendant 2h puis passée au bain à ultrasons pendant 30 minutes afin d'assurer une bonne homogénéité. Cette solution se conserve au maximum 72h au réfrigérateur dans le noir.

L'électrodépôt est réalisé par chronopotentiométrie à un courant de $10 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ pendant 380 secondes.

III.3.2.iii PPy:DWCNT

Une solution de dépôt contenant $0,25 \text{ M}$ de pyrrole et 1 mg/mL de DWCNT est préparée. Pour cela, $75 \text{ }\mu\text{L}$ de pyrrole sont dissous dans 5 mL d'eau. La solution est passée au vortex 15 min puis 5 mL de dispersion de DWCNT à 2 mg/mL y sont ajoutés. La solution est passée aux ultrasons 15 min puis passée au vortex 15 minutes à nouveau. Cette solution se conserve 24h à température ambiante.

L'électrodépôt est réalisé par chronopotentiométrie à un courant de $10 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ pendant 480 secondes.

III.3.3. Caractérisation des dépôts

III.3.3.i Microscopie

Des images au microscope optique ainsi qu'au microscope électronique à balayage ont été réalisées afin de pouvoir observer leur morphologie.

Le dépôt de PEDOT:PSS est un dépôt très répétable qui se réalise de manière homogène sur l'ensemble des 25 ultramicroélectrodes interconnectées du réseau. Comme le montre les images, le dépôt reste concentré sur l'électrode et ne dépasse pas les 10 μm de diamètre. (fig. 3.16a et 3.17a)

Dans le cas du dépôt de PEDOT:DWCNT, les images montrent la formation d'agrégats de DWCNT dans le PEDOT et il est impossible de voir les DWCNT (fig. 3.16b et 3.17b). Il est important de préciser que ce dépôt n'était pas très répétable et il ne s'effectuait pas toujours bien sur l'ensemble des microélectrodes du réseau. Cela peut éventuellement s'expliquer par la faible hydrosolubilité de l'EDOT dans l'EDI.

Enfin, le dépôt de PPy:DWCNT était un dépôt très répétable bien que dépassant légèrement sur les bords de l'électrode. Les images en microscopie électronique à balayage ont permis de mettre en évidence cette fois-ci la présence des DWCNT dans le polypyrrole. (fig. 3.16c et 3.17c).

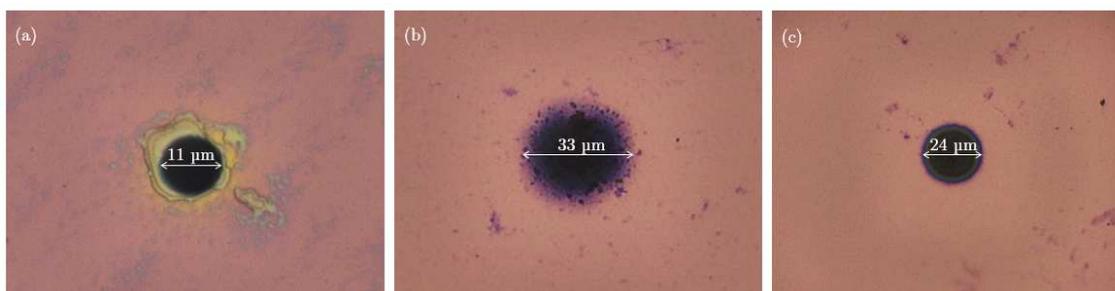


Figure 3.16 : Images en microscopie optique des dépôts de (a) PEDOT:PSS, (b) PEDOT:DWCNT et (c) PPy:DWCNT

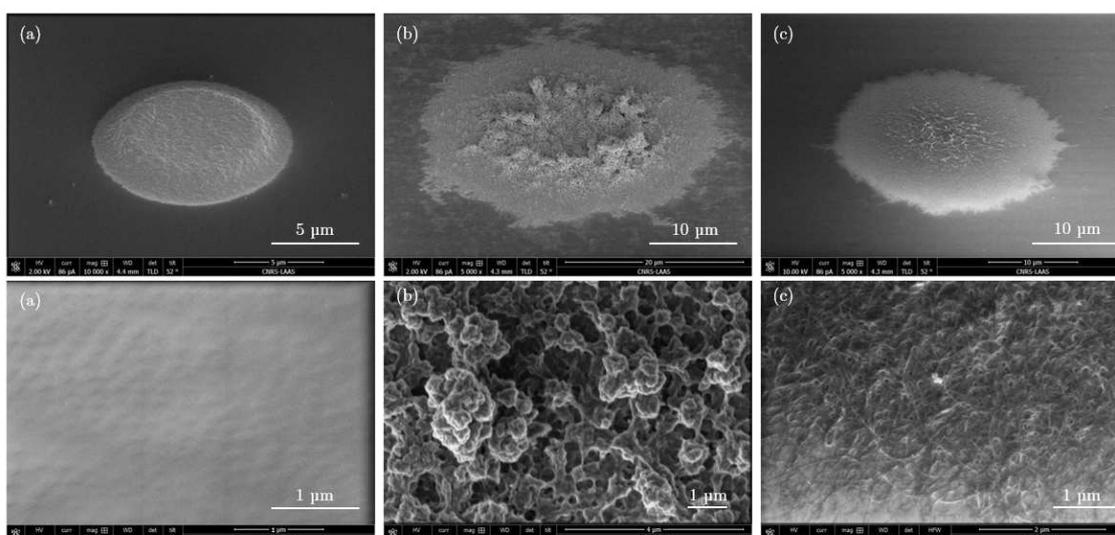


Figure 3.17 : Images en microscopie électronique à balayage des dépôts de PEDOT:PSS, (b) PEDOT:DWCNTs et (c) PPy:DWCNTs

III.3.3.ii Spectroscopie d'impédance électrochimique

Pour rappel, le principal objectif recherché par l'utilisation de ce type de matériaux nanostructurés comme contact solide est d'augmenter la surface de contact et donc par conséquent la capacité de double-couche. Afin de s'assurer que c'est bien le cas, il est possible d'effectuer des caractérisations par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) (cf. Chapitre 2, II.4).

Les mesures d'impédances ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat BioLogic dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ à 0V vs. SCE dans la gamme de fréquence [10 Hz - 10 kHz]. Les diagrammes de Bode tracés pour les différents dépôts ainsi que pour le platine seul ont permis de déduire plusieurs informations. (fig. 3.18)

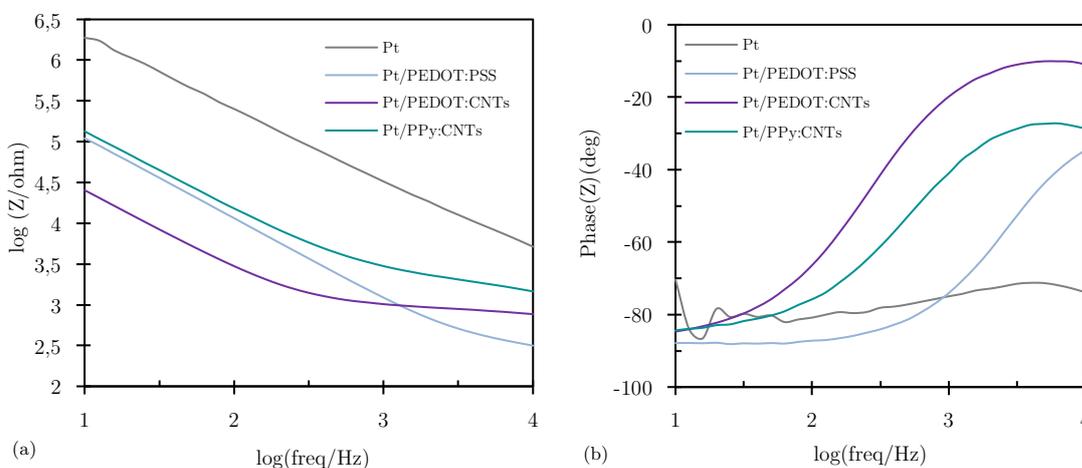


Figure 3.18 : Diagrammes de Bode réalisés par EIS sur les différentes électrodes modifiées

Tout d'abord, le premier graphique représentant en échelle logarithmique les valeurs du module de l'impédance en fonction de la fréquence traduit que les valeurs d'impédance des UMEA modifiés par un dépôt sont inférieures à celle de l'UMEA en platine brut. De tels dépôts améliorent la conductivité spécifique du matériau. De plus, les composites, de par leur morphologie, augmentent la surface active, ce qui se traduit par une diminution de l'impédance. Enfin, comme observé en microscopie, le dépôt particulier de PEDOT:DWCNT semble présenter une surface plus importante ainsi qu'une morphologie assez poreuse entraînant une meilleure diffusion des ions, ce qui peut expliquer cette réduction d'impédance plus importante.

Le second graphique représente la valeur de l'angle de phase en fonction du logarithme de la fréquence. Ce graphique montre que dans le cas des UMEA modifiées par les trois types de dépôt, l'angle de phase passe d'environ 90° dans les basses fréquences à une valeur comprise entre 40° et 10° vers les hautes fréquences. Cela révèle un comportement capacitif prédominant à basses fréquences et un comportement résistif prédominant à hautes fréquences. Ce

changement de phase permet de confirmer que les dépôts effectués entraînent une augmentation de la capacité de double-couche électronique.

Ces résultats confirment que la réalisation de tels dépôts permet d'améliorer les propriétés des électrodes notamment par augmentation de la surface active des électrodes et donc de la capacité de double-couche.

III. 4. Mesure des ions nitrates et performances des capteurs

III.4.1. Sensibilité, stabilité et temps de réponse

Les quatre types d'ISE ont été testés dans des solutions de KNO_3 à différentes concentrations afin d'évaluer différents paramètres à savoir : leur temps de réponse, leur sensibilité ainsi que leur limite de détection. Le capteur est ainsi placé successivement dans des solutions de KNO_3 à différentes concentrations et le potentiel à courant nul est mesuré par le potentiostat en présence d'une électrode de référence $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$. Comme expliqué précédemment, la valeur de la différence de potentiel entre l'UMEA et l'électrode de référence est supposée être proportionnelle au logarithme de la concentration en ions NO_3^- (pNO_3) et suivre, dans le cas idéal, la loi de Nernst.

La figure 3.19 reporte les réponses des électrodes dans des solutions de KNO_3 successives de concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-1} mol.L⁻¹.

En l'absence de couche de transduction (fig. 3.19a), bien qu'il soit possible d'atteindre une valeur plus ou moins stable du potentiel, le temps de réponse est d'environ 30 minutes minimum. La gamme de linéarité est réduite (entre 10^{-2} et 10^{-4} mol.L⁻¹). A des concentrations inférieures à 10^{-4} mol.L⁻¹, l'ISE répond aléatoirement (résultats non présentés).

D'après les graphes suivants (fig. 3.19b-d), il apparaît clairement que l'ajout d'une couche de transduction quelle qu'elle soit permet d'améliorer la réponse de l'ISE sous différents aspects. Tout d'abord, le temps de réponse passe de 30 à 5 minutes pour une couche de PEDOT:PSS puis devient inférieur à la seconde pour les couches contenant des DWCNTs. Cela permet de déduire que la présence de DWCNTs permet d'améliorer drastiquement le temps de réponse. Pour les trois dépôts, les réponses présentent une bonne stabilité sur les durées testées comprises entre 3 et 5 minutes.

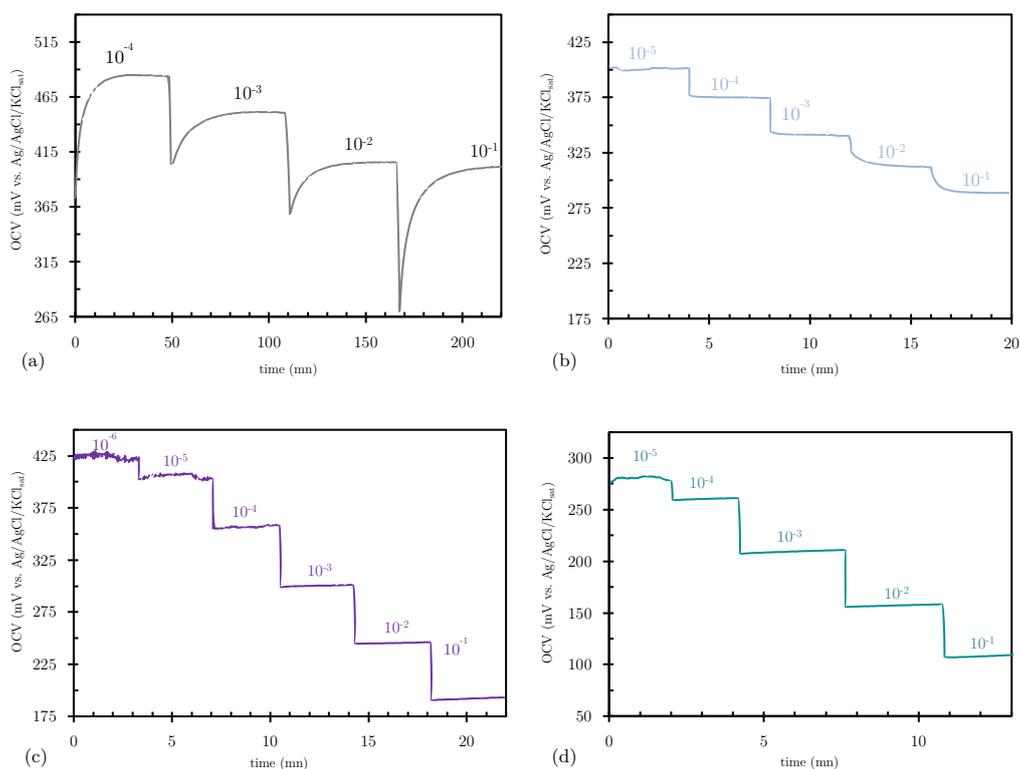


Figure 3.19 : Évolution du potentiel en circuit ouvert pour des ISE à différentes couches de transduction (avec (a) sans, (b) PEDOT:PSS, (c) PEDOT:DWCNT et (d) PPy:DWCNT) en fonction du temps dans des solutions de KNO_3 de concentrations comprises entre 10^{-5} et $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$

Ces résultats ont permis de déterminer les pentes de sensibilités (potentiel à courant nul en fonction du logarithme de la concentration en NO_3^- , noté pNO_3) pour chacune des ISE (fig. 3.20).

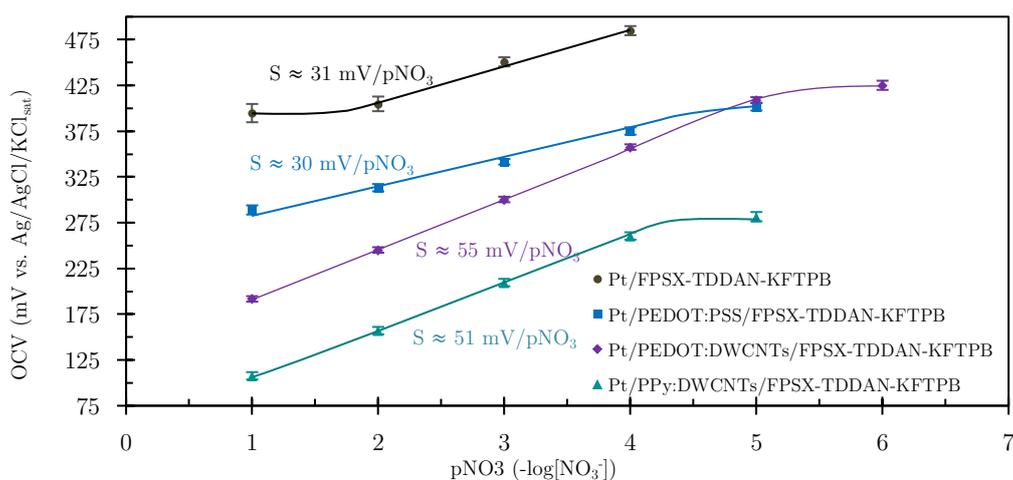


Figure 3.20 : Évolution du potentiel en circuit ouvert en fonction du pNO_3 pour des ISE à différentes couches de transduction (avec (a) sans, (b) PEDOT:PSS, (c) PEDOT:DWCNT et (d) PPy:DWCNT)

Il est clair que l'ajout de DWCNT permet d'augmenter la sensibilité. En effet, alors que la sensibilité approxime les 30 mV/pNO₃ pour les ISE sans couche de transduction et avec PEDOT:PSS, elle atteint les 55,3 mV/pNO₃ et 51,1 mV/pNO₃ respectivement pour des dépôts de PEDOT:DWCNT et PPy:DWCNT. La meilleure sensibilité des dépôts contenant du PEDOT face à celle du polypyrrole peut s'expliquer par la morphologie obtenue totalement différente de ces deux types de dépôts (fig. 3.14b-c). La structure très poreuse due aux agrégats formés par les DWCNT dans le PEDOT ainsi que la taille plus importante du dépôt augmente la surface active et donc la capacité de double-couche, ce qui permet de se rapprocher d'une réponse nernstienne.

Le tableau 3.3 regroupe les résultats obtenus pour les quatre types d'ISE. La limite de détection varie entre 10⁻⁴ M pour un dépôt de PEDOT:PSS à 10⁻⁶ M pour un dépôt de PEDOT:DWCNT. Cette valeur est tout à fait convenable étant donné que la concentration en nitrates dans les eaux douces de surface est au minimum de 7,5.10⁻⁵ mol.L⁻¹ (dans le cas d'une eau non polluée) et atteint aujourd'hui dans certaines eaux polluées les 8.10⁻⁴ mol.L⁻¹. D'après les gammes de linéarité obtenues, les capteurs sont capables de mesurer la quantité d'ions nitrates en eau douce.

Couche de transduction	Sensibilité (mV/pNO ₃)	Limite de détection (M)	Gamme de linéarité (M)	Temps de réponse estimé
aucune	31 ± 2	10 ⁻⁴	10 ⁻² - 10 ⁻⁴	30 mn
PEDOT:PSS	30 ± 1	10 ⁻⁵	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁴	2 mn
PEDOT:DWCNTs	55 ± 1	10 ⁻⁶	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁵	< 1 s
PPy:DWCNTs	51 ± 1	10 ⁻⁵	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁴	< 1 s

Tableau 3.3 : Résultats obtenus pour les quatre types d'ISE

III.4.2. Sélectivité

La sélectivité est un paramètre essentiel dans la réalisation d'ISE. En effet, elle sert à définir la capacité du capteur à détecter l'ion cible en présence d'autres ions interférents. Si l'ISE n'est pas suffisamment sélective, la réponse du capteur sera grandement altérée par les concentrations des ions interférents pouvant être présents dans le milieu réel d'analyse.

Il existe différentes méthodes de mesure de la sélectivité. Celle qui a été choisie ici est la méthode « FIM » (Fixed Interference Method). Dans ce cas, la détermination de la sélectivité se fait dans une solution contenant à la fois l'ion cible et l'ion interférent. L'activité de l'ion interférent a_j est fixe et l'activité de l'ion interféré varie. La valeur du potentiel à courant nul pour chaque valeur de a_i est tracée et l'extrapolation des parties linéaires de cette courbe permet d'obtenir la valeur de a_i à l'intersection (fig. 3.21) permettant de calculer le coefficient de sélectivité K_{ij} tel que :

$$K_{ij} = \frac{a_i}{a_j^{z_i/z_j}}$$

avec z la valence de l'ion et a_j l'activité de l'ion primaire (fixe).

La valeur du coefficient de sélectivité est souvent exprimée par son logarithme et une bonne sélectivité face à un ion est souvent considérée lorsque $\log(K_{ij})$ est au minimum supérieur à 2.

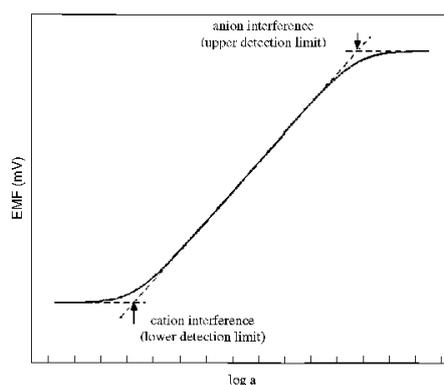


Figure 3.21 : Réponse d'une ISE en présence d'un ion interférent dans le cas de la détection d'anions ou de cations [70]

Dans le cadre de ces travaux, il a été choisi d'étudier la sélectivité face à trois anions interférents que sont les ions chlorures (Cl^-), les ions carbonates (HCO_3^-) et les ions sulfates (SO_4^{2-}) car ils sont les anions les plus présents dans les eaux douces de surface et donc les plus susceptibles d'interférer avec la mesure des ions nitrates. La concentration fixe en ion interférent choisie est de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de sorte à être suffisamment supérieure aux concentrations pouvant exister en eau douce et donc de s'assurer d'une bonne sélectivité du capteur.

Ainsi, le capteur est placé dans des solutions de KNO_3 dont la concentration varie mais qui contiennent toute une concentration en ion interférent fixée. Étant donné les meilleures performances des capteurs avec couche de transduction PEDOT:DWCNT et PPy:DWCNT, seules leurs sélectivités ont été étudiées. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 3.22 et dans le tableau 3.4 et montrent que le capteur PEDOT:DWCNT présente

les meilleures performances quant à la sélectivité face aux ions chlorures et sulfates. Néanmoins, les deux capteurs présentent une bonne sélectivité face aux trois ions interférents testés.

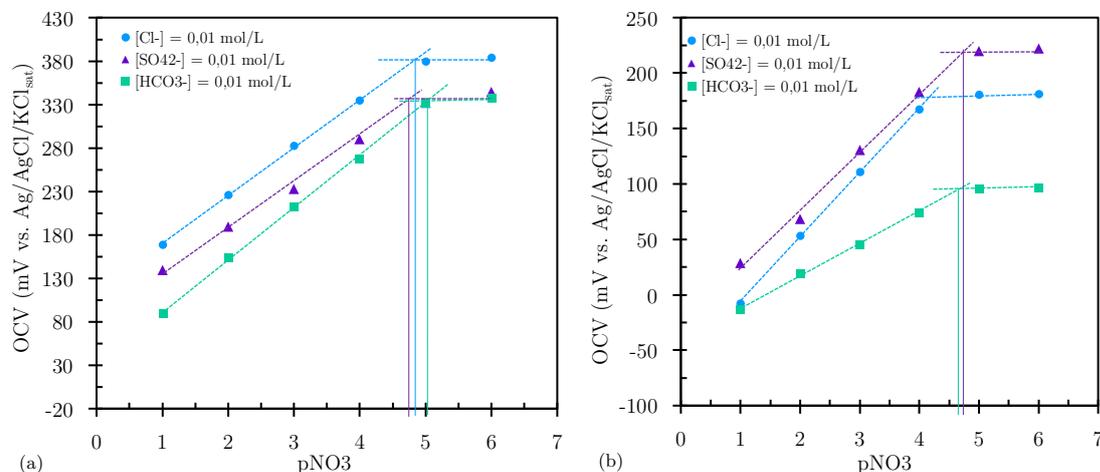


Figure 3.22 : Évolution du potentiel en circuit ouvert à différents pNO₃ avec une concentration en ion interférent constante (méthode FIM) pour un capteurs (a) Pt/PEDOT:DWCNTs/FPSX-TDDAN-KFTPB et (b) Pt/PPy:DWCNTs/FPSX-TDDAN-KFTPB

	$\log(K_{NO_3, Cl^-})$	$\log(K_{NO_3, HCO_3^-})$	$\log(K_{NO_3, SO_4^{2-}})$
PEDOT:DWCNT	-2,7	-2,8	-4,1
PPy:DWCNT	-2,2	-2,8	-3,9

Tableau 3.4 : Coefficients de sélectivités obtenus par la méthode FIM pour les capteurs à ISEs modifiées avec couche de transduction

Il a été remarqué une diminution importante de la sensibilité du capteur à transduction PPy:DWCNTs en présence de l'ion carbonate HCO_3^- (fig. 3.22b). L'ion carbonate participe à deux couples acide/base que sont H_2CO_3/HCO_3^- ($pK_a = 6,37$) et HCO_3^-/CO_3^{2-} ($pK_a = 10,32$), son ajout dans la solution pourrait donc entraîner des modifications du pH. Or, il est reporté dans la bibliographie que le pH influe sur la protonation du polypyrrole, ce qui entraînerait la diminution du nombre de porteurs de charge et donc expliquerait la diminution de sensibilité [71–73].

III.4.3. Dérive à long terme et durée de vie

Bien que l'objectif final de l'application soit des mesures rapides et ponctuelles sur site, la stabilité sur plusieurs jours des capteurs a été testée. Les capteurs ont été placés dans une solution de KNO_3 à 1.10^{-2} mol.L⁻¹ pendant 72h et la valeur de potentiel à courant nul a

été mesurée continuellement (fig. 3.23). Les résultats montrent que l'ISE à couche de transduction PPy:DWCNTs présente une bonne stabilité sur les plusieurs jours avec une dérive estimée à -2 mV/jour tandis que l'ISE à couche de transduction PEDOT:DWCNTs laisse apparaître un phénomène non expliqué induisant une instabilité plus importante.

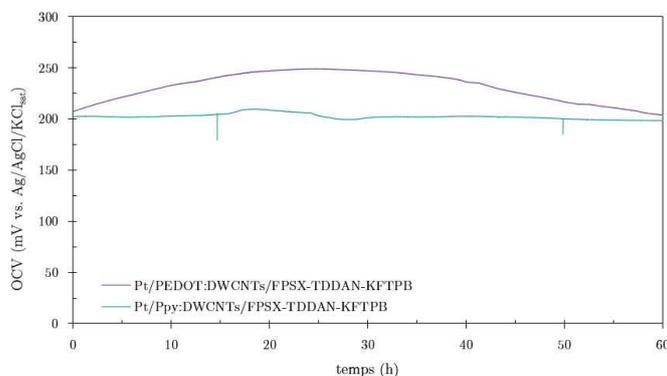


Figure 3.23 : Évolution du potentiel en circuit ouvert dans une solution de KNO_3 à 1.10^{-2} mol.L $^{-1}$ pour les ISE modifiées

Une autre étude a été menée de sorte à estimer la durée de vie des capteurs (tab. 3.5). Chaque capteur a été testé au jour 1, jour 7 et jour 30. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.3 et montrent que, pour les deux types de capteurs, la sensibilité décroît légèrement au bout du 7^{ème} jour. Après 30 jours, la sensibilité a largement baissé dans les deux cas également. Néanmoins, le capteur répond toujours. Entre chaque mesure, les capteurs ont été stockés à sec sans conditionnement particulier.

Au bout d'un mois, il faut noter que les temps de réponse sont un peu plus lents, ce qui peut être dû au vieillissement de la membrane et qu'enfin, la dérive devient non négligeable.

	PEDOT:DWCNT		PPy:DWCNT	
	Sensibilité (mV/pNO ₃)	Temps de réponse (s)	Sensibilité (mV/pNO ₃)	Temps de réponse (s)
Jour 1	55 ± 1	< 1	51 ± 1	< 1
Jour 7	53 ± 2	< 1	49 ± 2	< 1
Jour 30	42 ± 6	~ 60	40 ± 20	~ 120

Tableau 3.5 : Évolution des propriétés des capteurs avec ISE (a) Pt/PEDOT:DWCNT/FPSX-TDDAN-KFTP et (b) Pt/PPy:DWCNT/FPSX-TDDAN-KFTP

En vue de l'application, ces capteurs sont initialement destinés à être à usage unique et les temps de mesures sont prévus pour ne pas excéder les 10 minutes. Ainsi, leur durée de vie n'est pas un point bloquant dans ce cadre.

III.4.4. Hystérésis

Comme le montre la figure 3.24, une hystérésis apparaît parfois. En effet, le capteur semble ne pas répondre de la même façon lorsque la concentration en ions nitrates augmente et lorsqu'elle diminue. Cependant cette hystérésis n'apparaît pas toujours. Cela s'explique probablement par le dépôt de la membrane FPSX-TDDAN-KFTPB et notamment par son épaisseur. En effet, comme expliqué précédemment, le dépôt de cette membrane s'effectue manuellement par goutte à l'aide d'une seringue. La quantité de dépôt nécessaire pour recouvrir entièrement l'UMEA en regard des propriétés de mouillabilité du support conduit à une épaisseur de membrane pouvant varier entre 10 et 15 μm d'épaisseur (1,5 à 2 μL déposés). Or, il est possible que plus la membrane soit épaisse, moins elle aura de facilité à désorber les ions. Cela pourrait donc conduire à une sensibilité moins importante lors de la diminution de la concentration par rapport à la sensibilité lors de l'augmentation de la concentration.

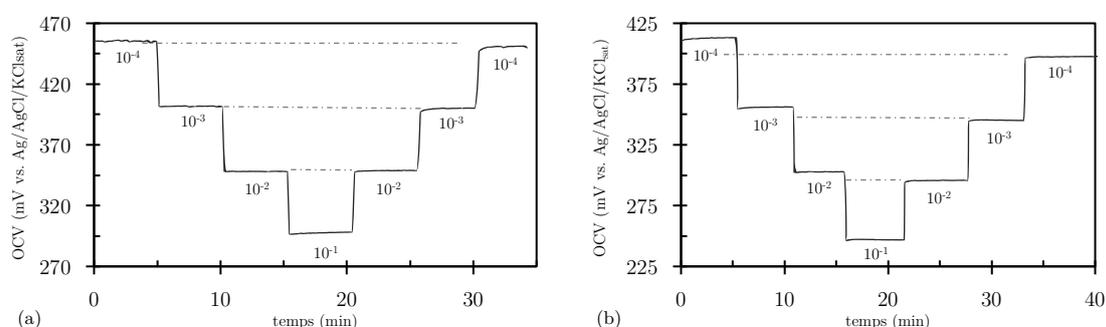


Figure 3.24 : Potentiel en circuit ouvert en fonction du temps dans différentes solutions de KNO_3 sur des capteurs Pt/PEDOT:DWCNT/FPSX-KFTPB-TDDAN présentant (a) ou non (b) une hystérésis

Afin d'éviter ce type de problème, il pourrait être intéressant de revoir le procédé de dépôt de la membrane et de l'améliorer. Il est tout à fait envisageable d'automatiser ou semi-automatiser ce dépôt ce qui rendrait les résultats plus répétables en termes d'épaisseur de couche.

III.5. Conclusion sur la détection des ions nitrates

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer que l'ajout d'une couche de transduction « ion-électron » à base d'un composite polymère conducteur/matériau carboné nanostructuré permettait d'augmenter drastiquement les performances du capteur potentiométrique dans le cadre de la détection des ions nitrates. Le Polypyrrole, dû à sa dissolution aisée dans la solution de nanotubes de carbones, a démontré une réelle facilité dans l'obtention d'un dépôt bien localisé et répétable sur les ultramicroélectrodes interconnectées du réseau contrairement au PEDOT. Pour des mesures potentiométriques, il serait plus aisé d'avoir une unique électrode, de surface plus importante, ce qui faciliterait le processus de dépôt. Néanmoins, cette configuration en réseau présentant de nombreux avantages en ampérométrie (cf. Chapitre 2 et 4) et étant donné qu'il a été décidé d'utiliser les capteurs issus d'un même

procédé de fabrication, il a fallu optimiser les paramètres sur ce type de capteur. Les résultats obtenus dans le cadre de la détection des ions nitrates sont satisfaisants pour de la pré-détection en eau douce de manière ponctuelle et rapide.

IV. Conclusion

Les résultats obtenus ici montrent que la cellule électrochimique ElecCell développée en salle blanche (cf. Chapitre 2) est adaptable à des fins de détection potentiométrique du pH et des ions nitrates. Pour rappel, ces capteurs ont pour objectif d'être intégrés au sein d'une plateforme multicapteurs afin d'effectuer des mesures ponctuelles et rapides directement sur site en eau douce.

Le microcapteur pH basé sur un dépôt par voie électrochimique d'oxyde d'iridium a permis d'obtenir une bonne sensibilité (62 mV/pH) en accord avec la bibliographie et une bonne stabilité à court terme. Ce capteur présente une dérive sur le long terme qui pourrait être diminuée en optimisant encore la méthode et/ou l'épaisseur de dépôt mais qui n'est pas bloquante pour l'application.

De la même manière, le microcapteur d'ions nitrates basé sur une membrane polymérique en FPSX à base d'échangeur d'ions TDDAN a été optimisé au maximum par ajout d'une couche de transduction « ion-électron » adaptée. Les résultats ont montré l'intérêt de l'utilisation d'un composite polymère conducteur (PEDOT ou pyrrole) et nanotubes de carbone. Ainsi, une bonne sensibilité des capteurs approchant une réponse nernstienne a pu être obtenue sur une gamme de concentrations en nitrates adaptée à l'application.

Les protocoles mis en œuvre, bien que perfectibles, permettent néanmoins l'obtention de mesures fiables et répétables. Il pourrait par ailleurs être envisageable de développer des capteurs adaptés à la détection d'autres ions basés sur la même approche d'électrodes sélectives à membranes polymères.

Bibliographie

- [1] Cremer, M. Über Die Ursache Der Elektromotorischen Eigenschaften Der Gewebe, Zugleich Ein Beitrag Zur Lehre von Den Polyphasischen Elektrolytketten. *z. Biol.*, **1906**, *47*, 562–608.
- [2] Haber, F.; Hlomensiewicz, Z. Über elektrische Phasengrenzkkräfte. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **1909**, *67U*, 385–431.
- [3] Moore, C.; Pressman, B.C. Mechanism of Action of Valinomycin on Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1964**, *15*, 562–567.
- [4] Štefanac, Z.; Simon, W. In-Vitro Behavior of Macrotetrolides in Membranes as Basis For High-Selective, Cation-Specific Electrode Systems. *Chimia*, **1966**.
- [5] LeBlanc, O.H.; Grubb, W.T. Long-Lived Potassium Ion Selective Polymer Membrane Electrode. *Anal. Chem.*, **1976**, *48*, 1658–1660.
- [6] R. Thomas, J.D. Selective Membrane Electrodes for Analysis. *Analyst*, **1994**, *119*, 203–208.
- [7] Armstrong, R.D.; Horvai, G. Properties of PVC Based Membranes Used in Ion-Selective Electrodes. *Electrochimica Acta*, **1990**, *35*, 1–7.
- [8] Eugster, R.; Rosatzin, T.; Rusterholz, B.; Aebersold, B.; Pedrazza, U.; Rüegg, D.; Schmid, A.; Spichiger, U.E.; Simon, W. Plasticizers for Liquid Polymeric Membranes of Ion-Selective Chemical Sensors. *Analytica Chimica Acta*, **1994**, *289*, 1–13.
- [9] Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 3083–3132.
- [10] Faridbod, F.; Ganjali, M.; Dinarvand, R.; Norouzi, P. The Fabrication of Potentiometric Membrane Sensors and Their Applications. *African Journal of Biotechnology (ISSN: 1684-5315) Vol 6 Num 25*, **2007**, *6*.
- [11] Schaller, Ulrich.; Bakker, Eric.; Spichiger, U.E.; Pretsch, Ernoe. Ionic Additives for Ion-Selective Electrodes Based on Electrically Charged Carriers. *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 391–398.
- [12] Eugster, Rudolf.; Gehrig, P.M.; Morf, W.E.; Spichiger, U.E.; Simon, Wilhelm. Selectivity-Modifying Influence of Anionic Sites in Neutral-Carrier-Based Membrane Electrodes. *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 2285–2289.
- [13] Bobacka, J.; Maj-Zurawska, M.; Lewenstam, A. Carbonate Ion-Selective Electrode with Reduced Interference from Salicylate. *Biosensors and Bioelectronics*, **2003**, *18*, 245–253.
- [14] Aghamohammadi, M.; Alizadeh, N. Coated Wire Ion-Selective Electrode for Palladium(II) and Its Application to Catalyst Analysis. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, *480*, 299–306.
- [15] Hu, J.; Stein, A.; Bühlmann, P. Rational Design of All-Solid-State Ion-Selective Electrodes and Reference Electrodes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2016**, *76*, 102–114.
- [16] Hulanicki, A.; Trojanowicz, M. Calcium-Selective Electrodes with Pvc Membranes and Solid Internal Contacts. *Analytica Chimica Acta*, **1976**, *87*, 411–417.
- [17] Nikolskii, B.P.; Materova, E.A. Solid Contact in Membrane Ion-Selective Electrodes. In: *Ion-Selective Electrode Reviews*; Thomas, J.D.R., Ed.; Ion-Selective Electrode Reviews; Elsevier, **1985**; Vol. 7, pp. 3–39.
- [18] Cha, G.Sig.; Liu, Dong.; Meyerhoff, M.E.; Cantor, H.C.; Midgley, A.Rees.; Goldberg, H.D.; Brown, R.B. Electrochemical Performance, Biocompatibility, and Adhesion of New Polymer Matrixes for Solid-State Ion Sensors. *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 1666–1672.

-
- [19] Fibbioli, M.; Morf, W.E.; Badertscher, M.; De Rooij, N.F.; Pretsch, E. Potential Drifts of Solid-Contacted Ion-Selective Electrodes Due to Zero-Current Ion Fluxes Through the Sensor Membrane. *Electroanalysis*, **2000**, *12*, 1286–1292.
- [20] Chan, A.D.C.; Li, Xizhong.; Harrison, D.J. Evidence for a Water-Rich Surface Region in Poly(Vinyl Chloride)-Based Ion-Selective Electrode Membranes. *Anal. Chem.*, **1992**, *64*, 2512–2517.
- [21] Bobacka, J. Potential Stability of All-Solid-State Ion-Selective Electrodes Using Conducting Polymers as Ion-to-Electron Transducers. *Analytical chemistry*, **1999**, *71*, 4932–4937.
- [22] Nguyen, D.N.; Yoon, H. Recent Advances in Nanostructured Conducting Polymers: From Synthesis to Practical Applications. *Polymers*, **2016**, *8*, 118.
- [23] He, N.; Papp, S.; Lindfors, T.; Höfler, L.; Latonen, R.-M.; Gyurcsányi, R.E. Pre-Polarized Hydrophobic Conducting Polymer Solid-Contact Ion-Selective Electrodes with Improved Potential Reproducibility. *Anal Chem*, **2017**, *89*, 2598–2605.
- [24] Lindfors, T. Light Sensitivity and Potential Stability of Electrically Conducting Polymers Commonly Used in Solid Contact Ion-Selective Electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry*, **2009**, *13*, 77–89.
- [25] Bobacka, J.; Ivaska, A.; Lewenstam, A. Potentiometric Ion Sensors. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 329–351.
- [26] Crespo, G.A.; Macho, S.; Bobacka, J.; Rius, F.X. Transduction Mechanism of Carbon Nanotubes in Solid-Contact Ion-Selective Electrodes. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 676–681.
- [27] Crespo, G.A.; Macho, S.; Rius, F.X. Ion-Selective Electrodes Using Carbon Nanotubes as Ion-to-Electron Transducers. *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 1316–1322.
- [28] Paczosa-Bator, B. Effects of Type of Nanosized Carbon Black on the Performance of an All-Solid-State Potentiometric Electrode for Nitrate. *Microchimica Acta*, **2014**, *181*.
- [29] Hernández, R.; Riu, J.; Bobacka, J.; Vallés, C.; Jiménez, P.; Benito, A.M.; Maser, W.K.; Rius, F.X. Reduced Graphene Oxide Films as Solid Transducers in Potentiometric All-Solid-State Ion-Selective Electrodes. *J. Phys. Chem. C*, **2012**, *116*, 22570–22578.
- [30] Ping, J.; Wang, Y.; Wu, J.; Ying, Y. Development of an All-Solid-State Potassium Ion-Selective Electrode Using Graphene as the Solid-Contact Transducer. *Electrochemistry Communications*, **2011**, *13*, 1529–1532.
- [31] Ye, J.; Li, F.; Gan, S.; Jiang, Y.; An, Q.; Zhang, Q.; Niu, L. Using Sp²-C Dominant Porous Carbon Sub-Micrometer Spheres as Solid Transducers in Ion-Selective Electrodes. *Electrochemistry Communications*, **2015**, *50*, 60–63.
- [32] Les Valeurs “Normales” Du pH de l’eau ?
- [33] Ives, D.J.G.; Janz, G.J. *Reference Electrodes, Theory and Practice*, Academic Press, **1961**.
- [34] Manjakkal, L.; Szwagierczak, D.; Dahiya, R. Metal Oxides Based Electrochemical pH Sensors: Current Progress and Future Perspectives. *Progress in Materials Science*, **2020**, *109*, 100635.
- [35] Bezbaruah, A. Fabrication of Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Film pH Microelectrodes for Microenvironmental Studies. *Analytical chemistry*, **2002**, *74*, 5726–5733.
- [36] VanHoudt, P.; Lewandowski, Z.; Little, B. Iridium Oxide pH Microelectrode. *Biotechnology and Bioengineering*, **1992**, *40*, 601–608.
- [37] Burke, L.D.; Mulcahy, J.K.; Whelan, D.P. Preparation of an Oxidized Iridium Electrode and the Variation of Its Potential with pH. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, **1984**, *163*, 117–128.
- [38] Ges, I.; Ivanov, B.; Schaffer, D.; Lima, E.; Werdich, A.; Baudenbacher, F. Thin-Film IrO pH

- Microelectrode for Microfluidic-Based Microsystems. *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, *21*, 248–256.
- [39] Lale, A.; Tsopele, A.; Civélas, A.; Salvagnac, L.; Launay, J.; Temple-Boyer, P. Integration of Tungsten Layers for the Mass Fabrication of WO₃-Based pH-Sensitive Potentiometric Microsensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, *206*, 152–158.
- [40] Tsopele, A.T. *Development of a Lab-on-Chip Platform Integrating Electrochemical Microsensors for the Detection of Water Contaminants Based on Algal Physiology Monitoring*. phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, February **2015**.
- [41] Elsen, H.A.; Monson, C.F.; Majda, M. Effects of Electrodeposition Conditions and Protocol on the Properties of Iridium Oxide pH Sensor Electrodes. *J. Electrochem. Soc.*, **2009**, *156*, F1.
- [42] Yamanaka, K. Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Films (AEIROF) from Alkaline Solutions for Electrochromic Display Devices. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1989**, *28*, 632.
- [43] Marzouk, S.A.M. Improved Electrodeposited Iridium Oxide pH Sensor Fabricated on Etched Titanium Substrates. *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 1258–1266.
- [44] Eddarir, A. *Conception et réalisation d'un dispositif tridimensionnel à matrice de microélectrodes pour la mesure électrophysiologique et la détection pH d'une culture neuronale in vitro*. phdthesis, Université Paul Sabatier - Toulouse III, September **2022**.
- [45] Johnson, C.J.; Bonrud, P.A.; Dosch, T.L.; Kilness, A.W.; Senger, K.A.; Busch, D.C.; Meyer, M.R. Fatal Outcome of Methemoglobinemia in an Infant. *JAMA*, **1987**, *257*, 2796–2797.
- [46] World Health Organization. *Nitrate and Nitrite in Drinking-Water: Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*; World Health Organization, **2003**.
- [47] Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000465574> (Accessed Jun 19, **2023**).
- [48] Concentrations en nitrates d'origine agricole dans les cours d'eau et les eaux souterraines en France - Données 2016-2017. <https://www.eaufrance.fr/publications/concentrations-en-nitrates-dorigine-agricole-dans-les-cours-deau-et-les-eaux-5> (Accessed Jun 19, **2023**).
- [49] Ianoul, A.; Coleman, T.; Asher, S.A. UV Resonance Raman Spectroscopic Detection of Nitrate and Nitrite in Wastewater Treatment Processes. *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 1458–1461.
- [50] Ferree, M.A.; Shannon, R.D. Evaluation of a Second Derivative UV/Visible Spectroscopy Technique for Nitrate and Total Nitrogen Analysis of Wastewater Samples. *Water Research*, **2001**, *35*, 327–332.
- [51] Michalski, R.; Kurzyca, I. Determination of Nitrogen Species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in Environmental Samples by Ion Chromatography. *Polish Journal of Environmental Studies*, **2006**, *15*, 5–18.
- [52] Friedberg, M.A.; Hinsdale, M.E.; Shihabi, Z.K. Analysis of Nitrate in Biological Fluids by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1997**, *781*, 491–496.
- [53] Lotfi Zadeh Zhad, H.R.; Lai, R.Y. Comparison of Nanostructured Silver-Modified Silver and Carbon Ultramicroelectrodes for Electrochemical Detection of Nitrate. *Analytica Chimica Acta*, **2015**, *892*, 153–159.
- [54] Shiddiky, M.J.A.; Won, M.-S.; Shim, Y.-B. Simultaneous Analysis of Nitrate and Nitrite in a Microfluidic Device with a Cu-Complex-Modified Electrode. *Electrophoresis*, **2006**, *27*, 4545–4554.

- [55] da Silva, I.S.; de Araujo, W.R.; Paixão, T.R.L.C.; Angnes, L. Direct Nitrate Sensing in Water Using an Array of Copper-Microelectrodes from Flat Flexible Cables. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2013**, *188*, 94–98.
- [56] Wardak, C. Solid Contact Nitrate Ion-Selective Electrode Based on Ionic Liquid with Stable and Reproducible Potential. *Electroanalysis*, **2014**, *26*, 864–872.
- [57] Oviedo, M.; Padilla, E.; Arias de Fuentes, O.; Prokhorov, Y.; Luna-Barcenas, G. *Chitosan/Bentonite Nanocomposite: Preliminary Studies of Its Potentiometric Response to Nitrate Ions in Water* In: **2014**; pp. 1–4.
- [58] Hjort, R.G.; Soares, R.R.A.; Li, J.; Jing, D.; Hartfiel, L.; Chen, B.; Van Belle, B.; Soupir, M.; Smith, E.; McLamore, E.; Claussen, J.C.; Gomes, C.L. Hydrophobic Laser-Induced Graphene Potentiometric Ion-Selective Electrodes for Nitrate Sensing. *Microchim Acta*, **2022**, *189*, 122.
- [59] Liu, Y.; Liu, Y.; Meng, Z.; Qin, Y.; Jiang, D.; Xi, K.; Wang, P. Thiol-Functionalized Reduced Graphene Oxide as Self-Assembled Ion-to-Electron Transducer for Durable Solid-Contact Ion-Selective Electrodes. *Talanta*, **2020**, *208*, 120374.
- [60] SM Hassan, S.; Galal Eldin, A.; E Amr, A.E.-G.; A Al-Omar, M.; H Kamel, A.; Khalifa, N.M. Improved Solid-Contact Nitrate Ion Selective Electrodes Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) as an Ion-to-Electron Transducer. *Sensors*, **2019**, *19*, 3891.
- [61] Pietrzak, K.; Wardak, C.; Łyszczek, R. Solid Contact Nitrate Ion-Selective Electrode Based on Cobalt(II) Complex with 4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthroline. *Electroanalysis*, **2020**, *32*, 724–731.
- [62] Schwarz, J.; Trommer, K.; Mertig, M. Solid-Contact Ion-Selective Electrodes Based on Graphite Paste for Potentiometric Nitrate and Ammonium Determinations. *American Journal of Analytical Chemistry*, **2018**, *9*, 591–601.
- [63] Garland, N.T.; McLamore, E.S.; Cavallaro, N.D.; Mendivelso-Perez, D.; Smith, E.A.; Jing, D.; Claussen, J.C. Flexible Laser-Induced Graphene for Nitrogen Sensing in Soil. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, *10*, 39124–39133.
- [64] Cuartero, M.; Crespo, G.; Cherubini, T.; Pankratova, N.; Confalonieri, F.; Massa, F.; Tercier-Waeber, M.-L.; Abdou, M.; Schäfer, J.; Bakker, E. In Situ Detection of Macronutrients and Chloride in Seawater by Submersible Electrochemical Sensors. *Anal. Chem.*, **2018**, *90*, 4702–4710.
- [65] Wardak, C.; Grabarczyk, M. Analytical Application of Solid Contact Ion-Selective Electrodes for Determination of Copper and Nitrate in Various Food Products and Drinking Water. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **2016**, *51*, 519–524.
- [66] Cazalé, A. *Développement de Microcapteurs Chimiques Intégrés Pour La Détection de l'ion Sodium En Phase Liquide : Application Au Suivi Du Stress Physiologique*. phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, December **2012**.
- [67] Joly, M. *Conception d'un Système d'analyse Multi-Capteur ISFET Pour La Surveillance in-Situ de l'azote Minéral. Application à La Culture Du Blé Dur*. thesis, Toulouse, INSA, March **2018**.
- [68] Flahaut, E.; Bacsá, R.; Peigney, A.; Laurent, C. Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes. *Chemical Communications*, **2003**, 1442–1443.
- [69] Bortolamiol, T.; Lukanov, P.; Galibert, A.-M.; Soula, B.; Lonchambon, P.; Datas, L.; Flahaut, E. Double-Walled Carbon Nanotubes: Quantitative Purification Assessment, Balance between Purification and Degradation and Solution Filling as an Evidence of Opening. *Carbon*, **2014**, *78*, 79–90.

- [70] Mohan, C.; Kumar, V. Ion-Selective Electrodes Based on PVC Membranes for Potentiometric Sensor Applications: A Review. *International Journal of Membrane Science and Technology*, **2021**, *8*, 76–84.
- [71] Lange, U.; Roznyatovskaya, N.V.; Mirsky, V.M. Conducting Polymers in Chemical Sensors and Arrays. *Analytica Chimica Acta*, **2008**, *614*, 1–26.
- [72] Pei, Q.; Qian, R. Protonation and Deprotonation of Polypyrrole Chain in Aqueous Solutions. *Synthetic metals*, **1991**, *45*, 35–48.
- [73] Mousavi, Z.; Bobacka, J.; Ivaska, A. Potentiometric Ag⁺ Sensors Based on Conducting Polymers: A Comparison between Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) and Polypyrrole Doped with Sulfonated Calixarenes. *Electroanalysis*, **2005**, *17*, 1609–1615.

Microbiocapteur à algues pour la détection des herbicides et des métaux lourds

Sommaire

VI. Introduction

VII. Des algues comme sonde ?

II. 1. Le métabolisme algal

- II. 1. 1. La photosynthèse
- II. 1. 2. La respiration

II. 2. L'effet des polluants sur ce métabolisme

- II. 2. 1. Généralités
- II. 2. 2. L'oxygène dissous comme indicateur
- II. 2. 3. La fluorescence comme indicateur complémentaire
- II. 2. 4. Les polluants choisis et leur mode d'action

II. 3. La microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (CR)

- II. 3. 1. Généralités
- II. 3. 2. Culture

VIII. La détection électrochimique

III. 1. Fonctionnalisation de l'UMEA (Pt-BI)

- III. 1. 1. Électrodépôt
- III. 1. 2. Caractérisation du dépôt

III. 2. Détection de l'oxygène dissous consommé et produit par les algues

III. 3. La détection des herbicides

- II. 3. 1. Diuron et Atrazine
- II. 3. 2. Glyphosate et S-métolachlore

III. 4. La détection des métaux lourds (ETM)

III. 5. Premiers tests en eau réelle

IX. La détection optique

IV. 1. Le montage et les composants utilisés

- II. 1. 1. La source d'excitation lumineuse
- II. 1. 2. Le disque microfluidique
- II. 1. 3. La photodétecteur
- II. 1. 4. Les filtres
- II. 1. 5. Les différents montages utilisés

IV. 2. La détection des polluants

- II. 2. 1. Comparaison des différents montages
- II. 2. 2. Étude des différents herbicides choisis

X. Conclusion

I. Introduction

Les algues, en tant qu'organismes photosynthétiques présents dans les milieux aquatiques, jouent un rôle crucial dans l'écosystème en participant à la production d'oxygène et à la régulation des cycles biogéochimiques. Cependant, en raison de leur sensibilité aux variations environnementales, les algues peuvent également servir de sondes naturelles efficaces pour la détection de polluants dans les écosystèmes aquatiques. Cette utilisation innovante des algues dans les capteurs de détection de polluants offre de nombreux avantages et opportunités pour la surveillance et la préservation de la qualité de l'eau.

Les capteurs de détection de polluants basés sur les algues exploitent leur capacité à réagir aux variations de leur environnement chimique. Lorsqu'elles sont exposées à des contaminants tels que les ETM, les produits chimiques toxiques ou les nutriments en excès, les algues modifient leur physiologie, leur croissance et leur composition biochimique. Ces réponses spécifiques aux polluants peuvent être mesurées et quantifiées à l'aide de technologies de détection appropriées. L'un des avantages majeurs de leur utilisation comme sondes est leur sensibilité élevée aux changements subtils dans l'environnement. Elles peuvent ainsi permettre une détection précoce des problèmes de pollution. L'intégration de capteurs à base d'algues dans les réseaux de surveillance environnementale peut fournir des données précieuses pour la gestion et la prise de décisions en matière de protection des ressources en eau. Ces capteurs peuvent être déployés dans des zones sensibles ou à risque, telles que les sources d'eau potable, les zones côtières ou les écosystèmes fragiles, afin de détecter rapidement les épisodes de pollution et de permettre une réponse appropriée. Cependant, bien que novatrice et prometteuse, cette approche d'utilisation des algues comme sondes dans le cadre de la détection de polluants présente également des défis. La calibration et la validation des capteurs nécessitent une compréhension approfondie des réponses spécifiques des algues aux différents types de polluants. De plus, la variabilité naturelle des réponses des algues peut compliquer l'interprétation des données.

Ce chapitre s'articule en trois grandes parties. La première explique le fonctionnement du métabolisme des microalgues vertes qui ont été utilisées ainsi que les cultures algales mises en œuvre. La seconde s'intéresse au développement du microbiocapteur électrochimique, sa fonctionnalisation et ainsi la détection d'oxygène dissous consommé et produit par les algues en présence de polluants (pesticides et ETM). Enfin, comme mentionné dans le chapitre 1, ces mesures électrochimiques se sont accompagnées, dans le cadre du projet, de mesures optiques de fluorescence algale qui seront détaillées dans la dernière partie de ce chapitre.

II. Des algues comme sonde ?

II. 1. Le métabolisme algal

Les algues sont des organismes autotrophes, plus précisément phototrophes, ce qui signifie qu'elles sont capables de se développer grâce à l'énergie lumineuse. Leur métabolisme implique deux processus majeurs : la photosynthèse et la respiration cellulaire.

II.1.1. La photosynthèse

La photosynthèse est un phénomène durant lequel les algues vont transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique afin de synthétiser de la matière organique. Ce processus, qui se déroule au sein des chloroplastes, organites présents dans les cellules (fig. 4.1), est lui-même subdivisée en deux phases : la phase claire (ou phase lumineuse) et la phase sombre (ou Cycle de Calvin).

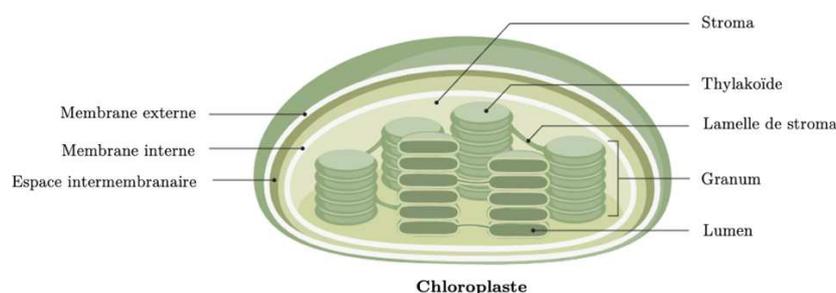


Figure 4.1 : Schéma de la composition d'un chloroplaste (réalisé avec BioRender)

II.1.1.i La phase claire

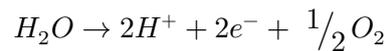
Ces chloroplastes renferment un liquide (le stroma) dans lequel sont empilés les thylakoïdes, des structures membranaires qui contiennent les photosystèmes (PSI et PSII). Ces photosystèmes sont des structures complexes de protéines et de pigments photosynthétiques qui jouent un rôle crucial dans la capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique. Ils sont tous deux composés d'un centre réactionnel. Le centre réactionnel du PSII, appelé P_{680} , absorbe à une longueur d'onde de 680 nm tandis que celui du PSI, appelé P_{700} , présente un maximum d'absorption à 700 nm. Tous deux sont composés d'un dimère de chlorophylle a relié à une molécule, la phéophytine, ayant pour rôle de capter les électrons.

La phase claire correspond ainsi à un ensemble de réactions photochimiques au cours desquelles des électrons sont transportés à travers les deux photosystèmes (PSI et PSII) dans le but de produire de l'adénosine triphosphate (ATP) et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) qui sont des coenzymes riches en énergie (fig. 4.2).

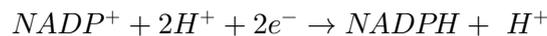
Tout d'abord, la lumière est absorbée par la chlorophylle contenue dans le PSII jusqu'à son centre réactionnel P_{680} qui passe alors dans un état excité noté P_{680}^* caractérisé par l'excitation de ses électrons. Ces électrons entraînent alors la réduction de ses accepteurs primaires (quinone a Q_A et quinone B Q_B) avant d'être éjectés puis transmis à la phéophytine puis à la plastoquinone jusqu'au complexe cytochrome. Transférés par la suite le long de la chaîne de transport, les électrons créent un gradient de protons à travers la membrane thylakoïdienne. C'est cette accumulation de protons dans l'espace intra-thylakoïdien qui est utilisée par l'adénosine triphosphate (ATP) synthase pour produire de l'ATP par phosphorylation à l'aide de phosphate inorganique (Pi) et de l'adénosine diphosphate ADP.



Les électrons sont finalement transmis au PSI via la plastocyanine. En parallèle, la chlorophylle oxydée extrait, via la photolyse de l'eau, des électrons à l'eau pour revenir à son état stable. Cette photolyse entraîne la libération de dioxygène et de protons selon l'équation d'oxydation de l'eau :



Par la suite, la lumière, simultanément absorbée au niveau du PSI entraîne le passage du centre réactionnel P_{700} à un état excité P_{700}^* provoquant à nouveau l'excitation d'électrons qui sont, de la même façon, transportés le long d'une autre chaîne de transport, notamment via une protéine (la ferredoxine), et sont utilisés par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) réductase pour réduire le $NADP^+$ en NADPH par combinaison avec des protons selon l'équation suivante :



Le NADPH constitue ainsi une source d'énergie réduite nécessaire à la phase sombre. Cette réaction entraîne la perte de deux électrons pour le PSI qu'il récupère grâce à ceux fournis par le PSII.

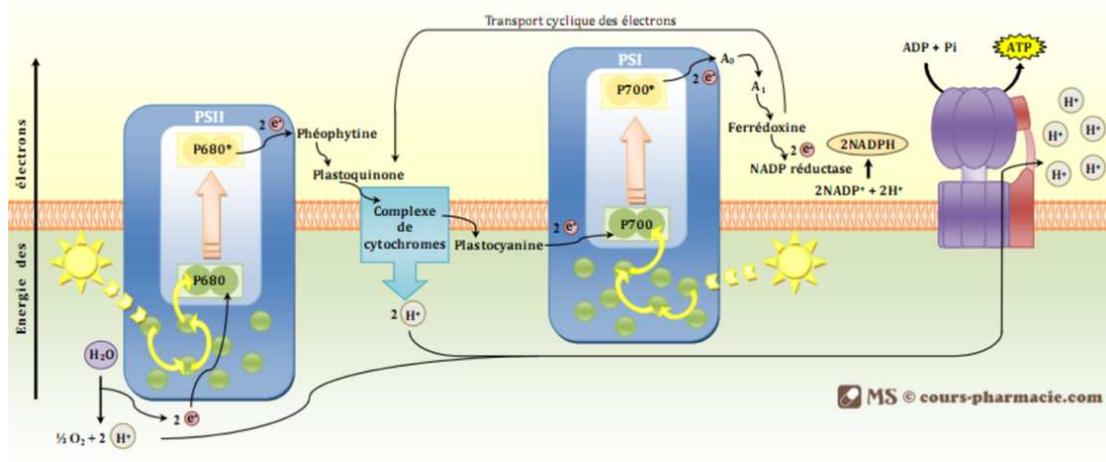
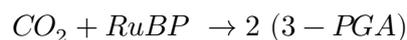


Figure 4.2 : Schéma simplifié des mécanismes de la phase claire de la photosynthèse [1]

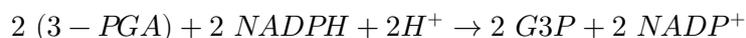
II.1.1.ii La phase sombre

Les algues se développent en fabriquant de la matière organique principalement pendant la phase sombre de la photosynthèse autrement dénommée cycle de Calvin (fig. 4.3). C'est lors de cette phase que le dioxyde de carbone (CO_2) est fixé et converti en molécules organiques, dont le glucose est l'un des produits finaux.

Tout d'abord, les molécules de CO_2 atmosphérique sont fixées à un accepteur de carbone, la ribulose-1,5-biphosphate (RuBP) avec l'aide de l'enzyme ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO). Cette réaction entraîne la formation des molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA).



Par la suite, les molécules de 3-PGA sont converties en molécules de glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) grâce à l'énergie et aux électrons fournis par le NADPH et l'ATP produits durant la phase claire.



Enfin, certaines molécules de G3P sont utilisées pour former du glucose ainsi que d'autres glucides. Ces sucres synthétisés fournissent à la plante l'énergie chimique et les squelettes carbonés nécessaires à la synthèse des molécules organiques et donc au développement de l'algue. D'autres molécules de G3P sont finalement régénérées en RuBP afin de maintenir le cycle.

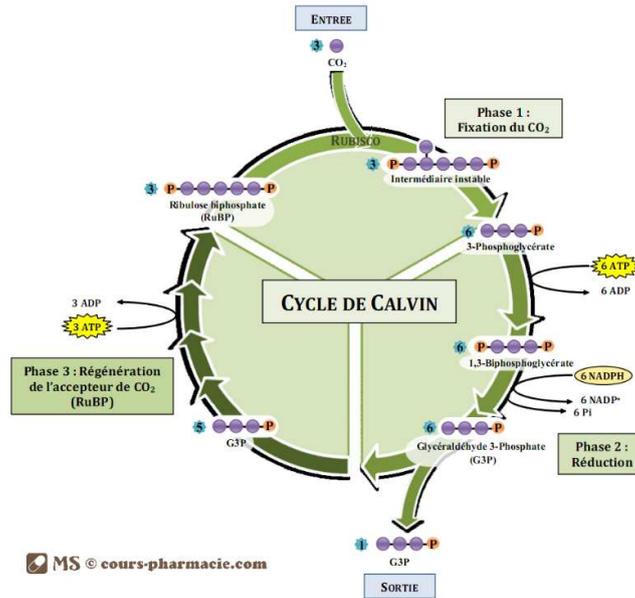
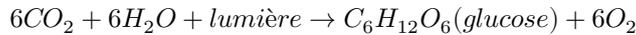


Figure 4.3 : Schéma du cycle de Calvin de la photosynthèse [1]

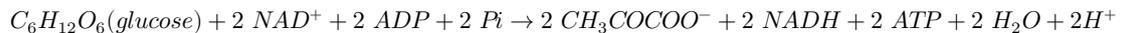
Plus généralement, l'équation générale simplifiée de la photosynthèse est la suivante :



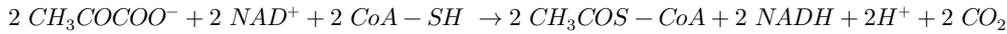
II.1.2. La respiration

La respiration est un processus métabolique essentiel dans le fonctionnement et la survie des cellules algales. Elle se produit au sein des mitochondries et de manière continue que cela soit en présence ou en l'absence de lumière. Elle consiste en la dégradation, à l'aide d'oxygène, de molécules organiques, telles que le glucose, pour libérer de l'énergie sous forme d'ATP. Elle permet de fournir de l'énergie à la cellule mais également de réguler son équilibre énergétique, d'éliminer les déchets métaboliques et de soutenir d'autres réactions métaboliques essentielles. Elle permet aux cellules de maintenir leurs fonctions normales, de croître et de se reproduire. Elle se déroule en plusieurs étapes.

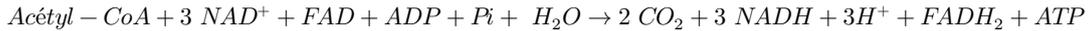
Tout d'abord, dans le cytoplasme, le glucose est dégradé en deux molécules de pyruvate (CH_3COCOO^-), c'est la glycolyse. Ce processus libère un petit nombre d'ATP et de molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH).



Le pyruvate peut ensuite entrer dans les mitochondries où il subit une décarboxylation oxydative pour former de l'acétyl-CoA. Cette réaction libère du CO_2 et produit du NADH.



Par la suite, l'acétyl-CoA ($\text{CH}_3\text{COS-CoA}$) entre dans le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique. Ce cycle permet de générer du NADH et de la flavine adénine dinucléotide (FADH_2) qui transportent alors les électrons le long de la chaîne de transport située dans la membrane mitochondriale interne.



Ce flux d'électrons induit un gradient de protons entre les deux côtés de la membrane qui est alors utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique en consommant de l'oxygène, il s'agit de la phosphorylation oxydative.



L'équation générale simplifiée admise pour décrire le processus de respiration est la suivante :



En conclusion, la photosynthèse a lieu en présence de lumière tandis que la respiration se produit en continu. Ces deux processus sont interconnectés et essentiels pour le fonctionnement des cellules algales.

II. 2. L'effet des polluants sur ce métabolisme

II.2.1. Généralités

La réponse métabolique des algues aux polluants est un aspect crucial de leur utilisation comme sonde pour la détection de la pollution dans les milieux aquatiques. Les effets possibles sont multiples et dépendent à la fois de l'algue et du polluant. Les principaux sont ici résumés.

○ Altération de la photosynthèse

Les polluants tels que les ETM, les pesticides et les produits chimiques toxiques peuvent interférer avec les pigments photosynthétiques et les enzymes impliqués dans la photosynthèse. Cela peut entraîner une réduction de la capacité des algues à capter la lumière et à effectuer la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique. Les algues peuvent présenter une réduction de la production d'oxygène, un ralentissement de la fixation du CO_2 et une altération des mécanismes de protection contre le stress photo-oxydant. Bon nombre de polluants, en particulier les herbicides, sont reportés dans la bibliographie pour agir comme bloquant du transfert électronique au niveau du PSII ou du PSI via l'interaction avec une

protéine [2,3], entraînant alors une diminution de la production d'oxygène et la dissipation de l'énergie absorbée par la chlorophylle a sous forme de fluorescence. Néanmoins, il a été démontré que certains polluants tels que les hydrocarbures peuvent être utilisés par les algues comme source d'énergie et ainsi induire une augmentation de l'activité photosynthétique [4].

○ **Perturbation de la respiration**

Ces mêmes polluants peuvent affecter la chaîne de transport d'électrons dans la respiration cellulaire. Par exemple, certains ETM peuvent perturber les complexes protéiques impliqués dans la phosphorylation oxydative, réduisant ainsi la consommation d'oxygène ainsi que par conséquent la production d'ATP. Les polluants peuvent également altérer les enzymes clés impliquées dans la dégradation des nutriments et la libération d'énergie [5,6].

○ **Dérèglement en lien avec le stress oxydatif**

Ces polluants peuvent également générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), provoquant un stress oxydatif dans les cellules. Les ROS endommagent les composants cellulaires, tels que les membranes, les protéines et les acides nucléiques, perturbant ainsi les fonctions cellulaires normales. Les algues activent un mécanisme de défense antioxydant pour contrer ce stress, mais une exposition prolongée à des niveaux élevés de ROS peut entraîner des dommages cellulaires irréversibles [7-9].

○ **Inhibition de la croissance et de la reproduction**

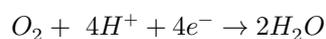
Enfin, ils peuvent également influencer la croissance et la reproduction des algues en altérant les voies métaboliques nécessaires à ces processus. Certains polluants peuvent inhiber la division cellulaire, affecter l'accumulation de biomasse et perturber les cycles de vie des algues [10-12].

Finalement, la surveillance de ces changements métaboliques dans les algues peut fournir des informations précieuses sur la présence et les niveaux de polluants dans l'eau. En complément, via la compréhension de la façon dont réagissent les algues aux polluants au niveau métabolique, les scientifiques peuvent évaluer l'impact de la pollution sur les écosystèmes aquatiques et prendre des mesures pour les éviter. Ainsi, différents types de biocapteurs basés sur le métabolisme algal ont été développés au cours des dernières décennies afin de permettre la détection de pesticides [13], d'ETM [14,15] et d'autres composés chimiques [16-18]. Durant ces travaux, l'attention a été portée à l'altération des phases de respiration et de photosynthèse induite par deux types de polluants : les pesticides et les ETM.

II.2.2. L'oxygène dissous comme indicateur

Comme expliqué précédemment, le métabolisme algal repose en partie sur des phénomènes dépendant de l'oxygène : sa consommation lors de la respiration cellulaire et sa production lors de la phase de photosynthèse. Ce métabolisme étant affecté par certains polluants, notamment les herbicides et les ETM, effectuer un suivi de ces taux de production et de consommation d'oxygène peut alors permettre de déduire la présence éventuelle de polluants. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux menés au cours de cette thèse. En effet, l'oxygène dissous a été sélectionné comme indicateur car ce dernier est aisément mesurable par électrochimie.

Les premières tentatives de mesures de l'oxygène par électrochimie remontent aux années 1930 avec l'utilisation d'électrodes en platine et en or via les réactions d'oxydation et de réduction de l'oxygène. C'est au cours des années 1950 que se développent réellement les électrodes spécifiques à oxygène. En 1956, le chercheur américain Leland C. Clark Jr. développe, en collaboration avec le chimiste britannique Michael L. Goodale, la première et encore connue aujourd'hui électrode à oxygène plus connue sous le nom d'électrode de Clark. Son principe de fonctionnement repose sur une mesure dite ampérométrique (cf. chapitre 2). Le dispositif est composé d'une électrode en platine, d'une électrode de référence combinée (Ag/AgCl/KCl) et d'une membrane en Teflon uniquement perméable aux gaz. Une différence de potentiel fixe est appliquée à l'électrode en platine par rapport à l'électrode de référence, correspondant à la réaction de réduction de l'oxygène à la surface d'une électrode, générant ainsi un courant proportionnel à la concentration en oxygène dans ce liquide.



De cette manière, il est simple de suivre l'évolution des taux respectifs de consommation et de production d'oxygène des algues en fonction du temps et ainsi d'étudier si ces derniers sont modifiés par la présence des polluants sélectionnés. De nombreux biocapteurs à algues ont alors été développés (fig. 4.4) sur ce principe dans le but de détecter pesticides et ETM via la consommation et production d'oxygène au cours de la respiration et la photosynthèse des algues [19–23].

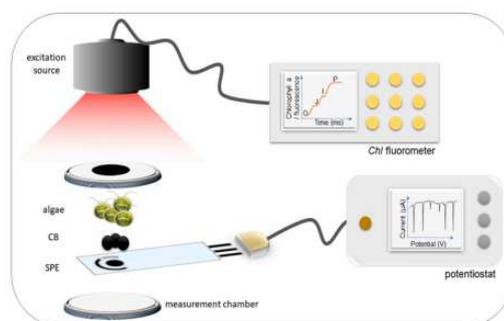


Figure 4.4 : Exemple de capteur ampérométrique à algues développé pour la détection de pesticides [22]

Dans le cadre de ces travaux, le microcapteur ElecCell développé (cf. chapitre 2) a été utilisé comme capteur ampérométrique pour réaliser de telles mesures. Les mesures ayant été réalisées pour certains en macrovolume et pour d'autres en microvolume en vue de l'application finale, les excitations d'algues ont été effectuées respectivement avec une lumière blanche ou avec une OLED bleue fabriquée par les partenaires du projet. Les résultats obtenus sont détaillés dans la partie II de ce chapitre.

II.2.3. La fluorescence comme indicateur complémentaire

Comme également mentionné précédemment, lorsque certains polluants influent sur l'appareil photosynthétique des algues, notamment en bloquant le transfert d'électrons au niveau des photosystèmes, cela peut induire une augmentation de la fluorescence chlorophyllienne. Parmi les premiers biocapteurs à algues développés, bon nombre d'entre eux étaient basés sur la détection de cette fluorescence par voie optique [24–26]. Leur développement n'a cessé et est encore d'actualité ces dernières décennies dans le but d'améliorer les performances de tels capteurs [18,21,27]. La plupart de ces capteurs fonctionnent à l'aide de LED pour l'excitation et de photodiodes pour la détection (fig. 4.5) [27,28].

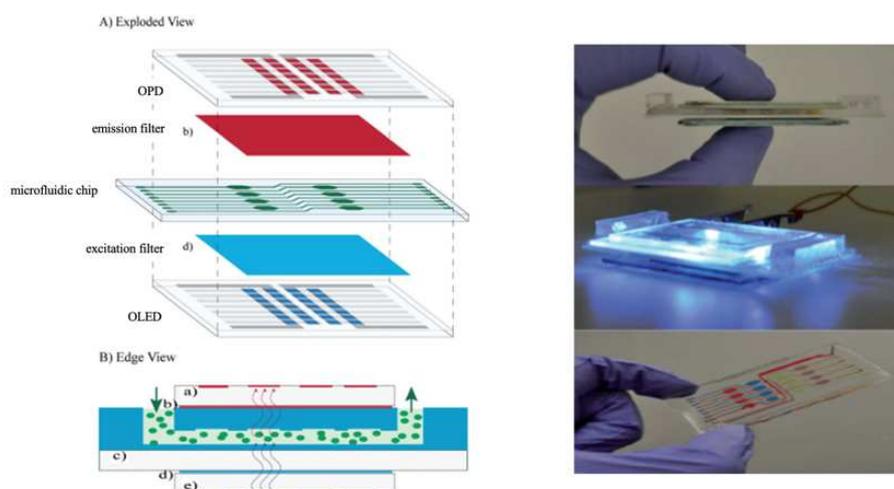


Figure 4.5 : Exemple de capteur de fluorescence algale [27]

Dans le cadre du projet BELUGA, comme mentionné dans le chapitre 1, des mesures optiques de fluorescence étaient prévues dans le but de tirer tous les avantages de la double-détection à savoir la confirmation de la pollution du milieu mais également la discrimination de certains polluants de par leurs réponses différentes. Pour se faire, l'excitation des algues a été réalisée dans un premier temps par une LED bleue commerciale classique. En parallèle, des MOLED bleues dont l'émission a été adaptée à la longueur d'onde d'absorption des algues ont été développées mais n'ont pas encore pu être utilisées. Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide soit d'une photodiode silicium commerciale soit d'une photodiode orga-

nique également adapté à la longueur d'onde d'émission des algues. Les deux types de composants adaptés ont été fabriqués par des partenaires du projet. Les résultats obtenus sont détaillés dans la partie III de ce chapitre.

II.2.4. Les polluants choisis et leur mode d'action

Plusieurs polluants ont été étudiés au cours de ce projet et sont regroupés en deux catégories : les herbicides et les ETM.

II.2.4.i Les herbicides

Quatre herbicides ont été sélectionnés dans le cadre de ce projet (fig. 4.6), possédant chacun un mode d'action différent sur le métabolisme algal, ceci afin de déterminer quels polluants étaient détectables par ampérométrie.

○ **Le Diuron**

Le Diuron ou 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée) est un herbicide connu, qui a été largement utilisé pendant des décennies dans l'agriculture et l'horticulture pour prévenir la prolifération des mauvaises herbes dans les cultures et les espaces verts avant d'être interdit dans certains pays pour sa haute toxicité et sa dangerosité. En ce qui concerne son effet sur le métabolisme algal, le Diuron agit principalement en perturbant la chaîne de transport d'électrons au sein des chloroplastes. Plus précisément, il cible le PSII en inhibant une enzyme clé lui appartenant : la D1 protéine. En bloquant cette enzyme, le Diuron empêche l'algue de convertir efficacement l'énergie lumineuse en énergie chimique et induit donc, entre autres, une diminution de la production d'oxygène et une augmentation de la fluorescence de l'algue.

Malgré son interdiction il y a 20 ans, le Diuron est encore retrouvé en quantité non-négligeable dans les cours d'eau. Il a ainsi été choisi car sa détection reste importante dans le but de préserver les eaux mais également, parce qu'il est connu pour inhiber la photosynthèse de manière immédiate, afin d'apporter une preuve de concept du biocapteur développé.

○ **L'Atrazine**

L'Atrazine ou 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine est également un herbicide qui a été longtemps utilisé en agriculture pour empêcher la croissance des mauvaises herbes dans les cultures de maïs, de canne à sucre et autres. Son utilisation a cependant causé des inquiétudes environnementales en raison de ses effets sur les écosystèmes aquatiques ainsi que sur la biodiversité, ce qui a conduit à son interdiction en France en 2001. De la même manière que le Diuron, l'Atrazine est encore aujourd'hui retrouvée dans certains cours d'eau contrôlés. C'est pourquoi elle a été choisie dans le cadre de ce projet.

Concernant son effet sur le métabolisme algal, elle est connue pour avoir un effet inhibiteur de la photosynthèse. Elle agit également sur le transfert d'électrons au niveau du

PSII mais cette fois-ci en bloquant la plastoquinone, une coenzyme impliquée dans le transport d'électrons pendant la photo-phosphorylation. Ainsi, elle entraîne, tout comme le Diuron, une diminution de la production d'oxygène ainsi qu'une augmentation de la fluorescence [29].

○ **Le glyphosate**

Le glyphosate ou N-(phosphonométhyl)glycine est un herbicide à large spectre qui est utilisé dans diverses cultures et espaces extérieurs pour le contrôle des mauvaises herbes. Son mode d'action diffère de celui de l'Atrazine et du Diuron car il agit en inhibant une enzyme clé, l'EPSP synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), impliquée dans la synthèse des acides aminés essentiels chez les plantes et certaines bactéries [30,31].

Sur les algues, par inhibition de cette enzyme, le glyphosate bloque la production d'acides aminés, ce qui a pour effet de perturber leur croissance et leur développement [32]. Il n'agit donc pas directement sur la photosynthèse ou sur le processus de transfert d'électrons, néanmoins il peut l'influencer indirectement en affaiblissement de manière générale les algues et les empêchant alors d'assurer un fonctionnement métabolique optimal.

Cet herbicide a fait l'objet de récentes controverses concernant son utilisation en raison de ses potentiels effets sur la santé humaine et sur l'environnement. Compte tenu des incertitudes concernant sa dangerosité et son possible caractère cancérigène, il est actuellement question d'une éventuelle interdiction en France dont la décision est attendue pour fin 2023. Il a été choisi dans le cadre de ce projet car il fait partie des herbicides les plus utilisés bien que son mode d'action ne soit pas spécifiquement lié à l'inhibition de la photosynthèse.

○ **Le S-métolachlore**

Le S-métolachlore est un herbicide de pré-levée utilisé pour le contrôle des mauvaises herbes annuelles et vivaces dans diverses cultures, notamment le maïs, le sorgho et le tournesol. Il appartient à la famille de chloroacétanilides et agit en inhibant une enzyme participant à la biosynthèse d'acides gras à longues chaînes [33,34]. Ainsi, dans le cas des algues, cette inhibition de la synthèse d'acide gras entraîne un déséquilibre dans la composition des membranes plasmiques cellulaires, conduisant à une perte de rigidité et de perméabilité cellulaire [35,36]. Cela induit principalement une inhibition de la croissance des algues mais, tout comme le glyphosate, peut induire un affaiblissement général se reflétant potentiellement dans le métabolisme photosynthétique des algues.

Ce polluant a, tout comme le glyphosate, fait l'objet de récentes controverses après avoir été retrouvé dans les eaux à des concentrations supérieures aux normes de qualité environnementales. Il a ainsi été question d'assouplir les normes dans un premier temps début 2023, puis finalement en fin d'année d'instaurer son interdiction au vu de sa dangerosité potentielle. Il a donc été choisi dans le cadre de ce projet.

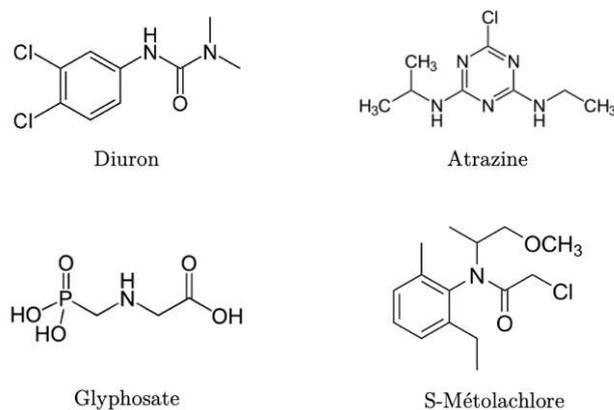


Figure 4.6 : Formule chimique des herbicides choisis dans le cadre du projet

II.2.4.ii Les métaux lourds (ETM)

Trois ETM ont été sélectionnés pour ce projet. Comme mentionné dans le chapitre 1, les ETM sont à la fois dangereux pour les écosystèmes comme pour la santé humaine. Issus de l'industrie actuelle ou passée (anciennes mines de charbon), ils se retrouvent dans les cours d'eau et sont une source importante de pollution.

Les effets des ETM sur le métabolisme algal sont reportés pour être divers et peuvent nettement varier en fonction de la concentration à laquelle les algues sont exposées [37].

Les trois métaux choisis sont le cuivre, le cadmium et le mercure. Dans les trois cas, les conclusions tirées de la bibliographie varient en ce qui concerne la toxicité et le mode d'action des ETM sur les algues. Les études ne convergent pas toutes vers une compréhension uniforme de leurs effets sur le métabolisme algal [6,37–39]. Il est important de noter que les différentes recherches ont adopté des approches méthodologiques variées et ont examiné différents types d'algues ainsi que des concentrations variables d'ETM. Les données recueillies peuvent alors refléter une gamme de réponses et de résultats relativement contrastés. Cela souligne la complexité des interactions entre les ETM et les algues et incite à adopter une approche nuancée quant à l'interprétation des résultats obtenus.

Quelques-uns des effets possiblement induits par les métaux choisis sur le métabolisme algal sont donnés ici.

o Le cuivre

Le cuivre, bien que nutriment nécessaire en petite quantité à la croissance et la reproduction algale, peut se révéler hautement toxique à des concentrations plus importantes [40]. Il peut agir sur les organites de l'algues tels que les chloroplastes, résultant en une diminution de la photosynthèse [41].

○ **Le cadmium**

Le cadmium est également connu pour affecter l'activité photosynthétique et la croissance des algues en agissant sur les chloroplastes [42]. Il a également été reporté pour agir sur des protéines et des acides aminés des algues, résultant en une inhibition importante de la respiration cellulaire [43].

○ **Le mercure**

Le mercure a été reporté comme hautement toxique pour les algues. En particulier au niveau de la respiration et de la photosynthèse. D'une part, il peut affecter la fixation métabolique du CO₂ et l'absorption de la source de carbone, pouvant se traduire par une diminution de la respiration [44]. D'autre part, il peut affecter en même temps le centre de réaction du PSI (via l'inhibition d'une enzyme) réduisant ainsi son activité, et le PSII en agissant sur des protéines perturbant alors la production d'oxygène [45,46]. Il a également été rapporté que le mercure entravait la croissance des algues en impactant l'assimilation des nutriments. Il peut ainsi provoquer l'inhibition de plusieurs fonctions enzymatiques et induire du stress oxydatif [44].

En résumé, les modes d'action et les effets rapportés pour les ETM sur les algues sont nombreux et dépendent de nombreux facteurs allant du type d'algues sélectionné à la composition du milieu de culture, de l'intensité lumineuse, de la forme sous laquelle est ajouté le polluant et de son temps d'incubation ou encore le degré d'aération du milieu [47,48].

En conclusion, ces quatre herbicides et ces trois ETM ont été choisis afin de mener une évaluation de l'efficacité et de la portée du biocapteur ampérométrique à algues par analyse des phases de respiration et/ou de photosynthèse des algues en leurs présences. L'intention est ainsi de déterminer la possible compatibilité de cette méthode de détection avec ces polluants spécifiques et de parvenir à une compréhension plus approfondie des limites de cette dernière en fonction des modes d'actions distincts de chaque polluant.

En parallèle, des premières mesures de fluorescence algale ont été réalisées. Dans un premier temps sur Diuron et Atrazine, mais qui devront être complétées par des mesures sur les autres polluants afin de pouvoir comparer la complémentarité des deux méthodes et d'assurer un dispositif final permettant l'obtention de résultats plus fiables et précis.

II. 3. La microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (CR)

II.3.1. Généralités

Chlamydomonas reinhardtii est une espèce d'algue verte appartenant à la classe des Chlorophyceae (fig. 4.7). Elle occupe une place importante dans le monde de la recherche scientifique et joue souvent le rôle d'organisme modèle dans de nombreux domaines de la biologie.

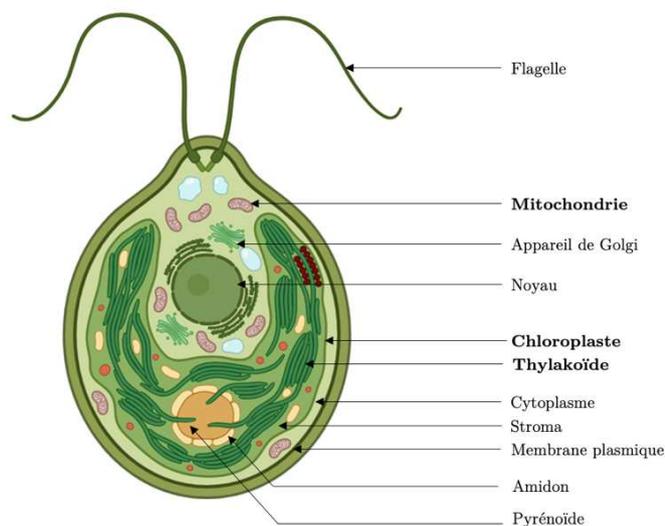


Figure 4.7 : Schéma de *Chlamydomonas reinhardtii* (réalisé avec Biorender)

C'est une algue unicellulaire, elle est composée d'une unique cellule et possède un noyau et des organites typiques tels que des chloroplastes, des mitochondries et un réticulum endoplasmique. Elle est capable de se déplacer grâce à des cils flagellés appelés flagelles situés à la surface de la cellule et lui permettant de nager librement dans l'eau.

Comme toutes les algues vertes, elle réalise la photosynthèse grâce à la chlorophylle contenue dans ses chloroplastes. Elle se développe facilement et son génome est relativement petit (environ 100 millions de paires de bases pour 17 chromosomes). Pour toutes ces raisons, *Chlamydomonas reinhardtii* fait partie des algues les plus étudiées en tant que modèle dans la recherche pour la compréhension des processus biologiques algaux fondamentaux. Elle est également utilisée pour diverses applications telles que la production de biocarburants, la bioremédiation ou encore la production de molécules anticancéreuses.

Dans ce projet, *Chlamydomonas Reinhardtii* a été choisie comme sonde biologique pour la détection des herbicides et des ETM. Elle a été fournie par le Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels de Lyon et provient initialement de l'algothèque de Thonon-Les-Bains.

II.3.2. Culture

Ces microalgues ont pu être cultivées au LAAS grâce à un incubateur SANYO (fig. 4.8) réglé pour opérer des cycles lumière/obscurité de respectivement 16h et 8h et à une tempéra-

ture régulée de 21°C. Elles ont été cultivées dans un milieu de culture TAP dont la préparation a été formulée par DS. Gorman et RP. Levine (cf. ci-après) [49]. Tous les produits chimiques utilisés proviennent de Merck KGaA.

Pour la préparation du milieu de culture TAP, des solutions dites « stock » sont tout d'abord préparées. Elles sont par la suite stockées au réfrigérateur et pourront être utilisées jusqu'à 6 mois pour la préparation du milieu de culture.

La première solution stock (1) est composée de base Tris et d'acide acétique glacial. Pour 24,2 g de base Tris sont dilués dans 100 mL d'eau désionisée (EDI) puis, 10 mL d'acide acétique glacial sont ajoutés.

La seconde solution stock (2) est un tampon phosphate. Elle est préparée en diluant 10,8 g d'hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) et 5,6 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans 100 mL d'EDI.

La troisième solution stock (3) est une solution de traces métalliques (Hutner). Pour la préparer, 5 g de Na_2EDTA sont dilués dans 400 mL d'EDI, puis le pH est ajusté entre 6,5 et 6,8 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 2 mol.L⁻¹. Par la suite, les éléments métalliques suivants sont pesés et ajoutés dans l'ordre en attendant bien la dissolution de chacun avant d'ajouter le suivant.

- 0,5 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- 2,2 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1,14 g de H_3BO_3
- 0,51 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
- 0,16 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- 0,073 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- 0,16 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

Enfin, le volume est ajusté à 500 mL et la solution est autoclavée.

La quatrième et dernière solution stock (4) est préparée par dissolution dans 500 mL d'EDI de 20 g de NH_4Cl , 5 g de $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ et 2,5 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Enfin, pour préparer 1 L de milieu de culture TAP, les solutions stock ainsi que de l'acide acétique glacial sont mélangés selon les volumes suivants et le volume est ajusté à 1 L par de l'EDI.

- 10 mL de solution (1)
- 1 mL de solution (2)
- 5 mL de solution (3)
- 10 mL de solution (4)
- 0,25 mL d'acide acétique glacial

Le mélange ainsi obtenu est autoclavé puis conservé au réfrigérateur au maximum 3 mois.

Les algues sont cultivées dans des erlenmeyers bafflés de 200 mL sous agitation orbitale continue (fig. 4.8) et repiquées toutes les deux semaines à raison de 25 mL d'algues dans 100 mL de milieu de culture TAP frais.

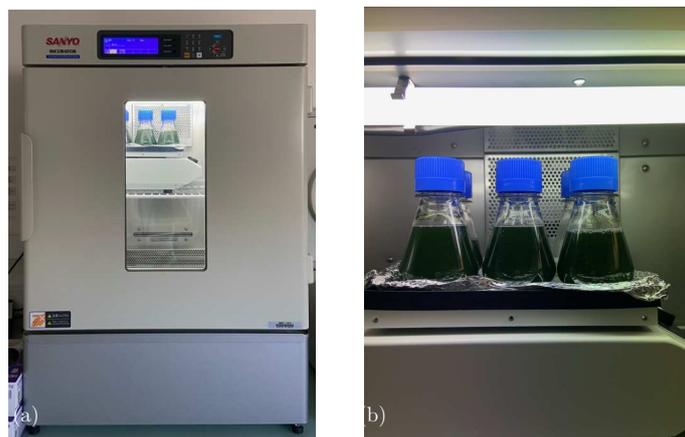


Figure 4.8 : Photographies de (a) l'incubateur utilisé et (b) des cultures d'algues CR

III. La détection électrochimique

III. 1. Fonctionnalisation de l'UMEA (Pt-BI)

La détection de l'oxygène dissous consommé et produit par les algues a été réalisée par ampérométrie sur le microcapteur ElecCell. Comme mentionné précédemment, la détection de l'oxygène peut se faire aisément sur une électrode de platine. Le réseau d'ultramicroélectrodes (UMEA) constituant l'électrode de travail du capteur est initialement en platine. Cependant, étant donné les faibles courants mesurés et afin d'améliorer le rapport signal/bruit, il a été décidé de fonctionnaliser cet UMEA par un électrodépôt (en trois dimensions) de noir de platine (Pt-BI) électrocatalytique et hautement poreux, permettant d'augmenter la surface active de l'électrode et ainsi d'augmenter les valeurs de courant mesurées tout en conservant les avantages de sa petite taille [50].

Tous les produits chimiques utilisés pour le dépôt et sa caractérisation proviennent de Merck KGaA.

III.1.1. Electrodépôt

La solution d'électrodépôt est réalisée par dissolution de 484,8 mg d'acide hexachloroplatinique hydraté ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) et de 7,7 mg d'acétate de plomb dans 30 mL de PBS. La solution est conservée à l'obscurité et au réfrigérateur pendant au maximum trois semaines.

Avant le dépôt, un nettoyage électrochimique de la surface de l'UMEA en platine est réalisé par voltammétrie cyclique dans une solution de H_2SO_4 à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ durant 25 cycles entre $-0,2 \text{ V}$ et $1,4 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$.

L'électrodépôt est réalisé par chronoampérométrie à un potentiel fixé de $-0,060 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ jusqu'à atteindre une densité de charge de $0,25 \mu\text{C}.\mu\text{m}^{-2}$

III.1.2. Caractérisation du dépôt

III.1.2.i Voltammétrie cyclique

L'électrodépôt est caractérisé par voltammétrie cyclique dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ entre $-0,2 \text{ V}$ et $1,4 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$. Les résultats (fig. 4.9), en comparaison au même voltammogramme obtenu sur l'UMEA avant dépôt, montrent une augmentation importante de la surface active qui se traduit ici par une augmentation drastique du courant mesuré passant de quelques dizaines de nanoampères à quelques milliers.

Le gain en surface a été estimé en comparant le courant du pic de réduction des oxydes de platine à $0,4 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$. La surface active a donc été multipliée par un facteur d'environ 200 par rapport à la surface initiale.

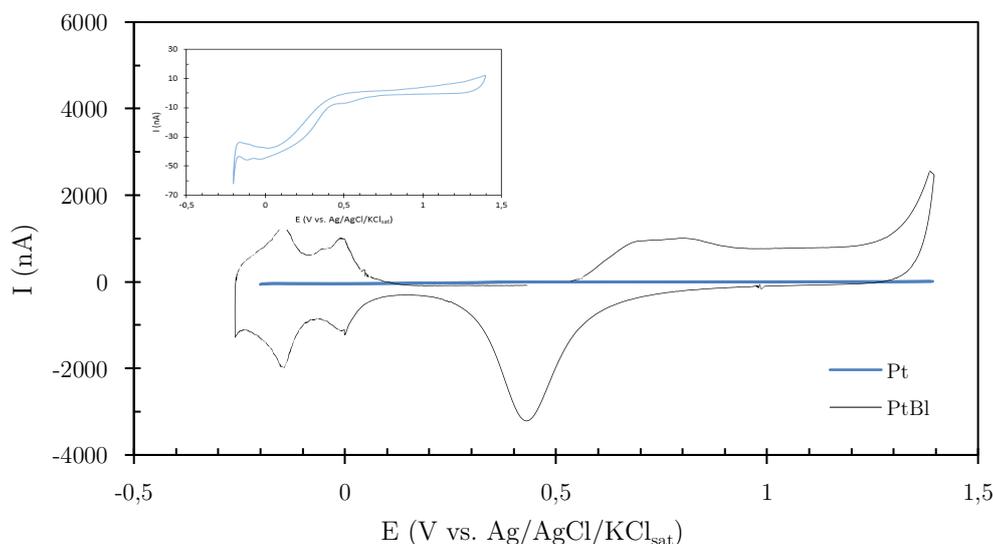


Figure 4.9 : Voltammétrie cyclique sur l'UMEA en Pt avec et sans (inset) dépôt de noir de platine dans H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ sans désaération (vitesse de balayage : 200 mV/s)

Sa durée de vie a été déterminée en effectuant cette même voltammétrie cyclique à plusieurs temps distincts. Entre chaque mesure, le capteur est stocké dans une solution de tampon phosphate à $\text{pH} = 7$. Les résultats (fig. 4.10) montrent qu'un tel dépôt peut durer aisément jusqu'à trois mois s'il est stocké dans une solution tampon bien qu'il perde légèrement de son effet catalytique au cours du temps.

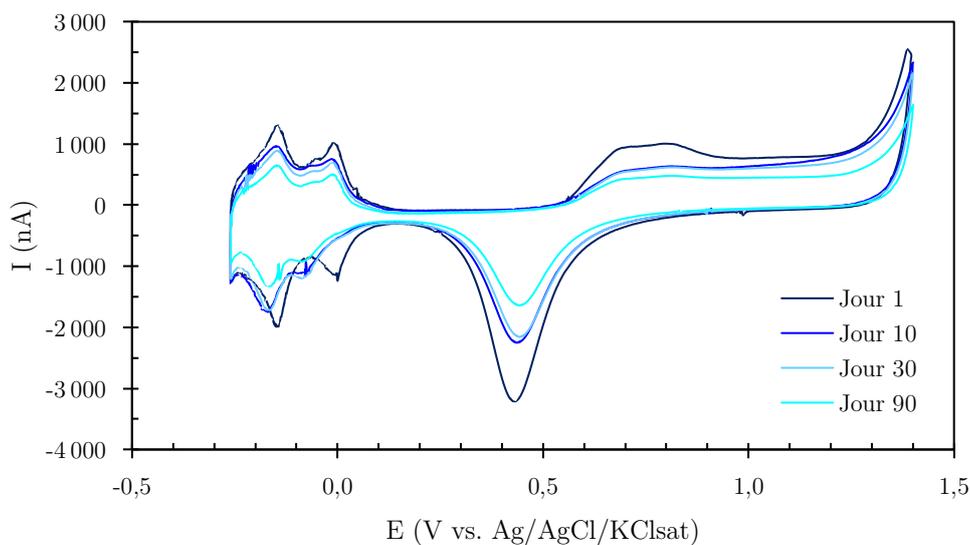


Figure 4.10 : Evolution de la voltammétrie cyclique dans H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ de l'UMEA fonctionnalisé par Pt-BI en fonction du temps (vitesse de balayage : 200 mV/s)

III.1.2.ii Microscopie

Le dépôt de noir de platine a également pu être caractérisé par microscopie électronique à balayage à l'aide d'un microscope HELIOS 600i. Les images (fig. 4.11) démontrent bien le caractère hautement poreux du dépôt souhaité, bien localisé au niveau de chaque électrode de l'UMEA. La quantité de charge choisie est adaptée à l'obtention d'un dépôt de taille suffisamment importante tout en évitant d'une part une épaisseur trop importante pouvant entraîner une fragilité mécanique du dépôt et donc à des détachements partiels et d'autre part un débordement sur les bords de l'électrode conduisant à une augmentation du diamètre des microélectrodes pouvant induire un chevauchement des zones de diffusion (cf. chapitre 2), ce qui ferait ainsi perdre tous les avantages du réseau d'UME.

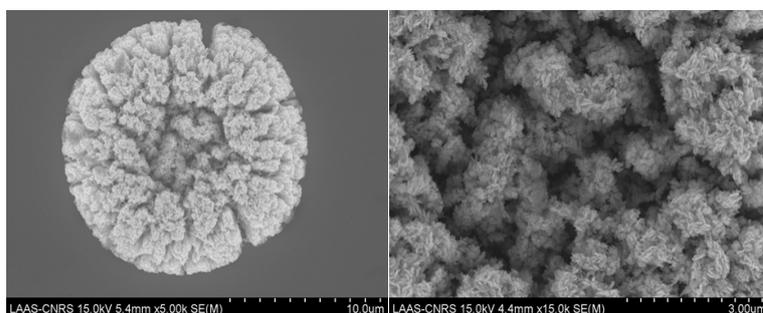


Figure 4.11 : Images MEB du dépôt de noir de platine sur une microélectrode de l'UMEA

III. 2. Détection de l'oxygène consommé et produit par les algues

Dans un premier temps, il a fallu déterminer le potentiel fixe auquel seront réalisées les chronoampérométries pour la détection du taux de consommation et de production d'oxygène des microalgues. Ainsi, dans un premier temps, des voltammétries cycliques sur le milieu de culture TAP ont été réalisées avant et après désaération de manière à déterminer le potentiel judicieusement et de s'assurer qu'aucun autre phénomène parasite n'avait lieu à ce potentiel choisi.

Les résultats obtenus (fig. 4.12) montrent l'apparition d'un plateau en milieu non désaéré, qui traduit donc bien le phénomène de réduction de l'oxygène dissous. Ainsi, pour l'ensemble des expériences qui suivront, le potentiel a été choisi fixé à $-0,6$ V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} correspondant au milieu du plateau.

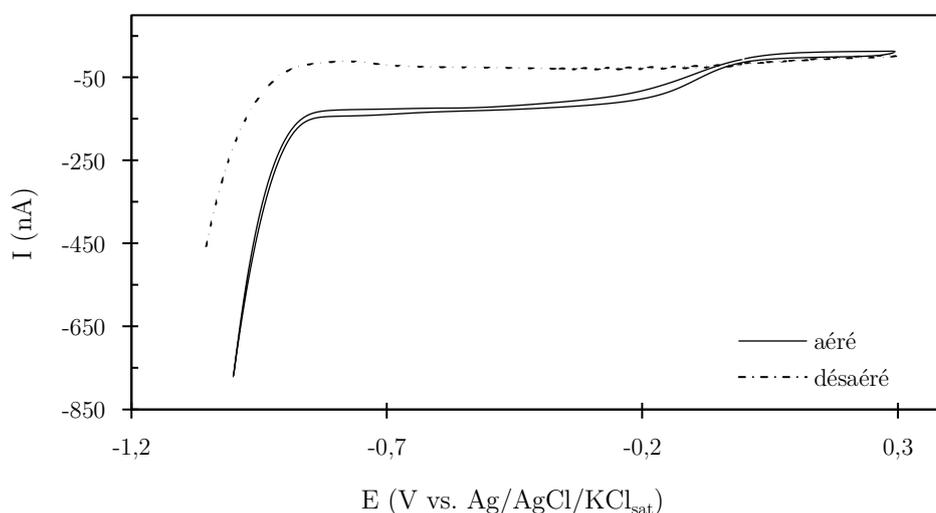


Figure 4.12 : Voltammétries cycliques réalisées sur l'UMEA (Pt-BI) dans le milieu TAP aéré et désaéré

Dans un second temps, le protocole de mesure a été défini. Dans le cadre des tests en macrovolume, 10 mL d'algues à 8×10^6 cellules/mL (sans préconcentration préalable) ont été utilisées avec comme source lumineuse excitatrice une lampe blanche (CHIU Technical corp. FO-150 LUMINA Light).

Une chronoampérométrie a été réalisée à $-0,6$ V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} sur l'UMEA pendant des cycles lumière/obscurité d'environ 20 minutes afin de déterminer les délais limites. Avant toute mesure, d'une part, les algues sont laissées à l'obscurité pendant 15 minutes afin de s'assurer de la fermeture totale de tous les photosystèmes et ainsi d'assurer une reproductibilité dans les mesures et, d'autre part, l'UMEA fonctionnalisé par Pt-BI est nettoyé électrochimiquement par voltammétrie cyclique dans l'acide sulfurique à $0,5$ mol.L⁻¹ durant 20 cycles.

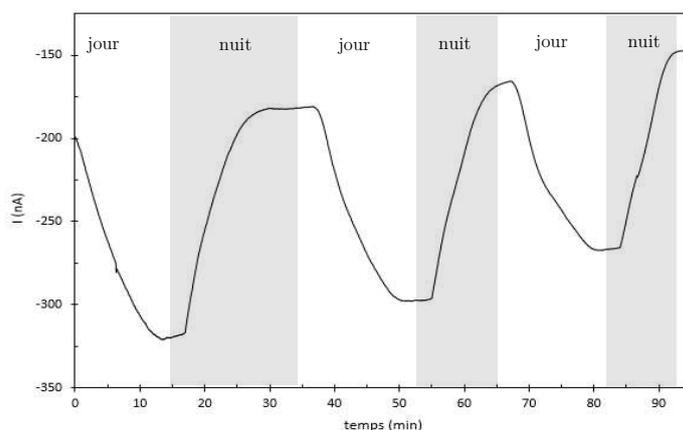


Figure 4.13 : Chronoampérométrie à $-0,6$ V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ dans une suspension d'algues *CR* pendant trois cycles lumière/obscurité

Comme le montre la figure 4.13, au-delà de 15 minutes, des ruptures de pentes sont observées en respiration comme en photosynthèse. Cela traduit un phénomène de saturation probablement dû à un appauvrissement du milieu en oxygène et en dioxyde de carbone au cours du temps. Il a été décidé pour l'ensemble des expériences menées sur les algues de se focaliser sur des cycles lumière/obscurité de plus faibles durées, i.e. de 3 min/3 min, afin d'éviter ce phénomène.

Les pentes de consommation (respiration) et de production (photosynthèse) d'oxygène peuvent ainsi être extraites. En considérant que la respiration a lieu en présence et en l'absence de lumière, cela signifie que la photosynthèse mesurée ici n'est pas la photosynthèse brute. En effet, la production réelle d'oxygène est supérieure à celle mesurée puisqu'elle est compensée par la consommation d'oxygène induite par la respiration. De ce fait, pour l'ensemble des résultats obtenus, la vraie valeur de pente de photosynthèse est recalculée telle que :

$$\text{Taux}_{\text{photosynthèse réelle}} = \text{Taux}_{\text{photosynthèse mesurée}} - \text{Taux}_{\text{respiration}}$$

En effectuant ce calcul, cela permet par ailleurs de s'affranchir de tout autre phénomène présent à la fois pendant la phase de respiration et de photosynthèse tels que la réduction d'autres espèces du milieu et l'apport de la réduction de l'oxygène issu de sa diffusion du milieu extérieur vers la solution algale.

III. 3. Détection des herbicides

Dans le cadre de la détection des herbicides, plusieurs protocoles ont été adoptés, dépendant du type de polluant et en particulier de son mode d'action.

III.3.1. Diuron et Atrazine

III.3.1.i Méthode de mesure

Le Diuron et l'Atrazine sont deux herbicides connus pour agir au niveau du photosystème II des algues. En bloquant le transfert d'électrons, ils inhibent la phase de photosynthèse et donc la production d'oxygène. Ils agissent donc spécifiquement sur la photosynthèse et non sur la respiration. Pour cette raison, un protocole de traitement des données particulier a pu être mis en place lors de travaux antérieurs. En effet, étant donné que les mesures peuvent induire des variations quant au nombre d'algues actives et afin de pouvoir comparer les résultats obtenus aisément, la phase de respiration et donc le taux de consommation d'oxygène mesuré est utilisé comme référence (fig. 4.14).

Ainsi, il sera considéré que la valeur de photosynthèse corrigée ($P_{i,corr}$) obtenue pour chaque mesure avec une concentration i en herbicide correspondra à la valeur de photosynthèse mesurée multipliée par un facteur de correction correspondant au rapport entre la valeur moyenne de toutes les pentes de respirations mesurées (R_{moy}) et la valeur de pente de respiration obtenue pour chaque mesure i (R_i).

$$P_{i,corr} = P_i * \frac{R_{moy}}{R_i}$$

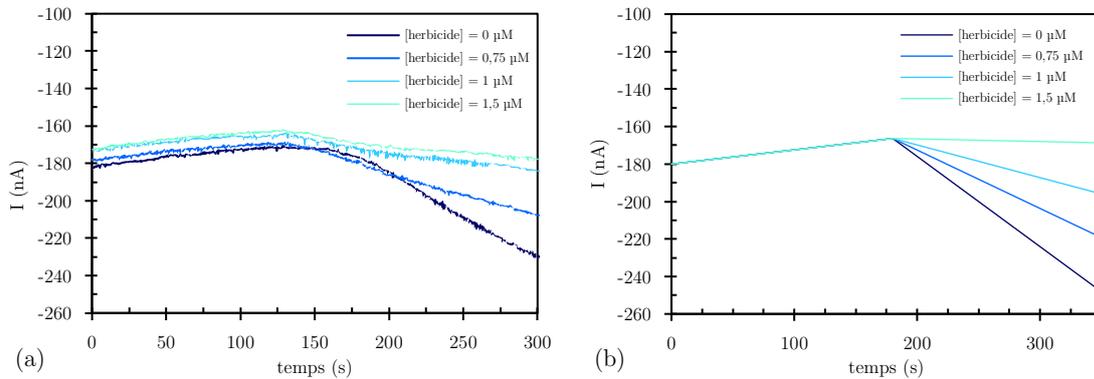


Figure 4.14 : Évolution du courant pendant un cycle lumière/obscurité (a) avant traitement et (b) après traitement des données complet

De cette façon, les valeurs de pente de photosynthèse sont comparées entre elles. En considérant P_0 la pente obtenue pour un échantillon sans herbicide, les pourcentages d'inhibition sont calculés pour chaque mesure $P_{i,corr}$ tels que :

$$\%_{inhibition,photosynthese} = \left(1 - \frac{P_{i,corr}}{P_0}\right) * 100$$

III.3.1.ii Résultats obtenus en macrovolume

Les tests ont tout d'abord été effectués en macrovolume, dans un bécher contenant 10 mL de suspension d'algues à 8×10^6 cellules/mL (sans préconcentration préalable).

Les mesures ont été effectuées sur plusieurs échantillons dans lesquels étaient ajoutés quelques microlitres de solution aqueuse concentrée en herbicide de sorte à négliger l'effet de dilution sur les algues. Des concentrations en Atrazine et Diuron comprises entre 0,1 et 2,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ont été testées. Les pentes ont pu être extraites et corrigées, et les valeurs de pourcentages d'inhibition de la photosynthèse ont été calculées.

Les résultats (fig. 4.15) montrent une influence différente des deux polluants sur l'inhibition de la photosynthèse algale.

Dans le cas de l'Atrazine, la courbe obtenue (fig. 4.15a) peut se diviser en trois parties. Tout d'abord à de faibles concentrations en herbicide comprises entre 0,1 et 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, un phénomène d'exaltation de la production d'oxygène semble avoir lieu. Ensuite apparaît une évolution linéaire de l'inhibition en fonction de la concentration en polluant entre 0,2 et 1,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ce qui permet de déterminer une valeur de pente de sensibilité estimée à $34\%_{\text{inhib,photosynthese}}/\mu\text{mol.L}^{-1}_{\text{Atrazine}}$. Enfin, au-delà de 1,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, il semble apparaître un phénomène de saturation.

Dans le cas du Diuron, les résultats diffèrent légèrement. Tout d'abord, le même phénomène d'exaltation de la production d'oxygène apparaît et de manière plus marquée à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ cette fois. Par la suite, il est difficile de repérer une linéarité, néanmoins l'inhibition est de plus en plus forte avec l'augmentation de la concentration en herbicide. Enfin, un début de saturation semble également apparaître au-delà de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Une valeur de sensibilité a été néanmoins approximée entre 0,75 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de l'ordre de $41\%_{\text{inhib,photosynthese}}/\mu\text{mol.L}^{-1}_{\text{Diuron}}$.

Ces résultats permettent de définir les limites du capteur. Le phénomène d'augmentation de la production d'oxygène par les algues apparaissant pour les deux herbicides à de faibles concentrations pourrait s'expliquer par la réponse des algues à un stress via un mécanisme de défense. Des résultats semblables rapportant qu'une faible concentration en contaminant pouvait stimuler le PSII des algues ont par ailleurs déjà été reportés dans la bibliographie pour d'autres types d'algues et de polluants [51]. Ce phénomène, bien qu'intéressant, entraîne alors l'obtention de limites de détection plus importantes (autour de 0,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). En effet, pour l'application, la méthode de mesure consistera à comparer les valeurs de production d'oxygène obtenues pour un échantillon d'algues dans le milieu de culture (blanc) et un échantillon d'algues auquel sera ajouté un échantillon d'eau à analyser. De ce fait, il sera difficile de déterminer le niveau de pollution de l'échantillon si les concentrations en herbicides ne sont pas suffisamment importantes.

Cette valeur de limite de détection est alors malheureusement largement supérieure aux valeurs limites imposées par les normes françaises, européennes et mondiales qui sont de

l'ordre de 5 à 10 nmol.L⁻¹. Néanmoins, il est important de noter que des concentrations de cet ordre de grandeur élevé ont déjà été retrouvés dans les cours d'eau. De plus, en sachant que les algues sont sensibles à plusieurs polluants d'une matrice écotoxique globale, il se pourrait qu'elles soient capables de fournir des résultats d'alertes de toxicologie du milieu global pour des concentrations en chacun des polluants plus faibles.

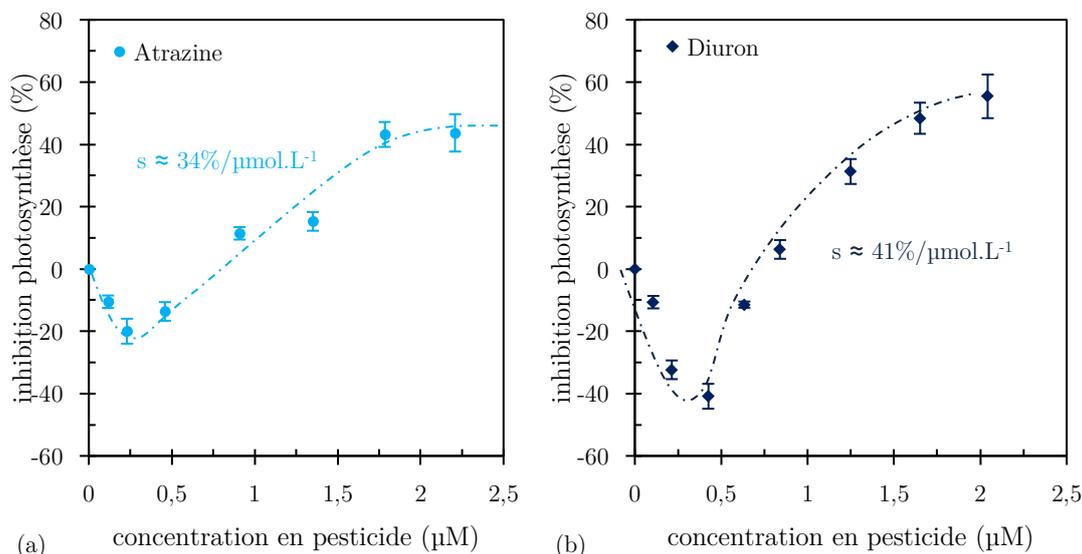


Figure 4.15 : Pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en herbicide pour (a) l'Atrazine et (b) le Diuron

III.3.1.ii Résultats obtenus en microvolume

Les tests devaient par la suite être reproduits en microvolume avec la fabrication des disques microfluidiques en vue de l'application finale du projet. Un retard des partenaires du projet n'a malheureusement pas permis l'obtention des disques avec capteurs intégrés finalisés à temps. Cependant, des tests de validation ont été réalisés pour le Diuron dans des prototypes de cuves microfluidiques récupérées de travaux antérieurs (F. Sekli-Belaïdi) de 12,5 μL de volume afin de s'assurer que les mesures étaient bien réalisables en microvolume. Les électrodes intégrées au sein de ces microcuves sont de taille identique à celles utilisées jusqu'à présent dans le cadre de ce projet et ont été réalisées par un procédé microtechnologique identique (fig. 4.16).



Figure 4.16 : Dispositif issu de travaux antérieurs utilisé pour les mesures en microvolume

Ainsi, la solution algale est insérée dans ces cuves microfluidiques. Dans le cas présent, les algues ont dû être préconcentrées à 48×10^6 cellules/mL du fait du très faible volume de la cuve. Cette préconcentration ne devrait pas être nécessaire dans les cuves finales de volume plus important. Cette fois-ci, la source de lumière utilisée pour l'illumination des algues est une diode organique électroluminescente de taille compatible avec la cuve microfluidique et dont l'émission a été adaptée aux algues. Ce type de source lumineuse a été réalisée par le LAAS dans le cadre du projet et sa description sera plus détaillée dans la partie IV de ce chapitre dédiée aux mesures optiques de fluorescence (cf. IV.1.1.ii).

Les résultats (fig. 4.17) obtenus montrent tout d'abord que le phénomène de stimulation de la production d'oxygène à faibles concentrations est ici amoindri, ce qui permet alors d'avoir une meilleure limite de détection (autour de $0,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). De plus ici, il apparaît une évolution linéaire de l'inhibition en fonction de la concentration en Diuron dont la pente de sensibilité a pu être évaluée à $51\%_{\text{inhib.photosynthèse}}/\mu\text{mol.L}^{-1}_{\text{Diuron}}$. Il est difficile de conclure quant à ces différences observées entre les mesures en macrovolume et microvolume. Néanmoins, il est envisageable de dire que la quantité d'algues comme la source lumineuse peuvent tout à fait influencer sur le comportement des algues. Ces résultats permettent tout de même de confirmer que les mesures pourront être réalisés à terme dans le dispositif final sans problème apparent.

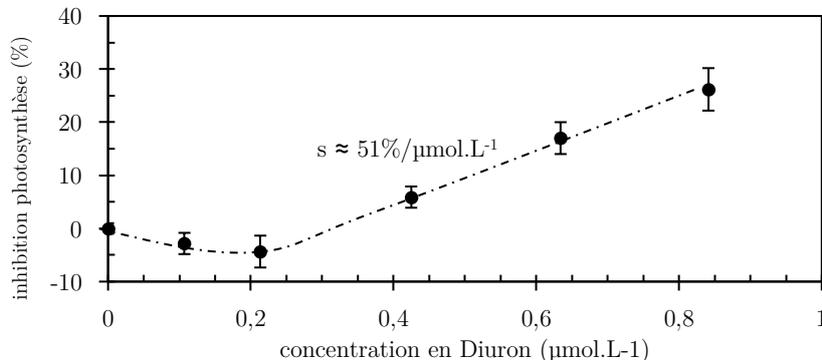


Figure 4.17 : Inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en Diuron en microvolume

III.3.2. Glyphosate et S-métolachlore

III.3.2.i Méthode de mesure

Le glyphosate et le S-métolachlore n'agissent pas de la même manière que le Diuron et l'Atrazine. Ils ne sont pas connus pour se focaliser uniquement sur la photosynthèse. Ainsi, la méthode de traitement des données utilisée précédemment et basée sur la mesure de la phase de respiration comme référence n'est plus valable. De ce fait, ici, un protocole plus minutieux d'homogénéisation des algues et de prélèvement a été effectué afin de s'assurer que

la quantité d'algues actives était comparable d'un échantillon à l'autre. Pour cela, avant chaque prélèvement les algues sont agitées au vortex pendant 5 minutes.

Afin de s'assurer, à minima, que le nombre d'algues prélevées dans chaque échantillon est comparable, les algues ont été comptées au microscope sur 10 échantillons. Les résultats obtenus (tab. 4.1) montrent une concentration d'algues suffisamment proche aux erreurs de comptage près pour considérer les mesures comparables par cette méthode.

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nb d'algues comptées dans 0,2 μL	155	165	164	162	157	165	159	154	172	166
Concentration d'algues calculée ($\times 10^6$ cellules/mL)	7,75	8,25	8,2	8,10	7,85	8,25	7,95	7,70	8,6	8,3

Tableau 4.1 : Décompte des cellules algales dans différents échantillons après homogénéisation et prélèvement

Étant donné que ces herbicides peuvent agir sur différentes fonctions métaboliques des algues, il a été choisi de comparer à la fois la respiration et la photosynthèse en extrayant les pentes directement.

III.3.2.ii Résultats

Les expériences ont ici été réalisées en macrovolume. A court terme, c'est-à-dire immédiatement après incubation, l'effet d'inhibition sur la respiration était très faible pour une gamme de concentration comparable à savoir 0,5 - 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Un effet de stimulation important de la photosynthèse a été observé. Les résultats (tab. 4.2) ont par ailleurs montré qu'une concentration beaucoup plus importante (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) avait tout de même un effet à la fois sur la respiration et sur la photosynthèse des algues traduisant un affaiblissement général.

Herbicide	Glyphosate			S-métolachlore		
Concentration ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	0,5	1	50	0,5	1	50
% _{inhibition,respiration}	4,1	6,5	38	-	4,4	84
% _{inhibition,photosynthèse}	-27,5	-17,3	36,8	-	-14,4	57

Tableau 4.2 : Inhibition de la respiration et de la photosynthèse par le glyphosate et le S-métolachlore à différentes concentrations

La concentration à laquelle une inhibition a pu être observée étant bien trop élevée et pas du tout en accord avec les normes environnementales ni avec les concentrations pouvant être retrouvées généralement dans les eaux de surface, il a été décidé d'effectuer une seconde étude en laissant un temps d'incubation plus important de ces polluants sur les algues. Deux concentrations ont été testées sur la gamme d'étude initiale (0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) à plusieurs temps d'incubation compris entre 2h et 72h.

Les résultats obtenus (fig. 4.18) indiquent des comportements différents des polluants. Concernant le glyphosate, les algues semblent subir les effets à partir de 24h d'incubation du polluant à la fois sur la respiration et sur la photosynthèse. Pour le S-métolachlore, les algues semblent subir des effets dans un premier temps (légers sur la respiration et plus importants sur la photosynthèse), mais ces effets ne semblent pas se poursuivre au-delà de 24h/48h (suivant la concentration ajoutée). Ce résultat pourrait éventuellement traduire la potentielle dégradation du S-métolachlore au sein du milieu de culture complexe (TAP) des algues ou bien que les algues soient capables de s'y acclimater à ces concentrations contrairement au glyphosate qui semble continuer à agir au-delà de 72h d'incubation.

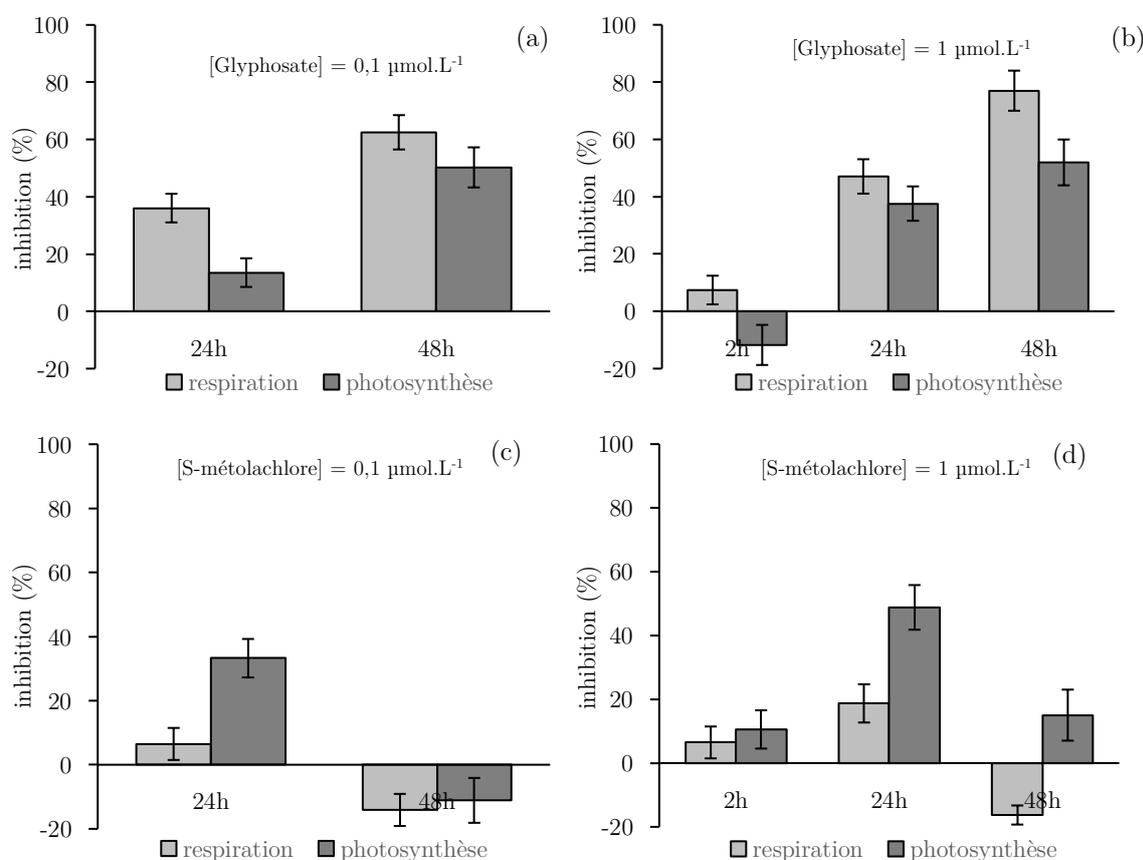


Figure 4.18 : Pourcentages d'inhibition de la respiration et de la photosynthèse à différents temps d'incubation pour le glyphosate ((a) 0,1 µmol.L⁻¹ et (b) 1 µmol.L⁻¹) et le S-métolachlore ((c) 0,1 µmol.L⁻¹ et (d) 1 µmol.L⁻¹)

Il n'est pas possible à ce stade de déterminer précisément le mode d'action du polluant et de savoir si ces diminutions en respiration et en photosynthèse sont dues à une inhibition réelle de ces phénomènes ou à une inhibition plus globale de la croissance des algues. Les concentrations étudiées (0,1 - 1 µmol.L⁻¹) sont encore supérieures aux normes environnementales. Néanmoins, comme mentionné pour le Diuron et l'Atrazine, dans un objectif de mesures de risque écotoxique globale, il se peut que les algues soient suffisamment sensibles pour donner une idée sur la pollution ou non du milieu.

III. 4. La détection des métaux lourds (ETM)

De la même façon que pour le glyphosate et le S-métolachlore, les ETM sont connus pour agir sur diverses fonctions vitales des algues. Ainsi, dans le cas présent, il a été décidé de suivre le même protocole que celui suivi pour les deux derniers herbicides. Les études ont été effectuées directement en fonction du temps d'incubation car aucune modification concrète de la respiration ou de la photosynthèse n'a été observée lors de mesures immédiates.

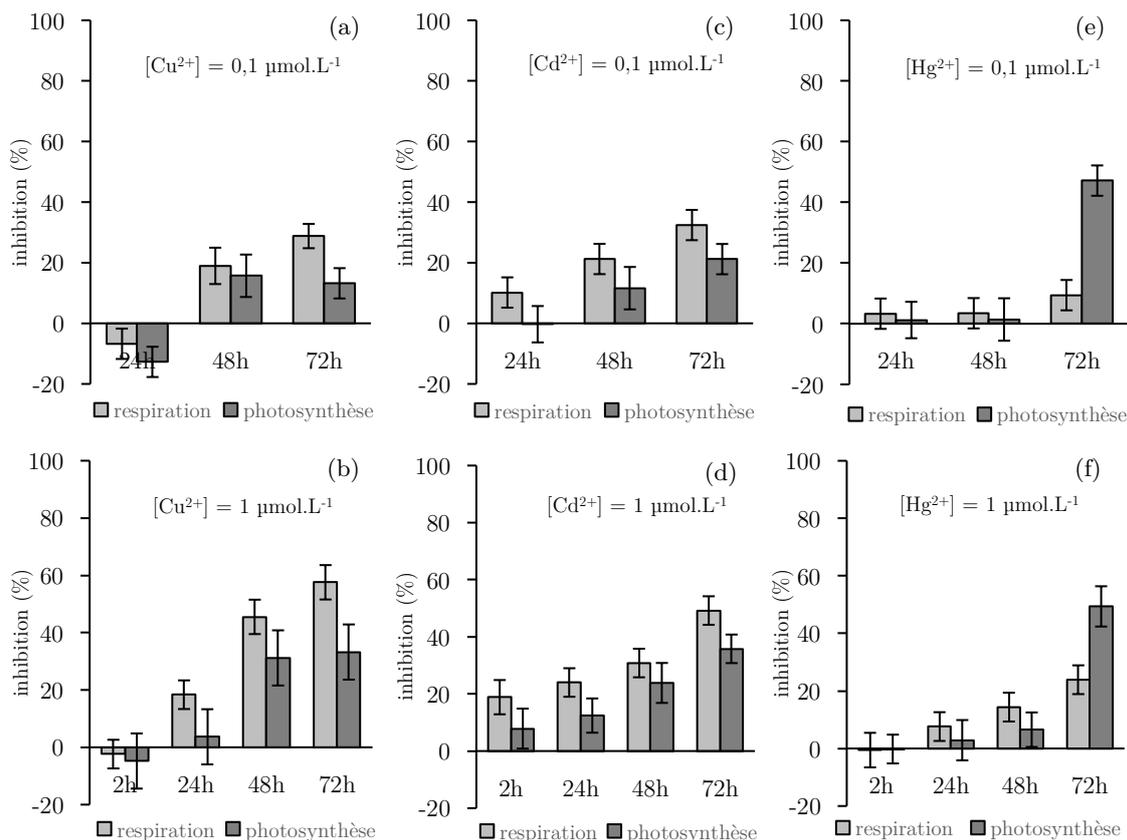


Figure 4.19 : Pourcentages d'inhibition de la respiration et de la photosynthèse à différents temps d'incubation pour le cuivre ((a) 0,1 µmol.L⁻¹ et (b) 1 µmol.L⁻¹), le cadmium ((c) 0,1 µmol.L⁻¹ et (d) 1 µmol.L⁻¹) et le mercure ((e) 0,1 µmol.L⁻¹ et (f) 1 µmol.L⁻¹)

Les résultats obtenus (fig. 4.19) montrent effectivement que le temps d'incubation a une influence importante sur l'inhibition des phases de respiration et de photosynthèse des algues pour les trois ETM testés.

Le cuivre, connu pour être un important inhibiteur de la photosynthèse, agit de manière plus importante à partir de 48h d'incubation et ce sur la photosynthèse comme sur la respiration. Ces inhibitions se poursuivent à 72h jusqu'à atteindre une inhibition d'environ 60 % de la respiration pour 1 µmol.L⁻¹.

Le cadmium lui semble agir dès 2h d'incubation, sur les phases de respiration et de photosynthèse également, et l'inhibition croît jusqu'à 72h où elle atteint pour la respiration une valeur de 50 %.

Pour ces deux métaux, il semble que la respiration soit légèrement plus affectée que la photosynthèse.

Enfin, le mercure lui semble mettre plus de temps à agir. A 48h, l'inhibition de la respiration pour une concentration d'1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ n'atteint que 14 %. Contrairement aux deux précédents, la photosynthèse semble plus affectée que la respiration et dès 72h, son inhibition atteint les 50% y compris pour une concentration plus faible de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Dans la bibliographie, les résultats reportés ne convergent pas vers un même effet et cela complique la compréhension exacte des mécanismes impliqués dans ces observations. Néanmoins, il est clair que les ETM affectent les métabolismes algaux avec un temps d'incubation nécessaire. Comme pour le glyphosate et le S-métolachlore, l'obligation de laisser un temps d'incubation n'est pas optimal pour l'application finale et les concentrations testées sont encore supérieures aux normes environnementales.

En conclusion, les algues se révèlent être sensibles aux polluants et cette sensibilité est bien mesurable par électrochimie via la détection des taux de consommation et de production d'oxygène. Les concentrations testées sont supérieures aux normes environnementales. Néanmoins, en plus du fait que les normes soient souvent dépassées notamment en périphérie de sites industriels et/ou agricoles, il est important de considérer que les eaux de surfaces sont des matrices complexes contenant en général de nombreux polluants. Il ne serait donc pas surprenant que l'accumulation de polluants ait un effet plus rapide et/ou plus important sur les algues qui serait suffisant pour le rendre mesurable dans le cadre de l'application finale et donc que ce biocapteur constitue bel et bien un système d'alerte précoce fiable.

III. 5. Premiers tests en eau réelle

Afin de confirmer la possible utilisation du biocapteur à algues sur eau réelle, de premiers tests ont été effectués à l'aide d'un échantillon d'eau minérale Cristalline et d'un échantillon d'eau brute issu du Canal du Midi. Dans les deux cas, 1 mL d'échantillon d'eau a été prélevé à la pipette et ajouté à 10 mL de suspensions d'algues afin de mesurer la respiration et la photosynthèse.

Afin de se rapprocher de l'application finale, les mesures ont été effectuées immédiatement sans temps d'incubation. Les résultats (fig. 4.20) ont montré une inhibition importante de la phase de photosynthèse en présence de l'échantillon d'eau issue du Canal du Midi, ce qui n'est absolument pas le cas en présence d'eau Cristalline.

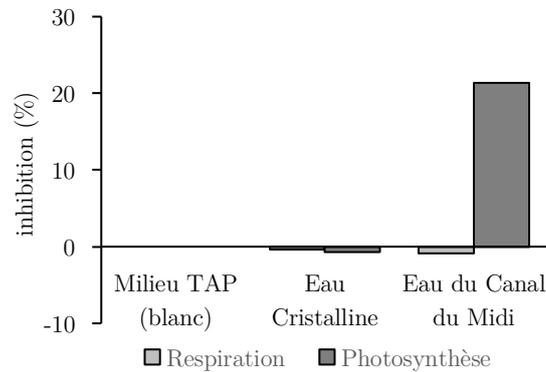


Figure 4.20 : Pourcentages d'inhibition de la respiration et de la photosynthèse pour des échantillons d'eau minérale et issue du Canal du Midi

Ces résultats sont donc très prometteurs en vue de l'application visée à savoir être capable de faire état d'une pollution globale du milieu avant d'effectuer des tests plus poussés en laboratoire.

IV. La détection optique

La bioluminescence est la capacité d'un organisme vivant à produire de la lumière. Lorsque cette production de lumière nécessite un éclairage (source d'excitation), il est question de fluorescence. Naturellement, lorsque les molécules de chlorophylle absorbent la lumière, une partie de l'énergie est transférée au PSII et l'excédent est quant à lui réémis sous forme de fluorescence appelée fluorescence chlorophyllienne. En présence de certains polluants, en particulier certains herbicides, bloquant le transfert d'électrons vers le PSII, l'énergie réémise sous forme de fluorescence est alors d'autant plus importante. A l'inverse, d'autres polluants, en agissant notamment sur la teneur en chlorophylle peuvent induire une inhibition de la fluorescence algale. C'est ainsi qu'il est possible de déterminer si un échantillon est pollué ou non.

Cette émission de fluorescence a lieu à 680 nm. Les algues absorbent principalement dans le bleu (entre 400 et 480 nm) et dans le rouge (entre 650 et 700 nm) (fig. 4.21). Afin d'éviter que le spectre de la source d'excitation n'interfère avec l'émission de fluorescence algale et donc d'être capable de mesurer aisément le photocourant associé, il est nécessaire de travailler avec une source lumineuse qui n'émet pas au-delà de 550 nm. De la même manière, le photodétecteur utilisé devra être adapté à cette détection, soit entre 620 et 720 nm, et ne devra donc pas détecter les signaux à des longueurs d'ondes inférieures à 550 nm.

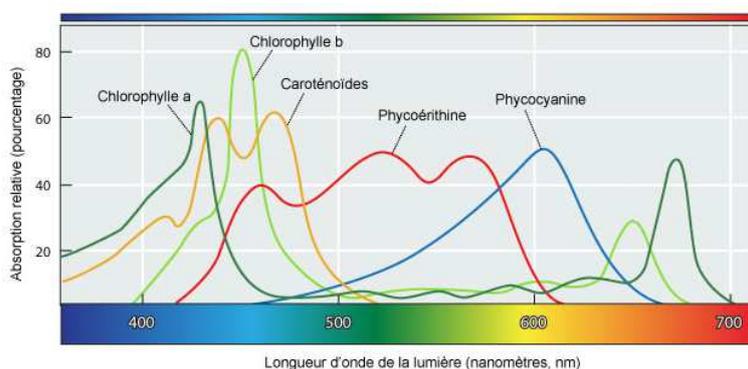


Figure 4.21 : Spectre d'absorption de la lumière par les différents pigments photosynthétiques des algues [52]

IV. 1. Le montage et les composants utilisés

Comme mentionné précédemment, la fluorescence algale peut aussi être utilisée comme indicateur de pollution. Les différents montages utilisés pour la détection optique de fluorescence comprennent ainsi quatre principaux éléments qui sont :

- une source lumineuse pour l'excitation des microalgues,
- une cuve contenant la solution de microalgues avec ou sans polluant,
- un photodétecteur capable de détecter le photo-courant de fluorescence émis par ces dernières,
- un ou plusieurs filtres optiques (éventuels) pour s'affranchir de certaines longueurs d'ondes indésirables suivant les composants utilisés.

Plusieurs composants ont été utilisés dans la réalisation de ces expériences. En effet, il a été décidé de comparer des composants du commerce aux composants organiques réalisés par les partenaires dans le cadre du projet.

IV.1.1. La source d'excitation lumineuse

La source d'excitation a été choisie de sorte à être adaptée à la longueur d'onde d'absorption des algues comprise entre 400 et 550 nm, soit dans le bleu.

Dans le cadre des mesures de fluorescence, une diode électroluminescente (LED pour « *Light Emitting Diode* » en anglais) bleue issue du commerce a été utilisée. Par ailleurs, trois types de diodes électroluminescentes organiques ont été fabriquées dans le cadre du projet BELUGA à savoir une OLED classique, une OLED à micro-cavité (MOLED pour « *Micro-cavity Organic Light Emitting Diode* » en anglais) et une MOLED autofiltrée bleues. Les MOLED réalisées n'ont pas encore pu être utilisées pour les mesures optiques car elles nécessitent la mise en œuvre d'un protocole adapté. Néanmoins, une OLED classique a

pu être utilisée lors des mesures électrochimiques (cf. III.3.1.ii), c'est pourquoi leur développement sera tout de même décrit ici.

IV.1.1.i La LED commerciale

La LED commerciale de la marque Nichia (NSPB510AS) utilisée provient de RS. Son émission est centrée sur un maximum à 465 nm (fig. 4.22).

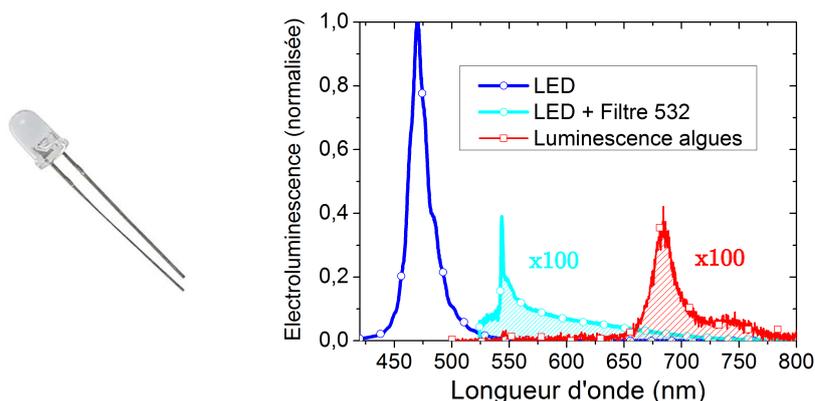


Figure 4.22 : (a) Photographie de la LED commerciale et (b) spectres d'électroluminescence de la LED commerciale avec et sans filtre comparé à celui des algues CR

Bien que son maximum d'émission soit parfaitement adapté à l'excitation des algues, des caractérisations menées au LAAS (R. Monflier) ont pu prouver que l'émission résiduelle de cette LED commerciale (au-delà de 550 nm) n'était pas négligeable. En effet, comme le montre la figure 4.21, où les spectres de luminescence de la LED (filtrée jusqu'à 532 nm) et des algues ont été multipliés par 100 pour une meilleure lisibilité, montrent que l'intensité lumineuse de la LED ainsi que celle des algues sont du même ordre de grandeur. Cela suggère qu'il sera nécessaire de s'assurer, lors de l'utilisation de cette LED commerciale, d'ajouter, dans le cas d'un photodétecteur efficace sur tout le spectre du visible, un filtre d'excitation entre la LED et la cuve contenant les algues permettant de filtrer les longueurs d'onde supérieures à 550 nm ou bien d'avoir un photodétecteur adapté ne détectant que le signal à partir de 630 nm (a minima) afin que le signal de la LED soit négligeable face à celui des algues.

IV.1.1.ii L'OLED et la MOLED du projet BELUGA

Afin d'éviter ce problème, le projet BELUGA a prévu la fabrication de d'OLED et de MOLED adaptées à l'application. L'élaboration de ce type de sources lumineuses permet une meilleure sélection des plages d'émission. Ainsi, il ne sera dans ce cas-là pas nécessaire d'utiliser un filtre d'excitation, celles-ci ne devant pas émettre au-delà de 530 nm. Autrement dit, cela doit permettre d'éviter la présence d'un courant parasite important pouvant être détecté par le photodétecteur et empêchant la bonne mesure du photocourant de fluorescence émis par les algues.

La fabrication de ces dernières a été réalisée lors de travaux menés au LAAS (L. Lozano Hernandez, I. Séguy, V. Bardinal et L. Salvagnac). Leurs dimensions ont été déterminées de sorte à s'adapter aux tailles de cuves prévues dans l'application finale du projet (Lab-On-Disc), soit $5 \times 5 \text{ mm}^2$ (fig. 4.23a).

Dans un premier temps, des OLED bleues classiques ont été fabriquées. Leur procédé de fabrication est un procédé issu des techniques de microtechnologie en plusieurs étapes de façon à obtenir les différentes couches nécessaires. Elles sont réalisées à partir d'empilements de semi-conducteurs organiques spécifiques et les matériaux sont déposés par sublimation sur une anode constituée d'oxyde d'étain et d'indium (ITO).

L'empilement final ayant permis l'obtention d'OLED présentant les caractéristiques nécessaires pour les mesures électrochimiques prévues dans le cadre du projet est le suivant :

ITO/HAT-CN(5nm)/NPB(40nm)/TrisPCz(15nm)/MADN :DPAVBi(4%,20nm)/BmPyPh(40nm)
/Liq (0.5nm)/Al(100nm)

Dans un second temps, dans le cadre des mesures de fluorescence chlorophyllienne, il a été décidé de développer les MOLED car cela devrait permettre de sélectionner mieux les plages d'émission mais également d'augmenter le rendement nécessaire à la mesure de fluorescence. Il s'agit alors ici de former, sur un miroir de Bragg distribué, un empilement de couches diélectriques alternées pour créer une microcavité verticale sur laquelle sera déposée l'anode conductrice et transparente puis l'empilement de l'OLED classique défini précédemment à l'exception de la couche de NPB qui a du être augmentée à 55 nm.

Deux types de MOLED ont pu être développées, une MOLED dite standard permettant alors une augmentation à la fois de l'efficacité lumineuse et une réduction de la largeur à mi-hauteur du pic en comparaison à une OLED classique, et une MOLED optimisée (filtrée) à l'aide d'un empilement optique supplémentaire (dénommé back-DBR) permettant d'améliorer la position du pic pour être encore plus adaptée à la longueur d'onde d'émission des algues et de diminuer encore plus l'émission au-delà de 550 nm (fig. 4.23b).

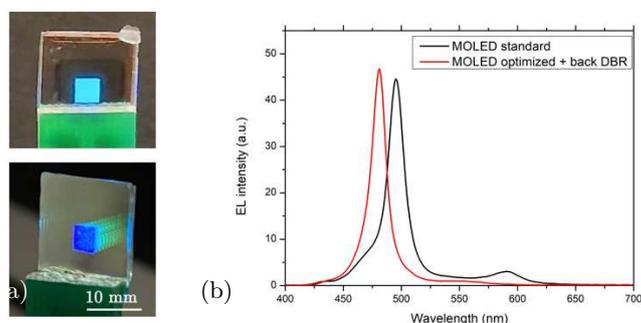


Figure 4.23 : (a) Photographies de la MOLED standard et de la MOLED filtrée et (b) spectres d'électroluminescence des MOLED du projet BELUGA

La réalisation de telles MOLED induit tout de même une perte en puissance en comparaison aux OLED classiques, c'est pour cette raison qu'elles nécessitent d'être utilisées selon un protocole différent (mode pulsé). En électrochimie, l'utilisation d'OLED classiques, plus puissantes, a été possible puisque l'émission parasite au-delà de 580 nm n'a pas d'importance.

IV.1.2. Le disque microfluidique

Comme mentionné dans le chapitre 2, en l'attente des disques initialement prévus dans le cadre du projet BELUGA devant être fournis par l'INL, des disques provisoires en PMMA ont été réalisés au LAAS par V. Raimbault. Pour rappel, ces disques comprennent des microcuves circulaires de rayon 3 mm et de volume 85 μL (fig. 4.24).

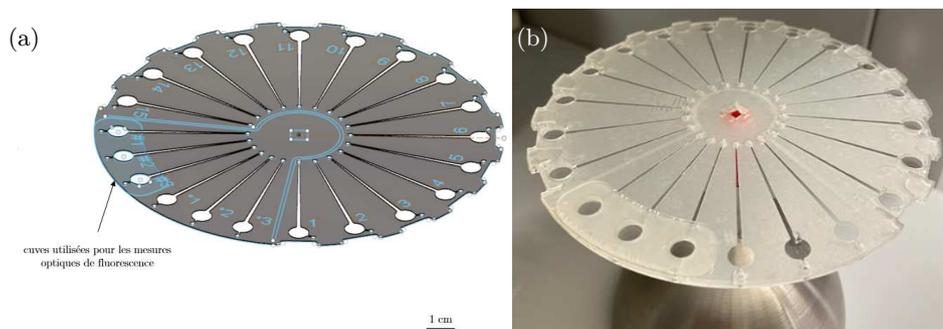


Figure 4.24 : (a) Schéma et (b) photographie du disque réalisé au LAAS utilisé pour les mesures optiques

Afin de s'assurer que le PMMA n'émettait pas, ce qui aurait pu perturber les mesures de fluorescence, une mesure de photoluminescence de ce matériau a pu être effectuée et comparée à celle des algues. Les résultats (fig. 4.25) montrent bien que l'émission du PMMA est largement négligeable face à l'émission des algues, cela confirme donc que l'utilisation de ce matériau comme cuve microfluidique est possible.

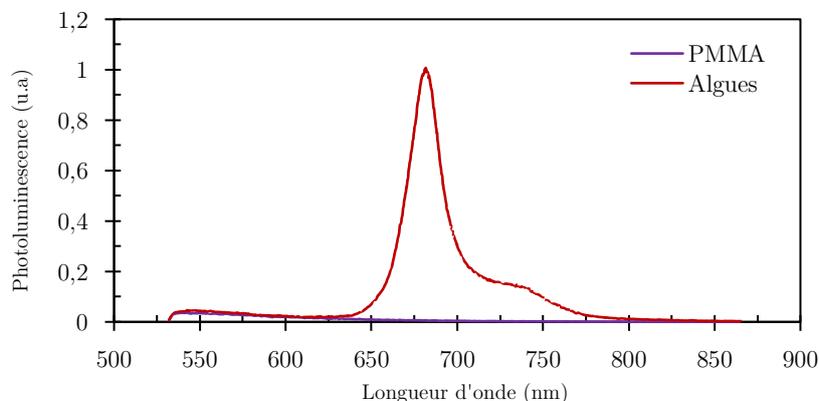


Figure 4.25 : Photoluminescence du PMMA comparé à la photoluminescence des algues

IV.1.3. La photodétecteur

Comme pour la source d'excitation, deux types de photodétecteurs ont été utilisés dans le cadre de ces mesures : une photodiode silicium commerciale et la photodiode organique (OPD pour « *Organic PhotoDiode* » en anglais) fabriquée par les partenaires du projet.

IV.1.3.i La photodiode silicium commerciale

La photodiode commerciale utilisée est une photodiode de la marque OSRAM (BPW 21) efficace sur tout le spectre du visible avec un maximum autour de 600 nm (fig. 4.26), soit proche de la longueur d'onde d'émission de fluorescence des algues.

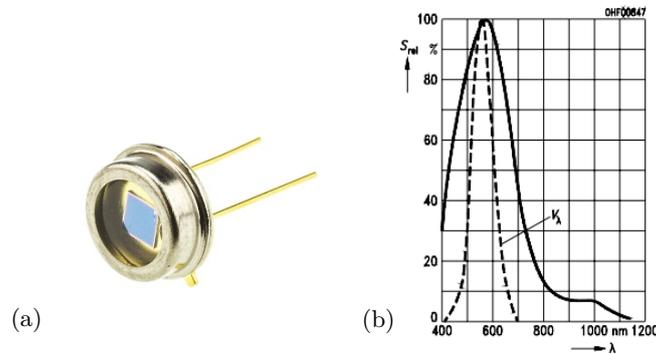


Figure 4.26 : (a) Photographie de la photodiode commerciale et (b) spectre de sa sensibilité relative

Cette photodiode étant capable de détecter le signal sur toute la plage de longueurs d'ondes du visible, il sera nécessaire d'utiliser un filtre entre cette dernière et les algues permettant de filtrer l'émission de la LED ou de la MOLED pour des longueurs d'ondes inférieures à 530 nm. Les dimensions de sa surface active sont de $2,73 \times 2,73 \text{ mm}^2$ soit une surface de $7,45 \times 10^{-6} \text{ m}^2$.

IV.1.3.ii L'OPD du projet BELUGA

Tout comme la MOLED du projet, l'OPD a été développée dans le cadre du projet de manière à être adaptée à l'application. Ainsi, le principal intérêt de la fabrication d'un tel composant est de rendre possible la détection de l'émission des algues (entre 600 et 700 nm) tout en restant aveugle aux sources excitatrices (LED ou MOLED). Pour cela, l'OPD développée est autofiltrante, autrement dit son utilisation ne doit nécessiter aucun filtre d'émission en amont. Contrairement à la photodiode commerciale, l'OPD n'est volontairement efficace que sur une bande de longueurs d'ondes bien définie.

L'OPD a été développée au CINaM dans le cadre des travaux de thèse de Q. Eynaud [53]. L'architecture choisie pour les premiers tests inclue six OPD sur un même substrat (fig. 4.27a) de deux tailles différentes. Les plus grandes ont un rayon de 2,821 mm soit une surface

de $2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ tandis que les plus petites ont un rayon de 1,6925 mm équivalent à une surface de $9 \times 10^{-6} \text{ m}^2$.

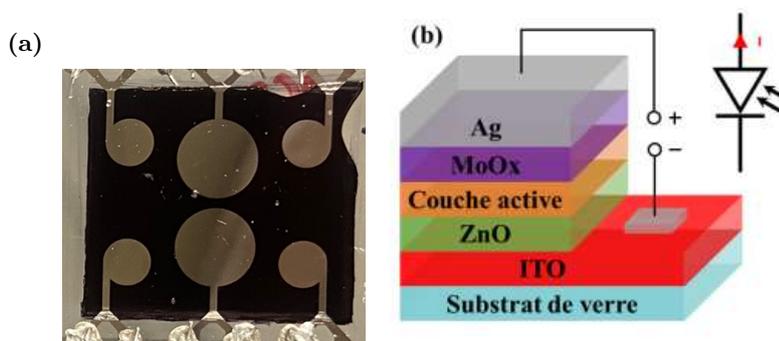


Figure 4.27 : (a) Photographie de l'OPD et (b) schéma de l'empilement sur lequel il est basé

Ces OPD sont constituées de différentes couches selon l'empilement suivant (structure dite inverse) : ITO/ZnO/Mélange photoactif/MoO₃/Ag (fig. 4.27b). Le mélange photoactif choisi pour l'OPD utilisée dans le cadre de la mesure de la bioluminescence des algues est une encre de PM6:PC₇₀BM.

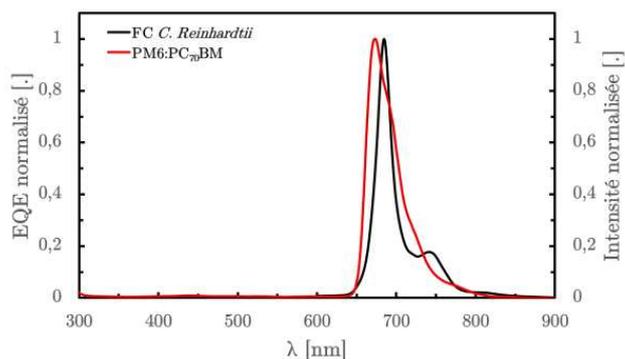


Figure 4.28 : Graphiques représentant l'EQE en fonction de la longueur d'onde pour l'OPD et les algues CR [53]

Les mesures d'efficacité quantique externe (fig. 4.28) en fonction de la longueur d'onde, permettent de mettre en évidence que l'OPD ainsi fabriquée permet bien d'autofiltrer les longueurs d'ondes inférieures à 650 nm et qu'elle est donc parfaitement adaptée à l'émission des microalgues utilisées.

IV.1.4. Les filtres

Dans le cas du montage avec les composants commerciaux et comme mentionné précédemment, il a été nécessaire d'utiliser des filtres afin de s'affranchir de certains signaux à certaines longueurs d'ondes pouvant perturber la mesure du photocourant émis par les algues. Deux types de filtres sont utilisés : un filtre d'émission et un filtre d'excitation.

IV.1.4.i Le filtre d'excitation

Le filtre d'excitation est utilisé devant la LED afin de couper son émission au-delà de 500 nm. Ce filtre est un filtre passe-bande THORLABS (FESH0500) qui transmet presque 100% les longueurs d'ondes comprises entre 380 et 500 nm (fig. 4.29).

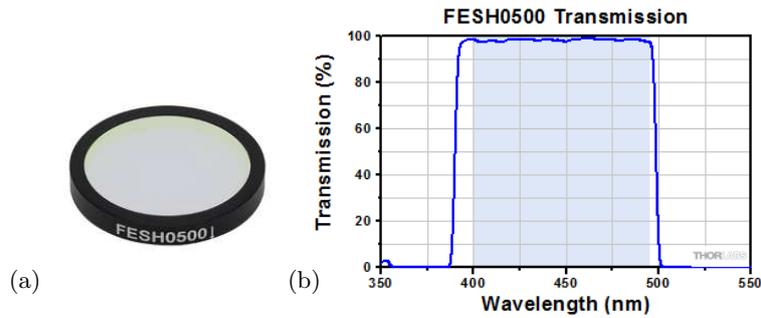


Figure 4.29 : (a) Photographie du filtre d'excitation utilisé et (b) son spectre en transmission

IV.1.4.ii Le filtre d'émission

Le filtre d'émission est utilisé devant la photodiode commerciale afin de couper les signaux émis aux longueurs d'ondes inférieures à 560 nm et transmet à 90% les longueurs d'ondes supérieures à 650 nm de sorte à ne détecter que l'émission des algues et non l'émission de la LED ou de la MOLED. Le filtre utilisé est un filtre de la marque ROSCOLUX (Supergel #19 Fire) (fig. 4.30).

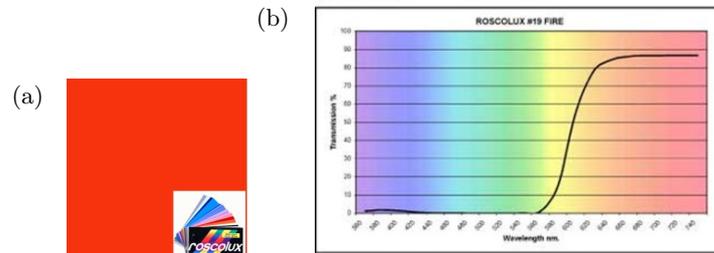


Figure 4.30 : (a) Photographie du filtre d'émission utilisé et (b) son spectre en transmission

IV.1.5. Les différents montages utilisés

Ainsi trois principaux montages ont pu être utilisés (fig. 4.31). Le premier (1) est constitué uniquement des composants issus du commerce, il nécessite alors à la fois un filtre d'émission et un filtre d'excitation. Le second (2) est composé de l'OPD issue du projet mais, en l'attente de l'obtention de MOLED, utilise la LED commerciale comme source excitatrice (impliquant donc l'utilisation du filtre d'émission). Enfin, le troisième (3) utilise à la fois l'OPD et la MOLED du projet, composants adaptés (autofiltrés) ne nécessitant, par conséquent, plus aucun filtre. Ce dernier n'a pas pu être utilisé à temps dû à, comme expliqué, la

mise en œuvre plus complexe du protocole incluant les OLED ou MOLED mais des mesures sont prévues pour la finalisation du projet.

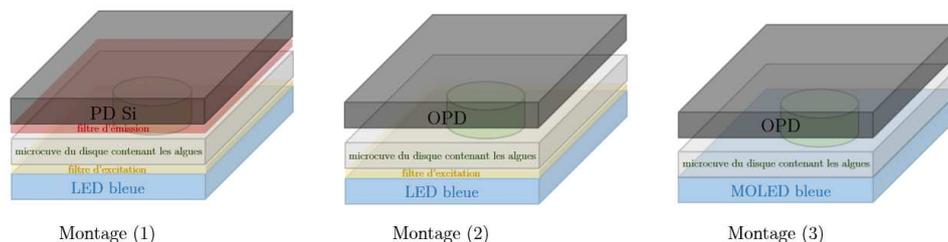


Figure 4.31 : Schéma des principaux montages utilisés pour les mesures optiques en fonction des composants utilisés

Pour pouvoir réaliser aisément ces mesures de la manière la plus répétable possible, un banc de mesure a été mis en place au LAAS (J. Roul et L. Séguier) composé de plusieurs platines permettant l'alignement précis de chaque composant et ainsi l'optimisation des mesures (fig. 4.32), finalement réalisées au sein d'une boîte noire.

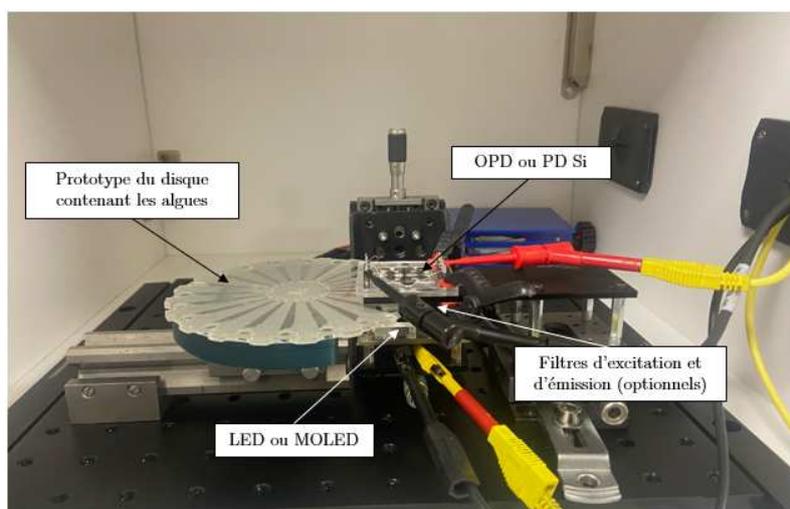


Figure 4.32 : Photographie du banc de mesure optique réalisé au LAAS

IV. 2. Premiers tests de détection d'herbicides

Les mêmes herbicides utilisés pour les mesures électrochimiques ont été étudiés pour ces mesures de fluorescence. Dans un premier temps, le Diuron a été utilisé comme polluant « modèle » afin de comparer les montages et donc l'utilisation des différents composants. Par la suite, plusieurs études ont été menées en comparant l'effet des quatre précédents herbicides.

IV.2.1. Comparaison des différents montages

IV.2.1.i Protocole de mesure

Un protocole de mesure a été défini de manière précise afin de pouvoir comparer aisément les mesures entre elles. Les algues ont été utilisées à une concentration moyenne de 8×10^6 cellules/mL, sans aucune préconcentration préalable. Avant chaque mesure, elles sont agitées au vortex pendant 5 minutes de sorte à assurer une bonne homogénéité. La suspension d'algues prélevée est insérée dans la cuve microfluidique du disque de sorte à mesurer la fluorescence sans polluant (il s'agit du « blanc »). De la même manière, un nouveau prélèvement de suspension d'algues est effectué en ayant au préalable mélangé cette solution à quelques microlitres d'herbicide (suivant la concentration souhaitée). Ce processus est répété autant de fois qu'il y a de concentrations en herbicides à tester.

Une fois la solution insérée dans le disque, ce dernier est placé entre la source lumineuse excitatrice et la photodiode (avec ou sans les filtres suivant les montages utilisés). L'ensemble est placé à l'obscurité pendant 15 minutes afin d'assurer que les photosystèmes des algues soient bien ouverts. Après ces 15 minutes, la source lumineuse est allumée et le photocourant résultant est mesuré par l'OPD en continu. Deux cycles allumé/éteint (1 min / 1 min) sont réalisés permettant l'obtention de graphes caractéristiques (fig. 4.33)

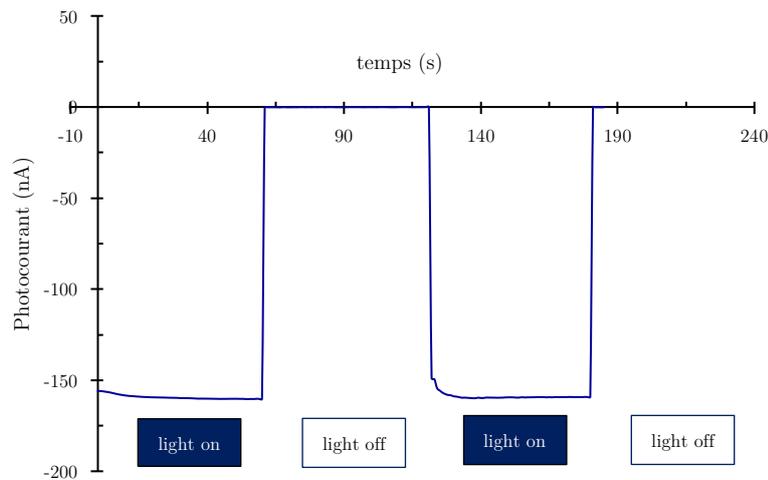


Figure 4.33 : Exemple de courbe obtenue durant une mesure de photocourant pendant deux cycles allumé/éteint

Le photocourant mesuré est censé être proportionnel à la fluorescence émise par les algues. Le photocourant étant dépendant de la surface de la photodiode et afin de pouvoir comparer les différents composants, la valeur mesurée est ramenée en densité de photocourant telle que :

$$J_{ph} = \frac{I_{ph}}{S_{PD \text{ ou } OPD}}$$

où J_{ph} représente la densité de photocourant (nA.cm^{-2}), I_{ph} le photocourant mesuré (nA) et $S_{PD \text{ ou } OPD}$ la surface du composant utilisé pour la détection (cm^2).

De ce fait, les valeurs moyennes de photocourant sont extraites et comparées entre elles pour les différentes concentrations en polluants. Cela permet de définir un pourcentage de variation du photocourant directement lié à la variation de fluorescence tel que [54] :

$$\text{Variation de } J_{ph} = \frac{J_{ph}(C_{i,polluant}) - J_{ph}(C_0)}{J_{ph}(C_0)} * 100$$

où $J_{ph}(C_{i,polluant})$ représente la densité de photocourant obtenue pour une suspension d'algues en présence d'une concentration C_i en polluant (nA.cm^{-2}) et $J_{ph}(C_0)$ la densité de photocourant obtenue pour la même suspension d'algues en absence de polluant (nA.cm^{-2}).

IV.2.1.i Comparaison PD Si et OPD

Avant d'effectuer les expériences avec les algues en présence de polluant et afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'OPD du projet, des mesures sur le milieu de culture des algues ont été effectuées (avec et sans filtre d'émission) puis comparées à celles obtenues cette fois-ci sur la PD Si commerciale (avec et sans filtre également). Les mêmes mesures ont été effectuées sur les algues sans polluant. Les densités de photocourant ont été calculées à partir des valeurs de photocourant mesurées, puis leurs variations ont été calculées selon l'équation suivante :

$$\text{Variation de } J_{ph} = \frac{J_{ph,algues CR} - J_{ph,milieu TAP}}{J_{ph,milieu TAP}} * 100$$

Les résultats (tab. 4.3) ont montré plusieurs choses. Tout d'abord que l'OPD du projet ne filtrait pas à 100% l'émission de la LED étant donné que la densité de photocourant est divisée par environ 78 en ajoutant le filtre d'émission. Cependant, il semble que l'OPD seule autofiltre suffisamment pour permettre de réaliser des mesures contrairement à la PD Si au regard de la densité de photocourant pour cette dernière qui est divisée par 3000 avec ajout du filtre. La meilleure configuration se révèle tout de même être l'OPD avec ajout du filtre.

	PD Si sans filtre	PD Si + filtre	OPD sans filtre	OPD + filtre
$J_{ph,milieu TAP}$ (nA/cm^2)	-1330	-0,454	-181	-2,325
$J_{ph,algues CR}$ (nA/cm^2)	-812	-1,270	-308	-7,125
Variation de J_{ph}	-39 %	180 %	70 %	206 %

Tableau 4.3 : Densités de photocourant obtenues pour différentes configurations des photodiodes

Au vu de l'application initiale du projet ayant pour but de développer des composants optimisés pour l'intégration dans le dispositif final et d'éviter l'utilisation de filtres, pour l'ensemble de la suite des mesures, l'OPD a néanmoins été utilisée sans filtre d'émission.

IV.2.1.ii Le Diuron comme polluant modèle

Le Diuron est un polluant très connu et reporté dans la bibliographie. Comme mentionné au début de ce chapitre, il est un inhibiteur du PSII des algues et induit donc instantanément un blocage du transfert d'électrons se traduisant en partie par une réémission de l'excédent d'énergie sous forme de fluorescence. Ainsi, afin de pouvoir comparer les composants commerciaux aux composants du projet, le Diuron a été utilisé comme polluant pour les calibrations.

Les mesures ont alors été effectuées pour les montages (1) et (2) mentionnés dans la partie IV.1.5. de ce chapitre. La source excitatrice était donc la LED bleue (accompagnée du filtre d'excitation). L'OPD comme la PD Si ont été polarisées toutes les deux à -0.25 V. Les résultats (fig. 4.34) montrent bien que l'OPD sans filtre, bien qu'il ait été démontré précédemment qu'elle ne filtre pas à 100% le signal résiduel émis par la LED, permet de mesurer aisément la variation de photocourant issue de la fluorescence algale en présence de Diuron de la même manière que la PD Si avec filtre.

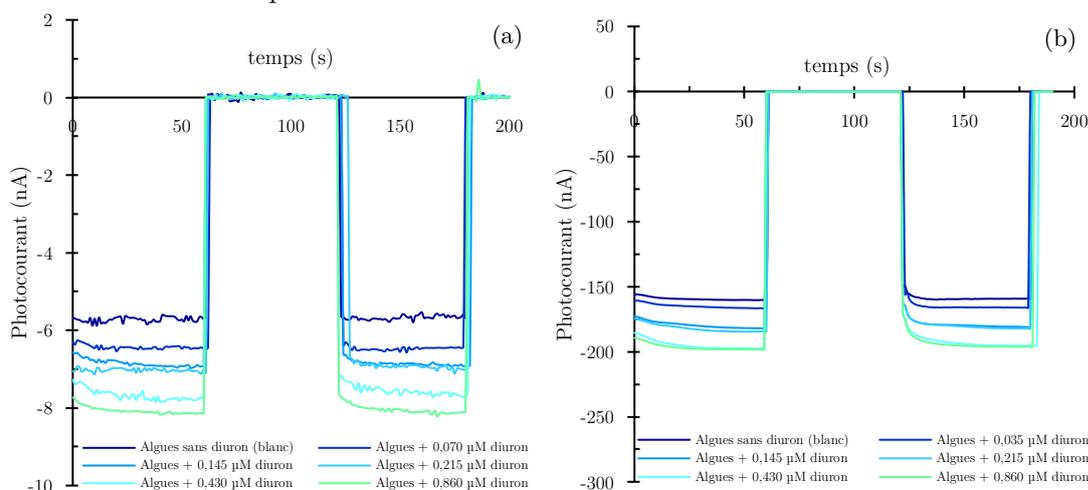


Figure 4.34 : Évolution du photocourant durant des cycles allumé/éteint pour des suspensions d'algues à différentes concentrations en Diuron pour (a) la PD Si avec filtre et (b) l'OPD sans filtre

Les variations de densités de photocourant (%) ont par la suite pu être calculées et les résultats (fig. 4.35) montrent que l'OPD sans filtre semble légèrement moins sensible. Ce résultat était attendu au vu des mesures précédentes (IV.2.1.i). Néanmoins, en plus de ne pas nécessiter obligatoirement un filtre, le rapport signal sur bruit est amélioré au vu des valeurs de courant mesurées plus importantes ce qui permet l'obtention de mesures plus précises.

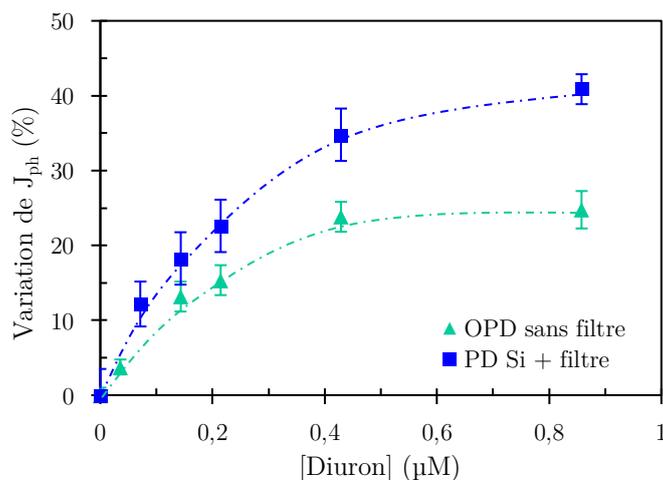


Figure 4.35 : Pourcentages de variation de la densité de photocourant en fonction de la concentration en Diuron pour la PD Si avec filtre et l'OPD sans filtre

Ces résultats ont permis de démontrer le bon fonctionnement de l'OPD réalisée dans le cadre du projet. Pour la suite des mesures sur différents polluants, seule l'OPD a donc été utilisée. Des retards dans la fabrication des MOLED pour ces tests ayant eu lieu, la suite des mesures n'a pu être effectuée qu'avec la LED commerciale. Néanmoins, les mesures finales avec le montage (3) pourront être effectuées prochainement pour la fin du projet.

IV.2.2. Étude des différents herbicides choisis

Pour chacun des polluants testés, le protocole mis en œuvre est le même que celui décrit précédemment. Ainsi, le Diuron, l'Atrazine, le Glyphosate ainsi que le S-métolachlore ont pu être testés à des concentrations comprises entre 0,05 et 1,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sorte à être comparables aux mesures effectuées en électrochimie. Les mesures ont été effectuées instantanément après l'ajout de polluant, donc avec un temps d'incubation estimé inférieur à 15 minutes. Les variations de densités de photocourant ont été calculées et leurs évolutions en fonction de la concentration en polluant ont pu être tracées (fig. 4.36).

Le Diuron et l'Atrazine sont deux polluants connus pour inhiber le transfert d'électrons au niveau du PSII des algues, cela résulte en une augmentation de la fluorescence algale et c'est ce qui a été observé lors de ces mesures.

Pour le Diuron, dès la plus faible concentration testée de 0,035 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, une augmentation du photocourant et donc de la fluorescence a pu être observée. Cette fluorescence augmente ensuite avec la concentration en Diuron jusqu'à atteindre une saturation autour de 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Il est intéressant de remarquer que, pour une même concentration d'algues, cette gamme de détection diffère de celle obtenue par électrochimie qui était plutôt comprise entre 0,2 et 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. La méthode de mesure optique par fluorescence semble donc plus sensible et permet ainsi de détecter des concentrations plus basses en Diuron. En revanche, celle-ci

présente une saturation bien plus tôt que la méthode de mesure électrochimique. Cela démontre l'intérêt de la double-mesure électrochimique/optique.

Pour l'Atrazine, il apparaît une augmentation linéaire du photocourant entre $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Au-delà, il apparaît également un phénomène de saturation. De même que pour le Diuron, la gamme de détection est différente de celle obtenue par la méthode électrochimique plutôt comprise entre $0,35$ et $1,75 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ainsi, la méthode optique permet de compléter la méthode électrochimique en détectant des concentrations en Atrazine plus faibles.

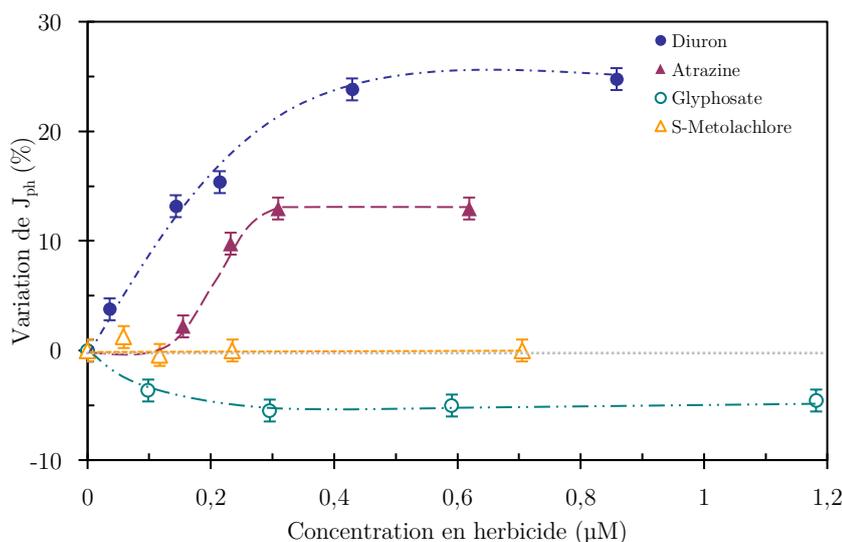


Figure 4.36 : Pourcentages de variation de la densité de photocourant mesuré pour les algues en fonction de la concentration en différents herbicides mesurés par l'OPD sans filtre

Le Glyphosate et le S-métolachlore, eux, ne sont pas connus pour bloquer le transfert d'électrons du PSII et ainsi induire de la fluorescence. Leurs effets peuvent être très variables. Néanmoins, il a été décidé de les tester afin de comparer les résultats à ceux obtenus par électrochimie.

L'ajout de Glyphosate a entraîné une diminution du photocourant, donc de la fluorescence, dès $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La bibliographie ne converge pas concernant les effets du glyphosate sur les algues néanmoins, ce type de résultat y a déjà été reporté [55,56]. Il se pourrait que le glyphosate entraîne la réduction de la teneur en chlorophylle des algues et réduise leur fluorescence de base. Cette diminution est relativement faible et atteint rapidement une saturation aux concentrations testées. L'effet de diminution de la fluorescence de base des algues pourrait être compensé par un effet inhibiteur sur les photosystèmes [57] qui entraînerait lui, en opposition, une augmentation de la fluorescence de la même manière que pour le Diuron et l'Atrazine. Les effets des polluants sur les métabolismes algaux étant très complexes et dépendant de nombreux facteurs, il est difficile de conclure pour le Glyphosate. Le résultat

reste intéressant car rien de tel n'avait pu être observé en électrochimie sans temps d'incubation à ces concentrations ce qui pourrait éventuellement impliquer l'influence du glyphosate sur différents processus du métabolisme algal. Encore une fois, cela donne de l'intérêt à la combinaison des mesures via les deux méthodes.

Enfin, pour le S-métolachlore, aucun effet concret sur la fluorescence n'a pu être observé. Ce polluant semble donc ne pas agir instantanément sur des fonctions liées de près ou de loin à la photosynthèse algale. Les résultats obtenus en électrochimie n'avaient pas non plus mis en évidence un effet particulier de ce polluant. Cela peut s'expliquer par le fait que le S-métolachlore provoque un déséquilibre dans la composition des membranes plasmiques cellulaires des plantes induisant une perte de rigidité et de perméabilité cellulaire. Il se pourrait que ce phénomène soit plus lent et qu'ainsi il n'ait pas pu être mesuré ni immédiatement, ni après 48 heures d'incubation.

V. Conclusion

En conclusion, un microbiocapteur basé sur le métabolisme algal a pu être réalisé grâce à la cellule électrochimique ElecCell développée et permettre, via la mesure électrochimique des taux de consommation et de production d'oxygène des algues *Chlamydomonas reinhardtii*, la détection de certains herbicides (Atrazine et Diuron) de manière instantanée. Des études à temps d'incubation plus importants ont été menées sur d'autres herbicides (Glyphosate et S-métolachlore) et des ETM (cuivre, cadmium et mercure) afin de repérer d'éventuels effets sur les algues aux concentrations d'intérêts comprises entre 0,1 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les résultats ont montré que le Glyphosate tout comme les trois ETM semblaient inhiber les mécanismes de respiration et de photosynthèse des algues à partir d'un jour. Ces polluants pouvant agir sur de nombreuses fonctions vitales des algues, il n'a pas été possible de conclure réellement quant à l'effet exact de chaque polluant sur leur métabolisme. Néanmoins, l'ensemble des résultats obtenus est encourageant pour l'application finale visée à savoir utiliser ce capteur comme moyen d'alerte de pollution précoce directement sur site. Des premiers tests en eau réelle ont d'ailleurs démontré la faisabilité d'utiliser ce type de capteur.

En parallèle, et dans le cadre du projet, les partenaires ont pu développer des composants adaptés à la mesure d'un second paramètre des algues, lui aussi influencé par la présence de polluants : la fluorescence chlorophyllienne. Grâce à la photodiode réalisée par le CINaM, il a été possible d'effectuer de premiers tests sur les herbicides cités précédemment. La complémentarité des résultats obtenue était très intéressante.

La méthode optique ici mise en œuvre s'est révélée légèrement plus sensible, en particulier pour les herbicides mais pour être réalisée en milieu réel, elle nécessite forcément une étape pré-traitement de l'échantillon (filtration) afin de s'affranchir de la présence d'autres

macropolluants pouvant entraîner une variabilité importante de la fluorescence mesurée. A l'inverse, l'électrochimie, un peu moins sensible, ne nécessite quant à elle aucun pré-traitement. Chacune des méthodes présente donc des avantages qui lui sont propres et l'intégration des deux au sein du dispositif final permettra l'obtention de mesures croisées plus précises.

Bibliographie

- [1] Simon, M. La photosynthèse <https://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/la-photosynthese.html> (accessed Apr 11, 2020).
- [2] Kless, H.; Oren-Shamir, M.; Malkin, S.; McIntosh, L.; Edelman, M. The D-E Region of the D1 Protein Is Involved in Multiple Quinone and Herbicide Interactions in Photosystem II. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 10501–10507.
- [3] Jansen, M.A.K.; Mattoo, A.K.; Malkin, S.; Edelman, M. Direct Demonstration of Binding-Site Competition between Photosystem II Inhibitors at the QB Niche of the D1 Protein. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **1993**, *46*, 78–83.
- [4] Umar, L.; Alexander, F.A.; Wiest, J. Application of Algae-Biosensor for Environmental Monitoring. In *2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*; **2015**; pp. 7099–7102.
- [5] McBrien, D.C.H.; Hassall, K.A. The Effect of Toxic Doses of Copper upon Respiration, Photosynthesis and Growth of *Chlorella Vulgaris*. *Physiol Plant*, **1967**, *20*, 113–117.
- [6] Rai, L.C.; Gaur, J.P.; Kumar, H.D. PHYCOLOGY AND HEAVY-METAL POLLUTION. *Biological Reviews*, **1981**, *56*, 99–151.
- [7] Pinto, E.; Sigaud-kutner, T.C.S.; Leitão, M.A.S.; Okamoto, O.K.; Morse, D.; Colepicolo, P. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae1. *Journal of Phycology*, **2003**, *39*, 1008–1018.
- [8] Li, H.; Yao, J.; Duran, R.; Liu, J.; Min, N.; Chen, Z.; Zhu, X.; Zhao, C.; Ma, B.; Pang, W.; Li, M.; Cao, Y.; Liu, B. Toxic Response of the Freshwater Green Algae *Chlorella Pyrenoidosa* to Combined Effect of Flotation Reagent Butyl Xanthate and Nickel. *Environmental Pollution*, **2021**, *286*, 117285.
- [9] Xu, D.; Li, C.; Chen, H.; Shao, B. Cellular Response of Freshwater Green Algae to Perfluorooctanoic Acid Toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2013**, *88*, 103–107.
- [10] Yi, X.; Chi, T.; Li, Z.; Wang, J.; Yu, M.; Wu, M.; Zhou, H. Combined Effect of Polystyrene Plastics and Triphenyltin Chloride on the Green Algae *Chlorella Pyrenoidosa*. *Environ Sci Pollut Res*, **2019**, *26*, 15011–15018.
- [11] Kühn, R.; Pattard, M. Results of the Harmful Effects of Water Pollutants to Green Algae (*Scenedesmus Subspicatus*) in the Cell Multiplication Inhibition Test. *Water Research*, **1990**, *24*, 31–38.
- [12] Piotrowska-Niczyporuk, A.; Bajguz, A.; Talarek, M.; Bralska, M.; Zambrzycka, E. The Effect of Lead on the Growth, Content of Primary Metabolites, and Antioxidant Response of Green Alga *Acutodesmus Obliquus* (Chlorophyceae). *Environ Sci Pollut Res*, **2015**, *22*, 19112–19123.
- [13] Belaidi, F.S.; Tsopela, A.; Salvagnac, L.; Ventalon, V.; Bedel-Pereira, E.; Bardinal, V.; Séguy, I.; Temple-Boyer, P.; Juneau, P.; Izquierdo, R. Lab-on-Chip with Microalgal Based Biosensor for Water Assessment. In *2016 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference (NMDC)*; IEEE, **2016**; pp. 1–2.
- [14] Campanella, L.; Cubadda, F.; Sammartino, M.P.; Saoncella, A. An Algal Biosensor for the Monitoring of Water Toxicity in Estuarine Environments. *Water Research*, **2001**, *35*, 69–76.
- [15] Wong, L.S.; Judge, S.K.; Voon, B.W.N.; Tee, L.J.; Tan, K.Y.; Murti, M.; Chai, M.K. Bioluminescent Microalgae-Based Biosensor for Metal Detection in Water. *IEEE Sensors Journal*, **2017**, *18*, 2091–2096.

-
- [16] Antonacci, A.; Lambreva, M.D.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Scognamiglio, V. A Whole Cell Optical Bioassay for the Detection of Chemical Warfare Mustard Agent Simulants. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, *257*, 658–665.
- [17] Altamirano, M.; García-Villada, L.; Agrelo, M.; Sánchez-Martín, L.; Martín-Otero, L.; Flores-Moya, A.; Rico, M.; López-Rodas, V.; Costas, E. A Novel Approach to Improve Specificity of Algal Biosensors Using Wild-Type and Resistant Mutants: An Application to Detect TNT. *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, *19*, 1319–1323.
- [18] Sanders, C.A.; Rodriguez, M.; Greenbaum, E. Stand-off Tissue-Based Biosensors for the Detection of Chemical Warfare Agents Using Photosynthetic Fluorescence Induction. *Biosensors and Bioelectronics*, **2001**, *16*, 439–446.
- [19] Pandard, P.; Rawson, D.M. An Amperometric Algal Biosensor for Herbicide Detection Employing a Carbon Cathode Oxygen Electrode. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **1993**, *8*, 323–333.
- [20] Zamaleeva, A.I.; Sharipova, I.R.; Shamagsumova, R.V.; Ivanov, A.N.; Evtugyn, G.A.; Ishmukhametova, D.G.; Fakhrullin, R.F. A Whole-Cell Amperometric Herbicide Biosensor Based on Magnetically Functionalised Microalgae and Screen-Printed Electrodes. *Anal. Methods*, **2011**, *3*, 509–513.
- [21] Tahirbegi, I.B.; Ehgartner, J.; Sulzer, P.; Zieger, S.; Kasjanow, A.; Paradiso, M.; Strobl, M.; Bouwes, D.; Mayr, T. Fast Pesticide Detection inside Microfluidic Device with Integrated Optical pH, Oxygen Sensors and Algal Fluorescence. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, *88*, 188–195.
- [22] Attaallah, R.; Antonacci, A.; Mazzaracchio, V.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Arduini, F.; Amine, A.; Scognamiglio, V. Carbon Black Nanoparticles to Sense Algae Oxygen Evolution for Herbicides Detection: Atrazine as a Case Study. *Biosensors and Bioelectronics*, **2020**, *159*, 112203.
- [23] Kashem, M.A.; Kimoto, K.; Iribe, Y.; Suzuki, M. Development of Microalgae Biosensor Chip by Incorporating Microarray Oxygen Sensor for Pesticides Sensing. *Biosensors*, **2019**, *9*, 133.
- [24] Frense, D.; Müller, A.; Beckmann, D. Detection of Environmental Pollutants Using Optical Biosensor with Immobilized Algae Cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1998**, *51*, 256–260.
- [25] Kornet, J.G.; Griffioen, H.; Schurer, K. An Improved Sensor for the Measurement of Chlorophyll Fluorescence. *Meas. Sci. Technol.*, **1992**, *3*, 196.
- [26] Merz, D.; Geyer, M.; Moss, D.A.; Ache, H.J. Chlorophyll Fluorescence Biosensor for the Detection of Herbicides. *Anal Bioanal Chem*, **1996**, *354*, 299–305.
- [27] Lefèvre, F.; Chalifour, A.; Yu, L.; Chodavarapu, V.; Juneau, P.; Izquierdo, R. Algal Fluorescence Sensor Integrated into a Microfluidic Chip for Water Pollutant Detection. *Lab Chip*, **2012**, *12*, 787–793.
- [28] Shin, Y.-H.; Barnett, J.Z.; Song, E.; Gutierrez-Wing, M.T.; Rusch, K.A.; Choi, J.-W. A Portable Fluorescent Sensor for On-Site Detection of Microalgae. *Microelectronic Engineering*, **2015**, *144*, 6–11.
- [29] El-Sheekh, M.M.; Kotkat, H.M.; Hammouda, O.H.E. Effect of Atrazine Herbicide on Growth, Photosynthesis, Protein Synthesis, and Fatty Acid Composition in the Unicellular Green Alga *Chlorella Kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **1994**, *29*, 349–358.
- [30] Kamrin, M.A. *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*; CRC Press: Boca Raton, **1997**.

- [31] Sergiev, I.G.; Alexieva, V.S.; Ivanov, S.V.; Moskova, I.I.; Karanov, E.N. The Phenylurea Cytokinin 4PU-30 Protects Maize Plants against Glyphosate Action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2006**, *85*, 139–146.
- [32] Christy, S.L.; Karlander, E.P.; Parochetti, J.V. Effects of Glyphosate on the Growth Rate of Chlorella. *Weed Science*, **1981**, *29*, 5–7.
- [33] Deal, L.M.; Hess, F.D. An Analysis of the Growth Inhibitory Characteristics of Alachlor and Metolachlor. *Weed Science*, **1980**, *28*, 168–175.
- [34] Götz, T.; Böger, P. The Very-Long-Chain Fatty Acid Synthase Is Inhibited by Chloroacetamides. *Z Naturforsch C J Biosci*, **2004**, *59*, 549–553.
- [35] Schmalfuß, J.; Matthes, B.; Mayer, P.; Böger, P. Chloroacetamide Mode of Action, I: Inhibition of Very Long Chain Fatty Acid Synthesis in Scenedesmus Acutus. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, **1998**, *53*, 995–1003.
- [36] Böger, P. Mode of Action for Chloroacetamides and Functionally Related Compounds. *Journal of Pesticide Science*, **2003**, *28*, 324–329.
- [37] H, A.; Afkar, E.; Fathi, A. Toxicological Response of the Green Alga Chlorella Vulgaris , to Some Heavy Metals. *American Journal of Environmental Sciences*, **2010**, *6*.
- [38] Petsas, A.S.; Vagi, M.C. Effects on the Photosynthetic Activity of Algae after Exposure to Various Organic and Inorganic Pollutants. *Chlorophyll*, **2017**, *37*.
- [39] Vega, J.M.; Garbayo, I.; Domínguez, M.J.; Vígara, J. Effect of Abiotic Stress on Photosynthesis and Respiration in Chlamydomonas Reinhardtii: Induction of Oxidative Stress. *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, *40*, 163–167.
- [40] Guanzon, N.G.; Nakahara, H.; Yoshida, Y. Inhibitory Effects of Heavy Metals on Growth and Photosynthesis of Three Freshwater Microalgae. *Fisheries science*, **1994**, *60*, 379–384.
- [41] Cid, A.; Herrero, C.; Torres, E.; Abalde, J. Copper Toxicity on the Marine Microalga Phaeodactylum Tricornutum: Effects on Photosynthesis and Related Parameters. *Aquatic toxicology*, **1995**, *31*, 165–174.
- [42] Tukaj, Z.; Baścik-Remisiewicz, A.; Skowroński, T.; Tukaj, C. Cadmium Effect on the Growth, Photosynthesis, Ultrastructure and Phytochelatin Content of Green Microalga Scenedesmus Armatus: A Study at Low and Elevated CO₂ Concentration. *Environmental and experimental botany*, **2007**, *60*, 291–299.
- [43] Trevors, J.T.; Stratton, G.W.; Gadd, G.M. Cadmium Transport, Resistance, and Toxicity in Bacteria, Algae, and Fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, **1986**, *32*, 447–464.
- [44] Singh, R.; Dubey, G.; Singh, V.P.; Srivastava, P.K.; Kumar, S.; Prasad, S.M. High Light Intensity Augments Mercury Toxicity in Cyanobacterium Nostoc Muscorum. *Biological trace element research*, **2012**, *149*, 262–272.
- [45] Lu, C.M.; Chau, C.W.; Zhang, J.H. Acute Toxicity of Excess Mercury on the Photosynthetic Performance of Cyanobacterium, S. Platensis–Assessment by Chlorophyll Fluorescence Analysis. *Chemosphere*, **2000**, *41*, 191–196.
- [46] Deng, C.; Zhang, D.; Pan, X.; Chang, F.; Wang, S. Toxic Effects of Mercury on PSI and PSII Activities, Membrane Potential and Transthylakoid Proton Gradient in Microsorium Pteropus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2013**, *127*, 1–7.
- [47] Hussain, F.; Eom, H.; Ali Toor, U.; Lee, C.S.; Oh, S.-E. Rapid Assessment of Heavy Metal-Induced Toxicity in Water Using Micro-Algal Bioassay Based on Photosynthetic Oxygen Evolution. *Environmental Engineering Research*, **2020**, *26*, 200391–0.

- [48] Gibson, C.E. The Algicidal Effect of Copper on a Green and a Blue-Green Alga and Some Ecological Implications. *Journal of applied ecology*, **1972**, 513–518.
- [49] Gorman, D.S.; Levine, R.P. Cytochrome f and Plastocyanin: Their Sequence in the Photosynthetic Electron Transport Chain of Chlamydomonas Reinhardi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1965**, *54*, 1665–1669.
- [50] Lee, Y.J.; Park, J.Y. A Highly Miniaturized Dissolved Oxygen Sensor Using a Nanoporous Platinum Electrode Electroplated on Silicon. *Journal of the Korean Physical Society*, **2011**, *58*, 1505–1510.
- [51] Agathokleous, E.; Peñuelas, J.; Azevedo, R.A.; Rillig, M.C.; Sun, H.; Calabrese, E.J. Low Levels of Contaminants Stimulate Harmful Algal Organisms and Enrich Their Toxins. *Environmental Science & Technology*, **2022**, *56*, 11991–12002.
- [52] Physiologie des algues <http://algae-consulting.e-monsite.com/pages/physiologie-des-algues.html> (accessed Sep 18, 2023).
- [53] Eynaoud, Q. Vers Des Photo-Détecteurs Organiques Ultra-Sélectifs et Performants. These en préparation, Aix-Marseille, **2019**.
- [54] Gosset, A.; Durrieu, C.; Renaud, L.; Deman, A.; Barbe, P.; Bayard, R.; Chateaux, J.-F. Xurography-Based Microfluidic Algal Biosensor and Dedicated Portable Measurement Station for Online Monitoring of Urban Polluted Sample. *Biosensors & Bioelectronics*, **2018**, *117*, 669–677.
- [55] Zhang, Y.; Chen, Z.; Li, X.; Wu, X.; Chen, L.; Wang, G. Photosynthesis Responses of Tibetan Freshwater Algae Chlorella Vulgaris to Herbicide Glyphosate. *International journal of environmental research and public health*, **2022**, *20*, 386.
- [56] Choi, C.J.; Berges, J.A.; Young, E.B. Rapid Effects of Diverse Toxic Water Pollutants on Chlorophyll a Fluorescence: Variable Responses among Freshwater Microalgae. *water research*, **2012**, *46*, 2615–2626.
- [57] Wong, P.K. Effects of 2, 4-D, Glyphosate and Paraquat on Growth, Photosynthesis and Chlorophyll-a Synthesis of Scenedesmus Quadricauda Berb 614. *Chemosphere*, **2000**, *41*, 177–182.

Conclusion générale

Au terme de cette thèse, laquelle a été consacrée au développement de micro(bio)capteurs électrochimiques pour le suivi de la qualité des eaux douces de surface, des études ont été menées pour appréhender les défis inhérents à la surveillance environnementale. L'objectif principal de ces travaux de recherche consistait en la conception d'un outil de surveillance portable ayant comme avantage important la possible réalisation de mesures directement sur site.

Ainsi une microcellule électrochimique a été réalisée sur silicium via un procédé microtechnologique. Elle se compose d'une électrode de travail en platine (Pt) sous forme de réseau de 25 ultramicroélectrodes interconnectées ($d_{UME} = 10 \mu\text{m}$), d'une électrode de quasi-référence en argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) et d'une contre-électrode en platine (Pt). L'électrode de travail est prévue pour être fonctionnalisée suivant le type de détection souhaitée. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, trois types de capteurs ont pu être développés qui sont :

- un capteur de pH
- un capteur d'ions nitrates
- un biocapteur d'herbicides et de métaux lourds (ETM)

Pour la mesure du pH, l'électrode de travail a été fonctionnalisée par un oxyde métallique : l'oxyde d'iridium. Cette couche sensible est électrodéposée par chronoampérométrie et les paramètres définis ont permis l'obtention de manière répétable d'un film mince de dépôt de quelques nanomètres le rendant plus stable et robuste. La mesure du pH s'effectue de manière simple par potentiométrie à courant nul. La sensibilité de ce capteur de 62 mV/pH s'approche d'une réponse nernstienne, et la stabilité obtenue (dérive de 3 mV/jour) reste largement acceptable pour l'application prévue à savoir des mesures rapides instantanées.

Pour la mesure des ions nitrates NO_3^- , l'électrode de travail a cette fois-ci été fonctionnalisée par une membrane polymérique dans laquelle ont été incorporés des ionophores. Le fluoropolysiloxane a été choisi comme matrice polymère pour sa bonne tenue sur le nitrure de silicium et le tridodécylammonium nitrate a été choisi comme ionophore. A partir de ces composés et d'un solvant, le tétrahydrofurane, la solution de membrane formée est déposée par dépôt de goutte sur le réseau d'électrodes de sorte à recouvrir l'ensemble de ses ultramicroélectrodes métalliques. Afin d'améliorer les propriétés du capteur en termes de sensibilité, stabilité et temps de réponse, une étude a été menée sur l'ajout d'un transducteur ion-électron entre le métal et la membrane. Ainsi, l'ajout d'une couche formée d'un composite polymère conducteur (PEDOT ou PPy)/nanotubes de carbone (DWCNT) électrodéposé à la surface des électrodes avant le dépôt de la membrane ionosensible a démontré une réelle amélioration des performances sur tous les points métrologiques, cela permettant d'atteindre une réponse

en sensibilité quasi-nernstienne de 50 mV/pNO₃ sur plusieurs semaines. Ce capteur a ainsi démontré une stabilité à moyen terme suffisante pour l'application visée.

Enfin, pour la détection des herbicides et des ETM, le principe de détection repose sur l'utilisation de microalgues (*Chlamydomonas Reinhardtii*) comme sonde. Les microalgues sont des êtres vivants dont le métabolisme peut être affecté par la présence de polluants, en particulier les herbicides. Ce métabolisme peut être suivi, entre autres, par électrochimie via le suivi de leur taux de consommation et/ou de production d'oxygène au cours des phases de respiration et/ou de photosynthèse. L'oxygène dissous est détectable facilement par ampérométrie sur électrode de platine, néanmoins, étant donné les faibles tailles d'électrodes et donc les faibles courants mesurés, l'électrode de travail a tout de même été fonctionnalisée par un électrodépôt en trois dimensions réalisé par chronoampérométrie de noir de platine (Pt-BI) électrocatalytique et hautement poreux. Cela a permis d'augmenter les courants mesurés et donc d'améliorer le rapport signal sur bruit. Quatre herbicides (Diuron, Atrazine, Glyphosate et S-métolachlore) et trois ETM (cuivre, cadmium et mercure) ont été testés à des concentrations comprises entre 0,03 et 2 µmol.L⁻¹, tous ayant des modes d'action différents sur les algues. Les résultats ont montré une inhibition claire et immédiate de la phase de photosynthèse pour le Diuron et l'Atrazine tandis que le Glyphosate et les trois ETM nécessitaient un temps d'incubation plus important (24 à 48h) avant que leurs effets puissent être mesurables. Le S-métolachlore n'a pas donné de tendance concrète. Enfin, de premiers tests ont été réalisés en eau réelle à l'aide d'un échantillon issu du Canal du Midi (Toulouse, France) et ont montré une inhibition immédiate de la photosynthèse, traduisant une très probable pollution du milieu.

En parallèle, un biocapteur optique a été réalisé par les partenaires dans le cadre du projet via le développement d'un photodétecteur organique et d'une OLED comme source excitatrice. L'objectif étant de mesurer ici un second paramètre du métabolisme algal influencé par la présence de polluants : la fluorescence chlorophyllienne. Le photodétecteur organique du projet a pu ici être comparé à des composants commerciaux et les quatre herbicides précédemment cités ont à nouveau été testés par cette méthode. Le Diuron et l'Atrazine ont montré une augmentation de la fluorescence tandis que le Glyphosate a montré une diminution de celle-ci. À nouveau, le S-métolachlore n'a pas montré d'effet. Ces résultats permettent de confirmer la mise en œuvre de ce biocapteur optique pour l'application. De plus, l'obtention de gammes de détections différentes par voie optique et par voie électrochimique a permis de conclure sur l'intérêt de la double-détection. L'optique se révèle légèrement plus sensible mais l'électrochimie ne nécessite, elle, aucun pré-traitement préalable aux mesures.

Dans les deux cas, les limites de détections déterminées pour chacun des polluants restent relativement supérieures aux normes gouvernementales définies. Néanmoins, les algues pouvant être sensibles à plusieurs polluants en même temps et étant donné le possible effet-cocktail de matrices de polluants dans les eaux douces, il est tout à fait envisageable d'utiliser

ces capteurs en milieu réel en tant que système d'alerte précoce afin de déterminer l'éventuelle pollution d'un échantillon.

L'objectif final de la thèse était l'intégration de ces capteurs au sein de disques en copolymère d'oléfine cycliques micro-usinés contenant des cuves et des canaux microfluidiques permettant l'amenée des fluides et leur mélange via une simple mise en rotation. Des retards pris par les partenaires du projet dans la réalisation de ces disques n'ont pas permis d'aboutir au prototype final. Néanmoins, des disques ont pu être réalisés au LAAS en PMMA usinés par gravure laser afin de réaliser de premiers tests dans des structures se rapprochant de celles prévues pour l'application finale. Enfin, l'entreprise partenaire du projet Origalys Electrochem SAS a pu avancer quant à la mise en œuvre de ce type de disques, leur mise en rotation et la reprise de contact grâce à des moteurs directement intégrés à leur potentiostat portable ainsi que l'interface homme/machine de commande et de récupération des données (fig. C.1). Le prototype final fonctionnel devrait donc être obtenu d'ici la fin du projet ANR, soit en juin 2024.

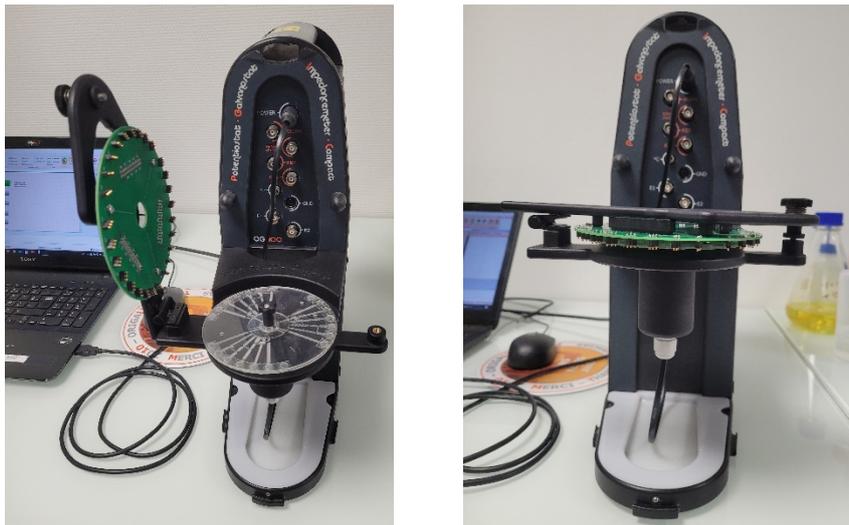


Figure C.1 : Intégration du disque microfluidique sur le potentiostat portable Origalys

Finalement, cette thèse a pu illustrer l'importance croissante de la technologie des capteurs électrochimiques dans la surveillance et la préservation des ressources en eau douce. Elle ouvre la voie à des opportunités intéressantes pour une gestion plus proactive et éclairée des écosystèmes aquatiques et l'espoir réside dans le fait que les résultats de cette recherche contribueront à la protection durable de ces précieuses ressources pour les générations futures.

Perspectives

Nonobstant les avancées enregistrées au cours de ces travaux de thèse, des défis subsistent. L'optimisation continue de la sensibilité, de la sélectivité, ainsi que de la stabilité de ces capteurs se révèle toujours nécessaire afin de rendre possible leur utilisation à grande échelle.

L'avantage de la réalisation d'une microcellule électrochimique à trois électrodes totalement intégrées sur puce est la possibilité d'effectuer des mesures via de nombreuses techniques électrochimiques. Pour ces travaux, les détections ont été réalisées principalement par potentiométrie à courant nul et par chronoampérométrie. Néanmoins, il existe d'autres techniques électrochimiques telles que la voltammétrie à impulsions différentielles ou encore la voltammétrie à vagues carrées qui sont des méthodes permettant dans la plupart des cas d'atteindre des limites de détections bien plus basses.

L'intégration d'une véritable microélectrode de référence reste un verrou majeur pour l'analyse électrochimique en phase liquide. L'électrode de quasi-référence Ag/AgCl pourrait être améliorée par l'utilisation d'un gel de KCl à sa surface afin d'éviter sa sensibilité aux ions chlorure dont la concentration pourrait varier dans les échantillons. Cela permettrait l'obtention de mesures d'autant plus précises et stables.

Concernant la détection du pH, des études sont en cours afin de mieux comprendre le comportement de l'oxyde d'iridium et de définir la meilleure utilisation de ce matériau. Une étude plus poussée sur l'épaisseur de couche et sur la variation de sensibilité dans le temps est actuellement en cours afin d'en améliorer sa stabilité et sa durabilité pour l'application prévue.

Concernant la détection des nitrates, l'utilisation de couche de transduction à base de nanotubes de carbone s'est révélée simple et efficace. Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre les études en ce qui concerne les paramètres de dépôts et de constitution de ces couches qui pourraient alors modifier les propriétés de détection. Cette optimisation associée à l'amélioration de la membrane ionosensible pourrait aboutir à des capteurs très performants en eau douce du fait de leur bonne sélectivité.

Enfin, concernant la détection des herbicides et des ETM, les études peuvent se poursuivre sur d'autres polluants (médicaments, hydrocarbures...) mais également sur d'autres souches algales. En effet, chaque algue est plus ou moins sensible à chaque type de polluant. Ce biocapteur ne présente pas de réelle sélectivité et est initialement envisagé pour la détection d'une pollution dite globale. Ainsi, une seconde étape de discrimination des polluants devra être réalisée dans le cas où une pollution est avérée. Il pourrait tout de même être envisagé dans le futur que l'étude combinée de plusieurs algues associées à plusieurs types de

polluants puissent être combinées pour ainsi déceler le ou les polluants en présence notamment en exploitant l'intégration de l'intelligence artificielle (IA). Cette approche permettrait finalement de traiter les problématiques d'analyse de type « effets-cocktails », qui ne manqueront pas de se présenter dans le cas d'échantillons réels.

Dans le cadre de la détection optique, il est prévu d'effectuer à court terme des mesures à l'aide des OLED et MOLED développées pour le projet mais qui n'ont pas encore pu être utilisées à ces fins ; ces dernières nécessitant la définition d'un protocole d'utilisation plus précis. Par ailleurs, il est également envisagé de mesurer plus tard, en plus de la fluorescence chlorophyllienne, les activités enzymatiques (estérase et phosphatase) des algues qui peuvent, elles aussi, être modifiées par la présence de certains polluants (en particulier les ETM) et qui sont mesurables par méthodes optiques. Cela permettra l'obtention finale d'un capteur robuste pour la mesure précoce de pollution et la détermination des polluants par combinaison des méthodes électrochimiques et optiques. Il est également envisagé par ailleurs d'utiliser ces capteurs dans le cadre de mesures de conductivité et de turbidité.

Finalement, l'intégration des capteurs dans le prototype officiel final se poursuit actuellement dans le cadre de la fin du projet. Ainsi, en continuant à explorer ces perspectives, les microcapteurs électrochimiques pourraient jouer un jour un rôle de premier plan dans la préservation et la gestion durable des ressources en eau.

ANNEXES

- I. Table des figures**
- II. Table des tableaux**
- III. Résumé**
- IV. Abstract**

Table des figures

Figure 1.1 : Le cycle naturel de l'eau et ses usages [1].....	25
Figure 1.2 : Chronologie des réglementations européennes et françaises autour de l'eau, de ses usages et des milieux aquatiques [4].....	27
Figure 1.3 : Schéma représentatif des cycles pour la mise en place de la DCE (adapté de [4])	29
Figure 1.4 : Etat chimique et écologique des cours d'eau en France en 2015 [10].....	30
Figure 1.5 : Evolution de la concentration en polluant par différents types d'échantillonnage	32
Figure 1.6 : Différents types d'analyseurs in situ [21].....	37
Figure 1.7 : (a) Schéma de l'architecture du Lab-On-Disc du projet BELUGA et (b) photographie du potentiostat portable Origastat	39
Figure 1.8 : Echelle de pH [33].....	40
Figure 1.9 : Photographie par Nick Brandt d'un corps d'oiseau calcifié par l'eau alcaline du lac Natron [34] et (b) Photographie du lac d'acide sulfurique de Dallol [35]	41
Figure 1.10 : (a) phénomène d'eutrophisation provoqué par une surconcentration en nitrates [36] et (b) Concentration moyenne en nitrates en France en 2018-2019 [37].....	42
Figure 1.11 : Illustrations en chiffres de (a) l'utilisation de pesticides dans le monde et de (b) la contamination humaine aux pesticides mondiale [39].....	43
Figure 2.1 : (a) Schéma de la première pile électrique [2] et (b) réplique du premier transistor [3]	55
Figure 2.2 : Voltammétrie cyclique avec (a) la variation du potentiel en fonction du temps et (b) la variation du courant en fonction du potentiel [6].....	58
Figure 2.3 : Courbe caractéristique de chronoampérométrie [6].....	59
Figure 2.4 : Schéma de la diffusion (a) planaire sur une électrode disque macroscopique et (b) hémisphérique sur une UME disque [10]	61
Figure 2.5 : Voltammogrammes schématisés pour (a) une électrode macroscopique immobile sans agitation et (b) une UME [13].....	61
Figure 2.6 : Schémas des types de profil de diffusion pour un réseau de microélectrodes [17].....	62
Figure 2.7 : Représentation schématisée des diagrammes de (a) Nyquist et (b) Bode en SIE [18].....	66
Figure 2.8 : Schéma de la géométrie du microcapteur "ElecCell"	67
Figure 2.9 : Schéma des étapes du procédé photolithographique de la microfabrication "ElecCell"	70
Figure 2.10 : Photographie des capteurs ElecCell réalisés en deux tailles différentes pour (a) le packaging bâtonnets des pré-tests et (b) le packaging disque de l'application finale.....	71
Figure 2.11 : Schéma des deux tailles de capteurs sur un substrat de silicium.....	71
Figure 2.12 : Photographies des capteurs montés sur PCB bâtonnets en vue des pré-tests.....	72
Figure 2.13 : Photographie des capteurs montés sur disque en vue de l'application finale.....	73
Figure 2.14 : Schéma 3D des disques réalisés au LAAS en vue de s'approcher de l'application finale	73
Figure 2.15 : Voltammétries cycliques réalisées sur UMEA en platine dans une solution d' H_2SO_4 à 0,5 mol.L ⁻¹ à une vitesse de balayage de 200 mV/s avec et sans désaération.....	74
Figure 2.16 : Image (a) au microscope optique et (b) au microscope électronique à balayage d'une électrode de l'UMEA	75
Figure 2.17 : Voltammétrie linéaire sur l'UMEA en platine dans FcMeOH à 1.10 ⁻³ mol.L ⁻¹ à une vitesse de balayage de 10 mV.s ⁻¹ pour différents capteurs	76
Figure 2.18 : Voltammétries cycliques sur (a) la contre-électrode en Pt et (b) l'UMEA de travail en platine dans H_2SO_4 0,5 M à une vitesse de balayage de 200 mV.s ⁻¹	77
Figure 2.19 : Voltammétrie cyclique sur l'électrode d'argent du capteur dans une solution de KNO_3 à 0,1 mol.L ⁻¹ à une vitesse de balayage de 50 mV.s ⁻¹	78

Figure 2.20 : Images MEB de l'électrode d'argent du capteur ElecCell (a) avant nettoyage électrochimique et (b) après.....	79
Figure 2.21 : Images MEB de l'électrode d'argent après oxydation en chlorure d'argent.....	79
Figure 2.22 : Evolution du potentiel en circuit ouvert en fonction du temps dans une solution de tampon phosphate (pH = 7) pour une électrode de quasi-référence Ag/AgCl du capteur ElecCell.....	80
Figure 3.1 : Exemples d'ionophores neutres macrocycliques (a) valinomycine et (b) nonactine.....	89
Figure 3.2 : Chaîne électrochimique dans le cadre d'une ISE conventionnelle.....	90
Figure 3.3 : Chaîne électrochimique d'une ISE à contact solide.....	91
Figure 3.4 : Structures chimiques des principaux polymères conducteurs utilisés pour les ISEs à contact solide [19].....	92
Figure 3.5 : Valeurs de sensibilité des capteurs pH pour différents oxydes métalliques (a) et pour différentes méthodes de fabrication (b) dans différents échantillons S1 à S5 avec A la valeur moyenne [34].....	95
Figure 3.6 : Images au microscope optique d'une microélectrode de l'UMEA (a) avant et (b) après dépôt d'IrO ₂	97
Figure 3.7 : Images MEB d'une microélectrode de l'UMEA fonctionnalisée par de l'IrO ₂	97
Figure 3.8 : Images MEB d'une électrode de l'UMEA fonctionnalisée par un dépôt d'IrO ₂ après découpe verticale (FIB).....	98
Figure 3.9 : Voltammétrie cyclique réalisée dans un tampon phosphate (pH = 7) à 50 mV/s sur l'UMEA avec et sans dépôt d'IrO ₂	98
Figure 3.10 : Potentiel en circuit ouvert mesuré sur UMEA fonctionnalisé par IrO ₂ à différents pH en fonction du temps.....	99
Figure 3.11 : Valeurs moyennes du potentiel en circuit ouvert en fonction du pH sur UMEA fonctionnalisé par IrO ₂	99
Figure 3.12 : Évolution du potentiel en circuit ouvert pour un capteur fonctionnalisé par IrO ₂ dans des solutions de différents pH.....	101
Figure 3.13 : Évolution du potentiel en circuit ouvert en fonction du pH pour plusieurs augmentations et diminutions de pH successives.....	101
Figure 3.14 : Évolution du potentiel en circuit ouvert dans une solution de tampon phosphate à pH = 6 pendant 6 jours.....	102
Figure 3.15 : Images du dépôt d'une goutte de membrane sensible (a) en vue de haut au microscope optique et (b) en découpe verticale au MEB.....	107
Figure 3.16 : Images en microscopie optique des dépôts de (a) PEDOT:PSS, (b) PEDOT:DWCNT et (c) PPy:DWCNT.....	109
Figure 3.17 : Images en microscopie électronique à balayage des dépôts de PEDOT:PSS, (b) PEDOT:DWCNTs et (c) PPy:DWCNTs.....	109
Figure 3.18 : Diagrammes de Bode réalisés par EIS sur les différentes électrodes modifiées.....	110
Figure 3.19 : Evolution du potentiel en circuit ouvert pour des ISE à différentes couches de transduction (avec (a) sans, (b) PEDOT:PSS, (c) PEDOT:DWCNT et (d) PPy:DWCNT) en fonction du temps dans des solutions de KNO ₃ de concentrations comprises entre 10 ⁻⁵ et 10 ⁻¹ mol.L ⁻¹	112
Figure 3.20 : Évolution du potentiel en circuit ouvert en fonction du pNO ₃ pour des ISE à différentes couches de transduction (avec (a) sans, (b) PEDOT:PSS, (c) PEDOT:DWCNT et (d) PPy:DWCNT).....	112
Figure 3.21 : Réponse d'une ISE en présence d'un ion interférent dans le cas de la détection d'anions ou de cations [70].....	114
Figure 3.22 : Évolution du potentiel en circuit ouvert à différents pNO ₃ avec une concentration en ion interférent constante (méthode FIM) pour un capteurs (a) Pt/PEDOT:DWCNTs/FPSX-TDDAN-KFTPb et (b) Pt/PPy:DWCNTs/FPSX-TDDAN-KFTPb.....	115
Figure 3.23 : Évolution du potentiel en circuit ouvert dans une solution de KNO ₃ à 1.10 ⁻² mol.L ⁻¹ pour les ISE modifiées.....	116

Figure 3.24 : Potentiel en circuit ouvert en fonction du temps dans différentes solutions de KNO ₃ sur des capteurs Pt/PEDOT:DWCNT/FPSX-KF ₂ TPB-TDDAN présentant (a) ou non (b) une hystérésis	117
Figure 4.1 : Schéma de la composition d'un chloroplaste (réalisé avec BioRender)	128
Figure 4.2 : Schéma simplifié des mécanismes de la phase claire de la photosynthèse [1]	130
Figure 4.3 : Schéma du cycle de Calvin de la photosynthèse [1]	131
Figure 4.4 : Exemple de capteur ampérométrique à algues développé pour la détection de pesticides [22]	134
Figure 4.5 : Exemple de capteur de fluorescence algale [27]	135
Figure 4.6 : Formule chimique des herbicides choisis dans le cadre du projet	138
Figure 4.7 : Schéma de Chlamydomonas reinhardtii (réalisé avec Biorender)	140
Figure 4.8 : Photographies de (a) l'incubateur utilisé et (b) des cultures d'algues CR	142
Figure 4.9 : Voltammétrie cyclique sur l'UMEA en Pt avec et sans (inset) dépôt de noir de platine dans H ₂ SO ₄ 0,5 mol.L ⁻¹ sans désaération (vitesse de balayage : 200 mV/s)	143
Figure 4.10 : Evolution de la voltammétrie cyclique dans H ₂ SO ₄ 0,5 mol.L ⁻¹ de l'UMEA fonctionnalisé par Pt-BI en fonction du temps (vitesse de balayage : 200 mV/s)	144
Figure 4.11 : Images MEB du dépôt de noir de platine sur une microélectrode de l'UMEA	144
Figure 4.12 : Voltammétries cycliques réalisées sur l'UMEA (Pt-BI) dans le milieu TAP aéré et désaéré	145
Figure 4.13 : Chronoampérométrie à -0,6 V vs. Ag/AgCl/KCl _{sat} dans une solution d'algues CR pendant trois cycles jour/nuit	146
Figure 4.14 : Évolution du courant pendant un cycle jour/nuit (a) avant traitement et (b) après traitement des données complet	147
Figure 4.15 : Pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en herbicide pour (a) l'Atrazine et (b) le Diuron	149
Figure 4.16 : Dispositif issu de travaux antérieurs utilisé pour les mesures en microvolume	149
Figure 4.17 : Inhibition de la photosynthèse en fonction de la concentration en Diuron en microvolume	150
Figure 4.18 : Pourcentages d'inhibition de la respiration et de la photosynthèse à différents temps d'incubation pour le glyphosate ((a) 0,1 µmol.L ⁻¹ et (b) 1 µmol.L ⁻¹) et le S-métolachlore ((c) 0,1 µmol.L ⁻¹ et (d) 1 µmol.L ⁻¹)	152
Figure 4.19 : Pourcentages d'inhibition de la respiration et de la photosynthèse à différents temps d'incubation pour le cuivre ((a) 0,1 µmol.L ⁻¹ et (b) 1 µmol.L ⁻¹), le cadmium ((c) 0,1 µmol.L ⁻¹ et (d) 1 µmol.L ⁻¹) et le mercure ((e) 0,1 µmol.L ⁻¹ et (f) 1 µmol.L ⁻¹)	153
Figure 4.20 : Pourcentages d'inhibition de la respiration et de la photosynthèse pour des échantillons d'eau minérale et issue du Canal du Midi	155
Figure 4.21 : Spectre d'absorption de la lumière par les différents pigments photosynthétiques des algues [52]	156
Figure 4.22 : (a) Photographie de la LED commerciale et (b) spectres d'électroluminescence de la LED commerciale avec et sans filtre comparé à celui des algues CR	157
Figure 4.23 : (a) Photographies de la MOLED standard et de la MOLED filtrée et (b) spectres d'électroluminescence des MOLED du projet BELUGA	158
Figure 4.24 : (a) Schéma et (b) photographie du disque réalisé au LAAS utilisé pour les mesures optiques	159
Figure 4.25 : Photoluminescence du PMMA comparé à la photoluminescence des algues	159
Figure 4.26 : (a) Photographie de la photodiode commerciale et (b) spectre de sa sensibilité relative	160
Figure 4.27 : (a) Photographie de l'OPD et (b) schéma de l'empilement sur lequel il est basé	161
Figure 4.28 : Graphiques représentant l'EQE en fonction de la longueur d'onde pour l'OPD et les algues CR [53]	161
Figure 4.29 : (a) Photographie du filtre d'excitation utilisé et (b) son spectre en transmission	162
Figure 4.30 : (a) Photographie du filtre d'émission utilisé et (b) son spectre en transmission	162
Figure 4.31 : Schéma des principaux montages utilisés pour les mesures optiques en fonction des composants utilisés	163
Figure 4.32 : Photographie du banc de mesure optique réalisé au LAAS	163

Figure 4.33 : Exemple de courbe obtenue durant une mesure de photocourant pendant deux cycles allumé/éteint	164
Figure 4.34 : Evolution du photocourant durant des cycles allumé/éteint pour des solutions d'algues à différentes concentrations en Diuron	166
Figure 4.35 : Pourcentages de variation de la densité de photocourant en fonction de la concentration en Diuron pour la PD Si avec filtre et l'OPD sans filtre	167
Figure 4.36 : Pourcentages de variation de la densité de photocourant mesuré pour les algues en fonction de la concentration en différents herbicides mesurés par l'OPD sans filtre.....	168
Figure C.1 : Intégration du disque microfluidique sur le potentiostat portable Orignalys.....	177

Table des tableaux

Tableau 1.1 : Substances prioritaires définies par la DCE (2013/39/UE)	29
Tableau 1.2 : Récapitulatif des caractéristiques des principales méthodes d'analyses de l'eau en laboratoire (informations issues de [20])	36
Tableau 1.3 : Réglementations nationales et internationales pour quelques pesticides	44
Tableau 1.4 : Réglementations nationales et internationales pour quelques métaux lourds	45
Tableau 2.1 : Valeurs de courant mesurés en voltammétrie linéaire dans FcMeOH et rayon d'UME correspondant pour différents capteurs	76
Tableau 3.1 : Travaux de recherche récents sur l'élaboration d'ISE à contact solide pour la détection des ions nitrates.....	105
Tableau 3.2 : Pourcentages massiques des constituants de la membrane sensible aux ions nitrates	106
Tableau 3.3 : Résultats obtenus pour les quatre types d'ISE	113
Tableau 3.4 : Coefficients de sélectivités obtenus par la méthode FIM pour les capteurs à ISEs modifiées avec couche de transduction.....	115
Tableau 3.5 : Évolution des propriétés des capteurs avec ISE (a) Pt/PEDOT:DWCNT/FPSX-TDDAN-KFTPb et (b) Pt/PPy:DWCNT/FPSX-TDDAN-KFTPb	116
Tableau 4.1 : Décompte des cellules algales dans différents échantillons après homogénéisation et prélèvement	151
Tableau 4.2 : Inhibition de la respiration et de la photosynthèse par le glyphosate et le S-métolachlore à différentes concentrations.....	151
Tableau 4.3 : Densités de photocourant obtenues pour différentes configurations des photodiodes	165

Résumé

L'eau douce de surface est l'unique ressource d'eau exploitable facilement que cela soit pour l'agriculture, l'industrie ou l'eau potable. Pourtant elle représente seulement 0,03% de l'hydrosphère terrestre totale, ce qui fait d'elle une ressource précieuse. Malheureusement, elle est souvent victime de pollutions principalement issues de l'activité humaine et il est alors nécessaire d'assurer le suivi de sa qualité afin de la protéger.

Les méthodes conventionnelles de laboratoire ont fait leurs preuves en termes de robustesse, de sensibilité et de fiabilité. Cependant, ces méthodes nécessitent en plus de matériel coûteux et de personnel qualifié, un transport de l'échantillon du site au laboratoire pouvant l'altérer ou le modifier. Cela impose le respect de règles strictes de conditionnement, conservation, stockage et transport rendant le processus de surveillance encore plus complexe et conduisant toujours à un manque de résultats en temps réel. Ainsi se développent ces dernières décennies de nouvelles technologies prometteuses pour assurer ce suivi directement sur site de manière rapide et fiable.

Ces travaux de thèses se focalisent sur le développement de trois types de capteurs électrochimiques afin d'assurer la détection du pH, de la quantité d'ions nitrates et des pesticides. Ces capteurs doivent ensuite être intégrés sur une plateforme microfluidique (laboratoire sur disques) dédiée afin de produire un système portatif d'alerte précoce à bas coût, autonome et fiable permettant de démultiplier les fréquences et points de mesures et d'orienter vers d'éventuelles analyses complémentaires en laboratoire.

Les trois capteurs sont basés sur la même puce technologique (ElecCell) consistant en une cellule électrochimique à trois électrodes miniaturisée sur puce silicium par procédé microtechnologique. Le capteur de pH est un capteur potentiométrique basée sur l'oxyde d'iridium. Le capteur d'ions nitrates est un capteur potentiométrique à membrane ionosensible. Une étude a été menée sur l'intégration d'une couche de transduction à base de nanotubes de carbone afin d'en améliorer ses performances. Enfin, le capteur de pesticides et ETM est un biocapteur ampérométrique basé sur le métabolisme algal. En effet, l'activité métabolique des algues étant influencée par la présence de certains polluants (photosynthèse et/ou respiration), l'échantillon d'analyse est mélangé à une solution de microalgues vertes et le biocapteur électrochimique se focalise sur la détection de ce taux d'oxygène consommé et/ou produit. Des études ont donc été menées sur plusieurs pesticides et ETM. Pour terminer, des premiers tests en eau réelle ont été réalisés.

Mots-clés : microcapteurs électrochimiques - biocapteurs à algues - qualité de l'eau - pH - détection des ions nitrates - détection des herbicides et des métaux lourds

Abstract

Fresh surface water is the only easily exploitable water resource, whether for agriculture, industry or drinking water. Yet it represents only 0.03% of the Earth's total hydrosphere, making it a precious resource. Unfortunately, it is often the victim of pollution, mainly caused by human activity, and it is therefore necessary to monitor its quality in order to protect it.

Conventional laboratory methods have shown their worth in terms of robustness, sensitivity and reliability. However, in addition to costly equipments and qualified manpowers, these methods require samples to be transported from the site to the laboratory, where it may be altered or modified. This imposes strict rules on packaging, conservation, storage and transport, making the monitoring process even more complex, and always leading to a lack of real-time results. Over the last few decades, promising new technologies have been developed to ensure fast, reliable on-site monitoring.

This thesis focuses on the development of three types of electrochemical sensors to detect pH, nitrate ions, herbicides and heavy metals. These sensors must then be integrated on a dedicated microfluidic platform (laboratory on disk) to produce a low-cost, autonomous and reliable portable early-warning system, enabling measurement frequencies and points to be multiplied, and pointing the way to possible further laboratory analyses.

The three sensors are based on the ElecCell technological platform, implying the microfabrication, on a silicon substrate, of a three-electrode electrochemical microcell. The pH sensor is a potentiometric sensor based on iridium oxide IrOx. The nitrate ion NO₃⁻ sensor is a potentiometric sensor with a polymer-based ion-sensitive membrane. A study has been carried out on the integration of a carbon nanotube-based transduction layer to improve its performance. Finally, the herbicide and heavy metal sensor is a dissolved oxygen O₂ amperometric biosensor based on algal metabolism. As the metabolic activity of algae is influenced by the presence of certain pollutants (photosynthesis and/or respiration), the analysis sample is mixed with a solution of green microalgae, and the electrochemical biosensor focuses on detecting the rate of oxygen consumed and/or produced. Studies were carried out on several pesticides and heavy metals. Finally, initial tests were carried out in real water samples.

Keywords: electrochemical microsensors - algae-based biosensors - water quality - pH - nitrate ion detection - herbicides and heavy metals detection

