

Biocapteurs basés sur de nouvelles générations de (bio)récepteurs et de transducteurs pour le contrôle de la qualité des eaux et des aliments

Georges Istamboulie

Université de Perpignan Via Domitia, Biocapteurs-Analyse-Environnement, 66860
Perpignan, France Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579
Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS
Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France
georges.istamboulie@univ-perp.fr

Résumé — La détection en continu de molécules cibles dans des matrices complexes est toujours considérée comme un défi scientifique et technologique. Les méthodes conventionnelles basées sur la chromatographie sont très puissantes et permettent une détection à très faibles concentrations, mais elles nécessitent un matériel coûteux ainsi que des personnels hautement qualifiés. Au cours des 30 dernières années, les biocapteurs sont apparus comme des outils analytiques alternatifs pour la détection “*in situ*” d’une grande diversité de cibles. Ces dispositifs sont basés sur l’association d’une molécule biologique assurant la reconnaissance spécifique de l’analyte et d’un transducteur permettant d’obtenir un signal mesurable. Les biocapteurs électrochimiques classiques sont généralement basés sur l’utilisation d’enzymes ou d’anticorps immobilisés sur des électrodes sérigraphiées. Ils présentent l’avantage d’être petits, faciles à utiliser, peu coûteux et permettent d’obtenir des informations quantitatives en temps réel sur la composition d’un échantillon avec une préparation minimale. Cependant, le développement de biocapteurs peut être entravé soit par l’indisponibilité de biorécepteurs pour certaines cibles, ou par une sensibilité insuffisante liée au transducteur. Dans cet article, nous présentons une gamme de biocapteurs électrochimiques développés par notre équipe pour la surveillance de la qualité des eaux et des aliments, y compris des biocapteurs de « nouvelle génération » basés sur de nouveaux récepteurs biomimétiques notamment des aptamères en association avec des méthodes de mesure électrochimiques très sensibles et/ou l’utilisation de la technologie d’impression 3D pour la conception de cellules électrochimiques complètes.

Mots-clés — Biocapteur, Électrochimie, Molécules biomimétiques, Technologie d’impression 3D, Analyse de l’eau et des aliments.

I. INTRODUCTION

Un biocapteur est un dispositif incorporant un élément de détection biologique (biorécepteur) immobilisé sur un élément physique (transducteur) ou intégré à celui-ci^[1]. L’objectif est de produire un signal mesurable qui est proportionnel à la concentration d’une molécule cible ou d’une famille de molécules. Le biorécepteur permet une reconnaissance spécifique de l’analyte dans un environnement complexe. Cette reconnaissance se traduit par un changement physico-chimique du milieu ou de l’interface du transducteur. Ce dernier (généralement une électrode ou un système optique) transforme ce changement produit par la réaction entre l’analyte et le biorécepteur en un signal mesurable qui peut ensuite être enregistré. Les biocapteurs sont des outils analytiques utilisables dans de nombreux domaines (médecine^[1], environnement^[2-4], ou agroalimentaire^[5-7]).

Au cours des vingt dernières années, les biocapteurs électrochimiques ont connu une forte avancée. Ces outils utilisent généralement des électrodes jetables fabriquées par sérigraphie^[2]. Cette technologie permet d’intégrer des matériaux innovants dans la conception de biocapteurs, tels que des médiateurs électrochimiques qui peuvent être incorporés dans des encres^[2,3], des polymères conducteurs^[4], ou encore des nanoparticules^[5]. Récemment, de nouveaux biocapteurs ont également été décrits avec une nouvelle génération d’électrodes fabriquées par la

technologie d’impression 3D^[8].

D’autre part, les efforts scientifiques se poursuivent pour rechercher de nouveaux récepteurs biologiques utilisables comme éléments de reconnaissance. Alors que les biocapteurs classiques sont basés sur l’utilisation d’anticorps ou d’enzymes, de nouveaux capteurs ont émergé sur la base de molécules biologiques génétiquement modifiées pour améliorer la sensibilité de détection et la sélectivité^[2], ou sur des molécules biomimétiques telles que les aptamères^[7].

Dans cet article, nous présentons une large gamme de biocapteurs développés par l’équipe BAE-LBBM, impliquant divers récepteurs biologiques ou biomimétiques associés à des transducteurs innovants, pour des applications dans les domaines de l’agroalimentaire et de l’environnement.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Réactifs et appareils

Les pâtes utilisées pour la sérigraphie (Electrodag PE- 410, 423SS et 6037SS) ont été obtenues auprès d’Acheson (Plymouth, Royaume-Uni), la pâte de carbone modifiée au Cobalt-Phtalocyanine (CoPC) a été achetée auprès de Gwent Electronic Materials, Ltd (Gwent, Royaume-Uni). Une peinture glycérophthalique (Astral, France) a été utilisée comme couche isolante. Des plaques de PVC transparentes (200 mm × 100 mm × 0,5 mm) (SKK, Allemagne) ont été utilisées comme supports de sérigraphie. Le photopolymère soluble dans l’eau (AWP) a été fourni par Toyo Gosei Kogyo Co (Chiba, Japon). L’AChE génétiquement modifié de *Drosophila melanogaster* de type B394 a été produit par Protein-Bio-Sensor (PBS, Toulouse, France). Des oligonucléotides modifiés sur l’extrémité 5’ et/ou 3’ ont été achetés auprès de Microsynth (Suisse). Tous les autres produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich Chemicals S.A. Toutes les mesures électrochimiques ont été effectuées à l’aide d’un potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT100 (EcoChimie, Pays-Bas) contrôlé par son logiciel d’interface Nova version 2.1.

B. Fabrication des électrodes

Les électrodes de carbone sérigraphiées (SPCE) ont été produites à l’aide d’un système de sérigraphie semi- automatique DEK 248 (DEK, UK). L’électrode de travail avait la forme d’un cercle de 4 mm de diamètre, l’électrode auxiliaire celle d’une ligne courbe de 16 mm × 1,5 mm et l’électrode de pseudo-référence Ag/AgCl celle d’une ligne droite de 5 mm × 1,5 mm. Des SPCE modifiées au cobalt- phtalocyanine (CoPC) ont été obtenues par sérigraphie directe d’une pâte de carbone commerciale (Gwent, UK). Les électrodes basées sur les technologies 3D ont été fabriquées à l’aide de filaments de carbone conducteurs et de l’imprimante 3D CreatBot DX30.

C. Immobilisation des bio(récepteurs)

Les enzymes ont été immobilisées sur les surfaces des électrodes de travail par piégeage physique dans un photopolymère biocompatible (PVA-AWP). Le PVA-AWP a été mélangé avec la

solution d'enzyme dans un rapport de 1:1 (v/v) et doucement vortexé pour obtenir une dispersion homogène enzyme/polymère. Un volume de 3 μL a été déposé sur chaque électrode de travail et l'ensemble d'électrodes a été laissé sous lumière néon ($2 \times 8 \text{ W}$) pendant au moins 3h à 4 °C pour réaliser la photopolymérisation. Ces biocapteurs sont stockés dans des conditions sèches à 4 °C pendant 6 mois.

Les aptamères modifiés avec un groupement amine sur l'extrémité 5' et les anticorps ont été immobilisés de la même manière. La surface des électrodes de travail a été modifiée pour avoir un groupement carboxylique. Pour cela, un cation diazonium a été synthétisé dans un flacon de 2mL en mélangeant le nitrite de sodium à 2 mM et l'acide 4-aminobenzoïque à 2 mM dans une solution aqueuse de HCL à 0,5M pour un temps d'incubation de 5 minutes à température ambiante. Ensuite, la génération électrochimique de 4-carboxyphényle (4-CP) sur la surface d'électrode a été effectuée in situ par voltampérométrie à balayage linéaire, de 0,6 à -0,8 V vs. Ag/AgCl. Les SPCE modifiées par la 4-CP ont ensuite été incubées pendant 60 minutes avec 50 μL de tampon MES (0,1M, pH=5,5) contenant 100 mM EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyle) carbodiimide hydrochloride) et 25 mM de NHS (N-hydroxysuccinimide). Après un rinçage à l'eau distillée, 20 μL de solution d'aptamères ou d'anticorps (à concentration optimisée) ont été déposés sur la surface SPCE avec un temps d'incubation de 3h sous atmosphère humide. Les SPCE modifiées ont finalement été incubées avec 50 μL de solution d'éthanolamine à 1 M pendant 3h afin de bloquer les groupes succinimides restants. Ces biocapteurs sont stockés dans des conditions sèches à 4 °C pendant une semaine.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Capteurs à base d'acétylcholinestérase génétiquement modifiées pour la détection d'insecticides organophosphorés

Les composés organophosphorés sont parmi les neurotoxiques les plus puissants, ils sont couramment utilisés comme pesticides (insecticides) et agents de guerre chimique [2,4]. Bien que ces pesticides aient une faible persistance dans l'environnement, la forte toxicité de leurs résidus perturbe les écosystèmes et affecte les organismes humains. Ces composés agissent généralement par inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), induisant une stimulation excessive du système nerveux parasympathique et affectant également le système nerveux central.

La détection précoce des insecticides organophosphorés est donc importante pour la protection de l'environnement, et plus particulièrement des ressources en eau. En conséquence, il existe une demande croissante pour le développement de dispositifs utilisables sur le terrain pour une surveillance sensible et sélective de ces composés. Pour cela plusieurs biocapteurs ont été décrits, notamment des capteurs électrochimiques à AChE. Le principe de la détection des composés organophosphorés à l'aide de ce type de capteur est basé sur la mesure de l'activité AChE immobilisée avant et après l'incubation avec l'échantillon, en utilisant un substrat artificiel : l'acétylthiocholine. La procédure de mesure est présentée dans la figure (1,a). La figure (1,b) présente la détection du chlorpyrifos et du chlorfenvinfos, deux insecticides inclus depuis 2001 dans une liste de substances prioritaires dans le domaine de la politique de l'eau (décision 2455/2001/CE)^[9], à l'aide d'un biocapteur basé sur l'acétylcholinestérase génétiquement modifiée B394^[2] par rapport à une enzyme disponible dans le commerce (AChE d'anguille électrique).

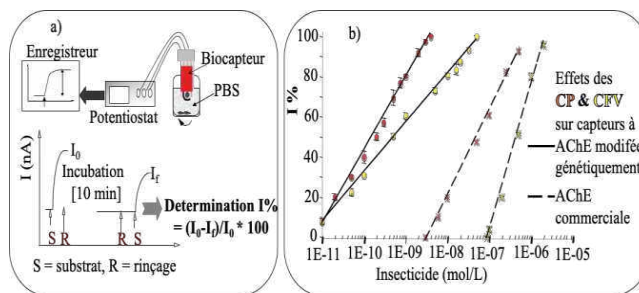


Figure 1 : a) Étapes de mesure pour la détection des composés organophosphorés à l'aide de ce capteur, b) Effet inhibiteur du chlorpyrifos (CP) et du chlorfenvinfos (CFV) sur le capteur à AChE modifiée génétiquement et sur un capteur à AChE commerciale.

Les biocapteurs développés ont permis de détecter les deux insecticides avec une limite de détection (LOD) de $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, correspondant à 3,3 ppt. Une telle performance correspond à la réglementation européenne, qui fixe la limite maximale de résidus dans l'eau potable à 100 ppt.

B. Immunocapteurs pour la détection des antibiotiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé^[10] : La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui l'une des menaces les plus graves pour la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement durable. Il s'agit d'un phénomène naturel, mais l'utilisation abusive de ces médicaments chez l'homme et l'animal accélère le processus. La résistance aux antibiotiques entraîne des hospitalisations prolongées, une augmentation des dépenses médicales et une augmentation de la mortalité. En Europe, il cause 25 000 morts par an et 1,5 milliards d'euros de pertes.

Afin d'éviter ces problèmes et de protéger les consommateurs, la présence d'antibiotiques chez les animaux destinés à l'alimentation a été réglementée en fixant des limites maximales de résidus d'antimicrobiens autorisés pour chaque espèce (LMR, règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission)^[11]. Par conséquent, la surveillance sensible et efficace des antibiotiques dans les échantillons d'aliments est cruciale. Dans ce contexte, un nouveau immunocapteur électrochimique a été fabriqué pour la détection rapide et sensible des fluoroquinolones (FQ) dans la viande. Les FQ sont des antibiotiques synthétiques à large spectre qui inhibent sélectivement les enzymes bactériennes impliquées dans la réplication de l'ADN des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces antibiotiques, en particulier l'enrofloxacin (EF), sont utilisés dans l'élevage à grande échelle pour prévenir ou traiter les maladies^[13], ou pour améliorer la croissance et la productivité du bétail. La réglementation européenne fixe les limites des résidus d'EF dans la viande entre 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, en fonction de l'espèce animale et du tissu.

Le biocapteur a été construit en immobilisant un anticorps anti-FQ sur des électrodes de carbone sérigraphiées via un couplage de carbodiimide. Un dérivé électrochimiquement actif a été synthétisé en conjuguant un autre FQ, la difloxacin, avec de l'aminoferrrocène (figure 2,a), dont l'oxydation est mesurable par voltampérométrie différentielle par impulsions à +0,2 V vs. Ag/AgCl. Le principe de détection est basé sur une compétition de fixation entre ce conjugué électroactif et l'EF libre sur des anticorps immobilisés (figure 2,b). Et afin d'améliorer la reproductibilité et la fiabilité des mesures, une nouvelle SPEC avec double électrode de travail a été conçue, ce qui a permis d'utiliser une des deux électrodes comme contrôle négatif.

Cet immunocapteur a permis de détecter l'EF à des concentrations allant de 0,005 à 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le tampon avec LOD de 0,003 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figure 2,c). L'immunocapteur est resté stable pendant au moins 1 mois à 4 °C et a montré

une bonne spécificité pour les autres fluoroquinolones.

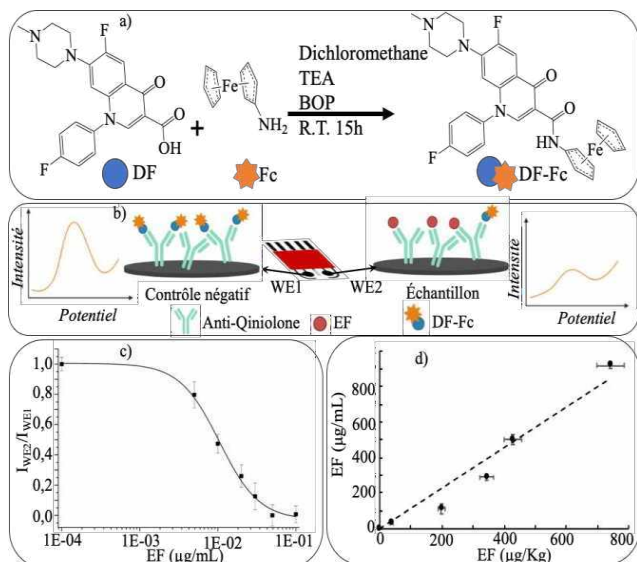


Figure 2 : a) Synthèse du conjugué difloxacin-ferrocène, b) Principe de détection de l'immunosenseur électrochimique pour la détection des FE. WE1 : En l'absence de FE (contrôle négatif); WE2 : En présence de FE, c) effet de la présence d'enrofloxacin sur la réponse du capteur avec un temps d'incubation de 45 min, d) Corrélation entre la concentration de fluoroquinolones déterminée dans l'échantillon de viande à l'aide d'un immunocapteur électrochimique développé et par chromatographie HPLC.

Ce capteur a été associé à un protocole simple de pré-traitement de l'échantillon. Brièvement, un morceau de 3 g de muscle a été placé dans un tube de 50 mL et chauffé dans un bain marie, et le jus produit au cours de cette étape a été recueilli et centrifugé 3 min à 4000 tr/min. Le surnageant a été ensuite dilué 5 fois dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DF-Fc. En parallèle, un échantillon de viande certifié sans antibiotique a été utilisé pour réaliser le contrôle négatif. L'efficacité du capteur et l'adéquation du processus d'extraction ont finalement été validées par la détection de FE dans différents échantillons de viande (figure 2,d).

C. Capteurs aptamères (oligonucléotides) pour la détection de différents contaminants dans les matrices alimentaires et hydriques.

Les aptamères sont des oligonucléotides (séquence d'ADN, simple ou double brin, ou ARN) qui ont une affinité spécifique pour une molécule cible (ou une famille de molécules). Les molécules cibles peuvent être des protéines, des peptides, des vitamines ou des composés organiques ou non organiques, de petite ou grande taille moléculaire.

Les aptamères sont généralement sélectionnés par la méthode SELEX[12] (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) à partir de banques combinatoires d'oligonucléotides synthétiques. Le principe de SELEX est de retenir les oligonucléotides qui se lient avec une affinité élevée avec la cible.

Le principal défi dans la conception d'un capteur basé sur un aptamère est la mesure de petits changements physico- chimiques résultant de la simple interaction entre ce ligand et la cible. L'utilisation de systèmes dérivés d'immunocapteurs montre une bonne fiabilité, mais ils nécessitent un pré- marquage de l'aptamère ou de la cible, ce qui n'est pas applicable à tous les analytes. De plus, ces protocoles de mesure impliquent plusieurs cycles d'incubation et de lavage, ce qui allonge le temps d'analyse. Cependant, l'utilisation d'une méthode électrochimique très sensible comme la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) permet de mesurer directement l'interaction aptamère-cible.

Sur la base de ce principe, un aptacapteur impédimétrique sans

marquage a été conçu pour la détermination de l'aflatoxine M1 (AFM1) dans le lait^[7]. Les mesures SIE ont été réalisées à un potentiel appliqué de 0,09 V vs. Ag/AgCl, correspondant au potentiel d'équilibre du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, avec une amplitude de 5 mV et une gamme de fréquences de 100 points allant de 10 kHz à 1 Hz. Les spectres EIS (figure 3,a) ont été tracés sous forme de diagrammes de Nyquist, ($Z_{\text{imaginaire}}$ vs $Z_{\text{réel}}$) et ajustés à une courbe théorique correspondant au circuit (figure 3,a). Afin de comparer les résultats obtenus à partir des différentes électrodes utilisées, et d'obtenir des résultats indépendants et reproductibles, des signaux relatifs et normalisés étaient nécessaires. Ainsi, la valeur du Δ_{ratio} a été définie selon les équations suivantes :

$$\Delta_{\text{ratio}} = \Delta_s / \Delta_b \text{ Avec}$$

$$\Delta_s = (R_{\text{et}}(\text{APT-AFM1}) - R_{\text{et}}(\text{électrode nue})) \text{ et } \Delta_b = R_{\text{et}}(\text{APT}) - R_{\text{et}}(\text{électrode nue})$$

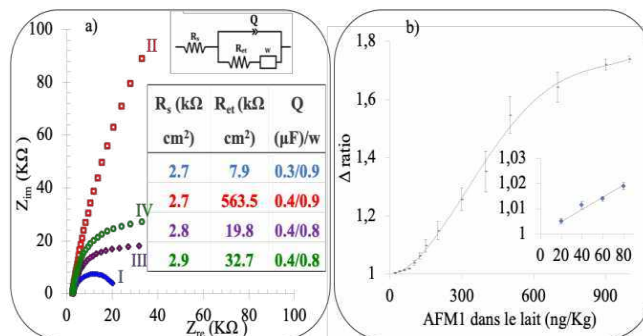


Figure 3 : a) Tracés de Nyquist de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ pour : (I) SPCE nu, (II) électrode modifiée SPCE/4-CP, (III) Aptacapteur (IV) Aptacapteur en présence d'AFM1 à 50 ng/L, avec les valeurs de R_s , R_{et} et Q à chaque étape successive de la construction de l'aptacapteur et en présence d'AFM1 à 50 ng/L⁻¹. b) La courbe de calibration de Δ_{ratio} mesuré en fonction de l'AFM1 présent dans le lait.

En raison de la spécificité de l'interaction Aptamer-AFM1, une simple filtration à travers une membrane PTFE de 0,2 mm d'un mélange lait/méthanol/tampon (1:1:8) a été utilisée comme prétraitement de l'échantillon. La figure (3,b) présente la détermination de l'AFM1 dans le lait à des concentrations allant de 20 à 1000 ng/kg. Ces performances satisfont pleinement les normes européennes fixant des limites maximales de résidu d'AFM1 dans le lait^[14] et les produits laitiers à 50 ng.kg⁻¹ pour les adultes et à 25 ng/kg⁻¹ pour les nourrissons.

D. Électrodes fabriquées par la technologie d'impression 3D

Afin d'augmenter la sensibilité des biocapteurs et d'élargir leur application, notre équipe a développé de nouveaux transducteurs basés sur des électrodes imprimées à l'aide de la technologie 3D^[8]. Cette technologie offre non seulement la possibilité de créer de nouveaux capteurs avec des matériaux innovants tels que les nanotubes de carbone ou l'oxyde de graphène, mais aussi d'intégrer des canaux micro- fluidiques à l'intérieur du capteur. Cette nouvelle technologie permet d'augmenter considérablement la surface active du capteur, de faciliter l'immobilisation des récepteurs biologiques ou biomimétiques, d'améliorer l'accessibilité de l'analyte au récepteur et d'améliorer la réponse électrochimique mesurée.

Dans la littérature, les biocapteurs à glucose oxydase pour la détection du glucose ont servi comme un modèle de base dans ce domaine. Il nous a donc semblé pertinent de comparer les performances des électrodes 2D et 3D sur lesquelles la glucose oxydase a été immobilisée par piégeage dans un photopolymère (PVA-AWP). La détection du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction enzymatique a été facilitée par l'utilisation d'un médiateur électrochimique, le bleu de Prusse, qui a simplement été adsorbé à la surface des électrodes avant l'immobilisation enzymatique.

La figure 4 montre la réponse du capteur (en unités d'intensité)

en fonction de la concentration de glucose (en mM). On peut observer que l'utilisation d'électrodes 3D augmente la sensibilité de détection d'un facteur ≈ 9 et améliore la limite de détection du glucose de $5 \mu\text{M}$ à $0,8 \mu\text{M}$.

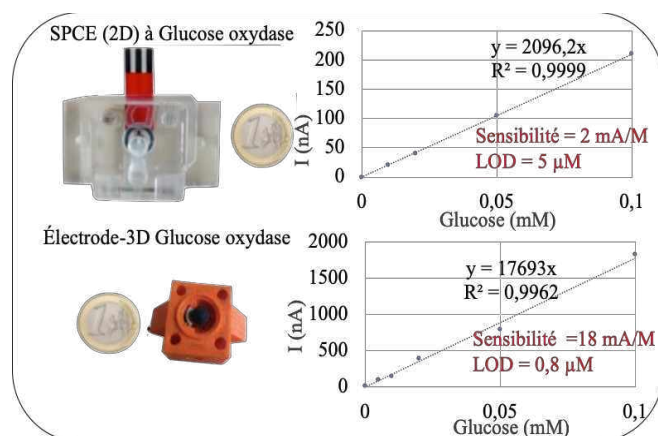


Figure 4 : Gammes de linéarités obtenues selon le type d'électrode utilisée avec les valeurs de sensibilité et les limites de détection (LOD) des deux biocapteurs.

CONCLUSIONS

L'utilisation de biocapteurs peut ouvrir la voie à des méthodes spécifiques, sensibles, rapides et peu coûteuses pour surveiller une large gamme d'analytes cibles dans l'analyse des aliments et la surveillance de la matrice environnementale.

Les biocapteurs sont historiquement basés sur des éléments biologiques utilisés comme biorécepteurs, mais le choix limité de molécules disponibles a conduit à la recherche de molécules alternatives pouvant être synthétisées "in vitro" avec une reproductibilité élevée. Ce concept est un vaste domaine de recherche qui ne cesse de se développer rapidement. Les capteurs biomimétiques suscitent le plus d'intérêt, en particulier les capteurs à base d'aptamères, principalement en raison de la large gamme d'aptamères sélectionnés et publiés récemment et de leur capacité à détecter une large gamme de cibles, des ions ou des cellules entières. De nombreux aptacapteurs ont été décrits pour l'analyse de divers composants et contaminants dans les domaines de l'alimentation et de l'environnement.

Bien que la grande majorité des capteurs électrochimiques décrits dans la littérature soient basés sur des électrodes de carbone sérigraphiées, des stratégies basées sur une technologie 3D innovante semblent prometteuses. La combinaison entre de nouvelles électrodes imprimées en 3D et des éléments biomimétiques pourrait permettre de développer une nouvelle

génération de biocapteurs répondant parfaitement aux normes fixées par la réglementation, ainsi qu'aux besoins d'analyse d'échantillons in situ avec un prétraitement minimal des échantillons.

RÉFÉRENCES

- [1] A. Turner, G. Wilson, I. Karube. « Biosensors: Fundamentals and Applications », Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 770, ISBN 0198547242, 1987.
- [2] G. Istamboulie, S. Andreescu, J.-L. Marty and T. Noguer. « Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase ». *Biosensors & Bioelectronics*, vol 23, pp 506-512, 2007.
- [3] C. Calas-Blanchard, G. Istamboulie, M. Bontoux, G. Plantard, V. Goetz, T. Noguer. « Biosensor-based real-time monitoring of paracetamol photocatalytic degradation ». *Chemosphere* vol 131 pp 124-129, 2015.
- [4] T. Sikora, G. Istamboulie, E. Jubete, E. Ochoteco, J.-L. Marty, T. Noguer. « Highly sensitive detection of chlorpyrifos using genetically engineered acetylcholinesterase based biosensors and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) as an electrochemical mediator », *Journal of Sensors* Article ID 102827, 7 pages. 2011.
- [5] A. Y. El-Moghazy, A. Soliman, H. Z. Ibrahim, T. Noguer, J.-L. Marty, G. Istamboulie. Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly(vinyl alcohol)/Fe-Ni alloy nanocomposite for phosmet pesticide detection in olive oil. *Food Chem.* Vol 203 73–78, 2016.
- [6] C. Aymard, H. Kanso, M. J. Serrano, R. Pagán, T. Noguer, G. Istamboulie. « Development of a new dual electrochemical immunosensor for a rapid and sensitive detection of enrofloxacin in meat samples ». *Food Chemistry* vol 370 pp131016, 2022.
- [7] G. Istamboulie, N. Paniel, L. Zara, L. Reguillo Granados, L. Barthelmebs, T. Noguer. « Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk ». *Talanta* vol 146 pp 464 2016.
- [8] G. Istamboulie, H. Kanso, T. Noguer. « Dispositif intégrant des électrodes conformées en 3D ». French deposited Patent : FR 20 11437 on November 6th 2020.
- [9] Decision N0 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001. establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC
- [10] Antibiotic resistance, [En ligne]. Disponible : www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance.
- [11] Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
- [12] C Tuerk, L Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* vol 249 pp 505-10, 1990.
- [13] A. Diana, M. Santinello, M. Penasa, F. Scali, E. Magni, G.L. Alborali, G. L., M. De Marchi, M. Use of antimicrobials in beef cattle: An observational study in the north of Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, vol 181 pp 105032, 2020.
- [14] Règlement (CE) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires