

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



جامعة باجي مختار – عنابة

Faculté des Sciences de l'Ingénierat

Année 2018

Département de Génie des Procédés

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de **MASTER**

MISE AU POINT D'UN BIOCAPTEUR IMPEDIMETRIQUE POUR LA DETECTION DU PROPYLPARABENE

Option:

Génie Chimique

Par

SAAIDIA AICHA

DIRECTEUR DE MEMOIRE : **ZOUGAR Saida**

MCA

Univ. Annaba

DEVANT LE JURY

Président : **TIFOUTI Lakhdar**

Pr.

Univ. Annaba

Examineur : **SAYOUD Nassim**

MAB.

Univ. Annaba

Dédicace

Je dédie ce modeste travail en hommage aux :

Deux êtres les plus chères, à ceux qui je dois mon épanouissement dans la vie, je n'oublierai jamais vos conseils et vos aides, ayez l'honneur de voir votre aimable fille réaliser son beau rêve ; acceptez ma chère mère « Rebeh » et mon cher père « Noureddine » l'expression de mes sentiments les plus profonds.

Je dédie aussi ce travail à mon mari «Kheir Eddine», lui qui représente la lumière de mes yeux et la couronne de ma tête ;

A ses parents ; Mr Mohamed et Mme Rachida

A mes chers frères, Ahmed, mouez, zikou et

A ma sœur Khadîdja

A toutes mes amies de génie des procédés

A ma chère copine Taous Siaghi

Remerciements

Avant de présenter ce travail, tout d'abord, je tiens à remercier notre grand seigneur dieu le tout puissant pour m'avoir donné la foi en lui, d'avoir éclairé ma route et de m'avoir guidé dans le meilleur et le bon chemin.

J'exprime ma gratitude à Madame, Snani Leila

Je remercie chaleureusement mon encadreur Dr. Zougar Saida pour avoir dirigé ce mémoire.

Mes remerciements sont adressés aux membres de jury pour m'avoir honoré par leur présence et d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Grand merci enfin, à mes parents pour tous ce qu'ils ont fait pour moi et l'éducation qu'on a reçu de leur part.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	11
Chapitre I : les capteurs biologiques	
I.1.Historique :	14
i.2. description du biocapteur	14
i.2.1. le biorecepteur	15
i.2.2. les transducteurs :	15
I.3 utilisation des (bio) capteurs	16
I.4 Principaux types de biocapteurs	16
1.5. différentes méthodes d'immobilisation des enzymes :	17
1.5.1. L'adsorption	18
1.5.2. La réticulation	19
1.5.3. Le greffage covalent :	19
1.5.4. L'encapsulation	20
I.6. facteur influençant la vitesse des réactions	21
I.6.1.concentrationen	21
I.6.2.la température	21
I.6.3.le ph	22
Conclusion	22
Références bibliographiques	23
Chapitre II: substrat cible, biorécepteur et méthode analytique	
II.1.les parabènes :	25
II.1.1.definition :	25
II.1.2. Ou les trouve-t-on ?	26
II.1.3 parabènes : effets sur la santé :	26
II.1.4 limites actuelles et recommandations	26
II.2.les enzyme	29
II.2.1.introduction et historique :	29
II.2.2.difinition :	30
II.2.3.structure des enzymes	30
II.2.4.lipase	30
II.3. la méthode analytique :	31

III.3.1 Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique	31
II.3.1.1. Diagramme de Bode	32
II.3.1.2. Diagramme de Nyquist	32
II.3.1.3.étude de l'impédance pour un système électrochimique :	33
Conclusion:	34
Référence bibliographique :	36
Chapitre III: Dispositif expérimental, résultats et discussion	
Introduction	38
III.1.1. Dispositif expérimental	38
Electrode de référence	38
contre électrode ou électrode auxiliaire	38
électrode de travail	39
a) cellule de mesure	39
b) potentiostat-galvamostat	40
c) Un micro-ordinateur	41
III.1.2.Protocole opératoire :	41
III.1.2.1.Réactifs :	41
III.1.2.2.Nettoyage des électrodes de platine	42
III.1.2.3.Préparation de la membrane :	42
III.2.Résultats et discussion :	45
III.2.1. effet de la tension de polarisation	45
III.2.2.l'effet la concentration de parabène	46
iii.2.3.courbe de calibration	48
iii.2.4.caracterisation de l'electrode nue et modifiée	48
III.2.5.Effet de pH sur la réponse de biocapteur enzymatique	50
III.2.6.Effet de l'injection du Tween 20	51
Conclusion	53
Référence Bibliographique	57
Conclusion générale	59

LISTE DES FIGURE

Figures	Titre de la figure	Page
Figure I.1	Adsorption des enzymes sur un support.	17
Figure I.2	Réticulation et co-réticulation des enzymes.	18
Figure I.3	Greffage covalent des enzymes	19
Figure I.4	Encapsulation des enzymes.	19
Figure I.5	effet de la température sur la catalyse enzymatique. a) Activation par la chaleur; b) dénaturation thermique	21

Figure II.1	structure générale des parabènes (R désigne un groupe alkyle)	24
Figure II.2.	représentation schématique d'une enzyme	27
Figure II.3.	Diagrammes de Bode pour un système faradique.	29
Figure II.4	Diagramme de Nyquist pour un système faradique.	29
Figure II.5	Circuit équivalent et tracé de l'impédance d'une cellule électrochimique.	30
Figure II.6.	Impédance du circuit de Randles	31
Figure III.1	.électrode de référence	35
Figure III.2	.électrode auxiliaire	35
Figure III.3	.electrode de travail	36
Figure III.4	.cellule de mesure	36
Figure III.5:	Appareillages de mesures électrochimiques	36
Figure III.6	.l'appareille de mesure EC – LAB	37
Figure III.7	micro-ordinateur muni d'un logiciel EC-LAB	37
Figure III.8.	Spectres d'impédance dans le plan de Nyquist pour des polarisations allant de -400mV à 0 mV.	42
Figure III.9	: Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de parabène pour une électrode modifiée avec la membrane	43

	enzymatique obtenus à différentes valeurs de masse de l'enzyme.	
Figure III.10 :	Courbe de calibration a différentes masses de LPP .	45
Figure III.11	Diagrammes de Nyquist pour une électrode du platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus à 0mV/Ag/AgCl . Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz.	46
Figure III.12	Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de parabène pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différentes valeurs de la ph du milieu. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS.	48
Figure III.13:	Courbe de calibration présentant l'influence de la pH du milieu sur la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations de parabène.	50
figureIII.14	.tween 20	51
Figure. III.15	.variation de l'impédance suite a l'injection de différentes concentration de tween 20.	52
Figure. III.16	courbe de calibration	53

Liste de tableau

tableau	Titre de tableau	Page
Tableau III.1	Paramètres de simulation d'une électrode du platine modifiée à l'aide d'une couche enzymatique à différentes masses d'enzyme.	44
Tableau III.2	Evolution de R_T en fonction de la concentration du PP.	45
Tableau III.3	Caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés.	46
Tableau III.4	Paramètres de simulation d'une électrode du platine modifiée à l'aide d'une couche enzymatique à différents pH du milieu.	49
Tableau III.5	Evolution de ΔR_T en fonction de la concentration du PP.	50
Tableau III.6	Caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés à différents pH.	50
Tableau III.7	Paramètres électriques du biocapteur élaboré suite à l'injection du Tween 20.	52
Tableau III.8	Caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés.	53

LISTE DES ABREVIATIONS ET NOMENCLATURES

ADN : acide désoxyribonucléique

pp :propylparabéne

BSA : albumine serum bovin

PBS : tampon de phosphate saline

EC : classe de l'enzyme

Ph : potentiel d'hydrogène

GA : glutaraldéhyde

Rs : résistance de l'électrolyte

LPP: lipase de pancréas de porc.

SIE : la spectroscopie d'impédance électrochimique.

R : la résistance.

Z : l'impédance.

μL : micro litre

E : enzyme

R : coefficient de corrélation

.

Introduction générale

Les micropolluants, également connus sous le terme de contaminants émergents, concernent une grande diversité de substances d'origine naturelle et anthropique issues de produits industriels comme les produits pharmaceutiques, alimentaires, et cosmétiques. Ils sont généralement présents dans les milieux aquatiques à faibles concentrations allant de quelques ng/L à plusieurs µg/L et peuvent, même à petites doses, avoir un impact sur l'environnement, et surtout sur les écosystèmes aquatiques.

Les parabènes, un exemple parmi de nombreux micropolluants émergents, font l'objet d'étude de ce mémoire du fait de leur forte utilisation industrielle en tant qu'agent conservateur dans les médicaments, les cosmétiques et les produits de soins personnels ainsi que de leur omniprésence dans l'environnement, notamment dans les milieux aquatiques.

De nombreuses études éco-toxicologiques ont rapporté le potentiel des parabènes en tant que perturbateurs endocriniens. Ces molécules sont capables d'altérer l'équilibre hormonal naturel et peuvent agir à différents stades de l'action hormonale. En effet, leur activité oestrogénique à l'origine de leur potentiel de perturbation endocrinienne est capable d'entraîner des effets toxiques, chez l'homme et les organismes aquatiques, même à très faibles doses lors des expositions continues et chroniques.

La détection du parabène dans l'eau se fait grâce à différentes techniques de chimie analytique. L'amélioration des procédés d'analyse au cours du temps, grâce aux innovations techniques et méthodologiques, permet d'évaluer avec plus de précision la présence de ces substances en matrice aqueuse.

Depuis une trentaine d'années, ils font face à l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples transformant le signal (bio)chimique en un signal électrique facilement exploitable. Ils sont en général constitués d'une partie biosélective (couche sensible), et d'un système transducteur transformant en signal électrique les modifications physicochimiques induites par la reconnaissance dans la couche sensible.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'élaboration d'un biocapteur enzymatique pour la détection du propylparabène avec une voie électrochimique. Ce support comporte trois chapitres :

Le premier chapitre est constitué d'une revue bibliographique donnant une présentation générale des biocapteurs. Cette étude décrit brièvement les différentes composantes impliquées dans la construction des biocapteurs, ainsi que les principaux mécanismes liés à leur fonctionnement.

Le deuxième chapitre a été dédié à une présentation détaillée de l'enzyme utilisée dans tous ce travail comme ionophore (Lipase de Pancréas de Porc) ainsi que la substance à détecter à savoir le propylparabéne.

Le troisième chapitre, englobe l'étude de réalisation du biocapteur et exposera les résultats du travail effectué pendant la période de notre stage dans le laboratoire de génie de l'environnement au sein de notre département.

Finalement, une conclusion générale vient clôturer ce mémoire.

Chapitre I

Les capteurs biologiques

Le terme « biocapteur » est une abréviation de « capteur biologique », c'est un dispositif composé d'un transducteur et d'un élément biologique qui peuvent être une enzyme, un anticorps, ou un acide nucléique. L'élément ou le bioélément biologique réagit avec de l'analyte et la réaction biologique est convertie en signal électrique par le transducteur [1].

I.1.HISTORIQUE

Le premier biocapteur a été l'œuvre de L'éland Clark en 1950 dans le but de mesurer la concentration en oxygène dissous dans le sang. En 1962, ce même biocapteur est adapté afin de quantifier la concentration de glucose dans le sang. Ces études ont été approfondies vers 1967 suite à la naissance du premier biocapteur réalisé par Updicke et Hicks. Ce biocapteur est une électrode à enzyme pour le dosage du glucose basée sur l'immobilisation de la glucose- oxydase dans un gel de polyamide. Depuis les années 70, un effort considérable a été fait dans leur développement du fait de leurs applications dans des domaines divers et variés (médecine, agro-alimentaire, ou contrôle environnemental) [1-3].

En effet, de par leur petite taille, leur facilité d'utilisation et la possibilité de les utiliser sur site, ce sont des éléments d'analyse particulièrement avantageux et intéressants . A la naissance du premier capteur biologique, la réalisation de ces dispositifs était simple et basée sur l'immobilisation physique de l'enzyme soluble à la surface d'un transducteur électrochimique.

I.2. DESCRIPTION DU BIOCAPTEUR

I.2.1. LE BIORECEPTEUR

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une molécule active (par exemple : enzyme, anticorps, ADN, cellule entière, micro-organisme) immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur. Dans un biocapteur, le biorécepteur offre une spécificité et une sensibilité élevée pour un groupe particulier d'analyte, ainsi qu'une réponse rapide. Plusieurs types de biorécepteurs ont été utilisés comme moyen de reconnaissances moléculaires pour le développement de biocapteurs.

Parmi ces biorécepteurs, on cite par exemple les biocapteurs à enzymes qui utilisent généralement des Enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, Thermiques, acoustiques...). Ce type de biocapteurs a été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques, etc... [1]. Ce type de Biocapteurs enzymatique est l'objet de notre étude.

I.2.2. LES TRANSDUCTEURS

Le transducteur représente l'élément physique du biocapteur. Il sert à exploiter la modification biochimique issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur pour le transformer en un signal électrique. Suivant le type de modification biochimique, on choisira le type de transducteur approprié pour exploiter au mieux l'effet créé par le biorécepteur en présence de l'espèce cible et obtenir un signal sensible, facilement exploitable avec un seuil de détection plus bas en améliorant les performances du biocapteur [1]. Différents systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal électrique exploitable [4].

I.3 UTILISATION DES (BIO) CAPTEURS

Dans cette étude, on entend par biocapteur, un capteur intégrant une composante biologique. En anglais le terme « *biosensor* » s'applique également pour désigner les capteurs qui permettent de mesurer un paramètre biologique.

L'utilisation des biocapteurs dans le domaine de la santé est aujourd'hui quasi exclusivement limitée à la mesure du taux de glycémie (95%). Ce type de dispositifs est principalement développé par des sociétés pharmaceutiques et/ou de dispositifs médicaux. C'est en effet le segment où les grands groupes pharmaceutiques sont les plus impliqués. Cela correspond aux observations mentionnées dans l'état de l'art de l'étude. [5] .

I.4 PRINCIPAUX TYPES DE BIOCAPTEURS

De nombreux transducteurs ont été utilisés pour développer des biocapteurs. La nature du transducteur sert souvent de base pour la classification des différents biocapteurs.

Le principe des **biocapteurs électrochimiques** repose sur l'immobilisation du ligand sur une électrode. La réponse biochimique à l'addition d'un substrat est transformée en un signal électrique amplifié et quantifiable. Les biocapteurs électrochimiques peuvent être conductimétriques, potentiométriques ou ampérométriques.

Les **biocapteurs conductimétriques** sont basés sur le principe de modification de la conductivité d'un milieu entre deux électrodes lorsque des micro-organismes métabolisent des substrats non chargés, tels que des sucres, en composés intermédiaires tel l'acide lactique. La quantité de métabolites chargés est directement proportionnelle à la vitesse de croissance de l'organisme et est facilement quantifiable.

Les **biocapteurs potentiométriques** consistent en une membrane ou une surface sensible à une espèce donnée qui génère un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration de cette espèce mesurée par rapport à une électrode de référence. Les biocapteurs potentiométriques peuvent mesurer des variations de pH et de concentrations ioniques. Ces biocapteurs sont basés sur l'immobilisation d'une molécule biologiquement active (enzyme, antigène, anticorps...) sur une membrane ou sur la surface d'un transducteur qui va répondre à l'espèce formée lors de la réaction enzymatique ou la formation du complexe immun antigène-anticorps.

Enfin, les **biocapteurs ampérométriques** mesurent le courant produit lors de la réaction chimique d'espèces électro actives soumises à un potentiel. En conséquence, le courant mesuré par l'instrument peut être fonction de la contribution de différentes espèces chimiques.

Les biocapteurs électrochimiques ont donc pour principaux avantages leur simplicité, leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité [6].

1.5. DIFFERENTES METHODES D'IMMOBILISATION DES ENZYMES

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse. Cependant, leur coût et leur stabilité limitée dans le temps sont des facteurs limitant leur utilisation industrielle. Afin de pallier ces inconvénients, une stratégie fut proposée : l'immobilisation des enzymes qui permet de stabiliser celles-ci au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique. En 1916, Nelson et Griffin seront les premiers à démontrer qu'une enzyme, en l'occurrence l'invertase, conserve son activité catalytique et ce même après avoir été immobilisée par adsorption sur du charbon actif. Cette technique connaîtra un véritable essor à partir des années 1950 avec les premières applications dans divers domaines. Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques. On peut notamment citer cinq méthodes, couramment utilisées, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients :

- L'adsorption
- La réticulation
- Le greffage covalent
- L'encapsulation

1.5.1. L'ADSORPTION

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface (figure I.1). L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges (liaisons ioniques), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles).



Figure I.1. Adsorption des enzymes sur un support.

Cette technique d'immobilisation présente plusieurs avantages. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données. De plus, elle est facilement réversible, économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme. Cependant, elle présente un inconvénient majeur, du fait des interactions faibles liant

l'enzyme au support, ces systèmes sont peu stables, l'enzyme se désorbant au cours du temps [7].

1.5.2. LA RETICULATION

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulant qui vont permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de co-réticulation (figure I.2).

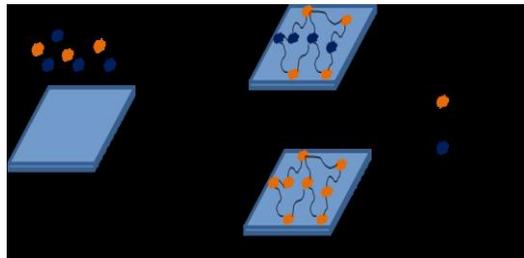


Figure I.2. Réticulation et co-réticulation des enzymes.

Les enzymes, après avoir été adsorbées sur un support, sont mises en contact avec un agent réticulant afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble. Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez simple à mettre en œuvre et de plus de part les liaisons chimiques, elle offre une bonne stabilité au système. Cependant, une perte d'activité enzymatique peut être observée. En effet outre l'utilisation de réactifs potentiellement non biocompatibles et pouvant altérer l'activité de l'enzyme, les propriétés physiques du système sont modifiées, leur donnant des propriétés mécaniques médiocres [8].

1.5.3. LE GREFFAGE COVALENT

Le principe de cette méthode d'immobilisation est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif (figure I.3). En général, les groupements fonctionnels du réactif sont des fonctions carboxyliques, thiols, hydroxyles ou encore amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule.

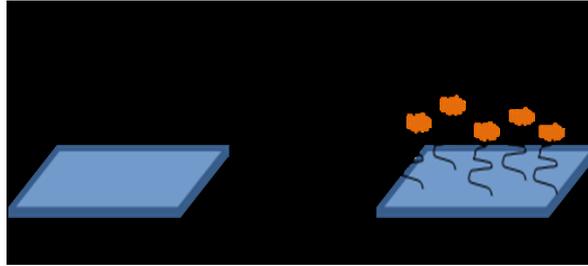


Figure I.3. Greffage covalent des enzymes

Cette méthode d'immobilisation présente principalement comme avantage de fixer l'enzyme de façon permanente et augmente la stabilité de celle-ci, lui conférant une durée de vie plus importante. Cependant, les réactifs indispensables au greffage risquent de dénaturer l'enzyme et donc de provoquer une perte d'activité [9].

1.5.4. L'ENCAPSULATION

Le principe de l'encapsulation est de fixer les enzymes dans une matrice (figure I.4). L'immobilisation se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent. La matrice doit permettre la diffusion des petites molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Ces matrices peuvent être inorganiques (gels de silice), organiques (nafion), polymères (polyacrylamide, polyuréthanes...) Ou composites (pâte de carbone).

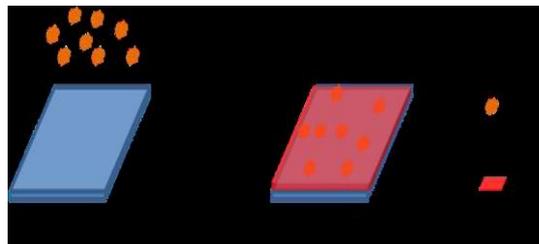


Figure I.4. Encapsulation des enzymes.

Les principaux avantages de cette méthode d'immobilisation sont qu'elle est économique, facile à mettre en œuvre et peut s'appliquer à un nombre élevé d'enzymes. Cependant, l'enzyme peut diffuser à travers la matrice au cours de l'utilisation et de plus elle n'est applicable que pour des substrats de petite taille. Par ailleurs, les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et donc entraîner une diminution de l'activité catalytique de celle-ci [10,11].

I.6. FACTEURS INFLUENÇANT LA VITESSE DES REACTIONS

La réponse d'un biocapteur est liée aux conditions de fonctionnement de l'enzyme immobilisée. Par conséquent, les facteurs affectant ordinairement la réaction enzymatique vont également influencer la réponse électrochimique et les performances du biocapteur. L'optimisation de son comportement est fonction du pH du milieu et de la température.

I.6.1. CONCENTRATION

La concentration en tampon du milieu de mesure est un paramètre important qui peut influencer la réponse du biocapteur en modifiant les propriétés électriques de l'interface électrode/électrolyte, la concentration locale des ions et les mobilités ioniques.

I.6.2. LA TEMPERATURE

Comme pour le pH, il existe une zone de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température est déterminée par la mesure de la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la température du milieu (figure I.5.). En fait, la variation de l'activité enzymatique résulte de deux effets antagonistes:

- a. D'une part, l'activité des réactions chimiques par la chaleur qui se traduit par l'augmentation de l'agitation des molécules avec l'élévation de la température qui va accroître la fréquence de collisions entre le substrat et l'enzyme (courbe a);
- b. D'autre part, la dénaturation de la protéine enzymatique par la chaleur et leur inactivation. Cette dénaturation va modifier les structures tertiaire et quaternaire de la protéine globulaire et donc faire passer l'enzyme d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité (courbe b) [12].

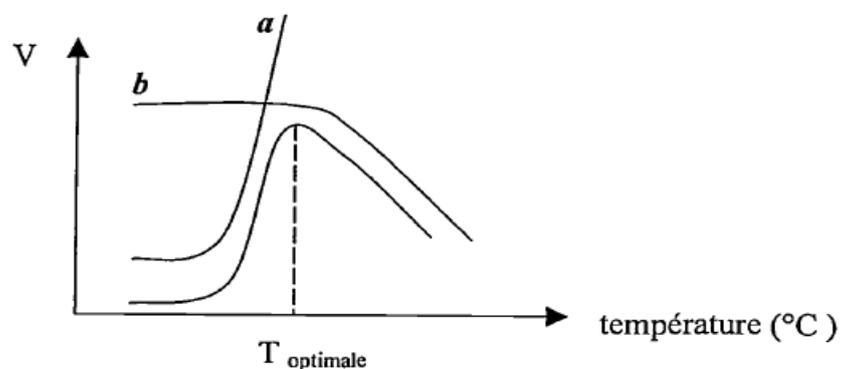


Figure I.5. Effet de la température sur la catalyse enzymatique. a) Activation par la chaleur;

b) dénaturation thermique

I.6.3. LE pH

Toutes les enzymes sont sensibles aux variations de la concentration en protons du milieu. Il existe une zone de pH pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. La plupart des réactions biologiques se déroulent à un pH neutre et beaucoup sont inactivées en dehors d'un pH compris entre 5 et 9. En conséquence, le contrôle du pH au moyen de tampons est une nécessité lors de toute mise en œuvre d'enzymes pour maintenir l'activité à une valeur déterminée (optimale) et aussi pour éviter une dérive vers les zones de pH entraînant l'inactivation de la protéine.

Dans le cas d'un biocapteur, le choix du pH optimal permettra d'améliorer sa sensibilité, mais devra être compatible avec le domaine d'utilisation. Suivant la nature du matériau d'immobilisation, c'est-à-dire s'il s'agit d'une matrice anionique, neutre, ou cationique, la concentration en protons au voisinage de l'enzyme est différente de celle mesurée dans la solution [13].

Conclusion

En conclusion, un biocapteur est un dispositif qui détecte, enregistre et transmet une information relative à un changement physiologique ou à la présence de différents composants chimiques ou biologiques dans l'environnement. C'est une Sonde qui intègre un composant biologique (tissu, microorganisme, organite, récepteur cellulaire, enzyme, anticorps, etc.), couplé à un système de transduction (optique, Electrochimique, thermoélectrique ou magnétique). Le but est de produire un signal électronique mesurable[4].

Références bibliographiques

- [1] www.cse.unt.edu/.../MohantyIEEEPotentials2006Mar-Apr.pdf
- [2] Houcine BARHOUMI, Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale, Thèse en Co-tutelle, Université de Monastir et Ecole Centrale de Lyon , 2006.
- [3] Haytem JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles , Thèse de doctorat de l'université de Montpellier, 2011.
- [4] Souad baali “ Immobilisation d' enzyme dans des membranes polymérique en vue d'élaborer des capteurs biologique pour la détection des polluants organique “thèse de doctorat, universite badji Mokhtar-annaba, 2015.
- [5] http://www.universal-biotech.com/file/fiches_produits_Opticsvalley
- [6] <http://www.ceb.utk.edu/bioprimer.pdf>
- [7] U. Spohn, D. Narasaiah, L. Gorton, D. Pfeiffer, A bienzyme modified carbon paste electrode for the amperometric detection of l-lactate at low potentials. *AnalyticaChimicaActa* 319 (1996) 79-90
- [8] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret, Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69 (2000) 153-163.
- [9] M. Pellissier, F. Barrière, A.J. Downard, D. Leech, Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting. *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 835-838.
- [10] M. Mazur, A. Krywko-Cendrowska, P. Krysiński, J. Rogalski, Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route towards polypyrrole microcontainers , *Synthetic Metals* 159 (2009) 1731-1738.
- [11] pressesagro.be/base/text/v12n1/57.pdf
- [12] PAC, 1992, 64, 143 (Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC recommendations 1992))
- [13] Dimitrios Karpouzas. G, Singh. K.B, *AdvMicrobPhys* 2006 51, 134-137.

Chapitre II

Substrat cible, biorécepteur et méthode analytique

II.1.LES PARABENES

Les parabènes (PARAoxyBENzoates) forment un groupe homologue dérivés de l'acidehydroxybenzoïque. Celui-ci est estérifié en C-4 par un alcool et, selon l'alcool utilisé, les différents parabènes obtenus sont le: méthyl-(MP), éthyl-(EP), propyl-(PP), isopropyl-, butyl-(BP), isobutyl- et benzylparabén. Ils sont employés couramment dans les cosmétiques, l'alimentation et les médicaments. Ils sont utilisés comme conservateurs, depuis les années 20 dans les produits pharmaceutiques. Les parabènes sont utilisés seuls ou en combinaison pour exercer une activité antimicrobienne et antifongique [1].

II.1.1.DEFINITION

Sous le terme « parabène », on entend une famille de substances chimiques. Il en existe plusieurs qui diffèrent les uns des autres par leur structure.

Généralement obtenus par synthèse, les parabènes existent aussi à l'état naturel dans un certain nombre d'aliments. Ils sont ainsi présents dans la mûre, l'orge, la fraise, la vanille, la carotte, la pêche, les haricots blancs, le pamplemousse ou l'oignon, ou encore dans des aliments préparés à partir de plantes (jus de raisin, vin blanc, vinaigre de vin...), les extraits de levure et certains fromages. On les trouve également dans les produits fabriqués par les abeilles (propolis, gelée Royale...). Ils sont par ailleurs naturellement présents dans le corps humain et peuvent être produits par certaines bactéries marines comme moyens de défense vis-à-vis d'autres microorganismes [2].



Figure.II. 1 : Structure générale des parabènes (R désigne un groupe alkyle)

II.1.2. OU LES TROUVE-T-ON ?

On trouve des parabènes dans la plupart des produits cosmétiques et d'hygiène personnels qui contiennent de l'eau en quantité significative, comme les shampoings, après-shampoings, nettoyants pour le visage, gels douches, gommages. On en trouve aussi dans les fonds de teint, dentifrices, déodorants et parfums.

Au niveau alimentaire, ils sont notamment utilisés dans les bières et les confitures. Des limites maximum de concentration existent pour chaque parabène, mais il faut noter l'absence de réglementation de l'utilisation de plusieurs parabènes dans un même produit, ou l'exposition d'une même personne résultant de plusieurs produits [3, 4].

II.1.3. PARABENES : EFFETS SUR LA SANTE

Selon la base de données de l'EWG (Environmental Working Group), la Skin Deep data base (comparaison d'ingrédients cosmétiques de plus de 50 bases de données sur la toxicité), les parabènes jouent un rôle dans le cancer, ils agissent comme perturbateurs endocriniens, ils sont toxiques pour la reproduction, immunotoxiques, neurotoxiques et irritent la peau. Leur utilisation pour tuer les bactéries implique par ailleurs nécessairement une certaine toxicité pour les cellules [3, 4].

II.1.4. LIMITES ACTUELLES ET RECOMMANDATIONS

La législation européenne autorise l'utilisation de parabènes dans les cosmétiques et un ou plusieurs parabènes peuvent être présents dans un produit donné. La concentration totale maximale autorisée dans ces produits de consommation est de 8g de parabènes par kg du produit cosmétique, aucun parabène ne devant avoir une concentration supérieure à 4 g/kg.

Après avoir examiné les informations scientifiques les plus à jour, le CSSC a confirmé que pour les petites molécules de parabène (parabènes de méthyle et d'éthyle), cette limite était considérée comme sûre. Pour les molécules de parabène plus longues (parabènes de propyle et de butyle), le Comité scientifique de sécurité des consommateurs recommande d'abaisser la limite à une concentration totale maximale de 1,9 g/kg. Pour d'autres parabènes (parabènes d'isopropyle, d'isobutyle et de phényle), qui sont moins utilisés, on dispose de très peu d'informations et le risque Potentiel ne peut être évalué [5, 6].

II.2.LES ENZYMES

II.2.1. INTRODUCTION ET HISTORIQUE

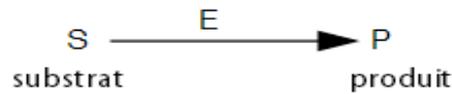
Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) des molécules du vivant. De ce fait, cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles diverses et variées.

Il observa l'action des sucs gastriques de requin sur des aliments. En 1815, Louis Joseph Gay-Lussac décrit la fermentation alcoolique par des micro-organismes. La première enzyme, ne fut découverte qu'en 1833 par Anselme Payen et Jean-François Persoz. En traitant un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol, ils firent précipiter une substance, sensible à la chaleur et capable d'hydrolyser l'amidon : la diastase. Enfin, en 1836, Theodor Schwann isolera la pepsine qu'il avait déjà décrite en 1834. C'est la première enzyme isolée à partir d'un tissu animal. Henri et Brown furent les premiers, en 1902, à proposer un modèle dans lequel il y a formation d'un complexe intermédiaire enzyme-substrat. L'uréase, capable de donner, à partir de l'urée, de l'ammoniaque et du CO₂, fut la première enzyme à être cristallisée et ce en 1926. La pepsine, la trypsine et la chymotrypsine ont ensuite été cristallisées par Northrop et Coll. Ceux-ci démontrèrent de plus que les cristaux de protéines étaient des enzymes pures. Dans les années 30, Otto Warburg établit les bases de la purification des enzymes, ce qui permit d'explicitier un grand nombre de phénomènes physiologiques.

En 1955, Sanger établit la séquence des 600 acides aminés qui compose l'insuline, avant qu'en 1966, Merrifield et Wang ne mettent au point une voie de synthèse. Progressivement, le champ d'application des enzymes s'est élargi, avec notamment des applications dans le domaine médical (comme par exemple le traitement des désordres digestifs par des enzymes pancréatiques), en chimie analytique ou encore dans le domaine agro-alimentaire (par exemple l'utilisation de l'amylase et du glucose isomérase pour la production de sirop de fructose à partir d'amidon de maïs), pour devenir une science à part entière, l'enzymologie [7].

II.2.2. DEFINITION

Les enzymes (E) sont des protéines qui catalysent des réactions biologiques dans y lesquelles un substrat est transformé en produit. Ce sont les catalyseurs du monde vivant. Y [8].



II.2.3. STRUCTURE DES ENZYMES

- Les enzymes sont en général des protéines globulaires.
- Le **site actif** est formé d'un **site de fixation** et d'un **site catalytique** (Fig.II.2) :
 - Le site de fixation reconnaît la structure du substrat et détermine l'affinité et la spécificité de la réaction ;
 - Le site catalytique permet la transformation du substrat en produit et détermine-la vitesse de la réaction [8].



Figure.II.2.Représentation schématique d'une enzyme

II.2.4.LIPASE

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC.3.1.1.3), les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol.

Leur particularité vient du fait que ces enzymes sont plus actives sur les lipides qui sont sous forme agrégée [9].

Les lipases sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux ainsi que chez les microorganismes qui constituent une source importante de production de lipases à grande échelle.

À ce jour, de nombreuses lipases de microorganismes ont été purifiées et caractérisées et certaines d'entre elles ont été cristallisées (*lipase de Pseudomonas glumae*, *lipase de Rhizomucor miehei*, *lipase Geotrichum candidum*, *lipase de Candida rugosa* ...).

La lipase de *Candida cylindracea* (qui est l'ancien nom de *Candida rugosa*) a été cristallisée en présence et en l'absence d'inhibiteurs. Il s'agit d'une alpha/beta hydrolase comprenant 11 brins beta entourés par 8 hélices alpha. La triade catalytique est cachée sous un flap constitué de 26 résidus d'acides aminés. La lipase est un biocatalyseur unique avec une large spécificité de substrat. Maintenant, il est largement utilisé dans la synthèse organique, la médecine, et l'industrie des pâtes et papiers [10].

II.3. METHODE ANALYTIQUE

L'électrochimie est la discipline qui a pour objet l'étude des interfaces entre des conducteurs électroniques (métaux, polymères conducteurs...) et des conducteurs ioniques (Solutions électrolytiques, sels fondus, électrolytes solides...). Il est traditionnel de la présenter en deux parties. La première partie traite des mesures concernant l'interface à l'équilibre ou dans des situations dynamiques excluant tout transfert électronique. La seconde partie concerne la réalisation et l'étude du transfert électronique hétérogène à l'interface. Dans les deux cas l'interface porte le nom d'électrode.

Nous présentons ici la technique d'analyse électrochimique utilisée au cours de ce travail à savoir la spectroscopie d'impédance ainsi que leur intérêt dans le développement de biocapteurs.

II.3.1 CARACTERISATION PAR LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE

Les données d'impédance sont typiquement représentées suivant deux types de Représentations: le diagramme de Bode et le diagramme de Nyquist [11].

II.3.1.1. Diagramme de Bode

Dans le diagramme de Bode, le logarithme du module $|Z(\omega)|$ et le déphasage φ de l'impédance sont tracés en fonction du logarithme de fréquence (figure II.3).

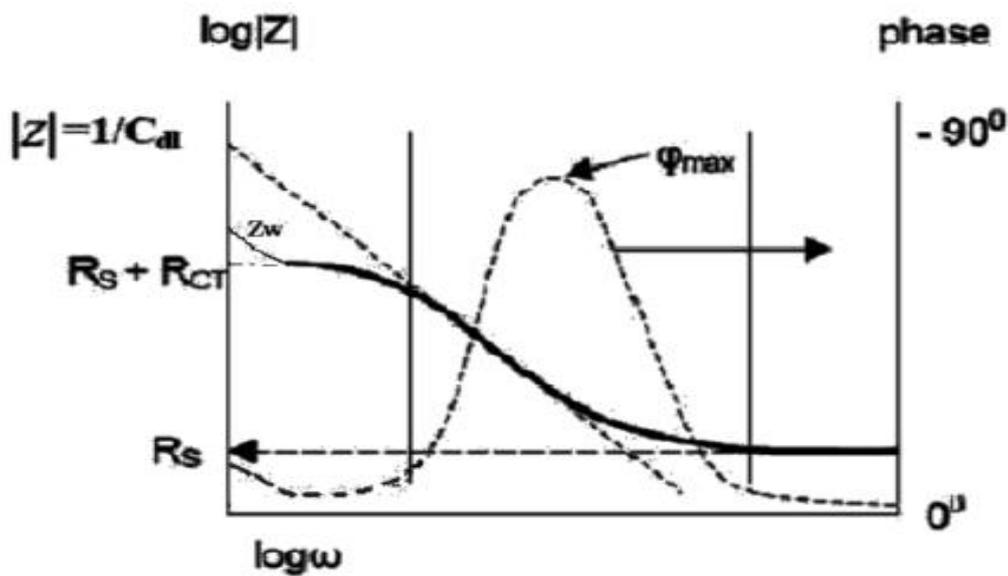


Figure II.3: Diagramme de Bode pour un système faradique.

II.3.1.2. Diagramme de Nyquist

Le diagramme de Nyquist, est une représentation graphique dans un plan complexe; l'axe des abscisses d'un système de coordonnées cartésiennes correspond à la partie réelle de L'impédance $Z(\omega)$, alors que l'axe des ordonnées correspond à sa partie imaginaire (figure II.5).

Les spectres d'impédance obtenus pour n'importe quelle interface, peuvent être Modélisés par un circuit électrique équivalent. Les paramètres du modèle peuvent être obtenus En ajustant la courbe expérimentale avec la courbe théorique. Des exemples de diagrammes seront illustrés ultérieurement

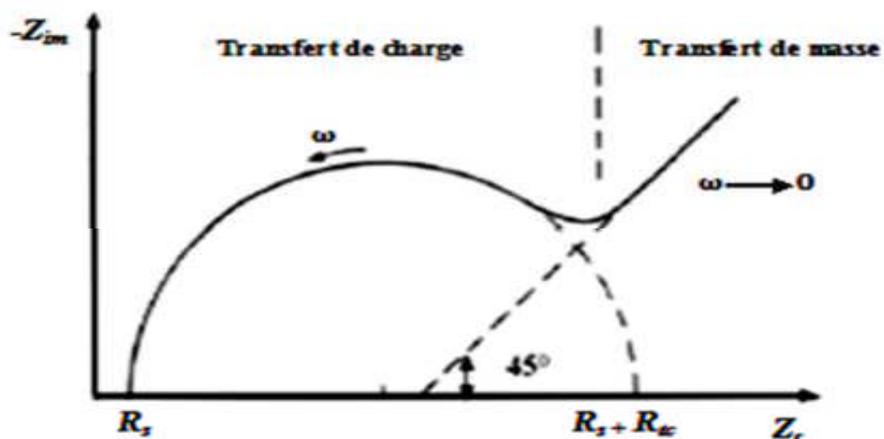


Figure II.4: Diagramme de Nyquist pour un système faradique.

II.3.1.3. Etude de l'impédance pour un système électrochimique

De façon générale, vis-à-vis d'une faible excitation sinusoïdale, une cellule électrochimique équivaut simplement à une impédance qui peut être représentée par un circuit électrique équivalent (figure II.5) selon le type du système (système faradique ou système non faradique).

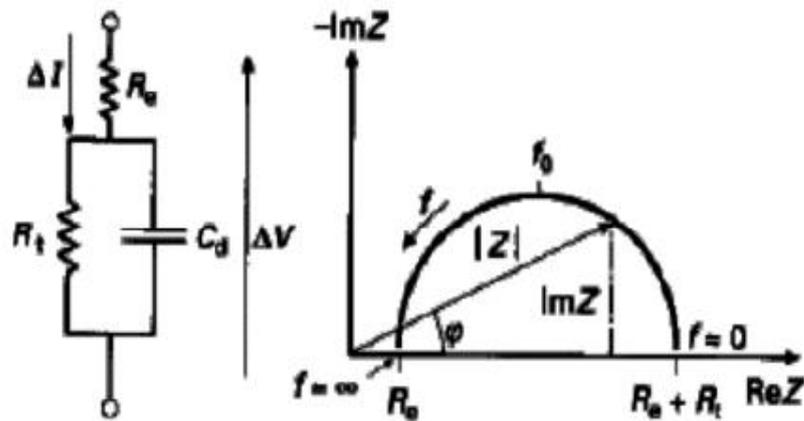


Figure II.5 : Circuit équivalent et tracé de l'impédance d'une cellule électrochimique.

$Z(\omega)$ est tracé sur la figure II.5 dans le plan complexe ($-\text{Im} Z, \text{Re} Z$) avec la partie imaginaire négative portée au-dessus de l'axe réel comme il est habituel de le faire en électrochimie.

Prenons comme exemple le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé pour les systèmes électrochimiques, le circuit de Randles. Il se compose généralement de quatre éléments : une résistance représentant la résistance due à la chute ohmique, R_s , un condensateur représentant la capacité de double couche, C_{dl} , une résistance de transfert de charge, R_{ct} , et l'impédance de Warburg, Z_{ω} , représentant le phénomène de diffusion des espèces redox. La forme générale du circuit équivalent est présentée sur la figure II.6.

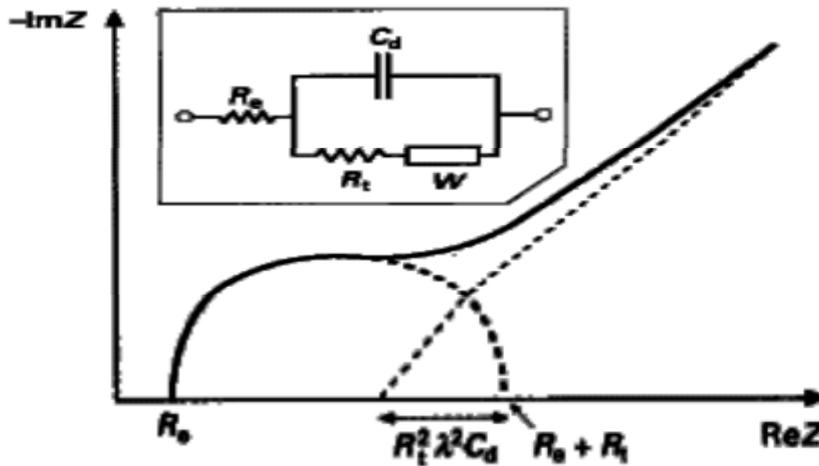


Figure II.6 : Impédance du circuit de Randles.

Aux hautes fréquences : l'impédance de Warburg est négligeable, alors Z tend vers R_{ct} , par conséquent, le circuit équivalent est une combinaison parallèle de la résistance de transfert de charge R_{ct} et de la capacité de double couche C_{dl} en série avec la résistance correspondant à la chute ohmique R_s .

Aux basses fréquences : le système est commandé par des processus de diffusion, ce qui signifie que l'impédance de Warburg est prédominante [12].

CONCLUSION

L'usage répandu des parabènes, principalement dans les domaines alimentaires, cosmétique et pharmaceutique, est dû à leur grande efficacité lorsqu'ils sont utilisés comme conservateurs. Mais cet usage s'accompagne de préoccupations environnementales et sanitaires. Environnementales en effet parce que les parabènes sont les composés chimiques les plus souvent quantifiés dans les eaux de surface, ce qui a conduit les autorités françaises à acter la nécessité de leur surveillance. Les parabènes pourraient par ailleurs intégrer dans la liste des substances préoccupantes du prochain cycle de la DCE. Sanitaires par ailleurs parce que les différents parabènes sont suspectés, à des niveaux différents, d'être des perturbateurs endocriniens. L'existence de ces controverses a conduit l'Europe à réviser la réglementation de l'usage des parabènes de manière substantielle, notamment dans les domaines cosmétique et alimentaire. Elles induisent par ailleurs une demande croissante pour les produits étiquetés « sans parabènes ». Ce contexte rend prégnante la question de la substitution de ces substances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. SONI M.G., CARABIN I.G., BURDOCK G.A. Safety assessment of esters of phydroxybenzoic acid (parabéns). Food Chem. Toxicol., 2005, 43: 985-1015.
- [2] college.dermocosmetologie@unilever.com»?
- [3]<http://www.safecosmetics.co.uk/the-use-of-parabens-in-cosmetics.html>
- [4] <http://www.safecosmetics.org/article.php?id=291>
- [5]http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf
- [6]http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_069.pdf
- [7] Haytem JARRAR « «THESE DE DOCTORAT Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles » 16 décembre 2011
- [8]<http://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-enzyme-710/>
- [9]. Sarda L, Desnuelle P. Action of pancreatic lipase on emulsified esters. Biochim Biophys Acta, 30: 513-21, **1958**.
- [10]. Reetz, M., Curr. Opin. Chem. Biol., vol. 6, p. 145, **2002**.
- [11]. Bobby Pejic, Roland De Marco, Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization, Electrochimica Acta 51, 6217-6229, 2006.
- [12]. Hafaid Imen, "Etudes physico-chimiques de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales"; thèse de l'université de Claude Bernard Lyon I, 2009.

Chapitre III

Méthodologie expérimentale, résultats et discussions

Un capteur enzymatique peut être considéré comme la combinaison de tout type de transducteur avec une fine couche enzymatique destinée, en général, à mesurer la concentration d'un substrat, la réaction enzymatique assure la transformation du substrat en produit de réaction détectable par le transducteur.

Dans la gamme des biocapteurs, notre choix s'est porté sur les biocapteurs électrochimiques et plus précisément sur les biocapteurs impédimétriques.

Ce travail a comme objet la caractérisation et l'étude du comportement d'un biocapteur enzymatique basé sur une enzyme hydrolase (la lipase de pancréas de porc (LPP)) immobilisée dans une matrice organique composée de BSA (Albumine sérum bovin) et de glutaraldéhyde (GA) afin de détecter le propylparabène (PP).

Ce présent chapitre s'organise en deux parties complémentaires :

- Dans la première partie, nous décrivons le dispositif expérimental et le protocole opératoires nécessaires pour élaborer nos biocapteurs.
- Dans la seconde partie, on présente les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail.

III.1.DISPOSITIF EXPERIMENTAL ET PROTOCOLE OPERATOIRE

III.1.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Toutes les expériences électrochimiques sont basées sur le montage expérimental de la figure III.5. Ce dernier est composé d'un potentiostat, d'un analyseur d'impédance, d'un ordinateur pour le pilotage des appareils ainsi que l'acquisition et le traitement des données et d'une cellule électrochimique constituée de trois électrodes :

Electrode de référence : est une électrode au $Ag/AgCl(KCl)$.

Une électrode de référence est une électrode qui a un potentiel d'électrode stable et bien connu. La grande stabilité du potentiel d'électrode est habituellement atteinte en employant un système d'oxydo-réduction avec des concentrations constantes (tamponnées ou saturées) de chaque participant de la réaction d'oxydo-réduction [1].

Les électrodes de référence sont utilisées de nombreuses façons. Le plus simple est lorsqu'elle est utilisée comme une demi-cellule pour construire une cellule électrochimique. Cela permet de déterminer le potentiel de l'autre demi-cellule. Une méthode précise et pratique pour mesurer le potentiel d'une électrode isolément (potentiel absolu d'électrode) doit encore être développée.



Figure.III.1.Electrode de référence

Contre électrode ou électrode auxiliaire

Une électrode auxiliaire est une électrode spéciale utilisée dans une cellule électrochimique à trois électrodes pour l'analyse voltammétrique. Il peut également être utilisé dans d'autres réactions où un courant devrait circuler. L'électrode auxiliaire est utilisée pour établir une connexion avec l'électrolyte afin d'appliquer un courant à l'électrode de travail. Le matériau utilisé pour fabriquer une électrode auxiliaire doit être un matériau inerte comme le graphite ou un métal noble tel que l'or, le carbone ou le platine. Ceci est nécessaire pour l'empêcher de se dissoudre dans l'électrolyte. Une électrode auxiliaire est également connue en tant que contre-électrode [2].



Figure III.2. Electrode auxiliaire

Electrode de travail : sur laquelle on dépose notre membrane, c'est une électrode en platine.



Figure III.3. Electrode de travail

a) **Cellule de mesure** : elle est constituée d'un corps en verre muni de tubulures ou rodage, pour la mise en place des électrodes.



Figure III.4. Cellule de mesure

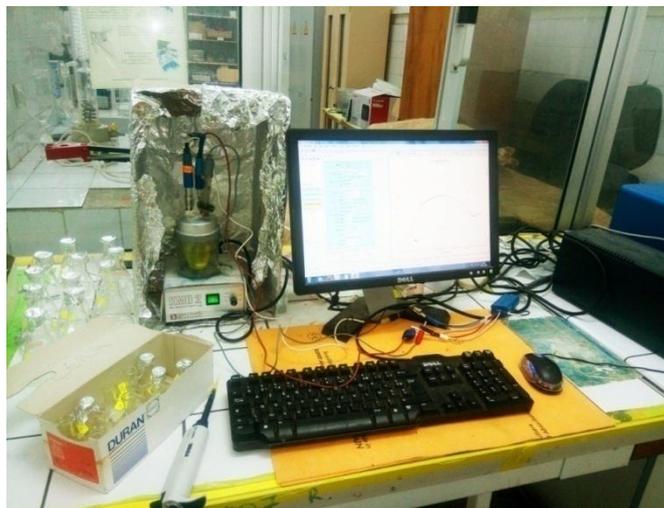


Figure III.5: Appareillages de mesures électrochimiques

b) Potentiostat-galvanostat

Le SP-300 est un potentiostat / galvanostat / FRA de qualité de recherche modulaire à la pointe de la technologie avec des spécifications remarquables. Le châssis SP-300 offre deux emplacements. Le premier est utilisé par un potentiostat. Le second reste disponible pour une option telle qu'une carte de potentiostat supplémentaire (standard ou EIS) pour atteindre une configuration de bipotentiostat. Il s'agit également d'un système à utilisateurs multiples puisque les cartes à deux canaux peuvent être utilisées indépendamment par deux utilisateurs différents. Un kit d'appoint peut également être sélectionné dans notre gamme de quatre boosters internes (1, 2, 4, 10 A) et branché dans la seconde fente.

Cet instrument est fourni avec le progiciel EC-Lab offrant un large éventail de techniques et d'applications[3].



Figure III.6. l'appareille de mesure EC - LAB

c) Un micro-ordinateur

Le pilotage et l'acquisition des paramètres expérimentaux et le traitement des données se fait par l'intermédiaire d'un logiciel l'EC lab.

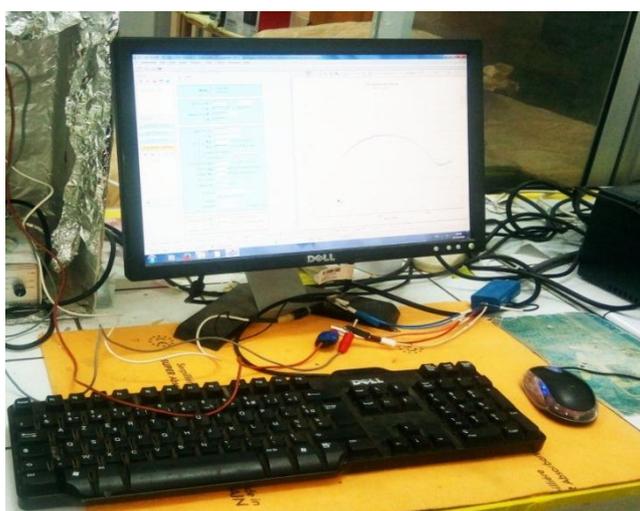


Figure III.7. Micro-ordinateur muni d'un logiciel EC Lab

III.1.2.PROTOCOLE OPERATOIRE

III.1.2.1.Réactifs

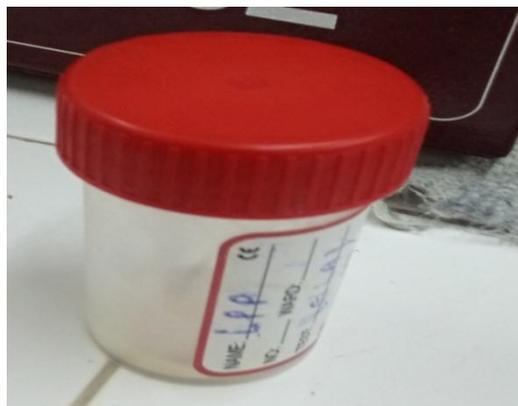
Le glutaraldéhyde est commercialisé par Sigma Aldrich (France) sous forme de solution aqueuse à 25% (m/v). Le glycérol (99% de pureté) commercialisé par Sigma Aldrich(France), l'acétone (99%), l'acide sulfurique (95-97%) et le peroxyde d'hydrogène (30% dans l'eau) ont été commercialisés par Aldrich et utilisés comme réactifs et aussi pour le prétraitement de l'électrode. NaH_2PO_4 (> 99% de pureté) et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (> 99% de pureté) ont été commercialisés par Sigma Aldrich (France) [4].

- Pour préparer 1000 ml de PBS, il faut mélanger :

Réactifs(mM)	Quantité(g/L)
NaCl à 137	8,0
KCl à 2,7	0,2
Na_2HPO_4 à 10	1,44
KH_2PO_4 à 1,76	0,24

- **Lipase de pancréas de porc (LPP)**

La lipase est un enzyme digestive sécrétée principalement par le pancréas de porc sous forme de poudre, commercialisé par sigma Chemical Co (St.Louis,Mo).

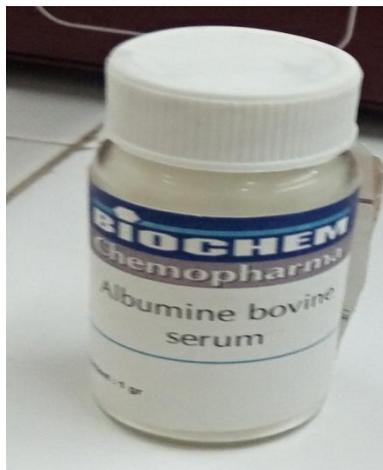


- **La protéine BSA**

L'albumine de sérum bovin ou (ASB) ((en)bovine serumalbumin), est l'une des protéines extraites du sérum de bovin largement utilisée en laboratoire de biologie. Cette albumine peut être utilisée comme agent diluant ou bloquant dans de nombreuses manipulations telles que l'ELISA (Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay), l'immunohistochimie et le Western blot.

Elle est également utilisée comme nutriment dans les cultures de cellules eucaryotes et microbiennes. Dans la technique de digestion par restriction enzymatique, l'ASB sert à la stabilisation de certaines enzymes de restriction pendant la digestion de l'ADN et évite l'adhésion de l'enzyme aux matériels de laboratoire. Elle a l'avantage de ne pas interférer avec les autres protéines, qui ne nécessitent pas sa présence.

Sa grande utilisation est due à sa stabilité, à son absence d'effets dans de nombreuses réactions biochimiques et à son faible coût ; en effet, elle est disponible très facilement et en grande quantité car elle provient du sang de bovin purifié qui est un sous-produit de l'industrie bovine [5]



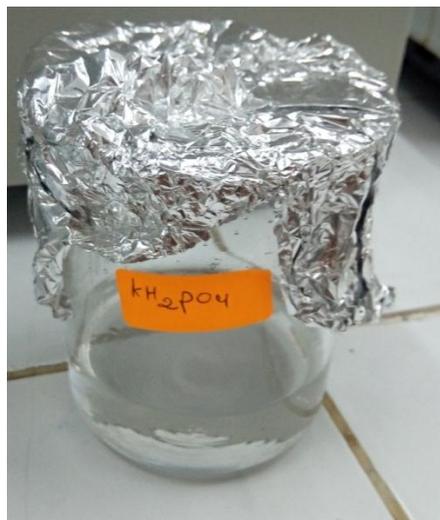
- **Le glycérol**

Le glycérol est un alcool naturellement présent dans l'organisme et constitué de trois atomes de carbone. Apporté par l'alimentation ou la dégradation du glucose, il a plusieurs fonctions, dont la première est d'être une source d'énergie. Le glycérol participe également à l'élaboration des corps gras et favorise l'élimination des selles. Il est encore présent sous forme d'esters, associé à des acides gras. Sous sa forme synthétique, il entre dans la

composition de certains médicaments, de produits cosmétiques, du vin. L'industrie l'utilise également en grande quantité. Utilisée pour fixer la membrane sur l'électrode[6].

- **Phosphate monopotassium :**

Il est utilisé comme engrais, il est un rôle secondaire, il déminéralise la membrane. Le phosphate monopotassique, MKP, (également le dihydrogénophosphate de potassium, KDP ou phosphate de potassium monobasique), KH_2PO_4 , est un sel soluble de potassium et l'ion dihydrogénophosphate. C'est une source de phosphore et de potassium. C'est aussi un agent de buffering. Lorsqu'il est utilisé dans des mélanges d'engrais avec de l'urée et des phosphates d'ammonium, il minimise les fuites d'ammoniac en maintenant le pH à un niveau bas et fiable. Il est utilisé comme engrais, il est un rôle secondaire, il déminéralise la membrane [7].



III.1.2.2. Nettoyage des électrodes de platine

Pour le nettoyage du dépôt de la membrane, un traitement de la surface de l'électrode a été exécuté avec une solution de piranha, cette solution est composée d'un mélange de 2/3 d'acide sulfurique concentré (96%), H_2SO_4 , et de 1/3 d'eau oxygénée, H_2O_2 . L'échantillon est laissé 1 minute dans la solution. Après ce traitement, l'électrode est rincée à l'eau ultra pure et séchée sous un flux d'air.

III.1.2.3. Préparation de la membrane

La membrane doit avoir des caractéristiques en vue de leur moyen d'analyse

- ✓ Stable.
- ✓ Poreuse.
- ✓ Suffisamment solide.

Le protocole opératoire adopté dans cette partie d'étude se présente comme suit :

- On pèse 5 mg de BSA avec 5 mg de LPP et on ajoute 10 μL de glycérol et 90 μL de KH_2PO_4 . On mélange bien les 4 composés jusqu'à avoir une solution homogène (membrane enzymatique) et à la fin, on dépose sur les deux côtés de l'électrode de platine 1 μL de la membrane préparée.
- On laisse notre électrode sécher presque 30 min.
- Après le séchage, on la met dans le dessiccateur ou elle est exposée à la vapeur de la solution de glutaraldhyde pendant 30 min.
- Après cela, on laisse la membrane sécher encore pendant 30 min à l'air libre et finalement on l'immerge dans le PBS (Tampon phosphate saline) et la met dans le réfrigérateur à $T=4^\circ\text{C}$ durant une nuit.

III.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.2.1. EFFET DE LA TENSION DE POLARISATION

L'étude du comportement d'une électrode de type ISE s'effectue en appliquant au système une contrainte sous forme d'une variation sinusoïdale de différence de potentiel électrique ; de fréquence $f=\omega/2\pi$ entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (potentiel supposé fixe).

Premièrement, nous avons cherché la tension de polarisation nécessaire qu'il faut imposer à notre système en vue d'obtenir la plus faible valeur d'impédance possible.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure suivante :

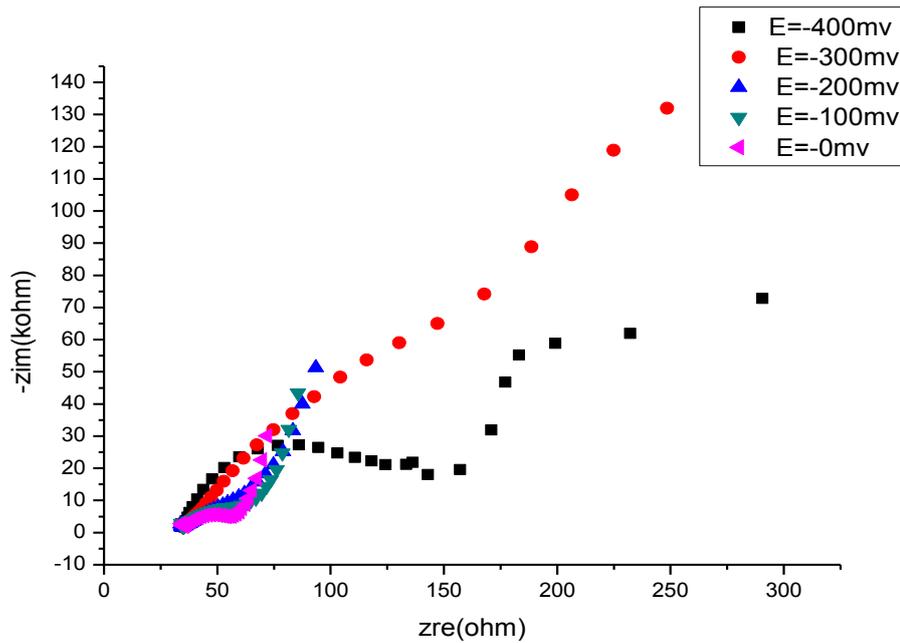


Figure III.8 : Spectres d'impédance dans le plan de Nyquist pour des polarisations allant de -400mV à 0 mV.

Ces diagrammes représentent la réponse de notre biocapteur à différentes tensions de polarisation imposées dans le plan de Nyquist. On constate que la meilleure réponse se manifeste pour une polarisation de **0 mV**, avec l'apparition du demi-cercle de Nyquist.

III.2.2. EFFET DE LA CONCENTRATION DE PARABÈNE

Une fois qu'on a assuré la stabilisation de la réponse des biocapteurs élaborés à différentes masses d'enzyme, nous avons alors abordé l'étude de l'effet de la concentration de parabène sur la réponse des biocapteurs. Les variations croissantes de concentration en substance cible sont assurées par des injections successives de concentration variant de 10^{-14} M. à 10^{-3} M de PP. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS.

L'ensemble des résultats obtenus sont représentés sur la (Figure. III.11) qui suit :

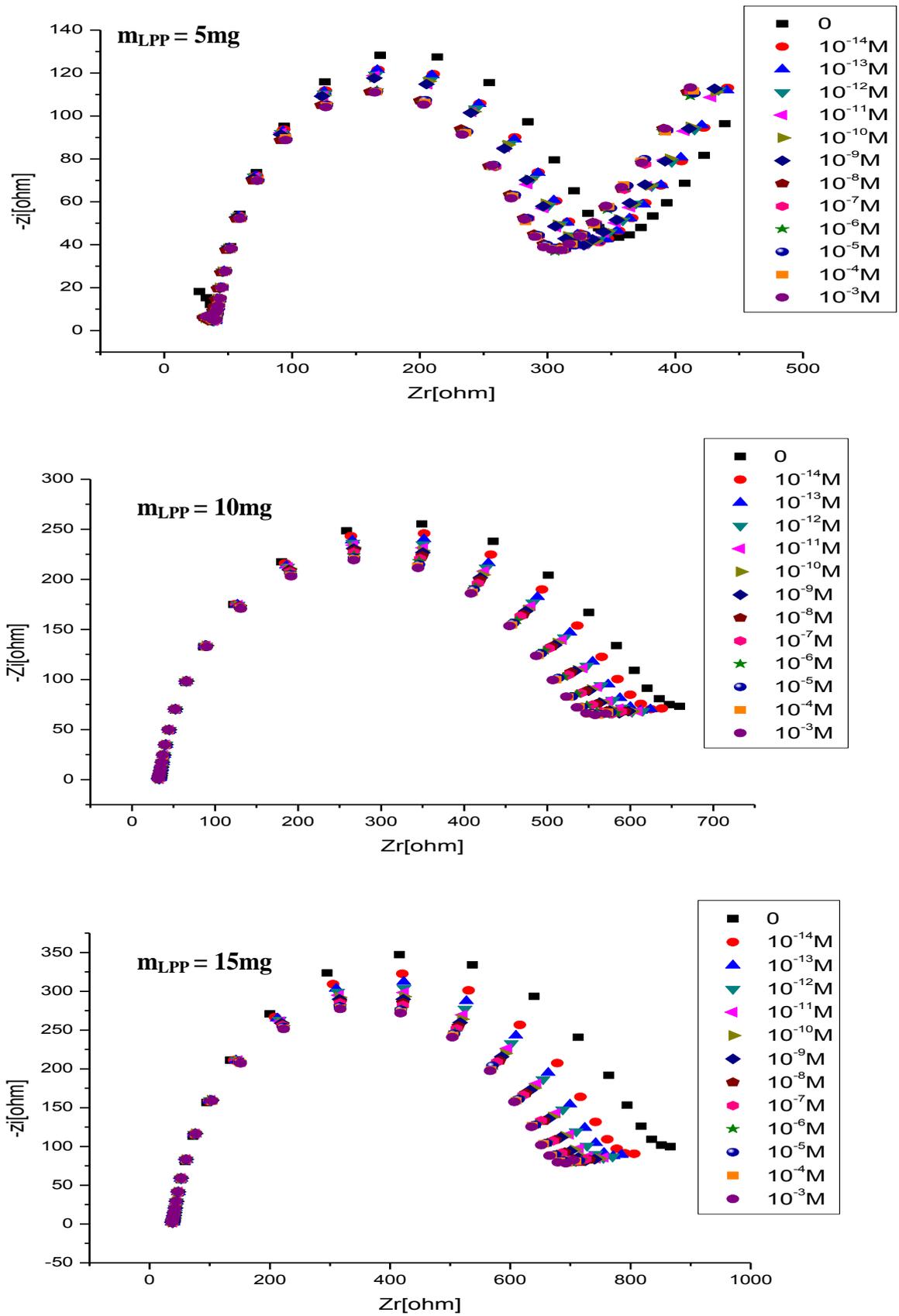


Figure III.9. Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes

concentrations de parabène pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différentes valeurs de masse d' l'enzyme.

Ces digrammes ont été analysés en utilisant le logiciel ECLab. Nous avons obtenu les meilleurs fitted avec une variance $\chi^2 \approx 10^{-3}$, pour une gamme de fréquences allant de 100 mHz à 100 kHz. Les valeurs des propriétés électriques tels que la résistance de l'électrolyte (R_s) et la résistance de transfert de charge R_{tc} sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau III.1: Paramètres de simulation d'une électrode du platine modifiée à l'aide d'une couche enzymatique à différentes masses d'enzyme.

m_{LPP} (mg)	5													
[PP] (M)	0	10^{-14}	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	
R_s (ohm)	42,90	41,48	41,40	41,45	41,40	41,59	41,30	41,40	41,10	40,59	40,80	40,75	40,59	
R_{tc} (ohm)	400	371	368,5	361	358	354,9	357	353	348,5	345	342,5	339,5	340	
$\chi^2 * 10^3$	3	3	3	3	3	6	5	8	6	6	3	2	5	
m_{LPP} (mg)	10													
R_s (ohm)	33,73	33,66	33,45	33,29	33,15	33,02	32,94	32,83	32,69	32,57	32,44	32,37	32,30	
R_{tc} (ohm)	583,4	559,4	547,9	539,4	534	526,8	522,8	518,4	513,3	507,3	500,9	497,1	494,1	
$\chi^2 * 10^3$	9	9	9	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	
m_{LPP} (mg)	15													
R_s	38,72	38,59	38,56	38,45	38,38	38,32	38,28	38,23	38,05	37,99	37,96	37,96	37,90	
R_{tc} (ohm)	786,7	730,0	708,7	693,6	680,6	672,1	664,5	656,2	651,1	642,1	640,1	634,7	631,8	
$\chi^2 * 10^3$	11,9	11,5	11,5	11,6	11,7	11,6	11,4	11,7	11,3	11,2	11,4	11,3	11,4	

D'après ce tableau, nous remarquons que les valeurs de la résistance de transfert de charge les plus faibles sont notées pour une masse de l'enzyme égale à 5 mg indique un bon échange à l'interface. Et pour mieux comparer le comportement de ces biocapteurs, il a été jugé utile de tracer leurs courbes de calibration.

III.2.3.COURBE DE CALIBRATION

Afin d'extraire les caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés tels que la gamme de linéarité, la sensibilité et la limite de détection, nous avons tracé la variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration en propylparabène.

Cette variation est calculée à l'aide de l'équation :

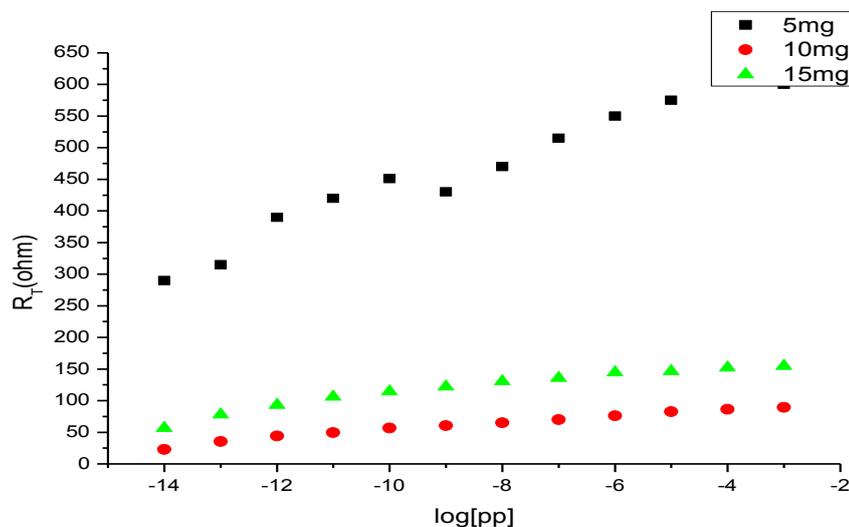
$$\Delta R_T = R_T^{C=0} - R_T^C$$

Où $R_T^{C=0}$ et R_T^C représente la résistance du transfert de charge de la biomembrane avant et après l'injection du propylparabène, respectivement. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau (III.2) : Evolution de R_T en fonction de la concentration du PP.

m_{LPP} (mg)	5mg											
Log[PP]	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3
ΔR_T (ohm)	290	315	390	420	451	430	470	515	550	575	605	600
m_{LPP} (mg)	10mg											
ΔR_T (ohm)	22,8	35,5	44	49,4	56,6	60,6	65	70,1	76,1	82,5	86,3	89,3
m_{LPP} (mg)	15mg											
ΔR_T (ohm)	56,7	78	93,1	106 ,1	114,6	122,2	130,5	135,6	144,6	146,6	152	154,9

Et afin de mieux comparer les résultats obtenus, nous avons préféré de les présentés dans le même graphe (figure.III.10).



Figure

III.10 : Courbes de calibration à différentes masses de LPP.

A partir de ces courbes de calibration, on a pu déterminer les caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés et qui sont récapitulés dans le tableau (III.3).

Tableau (III.3) : Caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés.

Masse de LPP (mg)	5	10	15
Sensibilité (Ohm.l/mole)	28,66	5,72	8,34
Coefficient de corrélation (r)	0,97	0,97	0,93
Limite de détection (M)	10^{-14}	10^{-14}	10^{-14}
Gamme de linéarité (M)	10^{-14} - 10^{-3}	10^{-14} - 10^{-3}	10^{-14} - 10^{-3}

La remarque qu'on peut dégager à partir de ces résultats, est que le biocapteur élaboré présence une meilleure réponse pour une masse d'enzyme (LPP) égale à 5 mg d'où on note une sensibilité la plus élevée de l'ordre 28,66 (Ohm.l/mole).

III.2.4.CARACTERISATION DE L'ELECTRODE NUE ET MODIFIEE

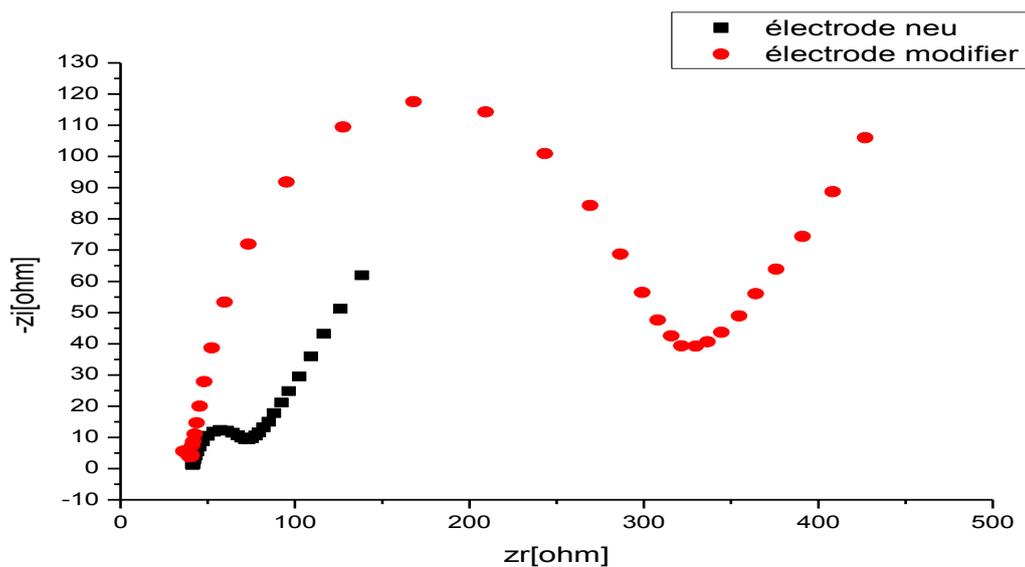


Figure III.11. Diagrammes de Nyquist pour une électrode du platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus à 0mV/Ag/AgCl . Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz.

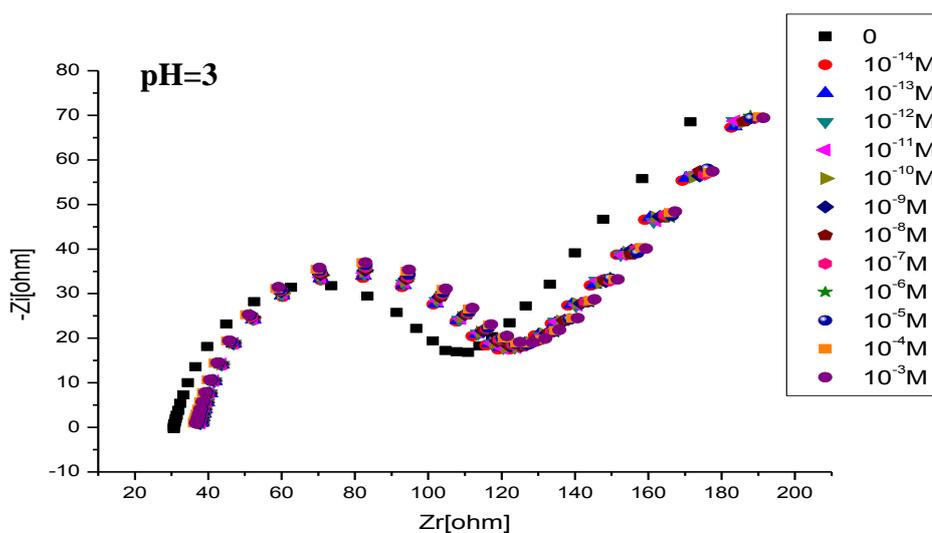
La figure III.11 présente un demi-cercle, caractéristique d'une résistance en parallèle avec une capacité. Le diamètre du demi-cercle de Nyquist augmente nettement après la formation de la couche enzymatique. Cette augmentation de la résistance (R_{tc}) est expliquée par la diminution de transfert d'électrons à l'interface électrode/ électrolyte (Il y a ralentissement du transfert de charge à la surface de l'électrode de travail (couche bloquante)).

III.2.5.Effet de pH sur la réponse de biocapteur enzymatique

Il est bien évident que l'enzyme n'était active que dans une certaine gamme de pH. Le choix d'un pH optimal pour la membrane enzymatique permet une meilleure activité catalytique de l'enzyme [24, 26, 27].

Au cours de cette étude, on va optimiser la valeur optimale de pH du milieu d'étude. La composition de la membrane a été optimisée et nous avons obtenus les valeurs suivantes : 5%(w/w) lipase de pancréas de porc (LPP) 5% (w/w) Albumine de bovine sérique (BSA) solubilisé dans 90 μ L d'un tampon à 20 mM de KH_2PO_4 de pH 7,4 et 10% de glycérol en masse.

La figure III.12 montre les spectres d'impédance du système Pt/LPP-BSA obtenu à différents pH du milieu pour différentes concentrations en propylparabène.



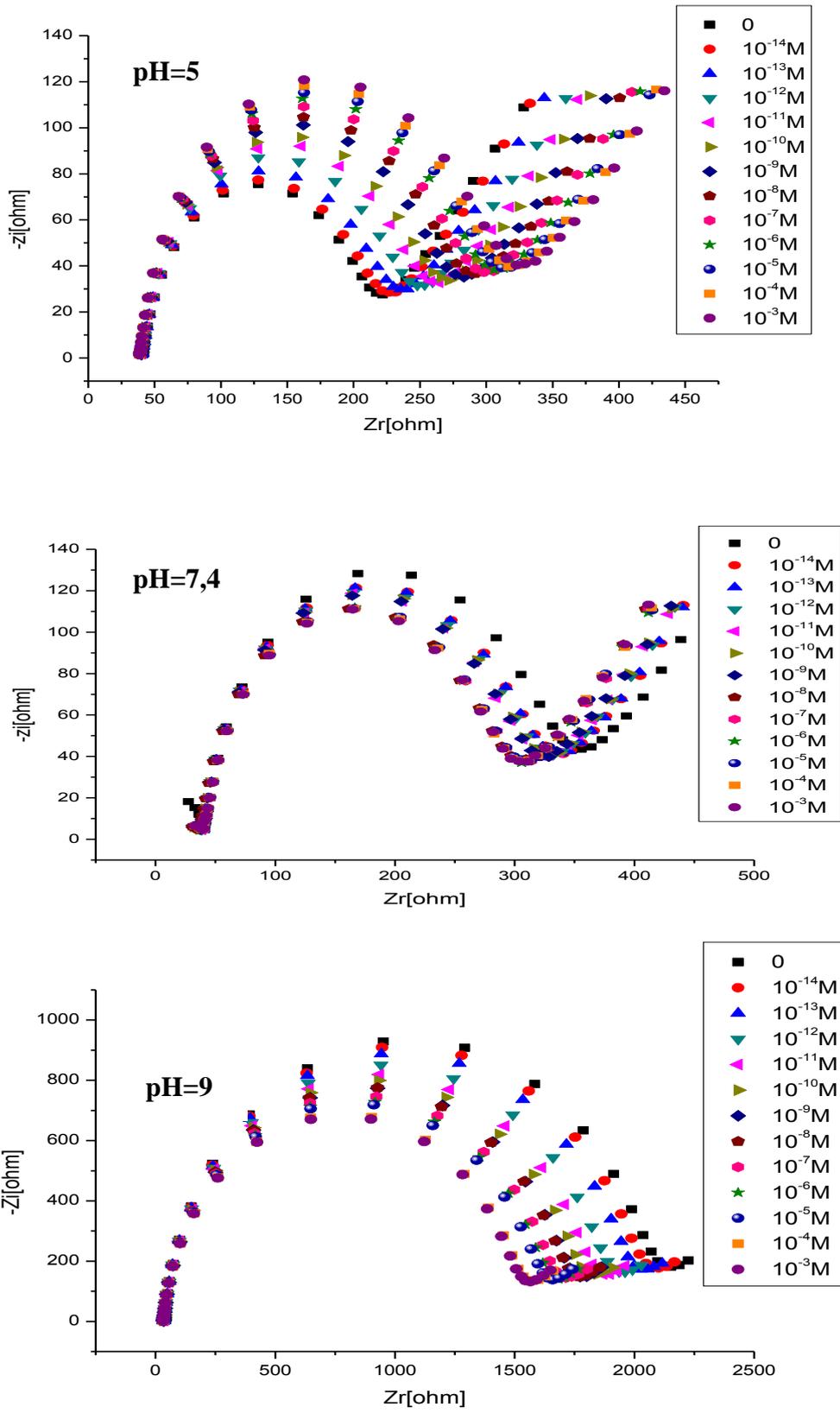


Figure III.12 : Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de parabène pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique

obtenus à différentes valeurs de pH du milieu. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS

A partir de ces spectres, on a pu déterminer les propriétés électriques des biocapteurs élaborés et qui sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau III.4: Paramètres de simulation d'une électrode du platine modifiée à l'aide d'une couche enzymatique à différents pH du milieu.

pH	3												
[PP] (M)	0	10⁻¹⁴	10⁻¹³	10⁻¹²	10⁻¹¹	10⁻¹⁰	10⁻⁹	10⁻⁸	10⁻⁷	10⁻⁶	10⁻⁵	10⁻⁴	10⁻³
R_s(ohm)	30,85	38,22	38,07	37,99	37,91	37,8	37,65	37,47	37,38	37,23	37,15	36,28	36,84
R_{tc}(ohm)	371,2	261,2	256,2	231,2	236,6	221	207	206	199	198,7	198,4	193,2	186,2
χ² * 10³	1	1	1	1	1	1	1	1	1	99	1	1	1
pH	5												
R_s(ohm)	41,29	40,83	40,66	40,4	40,2	39,81	39,89	39,65	39,27	38,9	38,92	38,75	38,62
R_{tc}(ohm)	170,2	165	156,3	142,9	131,9	123,9	112,7	104,1	96,3	88,2	82,4	77,1	71,3
χ² * 10³	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
pH	7,4												
R_s(ohm)	42,9	41,48	34,85	35,30	34,85	34,50	34,25	33,95	34,10	40,59	40,80	40,75	40,59
R_{tc}(ohm)	400	371	368,5	361	358	354,9	357	353	348,5	345	342,5	339,5	3400
χ² * 10³	3	3	3	3	3	6	5	8	6	6	3	2	5
pH	9												
R_s(ohm)	36,38	34,93	34,93	34,63	34,32	34,20	33,92	33,82	33,66	33,52	33,45	33,28	33,13
R_{tc}(ohm)	2026	1980	1931	1844	1780	1733	1686	1681	1627	1594	1573	1492	1483
χ² * 10³	7	6	7	7	7	7	8	8	8	8	8	4	4

A partir des résultats obtenus, nous avons calculé les variations de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration du propylparabène. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau (III.5) : Evolution de ΔR_T en fonction de la concentration du PP.

pH	3											
Log[PP](M)	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3
ΔR_T (ohm)	110	115	140	134,6	150,2	164,2	165,2	172,2	172,5	172,8	178	185
pH	5											
ΔR_T (ohm)	5,2	13,9	27,3	38,3	46,3	57,5	66,1	73,9	82	87,8	93,1	98,9
pH	9											
ΔR_T (ohm)	46	95	182	246	293	340	345	399	432	453	534	543

Afin de mieux exploiter les résultats obtenus, nous avons préféré de les présentés sous forme des courbes de la concentration de parabène et à différents pH (figure III .13).

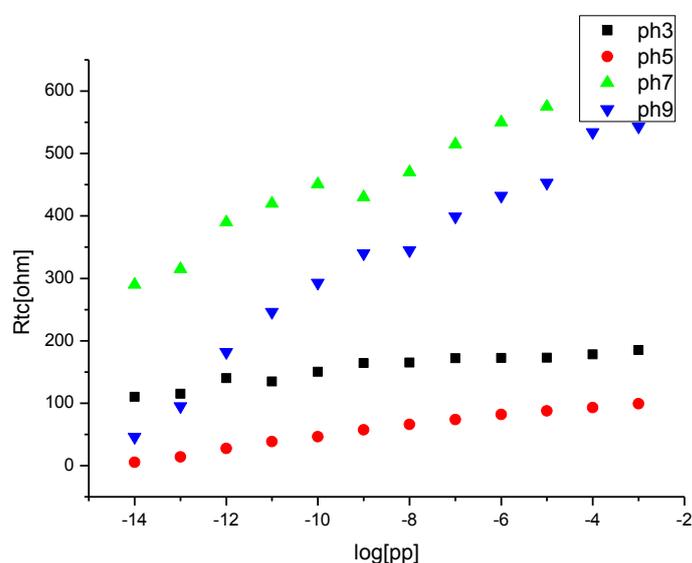


Figure III.13. Courbes de calibration présentant l'influence du pH du milieu sur la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations de parabène.

Grace à ces courbes, on a pu calculer les caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés à différents pH du milieu.

Tableau (III.6) : Caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés à différents pH.

pH	3	5	7,4	9
Sensibilité (Ohm.l/mole)	6,57	8,66	28,66	43,94
Coefficient de corrélation (r)	0,90	0,99	0,97	0,97
Limite de détection(M)	10^{-14}	10^{-14}	10^{-14}	10^{-14}

La figure.III.13 montre bien la variation de la réponse des biocapteurs élaborés à différents valeurs de pH du milieu d'étude. D'après ces figures, on peut voir que la réponse optimale du biocapteur est observée pour un pH basique 9 [4].

III.2.6.Effet de l'injection du Tween 20

L'étude de la sélectivité du biocapteur à été réalisée en absence du propylparabène et en faisant varier que la concentration de l'interfèrent (Tween 20), dans le but de comparer leurs courbes de calibrations.

Concernant la préparation de la membrane et les conditions opératoires, nous avons gardé les mêmes conditions utilisées afin de détecter le PP.

Le tween 20 est un agent tensio-actif non ionique et un émulsifiant dérivé du sorbitol. Il est un liquide soluble dans l'eau, utilisé comme agent dispersant et solubilisant pour mélanger des parfums et des huiles essentiels avec différentes bases (shampooing, gels douche, crèmes, etc.).

Propriétés chimiques

N°CAS : 9005-64-5.

Forme physique : visqueuse liquide.

Formule moléculaire : $C_{58}H_{114}O_{26}$

Masse molaire : 1227,54 g/mol.

Masse volumique : 1,1 g/cm³.

Synonyme : polysorbate 20, polyoxyethylene-20- sorbitin monolaurate et polyoxyethylene sorbitan monolaurate.

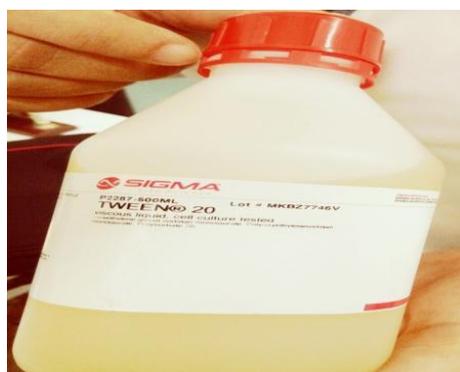


Figure.III.14.Tween 20

Les spectres d'impédance obtenus pour différentes concentrations en Tween 20 sont présentés sur la **(Figure III.15)** et les paramètres électrochimiques de ces courbes sont résumés dans le **Tableau (III.7)**.

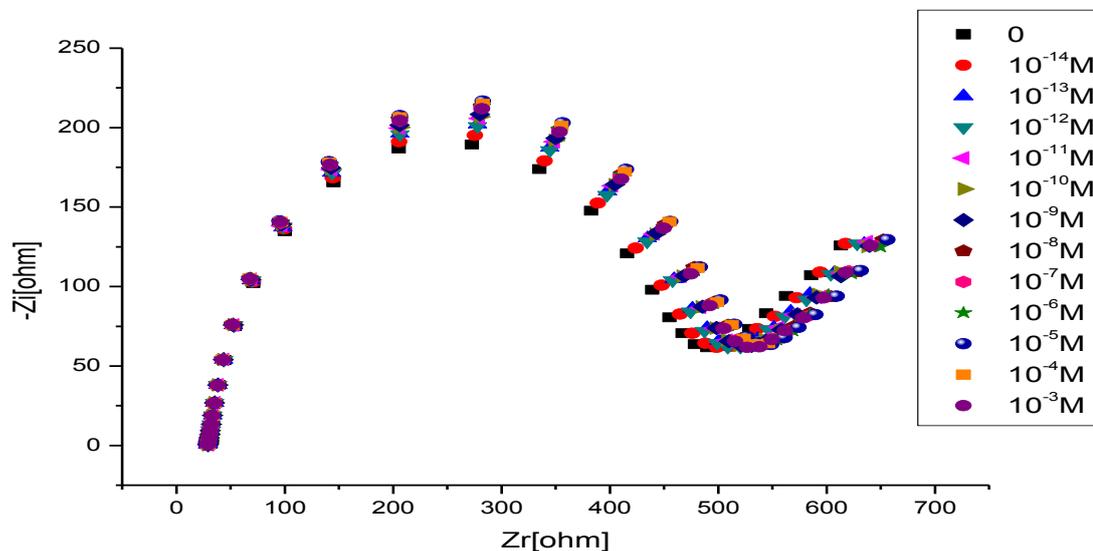


Figure. III.15. Variation de l'impédance suite à l'injection de différentes concentrations de Tween 20.

Tableau (III.7). Paramètres électriques du biocapteur élaboré suite à l'injection du Tween 20.

[Tween20] (M)	0	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
R_s(ohm)	29,72	29,66	29,63	29,60	29,62	29,54	29,61	29,61	29,68	29,72	29,72	29,78	29,77
R_{tc}(ohm)	435,3	425,9	412,6	415,1	405,9	404,6	403,2	392,3	395,4	393,1	387,1	401,0	397,3
χ² * 10³	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4
Log[Tween20](M)		-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3
ΔR_T (ohm)		9,4	22,7	20,2	29,4	30,7	32,1	43	39,9	42,2	48,2	34,3	38

Afin d'apprécier l'effet de la présence de l'interfèrent (Tween 20) sur la réponse du biocapteur élaboré afin de détecter le propylparabène, nous avons superposé les deux courbes de calibration dans le même graphe.

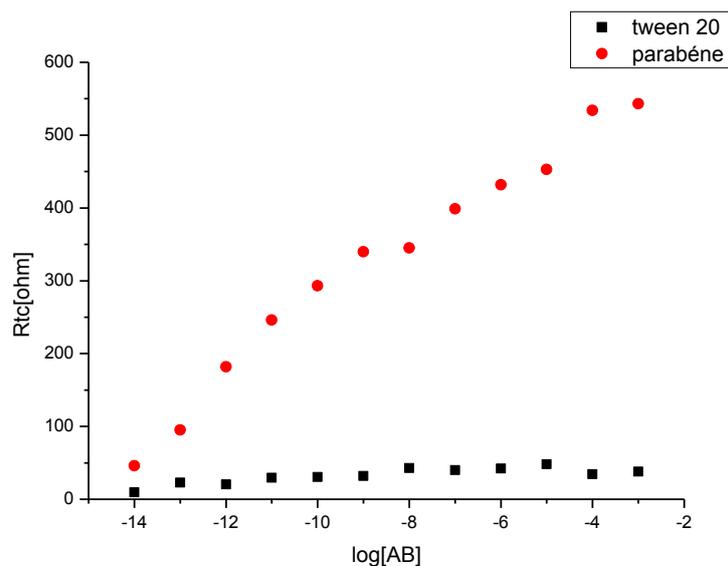


Figure. III.16. Courbes de calibration

Tableau (III.8) : Caractéristiques analytiques des biocapteurs élaborés..

Substance	Propylparabène	Tween20
Sensibilité (Ohm.l/mole)	43.94	2,51
Coefficient de corrélation (r)	0,97	0,66
Limite de détection(M)	10^{-14}	10^{-14}

D'après la courbe, il est clair que le Tween 20 n'est pas un élément gênant pour la détection de parabène car leur courbe de calibration est placée en dessous de celle de parabène avec un écart important et une faible sensibilité.

CONCLUSION

Au cours de cette étude nous avons présenté les résultats expérimentaux pour le développement d'un biocapteur incorporant la lipase pancréas du porc (LPP) comme enzyme pour la détection de propylparabène.

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche sont :

- Masse de l'enzyme $m=5$ mg
- Masse de BSA $m=5$ mg
- pH de milieu = 9
- Limite de détection = 10^{-14} M
- Polarisation $E= 0$ mV.
- Gamme de fréquence : 100mHZ-100kHz.

Références bibliographiques :

- [1] <https://www.cormettestingsystems.com/product/electrochemical-tools>
- [2] <https://www.origalys.com/auxiliaire-contre-electrode-c102x2925220>
- [3] <http://www.corrtest.com.cn/producten/dhxgcz/t1/2016/0601/379>.
- [4] souad baali “ immobilisation d enzyme dans des membranes polymérique en vue d’élaborer des capteurs biologique pour la détection des polluants organique “, thèse de doctorat, universitebadjimokhtar-annaba, 2015
- [5] https://fr.wikipedia.org/wiki/Albumine_de_sérum_bovi
- [6] www.chphplefomiqcs.com/ For details please send email to linchemical@chphplefomiqcs.com
- [7] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5462222, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5462222> (accessed June 20, 2018).

Conclusion générale

La détection de substances telles que les parabènes en milieu aquatique est plutôt récente. D'abord considérées comme issus des produits de soins corporels et analysées dans leur globalité, ces molécules sont maintenant analysées individuellement. La détection des parabènes dans l'eau a bénéficié des progrès des méthodes de recherche et des techniques électrochimiques. Celles-ci sont par ailleurs en constante évolution.

De nos jours, les besoins en biocapteurs visant des applications septiques sont réels. Et c'est pour répondre à certains de ces besoins que dans ce travail nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur, en utilisant des transducteurs impédimétrique pour détecter le propylparaben.

Ces biocapteur présentent de grand avantages : simplification, haute sensibilité, temps de réponse rapide, petite taille, grande précision des mesures, de plus, il est possible d'obtenir des dispositifs jetables, ainsi parmi les espèces chimiques couramment tester en suit dans les milieux aquatiques, le taux de parabène qui est souvent responsable de mauvaise classe d'une eau. C'est pour cette raison que l'objet de cette recherche était de réaliser un biocapteur sensible aux parabènes dans les milieux aqueux.

Au cours de cette étude, on a caractérisé notre biocapteur avec ces principales caractéristiques :

- une masse d'enzyme la lipase de pancréas de porc (LPP) est de 5 mg.
- Masse de BSA = 5 mg.
- Le temps d'exposition de la biomembrane à la vapeur de glutaraldéhyde est de l'ordre de 30 min.
- la valeur optimale de pH du milieu est égale à 9.
- Le sel de fond : est le PBS.

Et sous les conditions opératoires (tension de polarisation $E = 0$ mV et gamme de fréquence allant de 100 mHz à 100kHz), on a pu élaborer un biocapteur impédimétrique qui présente les caractéristiques suivantes :

- .Gamme de linéarité allant de 10^{-14} M à 10^{-3} M.
- limite de détection de l'ordre de 10^{-14} M.
- sensibilité de l'ordre de 43,94 (Ohm.l/mole).

A la fin de ce travail, nous avons essayé d'étudier la sélectivité de ce biocapteur élaboré vis-à-vis le tween 20. Cette étude a montré que la présence du Tween 20 ne gêne pas le dosage de propylparabène en milieux aqueux

La présente étude ne serait être complétée. De nombreuses recherches restent à mener pour découvrir d'autres informations essentielles qui influent sur la qualité des biocapteurs à savoir : tester d'autres éléments interférents et la durée de vie.