



THESE EN CO-TUTELLE

entre

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR
ANNABA

&

UNIVERSITE CLAUDE
BERNARD LYON1

Présentée et soutenue publiquement le 16 /10/2015

Par

ZEHANI Nedjla

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Claude Bernard Lyon1 et l'université de Badji Mokhtar Annaba

Spécialité : Chimie

***Etude et développement de biocapteurs
électrochimiques pour la détection de
polluants dans un milieu aqueux***

Co-directrice de thèse : **JAFFREZIC-RENAULT Nicole** Directeur de recherche CNRS Université de Lyon1

Co-directeur de thèse : **KHERRAT Rochdi** Professeur de l'Université de Annaba

Membres du Jury :

Président : LEONARD Didier Professeur à l'université Claude Bernard – Lyon1

Rapporteurs : PERROT Hubert Directeur de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie

BENOUNIS Messaoud Maître de conférences, HDR Centre Universitaire de Khenchela

Examineurs : HAMDAOUI Oualid Professeur à l'université Badji Mokhtar- Annaba

Résumé

Les biocapteurs sont des moyens d'analyse en plein essor à la fois rapides, sélectifs et peu coûteux applicables à des domaines extrêmement variés (environnement, santé, agroalimentaire,...). Dans ce type d'outil, un élément sensible de nature biologique (anticorps, enzyme, microorganisme, ADN...) doté d'un pouvoir de reconnaissance pour un analyte ou un groupe d'analytes est associé à un transducteur pouvant être de type électrochimique, optique ou thermique.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement de différents biocapteurs, en se basant à l'immobilisation d'enzymes sur des microélectrodes en vue de la détection électrochimique d'analytes d'intérêt dans le domaine environnemental. Nous avons montré les potentialités d'application de deux biocapteurs conductimétrique et impédimétrique à base de lipase *Candida Rugosa* pour la détection directe et rapide des pesticides organophosphorés. Nous avons cherché à mieux comprendre le fonctionnement des biocapteurs et optimisé le procédé d'immobilisation des enzymes ainsi que différents paramètres de mesure afin de maximiser les performances analytiques des outils développés. Nous avons également élaboré un biocapteur impédimétrique pour une détermination très sensible de la phospholipase A₂ en utilisant les nanoparticules d'or afin de renforcer la conductivité électrique. Enfin, nous avons développé un biocapteur de tyrosinase pour la détection du Bisphénol A, en se basant sur la modification électrochimique des électrodes de diamant dopé qui possèdent des propriétés électriques remarquables et uniques, avec l'ajout des nanotubes de carbones multi-feuillet, ce qui permet d'améliorer des performances analytiques du biocapteur, en particulier sa limite de détection et sa stabilité. Les biocapteurs à base de lipase et de tyrosinase ont été appliqués avec succès à la quantification des composés organophosphorés et du bisphénol A respectivement dans plusieurs échantillons d'eaux réels.

Mots-clés : Biocapteur, lipase, tyrosinase, phospholipase A₂, impédance, conductimétrie, voltammétrie cyclique.

Abstract

A biosensor is an analytical device, used for the detection of an analyte, that combines a biological component so-called a receptor (e.g. enzyme, antibody, DNA, microorganism) to a physical transducer (e.g. electrochemical, optical or thermal). In last decade, biosensors are quite promising tools since they are rapid, selective and cost effective, with an increasing interest for their application in various fields (e.g environment, food, health).

In this work, we developed different biosensors based on immobilized enzymes onto microelectrodes in view of electrochemical detection. First, we demonstrated the potentialities of conductometric and impedimetric biosensors based on lipase from *Candida Rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides. In order to enhance the analytical performances of the developed devices, we tried to optimize enzyme immobilization as well as several operational parameters. We also elaborated an impedimetric biosensor for a sensitive determination of phospholipase A₂ activity. Finally, a tyrosinase biosensor was developed for ultra-sensitive detection of Bisphenol A, based on the unique proprieties of boron doped diamond electrodes and taking advantage the use of multi walled carbon naotubes to improve the stability and detection limit of biosensor. We also demonstrated the applicability of both biosensors based on lipase and tyrosinase for the detection of organophosphate pesticides and bisphenol A in river water.

Keywords: biosensor, lipase, tyrosinase, phospholipase A₂, conductometry, impedance spectroscopy, cyclic voltammetry.

Sommaire

Sommaire	I
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI
Introduction générale	1

<p style="text-align: center;"><i>Chapitre I</i> Etude bibliographique</p>

I.1 Généralités.....	3
I.1.1 Historique.....	3
I.1.2 Définition d'un biocapteur.....	3
I.1.3 Caractéristiques analytiques de biocapteur.....	4
I.2. Classification des biocapteurs.....	6
I.2.1 Classification des biocapteurs par le mode de détection.....	6
I.2.1.1 Transduction électrochimique.....	7
I.2.2 Classification des biocapteurs selon la nature de biorécepteur	21
I.3 les enzymes.....	21
I.3.1 Structure générale	21
I.3.2 Le site actif.....	22
I.3.3 Les biocapteurs enzymatiques.....	23
I.3.4 Mécanisme réactionnel et cinétique enzymatique.....	25
I.3.5 Facteurs influençant l'activité enzymatique.....	25
I.3.6 Les différentes techniques d'immobilisation d'enzyme sur la surface.....	30
du transducteur	30
I.4 la modification de la surface d'électrode par des monocouches auto assemblées et des sels de diazonium	34
I.4.1 Les monocouches auto assemblés (SAMs) ; modification chimique de la surface...34	
I.4.2 Les sels de diazonium ; modification électrochimique de la surface.....	35
I.5 L'ajout des nanomatériaux pour le développement des biocapteurs.....	36
I.5.1 Intégration des nanoparticules dans les biocapteurs.....	37
I.5.2 L'utilisation des nanotubes de carbone	38
Références.....	41

Chapitre II

Développement des biocapteurs pour la détection des pesticides organophosphorés

Partie A

Développement d'un biocapteur enzymatique pour la détection des pesticides organophosphorés – vers une meilleure compréhension des paramètres clés influant les performances d'un biocapteur

II.1 Introduction	46
II.2 Matériel et méthodes	48
II.2.1 Réactifs.....	48
II.2.2 le transducteur.....	49
II.2.3 Préparation du biocapteur	50
II.2.4 Mésures conductimétriques	50
II.3 Résultats et discussions	52
II.3.1 Caractérisation électrochimique par la spectroscopie d'admittance	52
II.3.2 Optimisation des paramètres d'opération	53
II.3.2.1 Quantité de lipase	53
II.3.2.2 Influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur.....	54
II.3.2.3 Influence de pH du milieu.....	55
II.3.2.4 Influence de la concentration en tampon	56
II.3.3 les caractéristiques analytiques.....	57
II.3.3.1 Temps de réponse.....	57
II.3.3.2 Gammes linéaires et limite de détection	58
II.3.3.3 Reproductibilité et stabilité.....	61
II.3.3.5 Sélectivité	62
II.3.4 Application à des échantillons d'eau réels.....	62
II.4 Conclusion	63

Partie B

Développement d'un biocapteur impédimétrique à base des SAMs pour la détection du diazinon en milieux aqueux : Etude comparative entre la lipase de *Candida Rugosa* et la lipase du pancréas de porc.

II.1 Introduction	64
II.2 Matériels et méthodes	65

II.2.1 Réactifs.....	65
II.2.2 le transducteur	65
II.2.3 Mesures électrochimiques	65
II.2.4 Protocole de nettoyage	68
II.3 Préparation des biocapteurs	68
II.3.1 fonctionnalisation de l'électrode d'or.....	68
II.3.2 Immobilisation d'enzyme	68
II.4 Résultats et Discussions	69
II.4.1 Caractérisation impédimétrique	69
II.4.2 Réponse du biocapteur enzymatique	70
II.4.3 Linéarité, limite de détection	71
II.5 Conclusion	73
Références.....	74

Chapitre III

Développement d'un biocapteur impédimétrique pour la détermination de phospholipase A₂

III.1. Introduction	77
III.2 Matériels et méthodes.....	78
III.2.1 Réactifs.....	78
III.2.2 le transducteur.....	78
III.2.3 Nettoyage de l'électrode.	79
III.2.4 Elaboration des biocapteurs.....	79
III.2.4 Mesures électrochimiques	79
III.3 Résultats et discussion.....	80
III.3.1 Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	80
III.3.2 Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique.....	81
III.3.2 Influence de la quantité d'enzyme fixée sur la réponse des biocapteurs.....	81
III.3.3 Caractéristiques analytiques.....	82
III.3.3.1 Linéarité, limite de détection.....	82
III.3.3.2 Injection de Cobra Naja mossambica mossambica.....	85
III.4 Conclusion.....	86
Références	87

Chapitre IV

Développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection de Bisphénol A

IV.I Introduction	88
IV.2 Matériels et méthodes	90

IV.2.1 Réactifs.....	90
IV.2.2 le transducteur.....	90
IV.2.3 Mesures électrochimique.....	91
IV.2.4 Caractérisation de surface par la microscopie à force atomique (AFM).....	92
IV.2.5 Préparation de biocapteur	92
IV.2.5.1 Nettoyage de l'électrode BDD.....	92
IV.2.6.2 Fonctionnalisation de la surface de BDD par la génération <i>in-situ</i> du sel diazonium.....	92
IV.3 Résultats et Discussions.....	93
IV.3.1 Réduction électrochimique du sel de diazonium.....	94
IV.3.2 Caractérisation électrochimique.....	94
IV.3.2.1 Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	94
IV.3.2.2 Caractérisation impédimétrique.....	95
IV.3.2.3 Caractérisation par microscopie à force atomique.....	96
IV.3.3 Caractéristiques analytiques.....	97
IV.3.3.1 Gamme de linéarité, limite de détection et reproductibilité.....	97
IV.3.3.2 Sélectivité et stabilité.....	99
IV.3.4 Détermination du Bisphénol A dans des échantillons d'eaux dopés.....	101
IV. 4 Conclusion	102
Références.....	103
Conclusion générale et perspectives.....	106
Annexe.....	107

Liste des figures

Fig I.1 :	Schéma du principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	4
Fig I.2 :	Courbe d'étalonnage d'un capteur.....	4
Fig I.3 :	domaine de linéarité du capteur.....	5
Fig I.4 :	Classification des biocapteurs.....	6
Fig I.5 :	Schéma de principe de la potentiométrie.....	8
Fig I.6 :	Schéma de principe de la conductimétrie.....	10
Fig I.7 :	Schéma de principe de l'ampérométrie.....	12
Fig I.8 :	Schéma d'une fonction de transfert.....	13
Fig I.9 :	Schéma du principe de l'impédancemétrie.....	14
Fig I.10 :	Différents processus électrochimiques à l'interface métal/électrolyte.....	14
Fig I.11 :	Diagramme de Bode.....	15
Fig I.12 :	Diagramme de Nyquist.....	16
Fig I.13 :	Structure de la double couche.....	17
Fig I.14 :	Circuit équivalent de Randles.....	19
Fig I.15 :	Allure générale d'un voltammogramme.....	20
Fig I.16 :	Représentation schématique des différents biorécepteurs.....	21
Fig I.17 :	Structure tertiaire d'une protéine.....	22
Fig I.18 :	Topographie de site actif de lipase <i>Candida Rugosa</i>	23
Fig I.19 :	Représentation schématique du principe du biocapteur enzymatique.....	24
Fig I.20 :	Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique.....	26
Fig I.21 :	Représentation graphique d'une cinétique Michaélienne. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat.....	28
Fig I.22 :	Effet de la température sur l'activité enzymatique.....	29
Fig I.23 :	Comparaison sur l'effet du pH sur deux enzymes différentes.....	30
Fig I.24 :	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme.....	31
Fig I.25 :	Schéma de base d'une couche SAM.....	35
Fig I.26 :	Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone mono-feuillets et multi-feuillets.....	39
Fig II.1 :	Photographie des électrodes interdigitées en or.....	49
Fig II.2 :	Schéma du montage utilisé pour la mesure conductimétrique.....	51
Fig II.3 :	Vue générale du dispositif de mesure conductimétrique.....	52
Fig II.4 :	les spectres d'admittance pour (a) électrode nue et (b) électrode modifiée. Mesures effectuées en présence de PBS, pH= 5.2 dans une gamme de fréquence de 100 mHz à 100 kHz.....	53
Fig II.5 :	influence de la quantité d'enzyme sur la réponse du biocapteur. Immobilisation : vapeur de GA : 30 min. Mesures dans PBS 20 mM, pH 5.2.....	54
Fig II.6 :	influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur enzymatique. Mesures effectuées dans un PBS 20 mM.....	55
Fig II.7 :	Effet du pH sur la réponse du biocapteur enzymatique	56
Fig II.8 :	l'influence de la concentration du tampon sur la réponse du biocapteur CRL, [Diazinon]= 40µM dans du tampon phosphate pH 5.2.....	57
Fig II.9 :	Réponse typique du biocapteur conductimétrique. [diazinon]= 40 µM, pH 5.2.....	58

Fig II.10 :	Evolution de la réponse du biocapteur en fonction de la concentration de OPs ; (a, b) injection de diazinon en présence et en absence des AuNPs respectivement, (c) parathion méthy et (d) paraoxon méthyl.....	59
Fig II.11 :	Etude de la stabilité du biocapteur. Les électrodes sont stockées à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7.....	61
Fig II.12 :	Comparaison des réponses du biocapteur CRL obtenues en présence d'éventuelles substances interférentes. Les mesures ont été réalisées dans 20 mM PBS, pH 5.2.....	62
Fig II.13 :	Photographie des électrodes carrées en or.....	65
Fig II.14 :	Montage expérimental utilisé pour les mesures électrochimiques.....	66
Fig II.15 :	la cellule électrochimique.....	67
Fig II.16 :	Electrode de référence.....	67
Fig II.17 :	Diagrammes de Nyquist obtenus en présence de 20 mM PBs, pH 5.2 dans une gamme de fréquence de 100 mHz – 100 kHz : (a) or modifiée par thiol acide, (b) or modifiée-enzyme et (c) après l'injection de diazinon.....	69
Fig II.18 :	influence de la concentration de diazinon sur la réponse du biocapteur impédimétrique CRL. Mesures effectuées dans PBS 20 mM, pH 5.2, à un potentiel de -400 mV et une gamme de fréquence de 100 mHz- 100kHz.....	70
Fig II.19 :	Influence de la concentration de diazinon sur la variation de la résistance de polarisation des biocapteur impédimétriques, (A) à base de CRL et (B) à base de PPL.....	72
Fig III.1 :	Réaction d'hydrolyse de lécithine par la phospholipase A ₂	78
Fig III.2 :	Voltammogrammes cycliques en présence de 8 mM Fe (CN ₆) ^{3-/4-} , de l'électrode nue (a), après dépôt de la membrane PLA ₂ . Vitesse de balayage 100 mV/s.	80
Fig III.3 :	Diagrammes de Nyquist de l'électrode d'or avant (a) et après (b) le dépôt de la membrane enzymatique de PLA ₂ . Les mesures ont été effectuées dans un tampon PBS 10 mM, pH 7.4 à - 0.4V.....	81
Fig III.4:	Effet de la quantité d'enzyme (mg) sur la réponse du biocapteur impédimétrique. Injection de 10 ⁻⁶ M de lécithine dans du PBS (10 mM) pH 7.4.....	82
Fig III.5 :	Influence de la concentration de lécithine sur la réponse des biocapteurs impédimétriques (a) à base de PLA ₂ de venin de serpent et (b) PLA ₂ de venin de l'abeille. Mesures effectuées dans PBS 10 mM, pH 7.4, à un potentiel de -400 mV et une gamme de fréquence de 100 mHz- 100kHz.....	83
Fig III.6 :	Courbes de calibration des biocapteurs impédimétrique de PLA ₂ , (a) venin de serpent, (b) venin de l'abeille.....	84
Fig III.7 :	Circuit électrique équivalent.....	84
Fig III.8 :	Influence de la quantité de PLA ₂ (Naja Cobra, Thaïlande) sur la réponse du biocapteur impédimétrique . Mesures effectuées dans PBS 10 mM, pH 7.4, à un potentiel de -400 mV et une gamme de fréquence de 100 mHz- 100kHz.....	85
Fig III.9 :	Courbes de calibration du biocapteur impédimétrique de PLA ₂	86
Fig IV.1 :	la structure d'une électrode BDD.....	91
Fig IV.2 :	Représentation schématique des étapes de préparation du biocapteur.....	93
Fig IV.3 :	Voltammogramme de la réduction électrochimique du sel diazonium, (1) premier balayage, (2) balayages ultérieures... ..	94
Fig IV.4 :	Voltammogrammes cycliques de l'électrode nue (a), modifiée par greffage électrochimique (b) et après dépôt de la membrane enzymatique (c) en présence de 8mM de Fe(CN ₆) ^{3-/4-} . Vitesse de balayage : 50 mV. s ⁻¹	95
Fig IV.5 :	Diagrammes de Nyquist de l'électrode nue (a) modifiée par greffage électrochimique (b) et	96

	après dépôt de la membrane enzymatique (c) en présence de 8mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans une gamme de fréquence de 100 mHz – 100 kHz à 195 mV.....	
Fig IV.6 :	Circuit équivalent de Randles.....	96
Fig IV.7 :	images AFM représente la morphologie de surface de l'électrode BDD nue (a) et après le dépôt de la membrane enzymatique (b).....	97
Fig IV.8 :	Voltammogrammes cycliques obtenus après l'injection de BPA dans un PBS 10 mM, pH 7.2.....	98
Fig IV.9 :	Courbe de calibration de biocapteur enzymatique à BPA.....	99
Fig IV.10	Stabilité de stockage du biocapteur enzymatique, [BPA]= 0.1 μ M dans un PBS 10 mM, pH 7.2.....	100

Liste des tableaux

Tableau I.1 :	Exemples d'application des nanoparticules pour l'immobilisation des biomolécules.....	38
Tableau I.2 :	Biocapteurs développés à base des nanotubes de carbone.....	40
Tableau II.1 :	La structure et la formule moléculaire des pesticides organophosphorés détectés	48
Tableau II.2 :	Performances analytiques de quelques biocapteurs pour la détection des pesticides organophosphorés étudiés.....	60
Tableau II.3 :	Analyse des échantillons d'eaux dopés avec le diazinon.....	63
Tableau IV.1 :	Performances analytiques de quelques capteurs électrochimiques pour la détection de Bisphénol A.....	100
Tableau IV.2 :	Analyse des échantillons d'eaux dopés avec BPA.....	101

Introduction générale

Introduction générale

L'utilisation extensive de produits chimiques par les industries, les traitements agricoles et les communautés urbaines, conduit à la pénétration de nombreux composés dans l'environnement et par conséquent à la contamination du milieu aquatique, provoquant une grave menace qui affecte les écosystèmes et la santé humaine. D'un point de vue environnemental, il est nécessaire de limiter et de contrôler ces produits toxiques, mais également d'être en mesure de déterminer leur concentration dans les eaux, et de développer des stratégies de traitement appropriées.

Les méthodes d'analyses classiques de ces polluants chimiques présentent des contraintes importantes en termes de coût, durée d'analyse et demande d'une main d'œuvre généralement qualifiée. De plus, ces méthodes n'autorisent que des contrôles de toxicité épisodiques au laboratoire, effectués dans des conditions statistiques éloignées des conditions dynamiques. Alors que, l'amélioration de la qualité de l'environnement demande la réalisation de contrôles de toxicité in situ et en continu des sources de pollution ou des milieux contaminés à l'aide de systèmes à réponse rapide. Face à ce défi, des méthodes d'analyse simples dont les performances se rapprochent des techniques lourdes doivent être conçues et développées. C'est au carrefour de ce défi que notre étude s'installe. En effet, ce type de stratégie peut être développé au moyen de biocapteurs qui constituent l'une des alternatives les plus séduisantes, proposant ainsi des systèmes simples, fiables, rapides, économiques et permettant d'intervenir immédiatement à la source de pollution, d'interrompre le rejet d'un flux toxique et de prévenir ainsi les accidents de pollution.

De manière générale, la conception d'un biocapteur se base sur l'association d'une entité biologique faisant office de biorécepteur à un transducteur physique. Le biorécepteur peut être de nature très variée (enzyme, cellule, ADN, anticorps...). Les propriétés de reconnaissance moléculaire de l'entité biologique confèrent une sélectivité à l'interaction biorécepteur-analyte cible. Cette interaction est transformée, grâce au transducteur, en un signal électrique, optique ou autre, facilement mesurable, qui après traitement peut être directement corrélé à la concentration de l'analyte cible. Un grand nombre des travaux ont été consacrés ces dernières décennies au développement des biocapteurs destinés au contrôle environnemental mais aussi pour des applications très variées comme la santé ou de contrôle de qualité des produits agroalimentaires.

Cependant, malgré une très forte demande et l'intense activité de recherche qui y est consacrée, très peu de réalisations commerciales ont vu le jour. La difficulté majeure, qui freine le développement industriel de ces biocapteurs, est liée à la diminution de l'activité du biorécepteur lors de sa fixation sur la surface du transducteur, ou à sa faible stabilité. Pour remédier à ces inconvénients, les recherches actuelles sont orientées vers la création de nouvelles matrices d'immobilisation. Ces dernières permettent une meilleure conservation de l'activité biologique du biorécepteur sans que sa spécificité en soit altérée par la sévérité des conditions utilisées.

Dans ce contexte, le travail réalisé visait à mieux comprendre et à optimiser le fonctionnement de trois biocapteurs électrochimiques en vue de la détection d'analytes d'intérêt environnemental, en particulier pour le traitement des eaux. Ces trois biocapteurs avaient pour point commun d'utiliser les enzymes comme biorécepteurs. Trois types de transducteurs (les électrodes d'or interdigitées, les plaquettes d'or carrées et les électrodes de diamant dopé au bore) ont été évalués. Nous nous sommes attachés chaque fois à optimiser les différents paramètres de mesure afin de maximiser les performances des biocapteurs en termes de stabilité, reproductibilité, sélectivité et limite de détection.

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres ; le premier chapitre est consacré aux biocapteurs, principe de fonctionnement, différents constituants, modes de transduction, techniques d'immobilisation des enzymes. Ces différentes parties seront illustrées par quelques exemples d'application.

Le deuxième chapitre concerne le développement de deux biocapteurs, l'un conductimétrique et l'autre impédimétrique pour une détection directe des pesticides organophosphorés en utilisant la lipase de *Candida Rugosa*. Le biocapteur conductimétrique a également été appliqué à la détection des composés organophosphorés dans l'eau de rivière.

Le troisième chapitre est dédié à l'élaboration d'un biocapteur impédimétrique pour la détermination de l'activité de la phospholipase A₂ ; une étude comparative entre deux types différents de cette enzyme a été effectuée.

Le quatrième chapitre traite de la conception et de la mise en œuvre d'un biocapteur enzymatique à base de tyrosinase pour une détection sensible et rapide du bisphénol A.

La conclusion générale est suivie par les perspectives de ce travail.

Chapitre I

Etude bibliographique

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1 Généralités

I.1.1 Historique

L'histoire des biocapteurs a débuté en 1950, lorsque Leland Clark a créé le premier biocapteur dont le but est de mesurer la concentration de l'oxygène dissous dans le sang. En 1962, ce biocapteur est adapté à la mesure de la concentration de glucose dans le sang [1]. Cinq années plus tard, Updike et Hucks ont conçu une électrode enzymatique permettant de doser le glucose dans des solutions biologiques [2]. Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce premier biocapteur à glucose ou dans le but d'appliquer son principe au développement d'autres biocapteurs enzymatiques. On peut ainsi citer par exemple le biocapteur potentiométrique proposé par Guilbault et Montalvo en 1969 pour la détection de l'urée [3]. Mais ce n'est qu'en 1975 que le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fut commercialisé par la société Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique).

Depuis, l'engouement pour ce type d'outil n'a cessé de croître, et des biocapteurs se basant sur d'autres types d'éléments de reconnaissance (les bactéries, les anti-corps, ADN) ou de transducteurs sont destinés à des applications dans le domaine de la santé, de l'environnement ou encore de l'agroalimentaire ont vu le jour.

I.1.2 Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est un outil ou système analytique conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique [4]. Ce dispositif est basé sur l'accouplement spatial direct d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé "biorécepteur" ou "élément de reconnaissance biologique", avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique [5]. Le biocapteur emploie les systèmes biologiques à différents niveaux d'intégration pour identifier spécifiquement la substance à déterminer. La première étape de cette interaction est la formation d'un complexe spécifique de la substance active immobilisée avec l'analyte.

La figure I.1 représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans l'échantillon, toute information utile à son évaluation

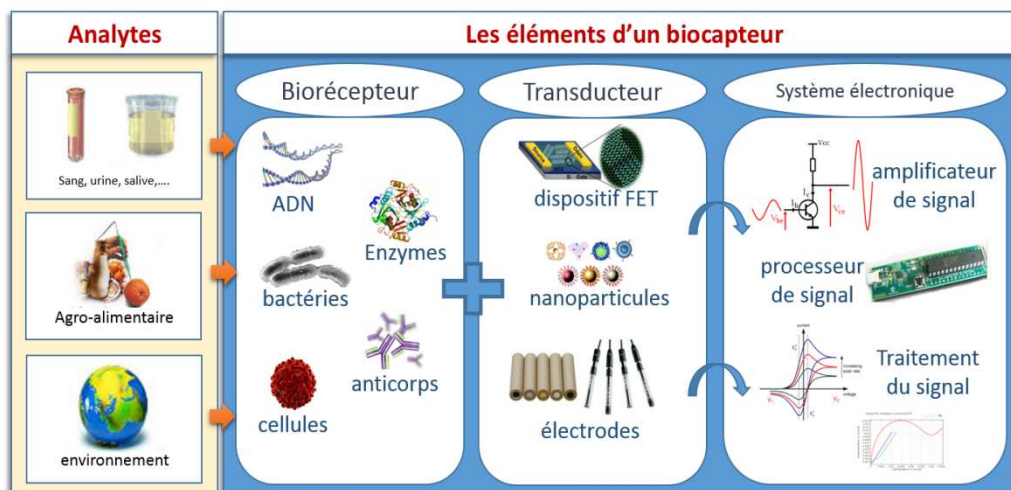


Figure I.1 : Schéma du principe de fonctionnement d'un biocapteur.

I.1.3 Caractéristique métrologiques d'un capteur

Les caractéristiques métrologiques d'un capteur constituent les liens effectifs entre le capteur et la grandeur qu'il mesure.

- **Étalonnage** : permet d'ajuster et de déterminer, sous forme graphique, la relation entre le mesurande et la grandeur électrique de sortie (figure I.2)

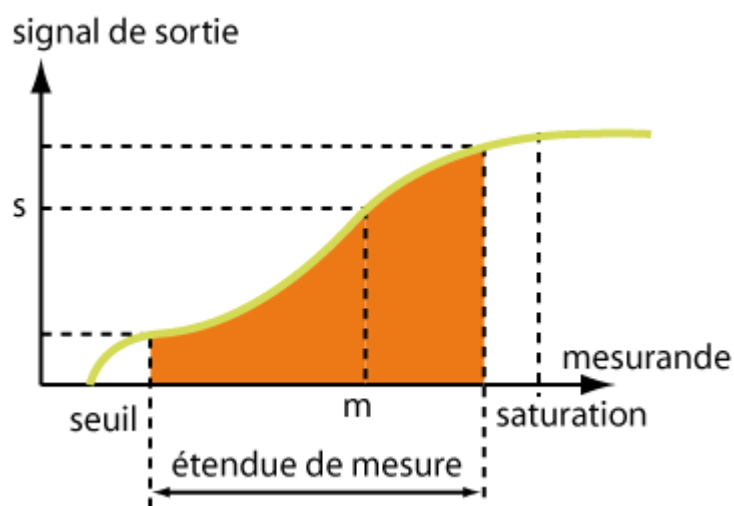


Figure I.2 : Courbe d'étalonnage d'un capteur

- **Étendue de mesure** : est définie sur la courbe d'étalonnage du capteur (figure I.2). À l'extérieur de cette zone se trouvent deux valeurs particulières: le seuil et la saturation.

Saturation et seuil : même si la valeur du mesurande augmente, la grandeur de sortie ne peut dépasser une valeur maximale S_{\max} : pour $m > m_{\max}$, $S = S_{\max}$. On ne peut donc pas effectuer de mesurage pour des valeurs au dessus de m_{\max} .

Le seuil ou limite de détection correspond à la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

- **Domaine de linéarité** : il s'agit du domaine pour lequel la caractéristique est une portion de droite. Dans ce domaine, la variation de la grandeur de sortie est donc proportionnelle à la variation du mesurande.

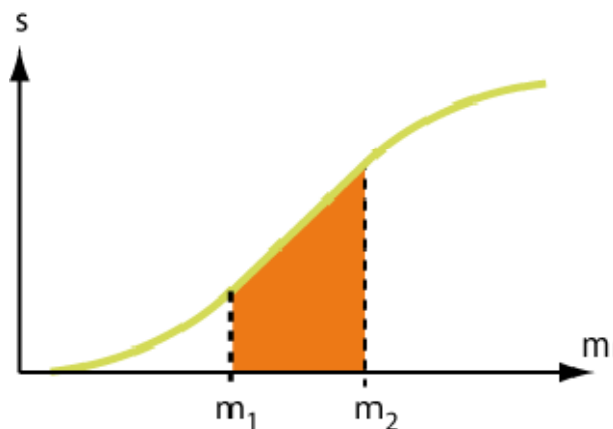


Figure I.3 : domaine de linéarité du capteur.

- **Sensibilité** : est une caractéristique importante pour l'exploitation et l'interprétation des mesures. Elle est définie comme étant la variation du signal de sortie (S) par rapport à la variation du mesurande (m) (pente de la portion linéaire de la courbe d'étalonnage) et s'écrit : $S = dS/dm$.
- **Précision- Exactitude** : C'est la plus petite variation de mesurande que peut détecter le capteur.
- **Répétabilité et reproductibilité** :

La répétabilité est l'étroitesse d'accord entre les résultats de mesures successives d'une même grandeur effectuée avec la même méthode, par le même expérimentateur, avec les mêmes instruments de mesure et à des intervalles de temps assez courts.

La reproductibilité caractérise l'étroitesse d'accord entre les résultats de mesures successives d'une même grandeur dans le cas où les mesures sont effectuées dans des conditions différentes.

▪ **Temps de réponse** : la rapidité est caractérisée par le temps que met le capteur à réagir à une variation brusque du mesurande. Cependant la valeur finale étant le plus souvent atteinte de manière asymptotique, elle correspond au temps nécessaire pour que le capteur délivre une certaine portion α de la pleine amplitude du signal. Le temps de réponse noté t_α est tel que α vaut généralement 90%.

La connaissance du temps de réponse d'un capteur est un élément essentiel lors de la réalisation de mesures.

▪ **Sélectivité** : un capteur est dit sélectif, si la variation du signal de sortie est due uniquement à la seule grandeur (physique, chimique, biologique...) qu'on veut mesurer.

▪ **Stabilité** : qualifie la capacité d'un capteur à conserver ses performances pendant une longue durée. C'est la stabilité de stockage ou stabilité relative à une utilisation en continu.

I.2 Classification des biocapteurs

Les biocapteurs sont généralement classés en fonction de la nature des biorécepteurs et des transducteurs qui les composent (figure I.4).

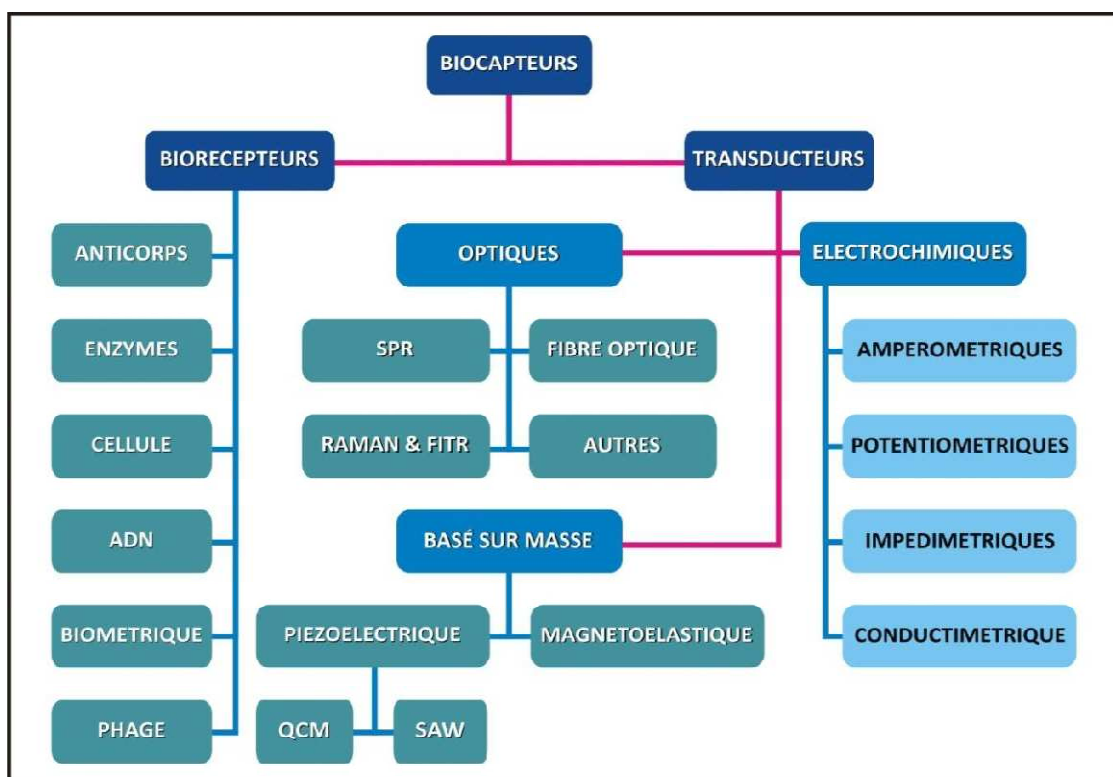


Figure I. 4 : Classification des biocapteurs.

1.2.1 Classification des biocapteurs par le mode de détection

Les biocapteurs sont classés selon le mode de transduction en 4 catégories : optique, thermique, piézoélectrique et électrochimique. Dans ce qui suit, nous nous intéressons à définir la transduction électrochimique qui sera utilisée comme mode de transduction des biocapteurs développés au cours de cette thèse.

I.2.1.1 Transduction électrochimique

Les capteurs électrochimiques peuvent être classés en quatre catégories selon leur mode de transduction: potentiométrique, ampérométrique, conductimétrique ou impédimétrique [6]. Le principe de base d'une mesure électrochimique repose sur le fait que certaines substances électroactives en solution (molécules ou ions) peuvent échanger des électrons avec une électrode, ceci dans des conditions analytiques bien définies en particulier par le potentiel auquel cet échange a lieu. Les différents principes exigent toujours une conception spécifique de la cellule électrochimique.

a) Potentiométrie

Le principe de ce type de capteur potentiométrique repose sur la mesure de l'accumulation de charges électriques à la surface d'une électrode. Pratiquement, cela se traduit par une détermination de la différence de potentiel qui s'établit entre une électrode de référence, dont le potentiel est constant et reproductible, et l'électrode indicatrice, sans polariser la cellule électrochimique (c.à.d. l'intensité de courant est nulle). L'électrode indicatrice développe un potentiel variable proportionnel à l'activité ou la concentration d'un analyte spécifique dans solution. Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration (activité) de l'échantillon selon la loi de Nernst (Eq.I.1), dans le cas d'un capteur redox

$$E_p = E_{Ox/Red}^0 + \frac{RT}{nF} * \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (Eq. I.1)$$

Où E_p : le potentiel normal standard du couple redox

a_{Ox}/a_{Red} le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état réduit ;

R : la constante des gaz parfaits (8,314 K·mol⁻¹)

T la température absolue en Kelvin

F : constante de Faraday = 96500 C·mol⁻¹.

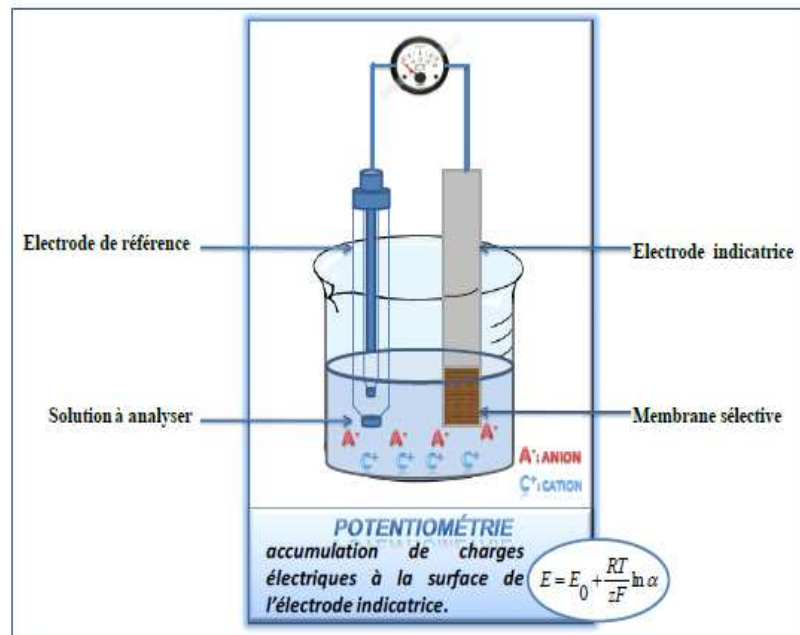


Figure I.5: Schéma du principe de la potentiométrie.

Les biocapteurs utilisant la potentiométrie comme mode de détection sont très nombreux [7, 8, 9, 10]. Ils sont réalisés à l'aide de différents types d'électrodes, à savoir les électrodes à membrane sélective aux ions (ISE), les transistors à effet de champ sélectifs aux ions (ISFET) ou plus récemment, les capteurs potentiométriques adressables par lumière (LAPS).

- L'électrode à membrane sélective aux ions (ISE) est une électrode indicatrice capable de mesurer de manière sélective l'activité d'une espèce ionique particulière. Elle comporte une membrane permselective, généralement constituée d'un matériau conducteur ionique. Les différentes stratégies employées pour produire ces électrodes sélectives dépendent principalement de la nature et de la composition du matériau constituant la membrane. Il peut s'agir d'une membrane mince en verre ou d'un matériau polymérique sur laquelle les bioéléments sont immobilisés afin de former un biocapteur qui peut être utilisé dans le domaine de l'environnement [11, 12] ou de l'analyse biomédicale [13-14].
- C'est en 1970 que l'ISFET a été introduit pour la première fois par Bergveld [15]. Il s'agit d'un transistor à effet de champ recouvert d'une membrane sélective aux ions. Depuis, de nombreuses versions et configurations de cet outil ont été développées. Les systèmes à effet de champ, fabriqués selon la technologie des semi-conducteurs, sont d'excellents candidats pour la construction de biocapteurs de par leur haut niveau de pureté dans le design et leur très petite taille [16], leur temps de réponse très court, leur grande sensibilité et la possibilité de les intégrer

sur une puce [17]. La plupart des applications des biocapteurs FET reposent sur la détection des changements de pH induits par le processus de reconnaissance à l'aide d'une couche isolante sensible aux H^+ tels que Si_3N_4 [18-19]. Ainsi des travaux ont permis la détection d'un large choix d'analytes avec des ISFETs à base de récepteurs olfactifs [11] ou d'enzymes [20], ou encore celles d'agents biologiquement actifs à l'aide de biocapteurs microbiens [12- 18- 20].

Certains ont également utilisé ces transducteurs à effet de champ pour la détection de l'ADN [20-21].

Les LAPSs (light addressable potentiometric sensors) sont d'autres types de transducteurs à effet de champ. Leur principe repose sur l'activation du transducteur par une diode électroluminescente (LED). L'illumination à l'aide d'une source d'intensité modulée génère un photocourant qui dépend du potentiel appliqué [22,23]. Ce type de biocapteur est très apprécié dans le domaine biomédical, environnemental [11-12] et agroalimentaire [24].

b) *La conductimétrie*

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie. Son principe repose sur la mesure de la conductivité électrique d'une solution électrolytique contenant des charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions [25]. Pratiquement la mesure de la conductance d'un électrolyte s'effectue, lorsqu'on applique une différence de potentiel (U) entre deux électrodes immergées dans une solution conductrice, on observe le passage d'un courant (I) provenant du mouvement des ions constituant l'électrolyte (Figure I.6). La conductance (G) qui représente cette capacité à laisser passer le courant est l'inverse de la résistance (R). Elle peut s'exprimer en fonction de I et de U , grâce à la loi d'Ohm (Eq.I.2).

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad (\text{Eq I.2})$$

La conductivité (σ) est également une propriété intrinsèque à la solution, inverse de la résistivité qui est reliée à la conductance par la formule suivante (Eq.I.3)

$$\sigma = G \times \frac{L}{S} \quad (\text{Eq I.3})$$

Avec S : surfaces des électrodes (m^2) ;

L : distance entre les électrodes (m) ;

G et S étant exprimés en S et $S.m^{-1}$ respectivement.

La grandeur L/S est appelé constante de la cellule. La conductivité dépend de la nature des ions présents dans la solution (leur charge et leur mobilité) et de leurs concentrations.

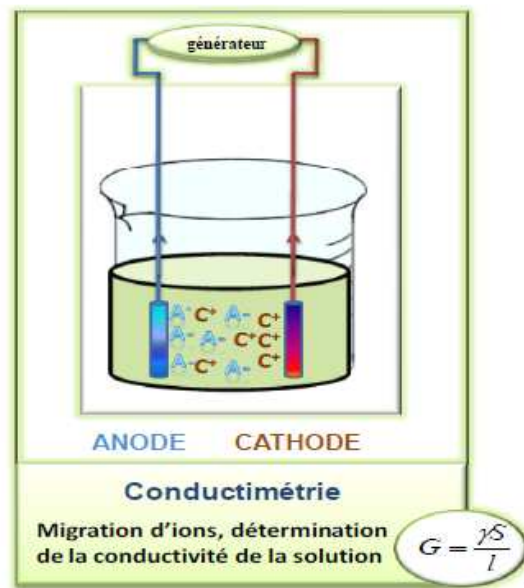


Figure I.6 : Schéma du principe de la conductimétrie.

La transduction conductimétrique, comparée aux autres techniques, a été relativement peu utilisée pour la mise au point de biocapteurs [25]. Même si la détection de la conductance en solution n'est pas spécifique, les mesures conductimétriques peuvent être extrêmement sensibles grâce aux éléments biologiques fixés sur la surface des transducteurs. Depuis quelques années, il existe un intérêt croissant pour les biocapteurs conductimétriques étant donné le nombre d'avantages qu'ils offrent :

- ils ne nécessitent pas une électrode de référence,
- il est possible d'utiliser une tension alternative de petite amplitude ce qui permet d'éviter des processus faradiques d'électrode,
- ils ne sont pas photo-sensibles,
- ils peuvent être aisément miniaturisés avec un grand degré d'intégration quand la technologie en couche mince, peu coûteuse, est employée.

Ce type de capteur suscite un intérêt croissant du fait de sa relative simplicité de fabrication. De ce fait, il est utilisé dans le domaine biomédical et le domaine environnemental. Le plus souvent, est l'utilisation des enzymes [22-25] comme des biorécepteurs des biocapteurs conductimétriques, on peut citer par exemple la détection d'Aflatoxin B1 en utilisant l'enzyme acétylcholinestérase [26], un biocapteur conductimétrique pour la détection des alcools

aliphatiques : Méthanol et éthanol en utilisant l'alcool oxydase [27], la détection de nitrite en utilisant un biocapteur à base de HRP/catalase [28].

Cependant, ces dernières années, d'autres entités biologiques commencent à être utilisées comme les algues pour la détection des pesticides dans un milieu aqueux [29] et un biocapteur à bactéries a été récemment développé pour la détection du trichloroéthylène [12].

c) Amperométrie

Le principe de l'ampérométrie repose sur la mesure de l'intensité du courant qui traverse une cellule électrochimique. L'intensité du courant mesurée est en fonction de la concentration des espèces électroactives qui seront oxydées ou réduites à une électrode indicatrice, la seconde étant en général une électrode de référence. La technique peut donc être quantitative, permettant de déterminer la concentration de certaines espèces chimiques présentes par mesure de l'intensité du courant, après la détermination d'une courbe de calibration [30].

Les biocapteurs ampérométriques consistent généralement en une électrode dont la surface est recouverte d'un biofilm dans lequel sont immobilisées des biomolécules. Dans ce système, l'électrode est maintenue à un potentiel constant par rapport à l'électrode de référence, permettant d'obtenir l'électro-oxydation (ou la réduction) de l'un des produits de la réaction enzymatique à la surface de cette dernière, générant ainsi un courant électrique dont l'intensité, dans certaines conditions, est proportionnel à la concentration en solution de l'espèce à doser.

L'ampérométrie est l'un des modes de transduction électrochimique les plus utilisés dans le domaine des biocapteurs. Cette technique présente l'avantage d'être très sensible, peu coûteuse et d'offrir une grande rapidité de réponse. Comparé au biocapteur potentiométrique, le biocapteur ampérométrique peut être plus intéressant en raison de sa haute sensibilité et sa large gamme linéaire [23]. Cependant, toutes les biomolécules n'étant pas capables de servir de partenaires d'oxydoréduction dans les réactions électrochimiques, des médiateurs doivent souvent être utilisés. Malgré cet inconvénient, les dispositifs ampérométriques sont généralement plus sensibles que les systèmes potentiométriques [22]. Différents médiateurs ont été proposés comme le ferrocène, les quinones, les colorants et les viologènes [31].

Des biocapteurs ampérométriques ont été développés pour la détection d'une large gamme de molécules d'intérêt parmi lesquelles on retrouve les pesticides organophosphorés et les carbamates [32], le glucose [33] et des cytokines [34].

Lorsque le potentiel appliqué est sinusoïdal, on parle d'impédance électrochimique. L'impédance est donc un cas particulier de l'ampérométrie.

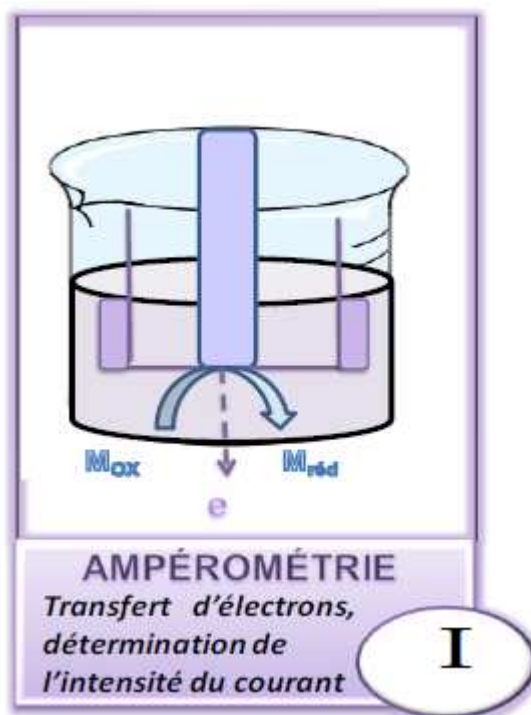


Figure I.7: Schéma du principe de l'ampérométrie

d) L'impédancemétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques interfaciales de n'importe quel matériau solide ou liquide connecté à un transducteur électrochimique. C'est une technique non invasive qui ne requiert pas d'instrumentation complexe permettant des applications courantes en laboratoire. Dans la dernière décennie, l'EIS a pris une importance croissante dans les domaines des technologies liées à la biophysique et aux biocapteurs [35-36]. Cette popularité est due à son aptitude à fournir un bon nombre d'informations. Elle permet une meilleure et plus complète compréhension d'un système électrochimique que les autres techniques électrochimiques.

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode non stationnaire qui permet d'avoir des informations sur les étapes élémentaires qui constituent le processus électrochimique global. En général, Cette technique repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du système électrochimique étudié. Ce système peut être considéré comme étant une « boîte noire » qui réagit en émettant un signal $y(t)$ quand il est soumis à une perturbation $x(t)$ (figure I.8). Les deux signaux $x(t)$ et $y(t)$ sont alors reliés par une fonction de transfert $H(\omega)$ telle que $Y(\omega) = H(\omega) * X(\omega)$, $X(\omega)$ et $Y(\omega)$ étant respectivement les transformées de Fourier de $x(t)$ et $y(t)$. Avec ω est la pulsation.



Figure I.8 : Schéma d'une fonction de transfert

Classiquement, la perturbation imposée au potentiel d'une électrode indicatrice est une perturbation sinusoïdale de faible amplitude. Le signal appliqué est donc de la forme $x(t) = A \sin(\omega t)$ et la réponse du système est $y(t) = B \sin(\omega t + \varphi)$ avec une fréquence f , une pulsation $\omega = 2\pi f$ et un déphasage φ .

En terme d'impédance, à l'instant t , le signal d'excitation est défini par la valeur du potentiel de l'électrode qui est exprimé en fonction de sa composante stationnaire E_0 et d'un terme sinusoïdal

$$E(t) = E_0 + |E| \sin(\omega t) \quad (\text{Eq I.4})$$

ΔE est l'amplitude de tension de la composante alternative et ω est la pulsation du signal.

Dans un système linéaire ou pseudo-linéaire la perturbation sinusoïdale du potentiel induit un courant sinusoïdal superposé au courant stationnaire et déphasé d'un angle φ

$$I(t) = I_0 + |I| \sin(\omega t + \varphi) \quad (\text{Eq I.5})$$

Dans le cas général, l'impédance d'un circuit constitué des résistances, capacités, inductances est définie comme étant le rapport de la tension appliquée à l'intensité du courant qui le traverse. L'impédance est calculée à partir des impédances des éléments constitutifs du circuit. Cette impédance est une grandeur complexe que l'on exprime en Ohm, et que l'on peut écrire, pour une fréquence donnée, sous la forme d'une fonction de transfert :

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{I(\omega)} \quad (\text{Eq I.6})$$

Avec $E(\omega)$ et $I(\omega)$ étant respectivement les transformées de Fourier de $E(t)$ et $I(t)$.

Dans le plan complexe l'impédance représente un vecteur, caractérisé par le module $|Z|$ et l'angle de déphasage φ . On peut aussi l'écrire comme une somme vectorielle d'une partie réelle et d'une partie imaginaire :

$$Z(\omega) = Z_{\text{Re}}(\omega) + jZ_{\text{Im}}(\omega) \quad (\text{Eq I.7})$$

Le module de l'impédance Z , peut être exprimé comme suit

$$|Z(\omega)| = \sqrt{Z_{Re}^2 \omega^2 + Z_{Im}^2 \omega^2} \quad (\text{Eq I.8})$$

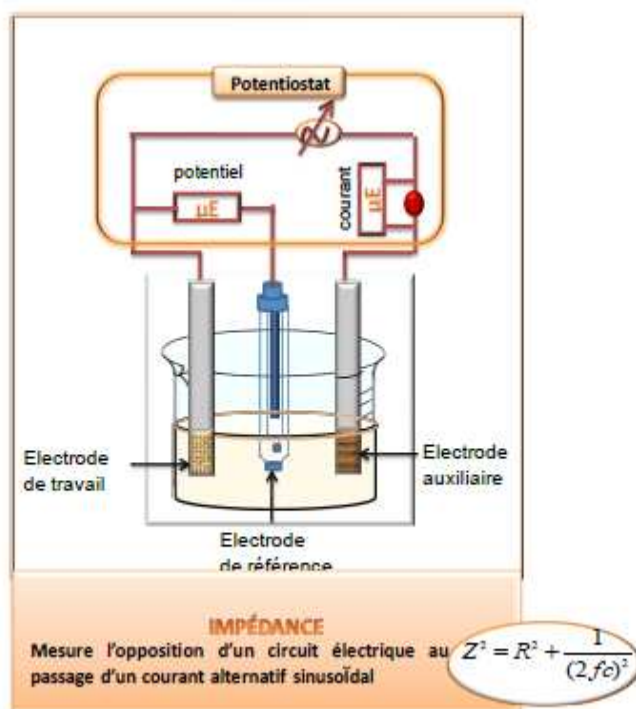


Figure I.9: Schéma de principe de l'impédancemétrie.

- **Représentation graphique de l'impédance**

La spectroscopie d'impédance électrochimique permet de différencier les différents phénomènes qui peuvent avoir lieu dans une cellule électrochimique en fonction de la fréquence. Ainsi, les phénomènes rapides tels que les transferts d'électrons se produisent à hautes fréquences, tandis que les phénomènes lents comme les transferts de masses et la diffusion se réalisent à basses fréquences (Figure I.10).

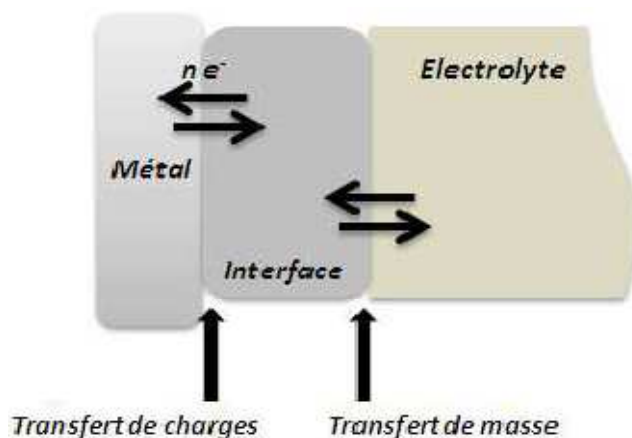


Figure I.10 : Différents processus électrochimiques à l'interface métal/électrolyte

Il existe deux modes classiques de représentation des résultats obtenus en impédimétrie

➤ **La représentation de Bode**

Dans le diagramme de Bode, le logarithme du module et le déphasage de l'impédance sont tracés en fonction du logarithme de la fréquence.

$$\log |Z(\omega)| = f_1(\log f) \quad (\text{Eq I.9})$$

$$\varphi = f_2(\log f) \quad (\text{Eq I.10})$$

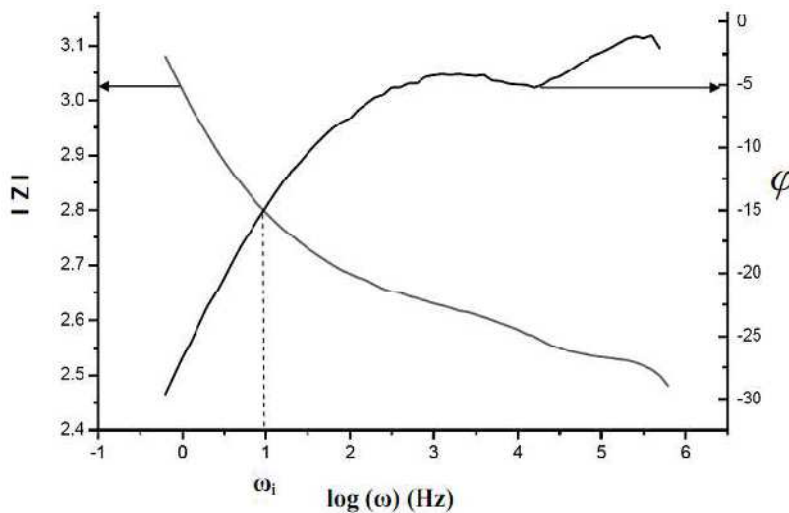


Figure I.11 : Diagramme de Bode.

➤ **La représentation 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. Cette dernière représentation ne fournit qu'une seule courbe, il est indispensable de repérer les fréquences auxquelles les points représentés correspondent.

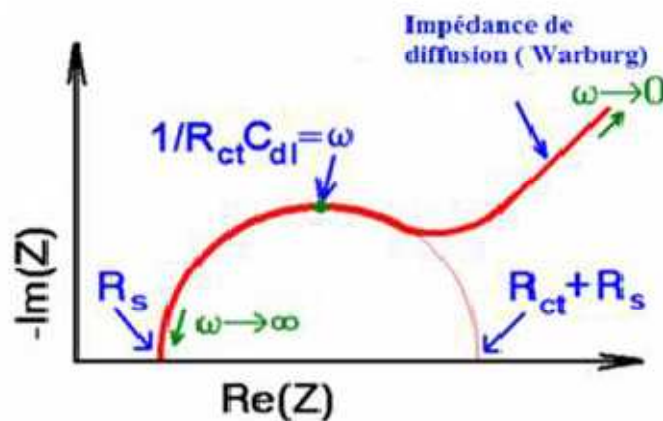


Figure I.12: Diagramme de Nyquist

L'impédance de différents phénomènes électrochimique

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

- **Résistance de la solution**

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

$$Z_{R_s}(\omega) = R_s \quad (\text{Eq I.11})$$

- **Capacité de la double couche**

Un phénomène observé à l'interface électrode/électrolyte est la formation d'une double couche d'ions [37]. L'application d'une perturbation sinusoïdale lors de la mesure d'impédance entraîne la charge et la décharge de cette couche qui se comporte, selon le modèle de Stern [38], comme un condensateur électrique. La réponse de cette double couche génère un courant I_{dc} qui dépend de la fréquence de perturbation et de la variation de charge interfaciale. Ce type de

processus peut être généralisé à tous les phénomènes qui entraînent la charge et la décharge de deux zones séparées par un diélectrique. L'impédance d'un condensateur de capacité C est donnée par l'équation :

$$Z_{C_{dl}}(\omega) = -\frac{1}{jC_{dl}\omega}, \text{ avec } C_{dl} = \varepsilon\varepsilon_0 \frac{A}{e} \quad (\text{Eq I.12})$$

Où C_{dl} est la capacité de la double couche, ε la permittivité relative du diélectrique, ε_0 la permittivité diélectrique du vide, A l'aire de réaction électrochimique à l'électrode de travail et e l'épaisseur du diélectrique.

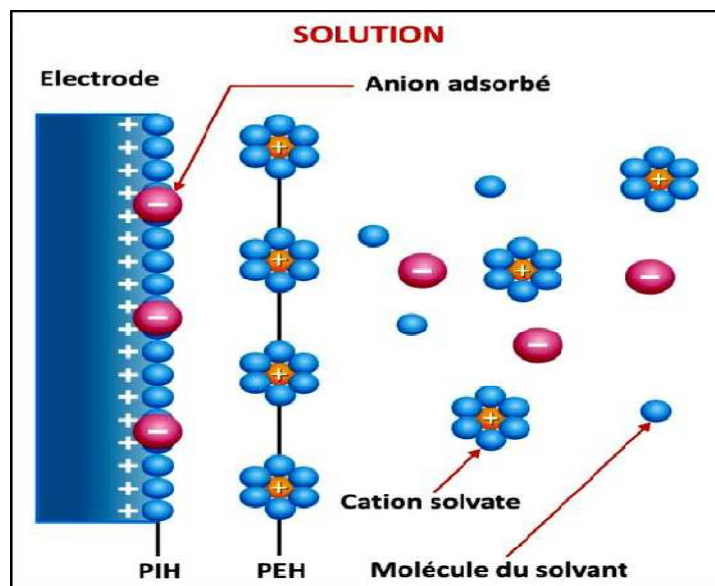
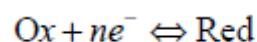


Figure I.13: Structure de la double couche.

- **Résistance de transfert de charge**

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



Dans ce cas la cinétique de réaction est limitée uniquement par le transfert de charge. La contribution faradique au courant mesuré est indépendante de la fréquence et n'influe que sur l'amplitude de la réponse du système. Cette résistance R_{ct} est définie comme la dérivée partielle de la densité du courant faradique (IF) par rapport au potentiel (E).

$$Z_{R_{ct}}(\omega) = R_{ct} = \frac{\partial I_F}{\partial E} = \frac{RT}{nFI_0} \quad (\text{Eq I.13})$$

Où R est la constante des gaz parfait, T la température, n le nombre d'électrons transférés, F la constante de Faraday et I_0 la densité de courant d'échange au potentiel d'équilibre (c'est-à-dire le potentiel auquel la vitesse de diffusion de l'espèce réduite est égale à la vitesse de diffusion de l'espèce oxydée) qui est reliée directement à la constante cinétique de transfert d'électron K^0 selon la relation suivante :

$$I_0 = nFAC_0k^0 \quad (\text{Eq I.14})$$

Où A est la surface active de l'électrode et C_0 la concentration du couple redox en solution.

- **Impédance de Warburg**

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

$$Z_W = \sigma \frac{1-j}{\omega^{0.5}} \quad (\text{Eq I.15})$$

Avec σ est le coefficient de Warburg

- **Modélisation de l'impédance :**

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.

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. Le modèle de Randles est le circuit le plus couramment utilisé pour décrire une cellule électrochimique [39]. Il se compose 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_w) représentant le phénomène de diffusion des espèces redox.

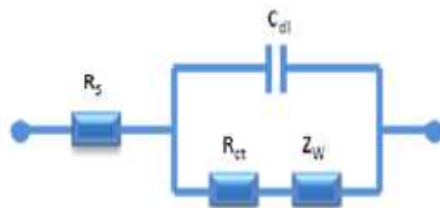


Figure I.14 : Circuit équivalent de Randles

➤ Application de l'impédance

On observe actuellement qu'EIS est de plus en plus utilisée pour le développement des biocapteurs. Cette technique non invasive qui ne requiert pas d'instrumentation complexe permettant des applications courantes en laboratoire. Il est possible d'employer cette technique non seulement pour caractériser le comportement et les propriétés des différentes couches immobilisées à la surface du biocapteur, mais également comme un moyen de transduction pour la détection de molécules cibles comme les pesticides [40-41], les odorants [42] et les bactéries [43].

La détection de l'urée a été réalisée à l'aide d'un biocapteur impédimétrique utilisant l'uréase comme agent de biorecognition [44]. Les ions produits suite à la réaction enzymatique provoquent une augmentation significative de l'impédance.

Un biocapteur à base de *Pseudomonas putida* F1 a été développé pour la détection de trichloroéthylène [45]. Des aptamères ont été également utilisés pour la détection impédimétrique de thrombine [46] et un immunocapteur pour la détermination de la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* [47].

En général, les mesures impédancemétriques sont adaptées à la détection de changements conformationnels dus à la reconnaissance de molécules [48] (changements de dimension et/ou de constante diélectrique).

e) La voltammétrie cyclique

La voltammétrie est une technique électrochimique stationnaire couramment employée pour le contrôle des processus qui se produisent sur une surface d'un métal utilisé en tant qu'électrode de travail. Cette technique est souvent utilisée pour étudier le comportement des espèces en solution (système rapide, réversible, nombre d'électrons échangés...) et pour avoir des

renseignements quant aux processus qui ont lieu à la surface de l'électrode (adsorption, passivation...etc). Elle consiste à appliquer une différence de potentiel variable, deux balayages linéaires (aller/ retour) du potentiel en fonction du temps, entre une électrode de référence et une électrode indicatrice, au contact de laquelle va se produire une réaction d'oxydo-réduction ($Ox + ne \leftrightarrow Red$). La réponse du système est l'enregistrement du courant, en fonction de la tension appliquée. Cette réponse se présente sous la forme de la courbe $I = f(E)$, appelé voltammogramme, qui est une caractéristique de l'espèce électroactive.

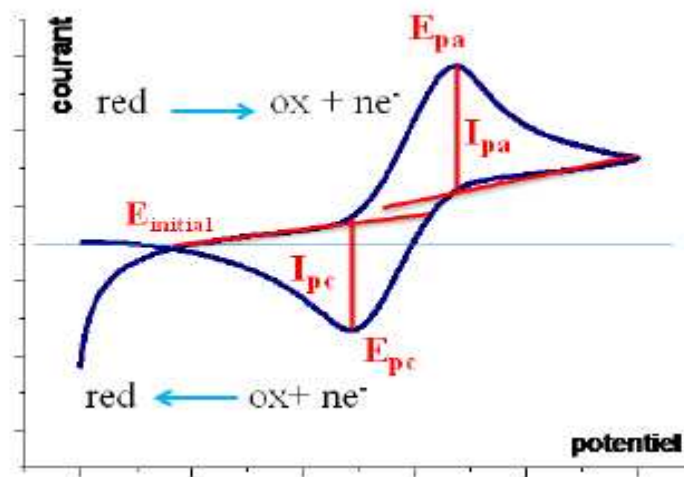


Figure I.15 : Allure générale d'un voltammogramme.

Pour un système réversible, lors du balayage (aller), on observe sur le voltammogramme une croissance du courant situé entre le nanoampère et le microampère. Pendant cette période, une réaction de réduction ($Red \rightarrow Ox + ne$) commence à se produire, correspondant à l'accélération du processus par accroissement du potentiel. Suite à cette croissance, le maximum du pic d'oxydation (E_{pa}) indique l'intensité du courant anodique pour l'espèce étudiée sur une électrode donnée. Puis une décroissance lorsque le ralentissement dû au phénomène de diffusion l'emporte. Le balayage retour apporte des informations quant à la réversibilité de la réaction électrochimique par la position et l'intensité des courants faradiques enregistrés. Le tracé présentera un second pic de réduction (E_{pc}) indiquant l'intensité du courant cathodique issu de la réduction de l'espèce oxydée produite à l'aller et encore présente dans la couche de diffusion.

La voltammétrie cyclique s'applique avantageusement dans le domaine de biocapteurs car elle permet d'obtenir des informations sur les mécanismes mis en jeu. Cette technique non invasive qui ne requiert pas d'instrumentation complexe permettant des applications courantes en laboratoire. Il est possible d'employer cette technique non seulement pour caractériser le comportement et les propriétés des différentes couches immobilisées à la surface du biocapteur,

mais également comme un moyen de transduction pour la détection des molécules cibles comme les pesticides [49-50], 4-Chlorophénol [51] ainsi la mesure de la dopamine [52].

I.2.2 Classification des biocapteurs selon la nature de biorécepteur

Le biorécepteur est l'élément principal du biocapteur, il sert à identifier 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. Dans un biocapteur, le choix de biorécepteur dépend de différents critères tels que la spécificité de sa réponse, sa stabilité, sa facilité d'utilisation et son affinité vis-à-vis l'analyte à détecter.

Plusieurs types de biorécepteur ont été utilisés comme moyens de reconnaissance moléculaire pour le développement de biocapteurs (figure I.16).

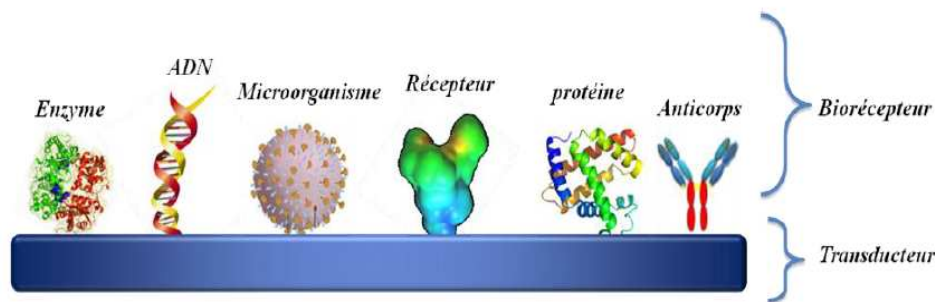


Figure I.16: Représentation schématique des différents biorécepteurs.

Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à définir les enzymes en tant que biorécepteurs utilisés pour la fabrication des biocapteurs développés au cours de cette thèse.

I.3 Les enzymes

I.3.1 Structure générale

Les enzymes ont été les premières molécules biologiques de reconnaissance intégrées dans les biocapteurs. Ces biomolécules sont très largement utilisées pour la construction du biocapteur du fait de leur pouvoir catalytique spécifique.

L'enzyme est une molécule de nature protéique, résultant de la condensation d'acides α aminés de la série L avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amine d'un autre acide aminé. La chaîne polypeptidique obtenue se replie sur elle-même grâce aux différents types de liaisons pour donner un édifice tridimensionnel bien défini [53], (Figure I.17).

L'enzyme joue le rôle d'un biocatalyseur et assure le déroulement de toutes les réactions métaboliques et empêche la présence des réactions secondaires gênantes.

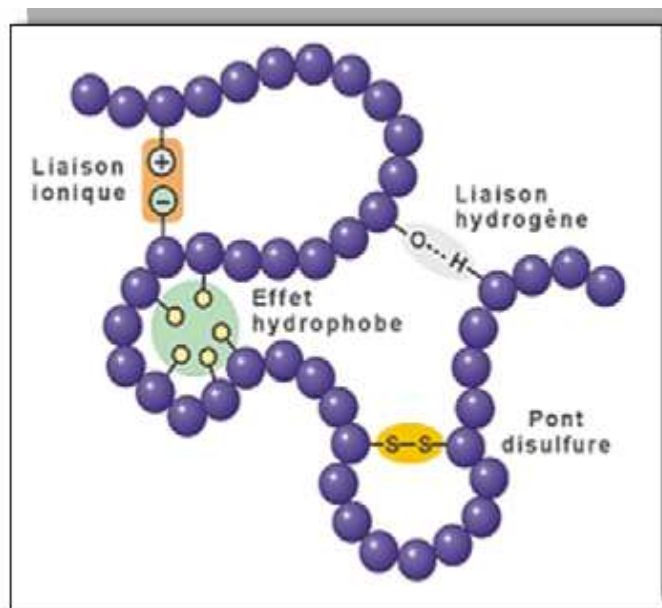


Figure I.17: Structure tertiaire d'une protéine

Les enzymes sont des biomolécules très importantes parce que leur pouvoir catalytique et leur spécificité sont souvent très supérieurs à ceux des catalyseurs chimiques. Elles accélèrent des millions de fois les réactions chimiques dans les organismes vivants sans être consommées ou altérer les produits de la réaction [54], d'où l'appellation de biorécepteurs catalytiques. En abaissant l'énergie d'activation de la réaction qu'elle catalyse, une enzyme abaisse le niveau énergétique de l'état de transition et accélère ainsi la réaction. Les enzymes ont une stéréospécificité tellement forte qu'elles effectuent des réactions leur permettant de choisir parmi différents énantiomères ou de discriminer d'autres groupes pratiquement identiques entre eux.

Les enzymes sont classées selon la réaction catalysée en six principaux groupes: Les oxydoréductases, les hydrolases, les transférases, les lyases, les isomérase, les ligases.

I.3.2 Le site actif

L'activité catalytique des enzymes est déterminée par leur structure tridimensionnelle dans laquelle, une cavité où s'effectue la réaction enzymatique. Cette cavité est appelé le site actif. La conformation et la composition chimique du site actif fixent la spécificité de la réaction catalysée par l'enzyme. On peut concevoir théoriquement le site actif comme composé d'un site de liaison, comprenant les acides aminés à l'origine de l'orientation du substrat, et d'un site catalytique composé des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et la rupture des liaisons

chimiques prenant le jeu du mécanisme catalytique. Mais, la fixation du substrat et la rupture de ses liaisons jouent toutes deux un rôle inséparable dans la catalyse enzymatique.

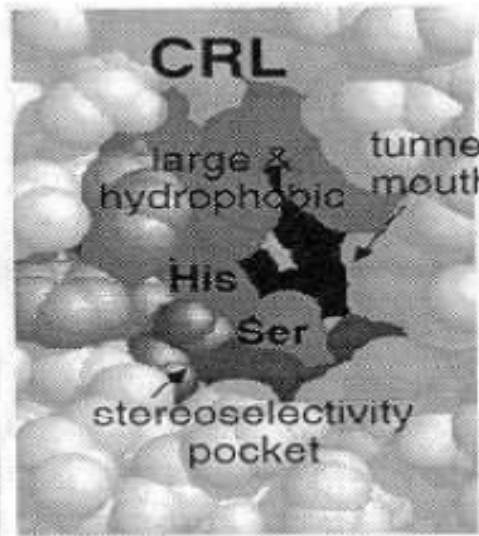


Figure I.18 : Topographie de site actif de lipase Candida Rugosa.

I.3.3 Les biocapteurs enzymatiques

Historiquement, les enzymes ont été les premières molécules de reconnaissance intégrées dans des biocapteurs et restent, de nos jours, les bases de la construction de nombreux biocapteurs pour des applications très variées. On peut considérer un biocapteur enzymatique 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 [55-56]. La sensibilité et la sélectivité du biocapteur dépendent de l'affinité du composant biologique pour le substrat mais également des propriétés physico-chimiques du transducteur [57].

Les étapes mises en jeu au cours du fonctionnement du capteur enzymatique sont :

- a) Transport du substrat de la masse de la solution vers la couche enzymatique
- b) Diffusion de substrat dans cette couche, accompagnée de la transformation enzymatique du substrat en produit de réaction.
- c) Migration du produit vers le transducteur
- d) Conversion de la concentration du produit à cette interface par le transducteur, en signal électrique.

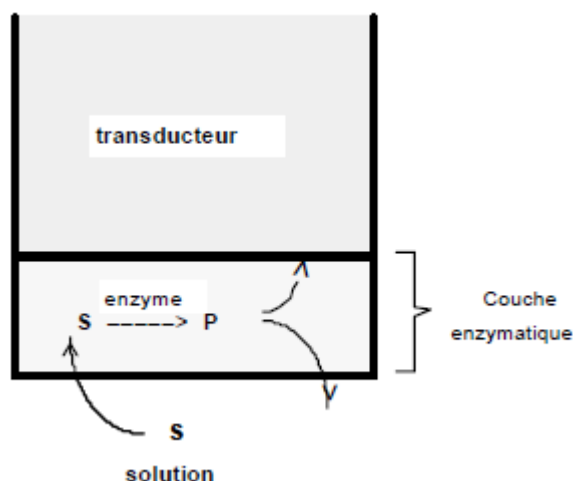


Figure I.19: Représentation schématique du principe du biocapteur enzymatique

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimique diminue l'utilisation des produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation des sous-produits. Les biocapteurs enzymatiques présentent de multiples avantages tels que la possibilité de modifier leurs propriétés catalytiques ou la spécificité de leur substrat par ingénierie génétique ainsi que l'aptitude à amplifier la réponse du capteur en modulant l'activité de l'enzyme [58]. Néanmoins, il existe certaines limitations à l'emploi des enzymes en tant que biorécepteurs. En effet, des étapes préliminaires de production, de purification et de conservation sont nécessaires, engendrant ainsi des contraintes économiques conséquentes. De plus, la stabilité dans le temps des enzymes, leur besoin en cofacteurs ou coenzymes [30] de même que la fragilité des enzymes lorsqu'elles sont extraites de leur milieu naturel peut être à l'origine de certaines limitations. En outre, l'un des inconvénients majeurs réside dans leur manque de versatilité, essentiellement en ce qui concerne les biocapteurs à enzymes basés sur les phénomènes d'inhibition. Ces derniers détectent de manière très spécifique une catégorie de composés avec un degré de sensibilité fluctuant pour chacun d'entre eux. Le nombre limité de substrats spécifiques à chaque enzyme ainsi que le phénomène de limitation par le substrat peuvent s'avérer dans certains cas fortement désavantageux [58].

De nombreux progrès ont pu être réalisés afin de remédier à ces contraintes. En effet des modifications génétiques ont été réalisées au niveau des microorganismes sécrétant de certaines enzymes pour améliorer la sensibilité des essais ainsi que la stabilité et le temps de demi-vie de ces enzymes. De même, des interfaces et des médiateurs électrochimiques performants ont été développés [58].

I.3.4 Mécanisme réactionnel et cinétique enzymatique

Quelque soit le type de la réaction catalysée, un cycle enzymatique se déroule généralement en quatre étapes :

- Diffusion des réactifs dans le milieu
- Reconnaissance enzyme- substrat
- Mécanisme catalytique
- Expulsion des produits

La réaction catalysée par l'enzyme a lieu sur une fraction très faible de la totalité de la surface moléculaire. Dans cette petite zone appelée site actif, l'enzyme catalyse la transformation chimique d'une ou de plusieurs molécules réactives référencées par S (substrat). Ce dernier diffuse vers le site actif en se liant à l'enzyme référencée par E pour former le complexe enzyme-substrat E-S soit par le modèle simple de complémentarité stérique ou par celui de l'injustement induit. La fixation E-S est réalisée par établissement des liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes et interactions de Van der Waals. Cette approche de substrat vers l'enzyme, peut induire une modification de la géométrie du site actif pour une meilleure orientation du groupe réactionnel. Après l'association E-S par différentes forces d'interactions, ils constituent un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instables qui permettent d'abaisser l'énergie de réaction et d'aller vers la formation des produits.

Le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des liaisons de faible énergie, il est ensuite libéré afin de permettre à l'enzyme de retrouver sa conformation native plus stable. Ces évènements se produisent à une vitesse de 10^6 fois/minute/molécule d'enzyme, lorsque cette dernière se trouve à des conditions optimales. Ces constatations dérivent de la théorie de Michaelis et Menten qui tient compte de la modélisation de l'aspect cinétique enzymatique, qui a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes (réaction enzymatique), en étudiant leur vitesse (leur évolution en fonction du temps).

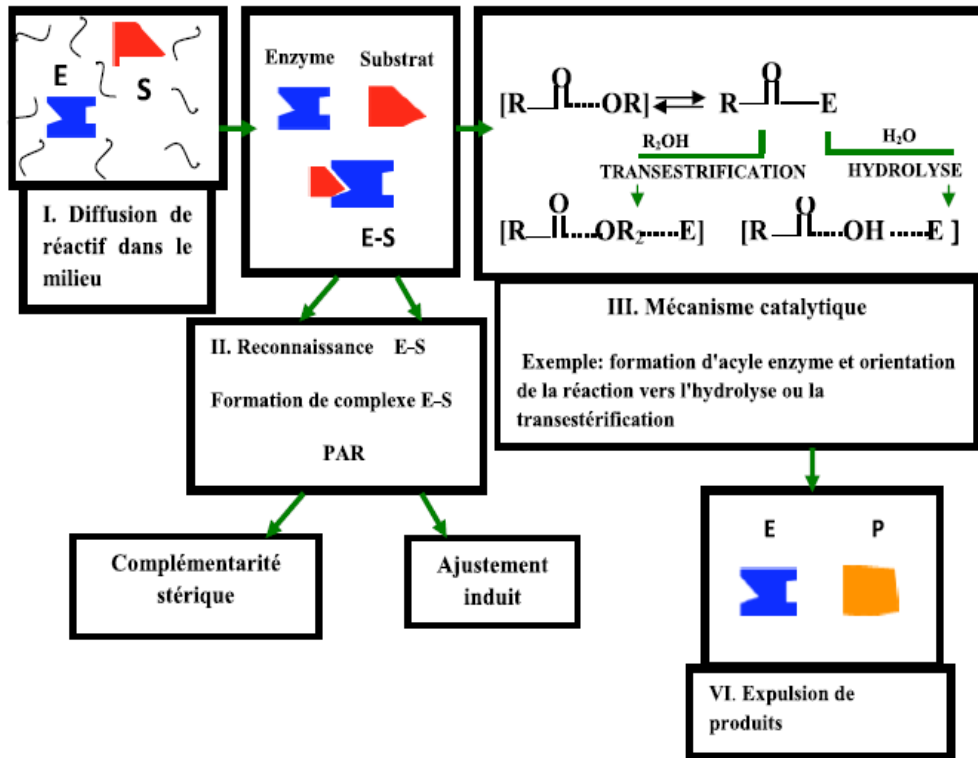


Figure I.20 : Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique.

- **La cinétique enzymatique : Modèle de Michaelis-Menten**

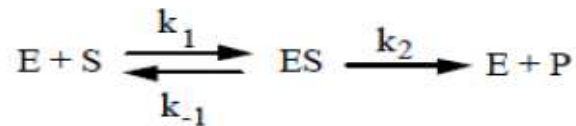
Les valeurs de la constante de Michaelis K_M et de la vitesse maximale V_M d'une enzyme peuvent, d'emblée, fournir certains renseignements sur son activité, bien qu'il faille avant tout tenir compte du nombre de molécules d'une enzyme disponibles dans une cellule pour savoir quelle sera l'efficacité de son action.

La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme à la concentration habituelle de son substrat dans la cellule. Pour la plupart des enzymes, K_M est approximativement égale à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat.

- K_M est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme est faible.
- K_M est basse, cela veut dire que l'affinité du substrat pour l'enzyme est forte.

Pour les concentrations en substrats inférieures ou égales à K_M , la vitesse de la réaction dépend de la vitesse d'association entre enzyme et substrat.

Equation de Michaelis-Menten



E: enzyme *S*: substrat
P: produit *ES*: complexe enzyme-substrat

K_M : représente la constante de Michaelis de l'enzyme, elle a la dimension d'une concentration et s'exprime comme [S] par une molarité

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad (Eq\ I.16)$$

La vitesse de réaction est alors donnée par l'équation de Michaelis-Menten:

$$v = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (Eq\ I.17)$$

$$V_M = k_2[E]_0$$

Où :

$[E]_0$: la concentration initiale en enzyme

Deux cas limites se présentent :

$$\text{Si } [S] \ll K_M \rightleftharpoons v = \frac{k_2[E]_0}{K_M} [S] \quad (Eq\ I.18)$$

La cinétique de réaction est de l'ordre 1 par rapport à S. Le rapport k_2 / K_M est fonction des autres constantes de vitesse :

$$k_2 / K_M = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} \quad (Eq\ I.19)$$

$$\text{Si } [S] \gg K_M \rightleftharpoons v = k_2[E]_0 \quad (Eq\ I.20)$$

La cinétique de réaction est d'ordre 0 par rapport à S. On atteint la vitesse maximale V_M .

L'équation (I.17) permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (figure.21).

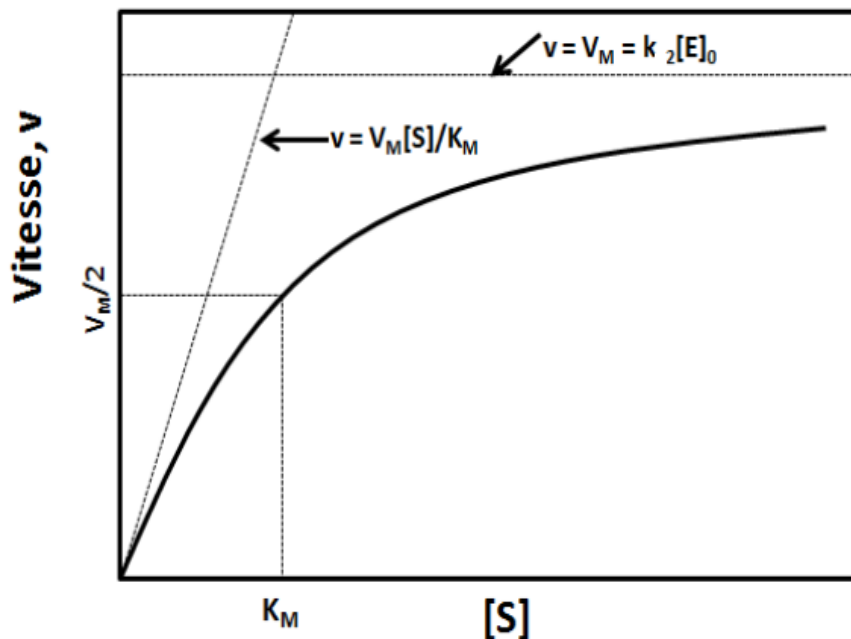


Figure I.21: Représentation graphique d'une cinétique Michaélienne. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

I.3.5 Facteurs influençant l'activité enzymatique

➤ Effet de la température

La vitesse des réactions chimiques augmente généralement avec la température en raison de l'énergie cinétique fournie aux molécules pour augmenter le nombre de collisions efficaces conduisant aux produits de réaction. Cependant, pour les enzymes dont la structure tertiaire, très ordonnée et complexe, est nécessaire à la fixation stéréospécifique du substrat, l'élévation de la température peut détruire cette structure conduisant à la perte d'activité enzymatique.

Ainsi que le montre la figure I.22, il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Il en résulte l'existence d'une température critique (T_c). Au-delà de laquelle il se produit le phénomène de dénaturation.

Les enzymes de faible masse moléculaire portant une seule chaîne polypeptidique et des liaisons disulfures sont plus sensibles à la dénaturation que les enzymes à grande masse moléculaire. En général, elles sont plus stables dans l'extrait brut en présence d'autres protéines ou immobilisées à l'état insoluble.

La résistance de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique dépend d'autres paramètres tels que le pH ou la force ionique et de la présence de ligands.

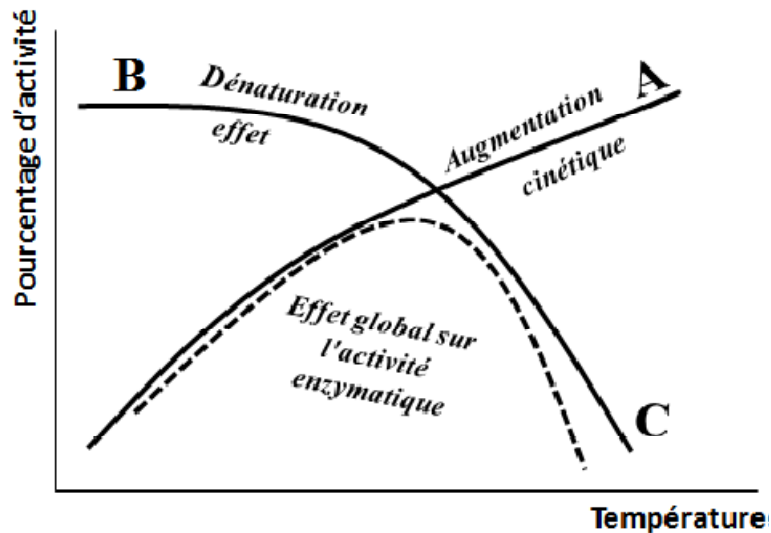


Figure I.22: Effet de la température sur l'activité enzymatique.

➤ Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité enzymatique est lié souvent à l'état d'ionisation, soit du substrat (dont une forme seulement est catalysée), soit d'un certain nombre de groupements dissociables de l'enzyme nécessaire pour maintenir la conformation du site actif et participant à l'élaboration du complexe E-S. Les différents groupements dissociables pouvant être présents au niveau du site actif sont : α -COOH carboxyle ou α -NH₂ amine en bout de chaîne, NH imidazole de l'histidine, NH guanidine de l'arginine, SH sulfhydryl de la cystéine et OH phénolique de la tyrosine. La valeur des pKa de ces groupements dépend beaucoup de leur environnement polaire ou non polaire. La plupart des enzymes sont actives dans un domaine limité de pH. On peut attribuer ce fait à la stabilité de la protéine enzymatique dans cette zone de pH. Le pH optimal est fonction du site actif, de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Dans la pratique, le pH optimal est choisi aussi en fonction des conditions de mesure dont un compromis est nécessaire surtout lorsqu'une séquence de réactions enzymatiques est mise en jeu.

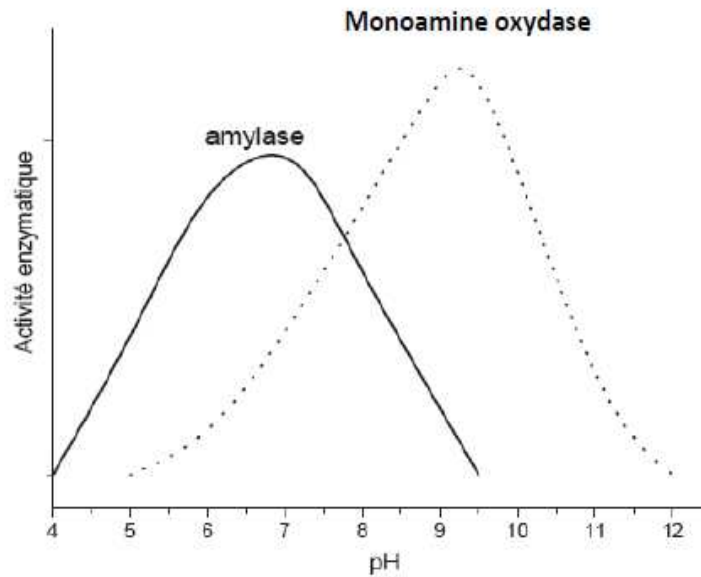


Figure I.23: Comparaison sur l'effet du pH sur deux enzymes différentes.

➤ Influence de la concentration d'enzyme

La réaction d'équilibre entre l'enzyme et son substrat est très rapide [59]. En effet, l'addition de quelques molécules d'enzymes à la réaction augmente la concentration du complexe enzyme-substrat (ES) et par conséquent la vitesse de la réaction. Pour des faibles concentrations en substrat, toutes les enzymes ne peuvent pas être liées. Par contre, cette condition ne sera satisfaite que pour des hautes concentrations ce qui augmente la vitesse de réaction le plus rapidement possible pour atteindre une valeur maximale V_{\max} . La variation de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat demeure linéaire pour de faibles concentrations jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur maximale pour les hautes concentrations. Alors, pour effectuer des mesures d'activité catalytique, il sera donc important de se placer en excès de substrat afin de pouvoir directement mesurer V_M .

I.3.6 Les différentes techniques d'immobilisation d'enzyme sur la surface du transducteur

Le point critique en technologie de fabrication des biocapteurs demeure dans l'immobilisation des biomolécules actives (enzymes, anticorps, cellules ou tissus...) à la surface du transducteur. Plusieurs techniques d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur peuvent être adoptées selon les biomolécules utilisées et l'application désirée, ces techniques peuvent être subdivisées en procédés physiques et en procédés chimiques (figure I.24). Plusieurs critères de sélection tels que le type de matériel biologique, le substrat à analyser ainsi que la configuration du

transducteur doivent être pris en compte pour le choix de la technique d'immobilisation, l'objectif étant de garantir une accessibilité et une réactivité maximales du biorécepteur. La meilleure technique, d'après Bowers, n'existe pas [60].

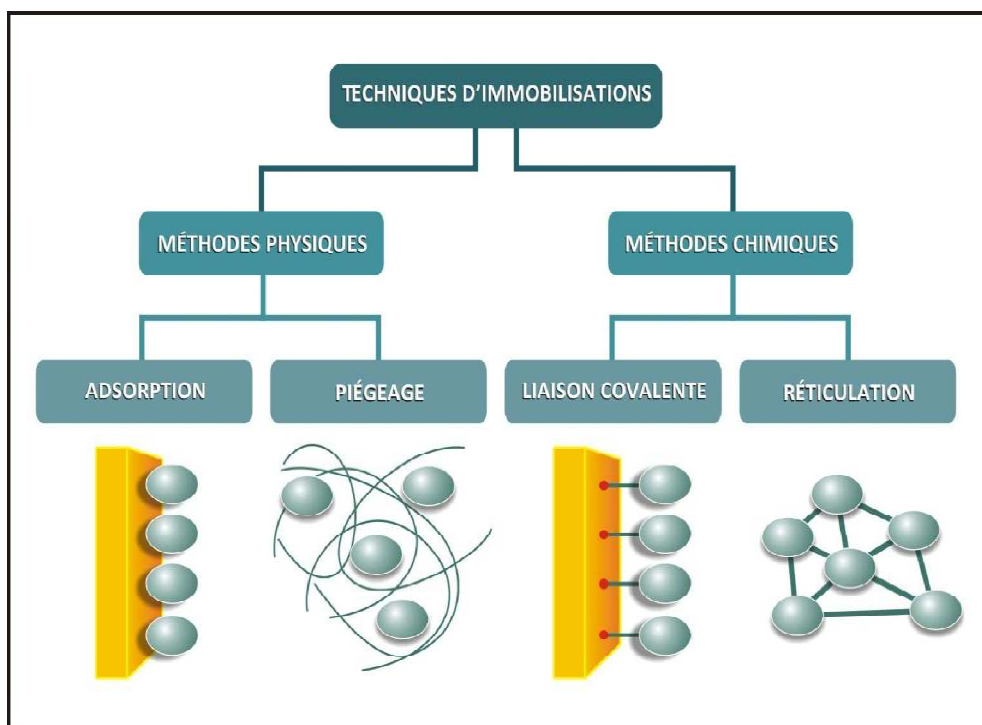


Figure I.24 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme.

Les méthodes physiques d'immobilisation

➤ L'adsorption

L'adsorption est l'une des méthodes les plus simples et non dénaturante de l'enzyme. Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant minéral ou organique, par l'établissement d'interactions de faible énergie de type ionique, polaire ou hydrophobe, ou encore de liaisons hydrogènes entre le biorécepteur et un support non soluble, par l'intermédiaire d'un matériau actif tel qu'une résine échangeuse d'ions anionique ou cationique [61], du charbon actif, de l'argile, de l'oxyde de l'aluminium, du verre poreux, des céramiques [62] ou des nanoparticules [63].

Malgré sa simplicité de mise en œuvre, elle demeure peu utilisée pour la conception des biocapteurs parce que les enzymes immobilisées peuvent facilement se désorber sous l'action des variations de pH, de la température, de la concentration en substrat ou de la force ionique [30]. La stabilité et la durée de vie des biocapteurs sont donc diminuées [64].

➤ **Le piégeage**

La méthode d'inclusion physique consiste à incorporer le biorécepteur dans une matrice organique (polymère) [65], ou inorganique (le chitosane, la gélatine, l'agarose) [66-67]. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention d'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat. L'inconvénient majeur de ce type de technique réside dans l'établissement d'une résistance diffusionnelle supplémentaire qui se traduit par une baisse de la sélectivité et une augmentation des limites de détection [30]. Le relargage du biorécepteur dans le milieu réactionnel suite à la modification des conditions expérimentales telles que le pH, la force ionique, la température ou encore la présence de solvant peut également constituer, dans certains cas, une limitation à cette technique.

Les méthodes chimiques d'immobilisation

➤ **Liaison covalente**

Cette technique est basée sur la réaction entre un groupement fonctionnel de l'enzyme et un groupement fonctionnel du support préalablement activé. Les groupements fonctionnels disponibles pour les enzymes ou les protéines proviennent des chaînes latérales des acides aminés, des groupements carboxyliques ou sulfhydriles et des transducteurs porteurs de groupement amine, époxy ou tosyloxy [68-69]. Une activation du support portant soit des groupements amines soit des groupements carboxyliques permet par exemple la formation de liaisons amides, respectivement, avec les fonctions carboxyliques ou amines de l'enzyme [68]. Néanmoins, l'exposition à des conditions chimiques agressives affecte la viabilité et l'activité cellulaire et peut entraîner la perte en enzymes intracellulaires [30].

➤ **La réticulation**

La technique de réticulation ou de co-réticulation consiste à associer l'enzyme et une protéine de charge à l'aide d'un agent bi ou multifonctionnel pour former un réseau tridimensionnel. Le plus souvent, la protéine de charge est l'albumine du sérum bovin (BSA) [69], et l'agent réticulant est le glutaraldéhyde [57]. Cet agent bifonctionnel possède à ces extrémités deux groupements aldéhyde est utilisé afin d'assurer la liaison entre les enzymes ou les protéines membranaires au niveau des cellules entières.

La réticulation des enzymes peut être réalisée directement au niveau du transducteur ou au niveau d'une membrane qui sera placée par la suite au niveau du transducteur [30]. Cette méthode est facile à mettre en œuvre, les membranes ainsi formées sur la surface solide sont insolubles dans l'eau assurant une fixation renforcée de l'élément biologique. Néanmoins, la

constitution d'un réseau tridimensionnel peut limiter la diffusion de l'analyte et diminuer la cinétique enzymatique. De plus, la réaction chimique peut être à l'origine d'un changement de conformation de l'enzyme, provoquant une perte d'activité de la membrane co-réticulée [68].

➤ *Cas de la réticulation par glutaraldéhyde*

Le glutaraldéhyde (GA) est largement utilisé pour le développement de biocapteurs, il possède une place importante dans le classement des agents de réticulation du fait de sa fiabilité, son faible coût et sa facilité d'utilisation. C'est le réactif de choix dans les cas nécessitant une immobilisation rapide et sûre de protéine [69]. Il est principalement disponible commercialement sous forme acide en solution aqueuse de pH compris entre 3,0 et 4,0. Pour l'immobilisation des enzymes, GA est souvent employé sous sa forme liquide mélangé directement avec les biomolécules [70- 71- 72]. Toutefois, il est possible également d'utiliser ce réactif sous forme de vapeur saturée [73- 74]. Dans des études précédemment effectuées comparant différents modes d'immobilisation d'enzyme pour le développement de biocapteurs, ils ont montré que les vapeurs de GA conduisaient à de meilleurs résultats que la forme liquide [75- 76]. Ces résultats peuvent être attribués au fait que les conditions expérimentales sont plus douces en présence de vapeur (effet de dilution).

Dans certains cas, la protéine immobilisée est plus active et/ou plus stable que la protéine libre, ou la même protéine immobilisée par n'importe quelle autre méthode. Ceci peut se produire parce que les liaisons multiples, présumées se produire avec le GA, empêchent le déploiement de la protéine. Alternativement, la nature polymérique du GA forme une longue chaîne, attachant la protéine à la matrice, qui permet une plus grande flexibilité pour les changements conformationnels de la protéine nécessaire à son activité [77]. De plus, l'utilisation d'une protéine inactive, telle que la BSA, avec l'enzyme et le GA (co-réticulation) permet, grâce à une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues.

I.4 la modification de la surface d'électrode par des monocouches auto assemblées et des sels de diazonium

I.4.1 Les monocouches auto assemblées (SAMs) ; modification chimique de la surface

L'auto-assemblage, au sens général du terme, c'est la formation spontanée des assemblages moléculaires, auto-organisés, par immersion d'un substrat dans un solvant organique contenant des molécules susceptibles d'interagir avec la surface du solide. Il existe une grande variété de groupements fonctionnels se liant à un métal, oxyde métallique et semiconducteurs spécifiques. En général, une SAM est constituée de trois grandes parties (Figure I.25).

- **Une tête réactive:** cette première partie possède une grande affinité avec le substrat. Une réaction chimique (chimisorption) fortement exothermique se produit entre ces molécules et des sites spécifiques de la surface. La liaison peut être covalente, ionique ou pseudo-covalente, elle intervient dans l'arrangement des molécules SAMs. Les molécules vont chercher à occuper tous les sites disponibles à la surface du substrat, déplaçant, dans ce processus, les molécules qui pouvaient préalablement être adsorbées à la surface : c'est le phénomène de « self-cleaning ». Cet effet, spontané, implique une certaine mobilité des molécules à la surface du substrat, ce qui permet un assemblage dense et ordonné.
- **Un corps:** c'est la partie centrale de la molécule, elle est constituée par des chaînes alkyles simples [78] qui peu inclure un ou plusieurs groupement fonctionnels comme, par exemple, la fonction amide ou la fonction phényle [79-80]. Lorsque les molécules sont suffisamment proches les unes des autres, suite au processus du chimisorption décrit précédemment, des interactions de Van Der Waals entre les chaînes interviennent. Si le corps de la molécule SAM comporte des groupements polaires, alors les interactions électrostatiques peuvent dominer. Ces forces contribuent à la formation d'un assemblage dense et ordonné de molécules. L'ordre et la stabilité des SAMs dépendent aussi de la longueur des chaînes : plus la longueur des chaînes croît, plus les SAMs sont ordonnées et stables.
- **Une queue:** ou fonction terminale, cette partie est constituée d'un groupement fonctionnel ou polyfonctionnel, selon l'expérimentation visée et le domaine d'application ($R = \text{CH}_3, \text{COOH}, \text{OH}, \text{NH}_2$), les caractéristiques de ce groupement peuvent modifier l'organisation et les propriétés de la SAM [81-82].

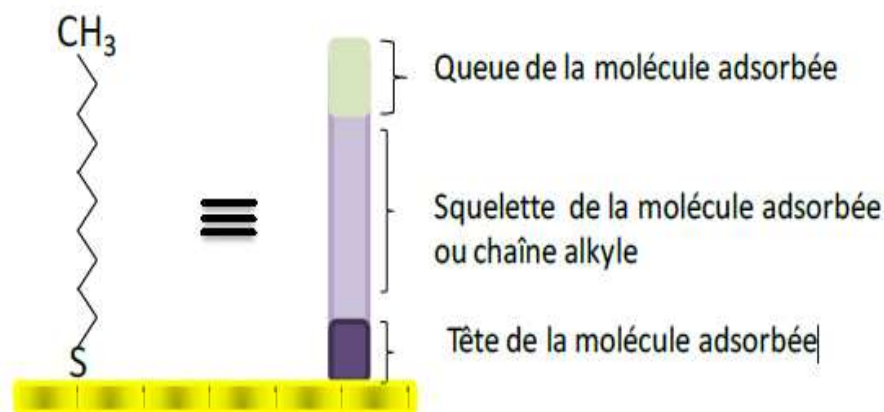


Figure I.25: Schéma de base d'une couche SAM.

Les SAMs possèdent des propriétés remarquables telles que: la facilité à préparer des monocouches ordonnées, stables et reproductibles, qui peuvent être facilement utilisées pour la fixation de biomolécules comme les enzymes et permettant d'augmenter leur activité [83]. De plus, les SAMs donnent la possibilité d'étudier certaines interactions comme l'adsorption des protéines, l'interaction anticorps-antigène, immobilisation d'enzyme et l'hybridation d'ADN en utilisant des techniques de microscopie à effet de tunnel et de microscopie à force atomique. Ces particularités des SAMs les rendent largement utilisées dans l'élaboration de biocapteurs.

Ces dernières années, de nombreux biocapteurs ont été développés utilisant les monocouches auto assemblées pour des applications variées. A titre d'exemple ; la quantification de glucose dans le lait par un biocapteur de glucose oxydase [84], l'antigène D-Dimère a été utilisé avec un système SAM/ SWCNT pour une détermination sensible de thrombine [85]. De même, un immunocapteur impédimétrique a été développé pour la quantification de cytokine [86]. L'alcool oxydase et la glucose oxydase ont également été immobilisées sur des électrodes d'or afin de détecter l'éthanol et le glucose respectivement [87-88]. Aussi, un biocapteur à base de l'acétylcholinestérase a été développé pour permettre la quantification de malathion [89].

I.4.2 Les sels de diazonium ; modification électrochimique de la surface

Les sels d'aryle ou alkylidiazonium sont un groupe de composés organiques qui possèdent une structure caractéristique : $\mathbf{R-N_2^+ X^-}$ telle que :

R : un résidu organique comme alkyl ou aryle.

X : un contre-anion tel que les halogènes.

Ces composés sont connus pour leur caractère stable et leur grande réactivité. Ils sont caractérisés par leur structure amphiphiles (tête polaire diazonium (N_{2+}) hydrophile et un noyau aromatique (hydrophobe).

La modification des microélectrodes par le sel organique de diazonium a été introduite par Delamar et al en 1992 [90]. Cette alternative est prometteuse pour la modification des arrangements de microélectrodes, une électrode modifiée par une couche organique de diazonium voit son domaine d'électroactivité augmenter. De plus, la capacité à créer une surface diazonium-modifiée par l'application d'un potentiel permet une fonctionnalisation sélective de la surface des microélectrodes étroitement situées [91]. Dans cette approche la réduction d'un sel diazonium va créer un aryl radical centré après l'élimination spontanée de dinitrogène. Le radical aryl résultant peut alors former une liaison covalente avec une surface conductrice ou semi-conductrice. Cette approche donne des surfaces bio-fonctionnelles très stables. De plus cette approche est très facile à manipuler vu la grande capacité à synthétiser des sels diazonium avec une vaste gamme de groupes fonctionnels. Ceci permet d'immobiliser plusieurs biomolécules (enzymes, anti-corps, ADN, etc). A titre d'exemple, Corgier et al ont démontré l'utilisation potentielle d'aryl diazonium pour l'électro-immobilisation directe des protéines. Ils ont montré que les immunoglobulines de type G (IgG) covalamment couplées avec 4-carboxymethylaniline (CMA) pourraient être greffées à la surface d'une électrode spécifique, par l'électro-réduction d'une fonction de diazonium produite in situ [92]. De même, Delmer et al, ont également immobilisée la glucose oxydase sur une électrode de carbone vitreux par une liaison covalente avec 4-nitophenyldiazonium [93]. Un immunocapteur impédimétrique basé sur le greffage électrochimique de 4-nitrophenyl diazonium a été développé pour la détection de la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* [94].

I.5 L'ajout des nanomatériaux pour le développement des biocapteurs

Le développement récent de la nanotechnologie a ouvert des nouvelles frontières fondamentales appliquées à la science des matériaux et à la technologie. Ce domaine comporte l'étude, la manipulation, la création et l'utilisation de matériaux, dispositifs et systèmes en général avec des dimensions inférieures à 100 nm. La nanotechnologie joue un rôle de plus en plus important dans le développement des biocapteurs, tant au niveau de leur miniaturisation que du développement de nouveaux systèmes d'immobilisation des biorécepteurs [95-96].

Dans ce dernier domaine, de nouveaux matériaux, tels que les nanoparticules ou les nanotubes de carbone se sont avérés extrêmement prometteurs. Ils permettent d'améliorer nettement leurs performances, en particulier leur sensibilité. Ces nanomatériaux présentent différentes morphologies telles que des sphères, des tubes, des tiges. Grâce à la facilité relative avec laquelle ils peuvent être préparés et manipulés, leur réactivité généralement élevée, leur surface développée et la nature de leurs propriétés électroniques, catalytiques ou optiques, les nanomatériaux sont actuellement employés dans les domaines de l'électronique, la biomédecine, la pharmacie, les produits de beauté, l'analyse environnementale, la catalyse et la science des matériaux, et d'une manière intensive de nos jours dans le domaine des biocapteurs [97-98].

Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à définir les nanoparticules et les nanotubes de carbone en tant que nanomatériaux utilisés pour la fabrication des biocapteurs développés au cours de cette thèse.

I.5.1 Intégration des nanoparticules dans les biocapteurs

Des nanoparticules en métal ou semi-conducteur, de dimensions comparables aux dimensions des biomolécules comme les enzymes, les antigènes-anticorps ou ADN, sont utilisées pour la fabrication des biocapteurs. Ces nanoparticules permettent de maintenir l'activité des biomolécules une fois adsorbées sur la surface. A titre d'exemple des nanoparticules d'or sont utilisées pour immobiliser des enzymes par adsorption chimique sur des monocouches auto-assemblées [99]. Une nouvelle approche de l'utilisation des nanoparticules pour le développement des biocapteurs suscite un intérêt croissant car elles apportent une solution idéale dans l'optimisation des molécules actives immobilisées. En effet, cette approche consiste à utiliser des nanoparticules fonctionnalisées avec des groupements présentant des sites d'affinité qui servent à immobiliser, et donc à concentrer localement, les espèces ciblées qui sont ensuite détectées. Donc, cette approche permet d'une part de minimiser le problème de diffusion, d'augmenter la surface de contact avec le milieu environnant ainsi que la densité de greffage des biomolécules et d'autre part, de maintenir la stabilité et l'activité de la biomolécule. En termes d'amélioration des performances des biocapteurs, grâce à leur comportement quasi moléculaire en raison de leur petite taille, les nanoparticules fonctionnalisées permettent d'augmenter la sensibilité et d'abaisser le seuil de détection.

Le tableau I.1 présente quelques exemples de biocapteurs électrochimiques développés avec des nanoparticules.

Tableau I.1: Exemples d'application des nanoparticules pour l'immobilisation des biomolécules

<i>Types de nanoparticules</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Analyte</i>	<i>Mode de détection</i>	<i>Références</i>
Au	<i>Arthrospira platensis</i>	Pesticides organophosphorés	conductimétrique	[100]
Au	Formaldéhyde dehydrogénase	Formaldehyde	conductimétrique	[101]
Fe₃O₄	Glucose oxidase	glucose	Ampérométrie et Voltammétrie cyclique	[102]
Au	Oligonucléotides	ADN	Ampérométrie	[103]
Ag	Laccase	Lutéolol (Flavonoïde)	Voltammétrie cyclique	[104]
Au	Peronase oxidase	glucose	Ampérométrie	[105]
Fe₃O₄	Anticoprs- OTA	Ochratoxin A	impédencémétrie	[106]
Pt	Laccase	Méthomyle (pesticide)	Voltammétrie cyclique	[107]

1.5.2 L'utilisation des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone suscitent un intérêt considérable dans le monde de la recherche, comme dans celui de l'industrie, compte tenu de leurs propriétés intrinsèques exceptionnelles et de leurs caractéristiques dimensionnelles [108]. Observés pour la première fois en 1991, les nanotubes se présentent comme des tubes creux concentriques séparés de 0,34 nanomètre (parfois il n'y a qu'un seul tube), avec un diamètre interne de l'ordre du nanomètre et une longueur de l'ordre de quelques micromètres. Ces structures allongées sont éventuellement fermées à leurs extrémités par des pentagones de carbone caractéristiques des fullerènes. Un tel filament présente une résistance 100 fois supérieure à l'acier, pour un poids divisé par six, et cela avec une résistance peu commune aux hautes températures. Leur diamètre est de l'ordre du millionième de millimètre. Les nanotubes de carbone sont subdivisés en deux : les nanotubes de carbone mono- feuillets, (en anglais *Single-walled Carbon Nanotubes, SWNT*) (figure I.25. A) et les nanotubes de carbone multi feuillets, (en anglais *Multi-walled Carbon Nanotubes, MWNT*) (Figure I.25, B) [109-110].

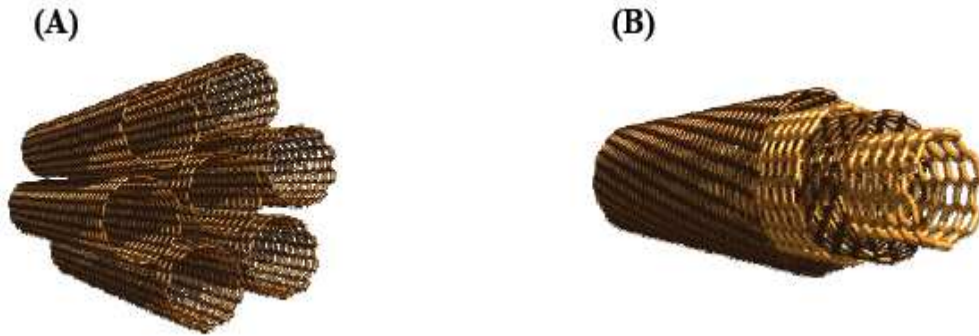


Figure I.26 : Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone mono-feuillet (SWCNT) (A) et multi-feuillets (MWCNT) (B).

Les propriétés exceptionnelles des nanotubes de carbone ont motivé une intense recherche scientifique. En effet, ce matériau présente des propriétés mécaniques, électriques, thermiques et chimiques hors du commun qui permettent d'envisager plusieurs applications telles que des dispositifs électroniques, des dispositifs à émission à effet de champ, le renforcement de matériaux composites et des capteurs.

Les nano-dimensions, la chimie de surface du graphite et les propriétés électroniques des nanotubes de carbone en font un matériau idéal pour la détection des espèces chimiques et biochimiques. L'utilisation de nanotubes de carbone pour le développement des biocapteurs suscite un intérêt croissant car il permet d'une part de minimiser le problème de diffusion, d'augmenter la surface de contact avec le milieu environnant ainsi que la densité de greffage des biomolécules et d'autre part, de maintenir la stabilité et l'activité de la biomolécule. En termes d'amélioration des performances des biocapteurs, les nanotubes de carbone permettent d'augmenter la sensibilité et d'abaisser le seuil de détection.

Le tableau I.2 présente quelques exemples de biocapteurs développés avec des nanotubes de carbone pour la détection de biomolécules.

Tableau I.2: Biocapteurs développés à base des nanotubes de carbone.

<i>Types de nanotubes</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Analyte</i>	<i>Mode de détection</i>	<i>Références</i>
<i>SWCNT</i>	<i>Pseudomonas putida F1</i>	trichloroéthylène	impédancemètrie	[45]
<i>MWCNT</i>	tyrosinase	Bisphénol A	Ampéromètrie	[111]
<i>SWCNT</i>	Anti-corps D-Dimère	Thrombine	impédancemètrie	[85]
<i>MWCNT</i>	Horseradish peroxidase (HRP)	Métaux lourds	Ampéromètrie	[112]
<i>MWCNT</i>	HRP, Cholestérol oxidase	<i>Cholestérol</i>	impédancemètrie	[113]
<i>MWCNT</i>	Glutamate oxydase	Glutamate	Ampéromètrie	[114]

Références

- [1] Clark Jr, L.C. *Trans. Am. Soc. Arti. Intern. Organs* 1956, 2, 41-48.
- [2] Clark Jr, L.C, Lyons. C. *Ann. Ny Acad. Sci.* 1962, 102, 29-45.
- [3] Guilbault, G.G., Montalvo Jr, J.G. *J. Am. Chem. Soc* 1969. 91, 2164-2165.
- [4] D'Souza, S.F. *Biosens & Bioelectron* 2001, 16, 337-353.
- [5] Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., *Biosens & Bioelectron.* 2001, 16, 121-127.
- [6] Mehrvar.M, Abdi.M, *Analyt. Sci* 2004, 20, 1113 - 1126.
- [7] Eltzov, E.; Marks, R.S., *Anal. Bioanal. Chem* 2011, 400, 895- 913.
- [8] Ispas, C.R.; Crivat, G.; Andreescu, S., *Anal. Lett* 2012, 45, 168- 86.
- [9] Jia. Y, Qin. M, Zhang. H, Niu. W, Li. X, Wang. L, Li. X, Bai. Y, Cao. Y, Feng. X. *Biosens. Bioelectron* 2007, 22, 3261-3266.
- [10] Gupta, V.K.; Nayak, A.; Agarwal, S.; Singhal, B. *Comb. Chem. Hight. T. Scr.* 2011, 14, 284- 302.
- [11] Du. L, Wu. C, Liu. Q, Huang. L, Wang. P, *Biosens. Bioelectron.* 2013, 42, 570-580.
- [12] Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 400, 947-964.
- [13] Bratov, A.; Abramova, N.; Ipatov, A. *Anal. Chim. Acta* 2010, 678, 149-159.
- [14] Ghosh, G.; Bachas, L.G.; Anderson, K.W. *Anal. Bioanal. Chem* 2008, 391, 2783-2791.
- [15] Bergveld, P. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 1970, 17, 70-71.
- [16] Shinwaria, M.W.; Deen, M.J.; Landheer, D. *Microelectron. Reliab* 2007, 47, 2025-2057.
- [17] Yuqing, M.; Jianguo, G.; Jianrong. C, *Biotechnol. Adv* 2003, 21, 527-534.
- [18] Bettaieb, F.; Ponsonnet, L.; Lejeune, P.; Ben Ouada, H.; Martelet, C.; Bakhrouf. A, Jaffrézic-Renault. N, Othmane A. *Bioelectrochem* 2007, 71, 118-125.
- [19] Sasaki. Y, Ogawa. J, Tani. T, *Biocatal. Agric. Biotechnol* 2012, 1, 259-261.
- [20] Lee, C.-S.; Kim, S.K., Kim. M, *Sensors* 2009, 9, 7111-7131.
- [21] Lin, T.-W.; Kekuda, D.; Chua. C.W, *Biosens. Bioelectron* 2010, 25, 2706-2710.
- [22] Ronkainen, N.J.; Halsall, H.B.; Heineman, W,R. *Chem. Soc.Rev* 2010, 39, 1747-1763.
- [23] Wang, J. *J.Pharm. Biomed. Anal* 1999, 19, 47-53.
- [24] Arora, P. Sindhu, A. Dilbaghi, N.; Chaudhury. A, *Biosens. Bioelectron.* 2011, 28, 1-12.
- [25] Jaffrezic-Renault, N.; Dzyadevych.S.V, *Sensors* 2008, 8, 2569-2588.
- [26] Soldatkina.O.O Burdak.O.S, Sergejevaa. T.A, Arkhypovaa. V.M, S.V. Dzyadevych. S.V, Soldatkina.A.P, *Sens. Actuators B* 2013, 188, 999-1003.
- [27] Hnaien.M, Lagarde. F, Jaffrezic-Renault. N , *Talanta* 2010, 81, 222-227.
- [28] Zazoua. A, Hnaien. M, Cosnier.S, Jaffrezic-Renault. N, Kherrat.R, *Mater.Sci.Eng C* 2009, 29, 1919-1922.

- [29] Chouteau. C, Dzyadevych. S. V, Durrieu. C, Chovelon. J .M, Biosens. Bioelectron 2005, 21, 273- 281.
- [30] Lei. Y, Chen. W, Mulchandani. A. Anal. Chim. Acta 2006, 568, 200-210.
- [31] Chaubey. A, Malhotra. B.D, Biosens. Bioelectron 2002, 17, 441-456.
- [32] Pohanka, M., Kuca, K., & Jun, D. Appl. Biomed 2008, 6, 27-30.
- [33] Newman. J ,Turner. A.Biosens. Bioelectron 2005, 20(12), 2435-2453.
- [34] Ghosh. G, Mehta. I, Cornette. A, Anderson. K. Biosen. Bioelectron 2007 23, 1109-1116.
- [35] Pejcic.B, De Marco. R, Electrochim. Acta 2006, 51, 6217–6229.
- [36] Saloua Helali, conception te réalisation de matériaux bifonctionnel pour des dispositifs capteurs impédimétriques, thèse soutenue le 15 décembre 2005.
- [37] Amokrane. S, Badiali. J. P, Plenum press 1992, 22, 1– 91.
- [38] Bousse. L, De Rooij. N.F, Bergveld. P, IEEE Trans. Electron Devices 1983, 30, 1263-1270.
- [39] Randles. J, Discuss. Faraday Soc 1947, 1, 11.
- [40] Ramon-Azcon. J, Valera. E, Rodriguez. A, Barranco. A, Alfaro. B, Sanchez-Baeza. F, Marco. M, Biosens. Bioelectron 2008, 23, 1367-1373.
- [41] Helali.S, Abdelghani. A, Hafaid. I, Martelet. C, Prodromidis . M.I, Albanis. T, Jaffrezic-Renault. N, Mater.Sci. Eng C 2008, 28, 826- 830.
- [42] Hou. Y, Jaffrezic-Renault. N, Martelet. C, Zhang. A, Minic-Vidic. J, Gorojankina. T, Persuy. M, Pajot-Augy. E, Salesse. R, Akimov. V, Reggiani. L, Pennetta. C, Alfinito. E., Ruiz. O, Gomila. G, Samitier. J. Errachid. A, Biosens. Bioelectron 2007, 22, 1550-1555.
- [43] Arora. P, Sindhu. A, Dilbaghi. N, Chaudhury. A. Biosens. Bioelectron. 2011, 28, 1-12.
- [44] Pohanka. M, Sklădal. P, Appl. Biomed 2008, 6, 57 - 64.
- [45] Hnaïen. M, Bourigua. S, Bessueille. F, Bausells. J, Errachid. A, Lagarde. F, Jaffrezic-Renault. N, Electrochim. Acta 2011, 56, 10353-10358.
- [46] Meini.N, Farre. C, Chaix. C, Kherrat. R, Dzyadevych. S.V, Jaffrezic-Renault. N, Sens. Actuators B 2012, 166-167, 715-720.
- [47] Chrouda. A, Braïek. M, Bekir Rokbani. K, Bakhrouf. A, Maaref. A, Jaffrezic-Renault. N, Electrochem 2013, 1, 1-9.
- [48] Lisdat. F, Schäfer. D, Anal. Bioanal. Chem 2008, 391, 1555-1567.
- [49] J.Kumar, S.F. D’Souza, Biosens. Bioelectron 2011, 26, 4289- 4293.
- [50] Gangadhara Reddy. K, Madhavi . G, Kumara Swamy. B. E, Mol. Liq 2014, 198, 181- 186.
- [51] Duana. X, Tian. L, Liua. W, Chang. L, Electrochim. Acta 2013, 94, 192-197.
- [52] Raghu. P, Madhusudana Reddy. T, Gopal. P, Reddaiah. K, Sreedhar. N. Y, Enzyme. Microb. Technol 2014, 57, 8-15.

- [53] Splittgerber. G. A, Chem. Educ 1985, 62, 1008-1018.
- [54] Moe. O, Cornelius. R, Chem. Educ 1988, 65, 137-149.
- [55] Zimmermann. S, Fienbork. D, Flounders. A.W, Liepmann. D, Sens. Actuators B 2004, 99, 163-173.
- [56] Marrackhi. M, Dzyadevych. S.V, Namour. P, Martelet. C, Jaffrezic-Renault. N, Sens. Actuators B, 2005, 111, 390-395.
- [57] Choi. J, Microchemica Acta 2004, 148, 107-132.
- [58] Rogers. K. R, Anal. Chim. Acta, 2006, 568, 222-231.
- [59] Durso. M. E, Coulet. R.P, Anal Chem. Acta 1999, 239, 105-114.
- [60] Bowers. L.D, Anal. Chem 1986, 58, 523 - 530.
- [61] Zheng. Y. H, Food Eng 2006, 74, 24 – 29.
- [62] Cao. M, Li. Z, Wang. J, Ge.W, Yue. T, Li. R, Colvin.V. L, Yu.W, Trends. Food. Sci. Tech 2012, 27, 47 – 56.
- [63] Ispas. C. R, Crivat. G, Andreescu.S. Anal. Lett 2012, 45, 168 – 186.
- [64] D'Souza. S.F, Biosens. Bioelectron 2001, 16, 337-353.
- [65] A. Bratov, N. Abramova, J. Munor, C. Domínguez, S. Alegret, J. Bartrolí, Anal. Chem 1995, 67, 3589-3595.
- [66] Wan. K, Chovelon. J. M, Jaffrezic-Renault. N, Soldatkin. A.P, Sens. Actuators B, 1999, 58, 399- 408.
- [67] Besombes .J. L, Cosnier. S, Labbe. P, Talanta, 1997, 44, 2209- 2216.
- [68] Sassolas. A, Blum. L.J., Leca-Bouvier. B.D. Biotechnol. Adv 2012, 30, 489 – 511.
- [68] Datta. S, Christena. L.R., Rajaram. Y. R. Biotechnplogy 2013, 3, 1-9.
- [69] Migneault. I, Dartiguenave. C, Bertrand. M.J, Waldron. K.C. BioTechniques 2004, 37, 790 – 802.
- [70] Walter. A, Wu. J, Flechsig. G. U, Haake. D.A, Wang. J, Anal. Chim. Acta 2011, 689, 29-33.
- [71] Wu. F, Huang. Y, Li. Q, Anal. Chim. Acta 2005, 536, 107 – 113.
- [72] Tao. L, Zhang. K, Sun. Y, Jin. B, Zhang. Z, Yang. K. *Biosens. Bioelectron* 2012, **35**, 186 – 192.
- [73] Fillit. C, Jaffrezic-Renault. N, Bessueille. F, Leonard. D, Mitsubayashi. K, Tardy. J, Mater. Sci. Eng. C 2008, 28, 781 – 786.
- [74] Singh. J, Mittal. S.K, Sens. Actuators B 2012, 165, 48 – 52.
- [75] Li. Y. G, Zhou. Y. X, Feng. J. L, Jiang. Z. H, Ma. L. R, Anal. Chim. Acta 1999, 382, 277 – 282.

- [76] Chang. K. S, Chang. C, Chou. S. F, Han. H. C, Chen. C. Y, *Sens. Actuators B* 2007, 122, 195 – 203.
- [77] Scouton. W. H, Luong. J.T, Brown. R.S. *Trends. Biotechnol* 1995, 13, 178 - 184.
- [78] Porter. M. D, Bright. T. B, Allara. D, Chidsey. E. D, *Am. Chem. Soc* 1987, 109, 3559-3569.
- [79] Sek. S, Bilewicz. R, *Electroanal. Chem* 2001, 509, 11-18.
- [80] Bandyopadhyay. K, Patil. V, Sastry. M, Vijayamohanan. K, *Langmuir* 1998, 14, 3808-3814.
- [81] Molinero.V, Calvo. E, *Electroanal. Chem* 1998, 445, 17-55.
- [82] Zhao. J, Luo. L, Yang. X, Wang. E, Dong. S, *Electroanalysis* 1999, 15, 1108-1115.
- [83] Chaki. N. K, Vijayamohanan. K, *Biosens. Bioelectron* 2002, 17, 1-12.
- [84] Eguílaz. M, Villalong. R, Pingarrónb. J .M, Ferreyraa. N. F, Rivas. G .A, *Sens. Actuators. B* 2015, 216, 629-637.
- [85] Bourigua. S, Hnaien. M, Bessueille. F, Lagarde. F, Dzyadevyhc. S.V, Maaref. A, Bausells. J, Errachid. A, Jaffrezic Renault. N, *Biosens. Bioelectron* 2010, 26, 1278-1282.
- [86] Baraket. A, Lee. M, Zine. N, Sigaud. M, Yaakoubi. N, Trivellac. M. G, Zabala. M, Bausells. J, Jaffrezic-Renault. N, Errachid. A, *Sens. Actuators. B* 2013, 189, 165-172.
- [87] Engin. A, Erol. A, *Biosens. Bioelectron* 2010, 25, 1014-1018.
- [88] Seul- Ki. J, Mi-Ok. N, Se-Young. O, Byung-Keun. O, *Ultramicroscopy* 2009, 109, 911-915.
- [89] Dan. D, Jiawang. D, Jie. C, Jianming. Z, Li. L. *Talanta* 2008, 74(5), 1337-1343.
- [90] Delamar. M, Hitmi. R, Pinson. J, Savéant. J. M, *Am. Chem. Soc* 1992, 114, 5883–5884.
- [91] Allongue. P, Delamar. M, Desbat. B, Fagebaume. O, Hitmi. R, Pinson. J, Saveant. J-M, *Am. Chem. Soc.*1997, 119, 201-207.
- [92] Corgier. B.P, Marquette. C. A, Blum. L. J, *Biosens. Bioelectron* 2007, 22, 1522-1526.
- [93] Bourdillon. C, Delamar. M, Demaille. C, Hitmi. R, Moiroux. J, Pinson. J. J, *Electroanal. Chem.* 1992, 336, 113-320.
- [94] Chrouda. A, Braiek. M, Bekir Rokbani. K, Bakhrouf. A, Maaref. A, Jaffrezic-Renault. N, *Electrochemistry* 2013, 2013, 367-377.
- [95] Vo-Dinh. T, Cullum. B, Stokes. D, *Sens Actuators B* 2001, 74, 2- 11.
- [96] Jain. K, *Expert Rev Mol Diagn* 2003, 3, 153- 161.
- [97] Zhang. X, Guo. Q, Cui. D, *Sensors* 2009, 9, 1033-1053.
- [98] Zeng. S, Yong. K. T, Roy. I, Dinh. X. Q, Yu. X, Luan. F. A, *Plasmonics* 2011, 6, 491 –506.
- [99] Crumbliss. A.L, Perine. S, Stonehuerner. J, Tubergen. K. P, Zhao. J, Henkens. R.W, O’Daly. J. P, *Biotechnol. Bioeng* 1992, 40, 483-490.

- [100] Tekaya. N, Saiapina.O, Ben ouda. H, Lagarde. F, Ben ouda. H, Jaffrezic-Renault. N, Environ. Pollut 2013, 178, 182-188.
- [101] Nguyen- Boisse. T-T, Saulnier. J, Jaffrezic-Renault. N, Lagarde. F, Anal. Bioanal. Chem 2014, 406, 1039-1048.
- [102] Baby. T-T, Ramaprabhu. S, Talanta 2010, 80, 2016 – 2022.
- [103] Ryu, S-W, Kim. C- H, Han. J-W, Kim. C. J, Jung. C, Park. H.G, Choi. Y. K. Biosens. Bioelectron 2010, 25, 2182 -2185.
- [104] Franzoi. A. C, Vieira. I.C, Dupont. J, Scheeren. C.W, Oliveira. L.F, Analyst 2009, 134, 2320 – 2328.
- [105] Caglar. O, Fatma. Y, Dilek. O, Suna. T, Food Chem 2010, 119, 380-385.
- [106] Zamfir. L. G, Geana. I, Bourigua. S, Rotariua. L, Bala. C, Errachid. A, Jaffrezic-Renault. N, Sens. Actuators. B 2011, 159, 178- 184.
- [107] Zapp. E, Brondani. D, Vieira. I. C, Scheeren. C. W, Dupont. J, Barbosa. A. M, Ferreir V. S, Sens. Actuators, B 2011, 155, 331 – 339.
- [108] Iijima .S, Nature 1991, 354, 56-58.
- [109] Wang. J, Tian. B, Lu. J, MacDonald. D, Wang. J, Luo. D, Electroanal 1998, 10, 1034-1037.
- [110] Smit, M. H, Rechnitz. G.A, Anal. Chem 1993, 65, 380-385.
- [111] Yin. H, Zhou.Y, Xu. J, Ai .S, Cui. L, Zhu. L, Anal. Chim. Acta 2010, 659, 144- 150.
- [112] Moyoa. M, Okonkwoa. J. O, Agyei. N. M, Enzyme. Microb. Technol 2014, 56, 28-34.
- [113] Cai. X, Gaoa. X, Wang. L, Wua. Q, Lin. X, Sens. Actuators. B 2013, 181, 575-583.
- [114] Ammam. M, Fransaer. J, Biosens. Bioelectron 2010, 25, 1597-1602.

Chapitre II

**Développement des biocapteurs pour la
détection des pesticides organophosphorés**

Partie A

Chapitre II : Développement d'un biocapteur enzymatique pour la détection des pesticides organophosphorés – vers une meilleure compréhension des paramètres clés influant les performances d'un biocapteur.

II.1 Introduction

L'utilisation des produits phytosanitaires a contribué de façon importante à l'augmentation significative de la production d'aliments et à l'amélioration des rendements agricoles en réduisant les pertes dues aux ravageurs des cultures. Les pesticides organophosphorés (OPs) sont largement utilisés dans l'agriculture en raison de leur forte activité et leur faible persistance dans l'environnement comparant aux organochlorés [1]. Parathion méthyl, paraoxon méthyl et diazinon sont classés parmi les OPs les plus couramment consommés dans le monde. Ces insecticides ont été utilisés pour contrôler les formes juvéniles d'insectes dans le sol, les plantes, les fruits, les légumes et de lutter contre les parasites externes d'animaux [2-3-4]. Néanmoins, leur toxicité est une grave menace qui affecte l'équilibre des systèmes aquatiques et la santé humaine, les pesticides peuvent facilement pénétrer dans le sol et les sources d'eau ce qui cause l'accumulation de leurs résidus dans les aliments et l'eau, ils peuvent être charriés par les eaux de ruissellement et polluer, les lacs, les rivières et les mers. Par conséquent, la pollution par les pesticides a été largement considérée comme l'une des plus grandes causes de la contamination des eaux de surfaces [5- 6-7- 8].

La dangerosité des OPs ne se limite pas seulement à l'environnement et les écosystèmes, ils sont également néfastes pour les êtres humains ; ils agissent comme des inhibiteurs de l'activité acétylcholinésterase (AChE) qui est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques, ce qui est nécessaire pour le contrôle de la neurotransmission [9-10]. Aussi, ils sont liposolubles et sont capables de pénétrer la peau, le placenta et le fœtus [11]. Leurs effets ont été mis en évidence ; des troubles de système nerveux et de la reproduction [9], ils étant également mis en cause dans la survenue de certains cancers ; certaines localisations tumorales sont régulièrement retrouvées en excès chez les agriculteurs notamment des cancers de la prostate, du cerveau et des cancers hématologiques [12]. Il est donc nécessaire de trouver des techniques d'analyse efficaces, faciles à mettre en œuvre et permettant une détection rapide de ces polluants.

Un grand nombre de techniques analytiques sont actuellement disponibles pour la détermination des pesticides organophosphorés. Il s'agit essentiellement de méthodes d'analyse classiques comme la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide, et la spectrophotométrie gaz-liquide [13-14]. Les plus performantes d'entre elles nécessitent des opérateurs qualifiés et l'utilisation d'instruments coûteux, pour certains difficilement utilisables sur le terrain [15]. Ces inconvénients peuvent être surmontés grâce à l'utilisation de biocapteurs.

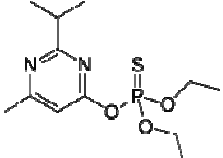
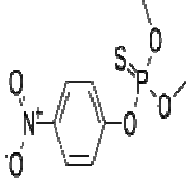
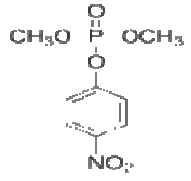
De nombreux biocapteurs à base d'enzymes, d'algues ou des bactéries ont été proposés pour l'analyse des OPs dans un milieu aqueux. Ils exploitent le pouvoir catalytique de différentes enzymes telles que la Choline oxidase (Chox) [16], Butyrylcholinestérase (BuChE) [17], Organophosphorus hydrolase (OPH) [18], *Arthrospira platensis* [19] et l'acétylcholinestérase (AchE) [16-20-21]. Néanmoins, à l'exception du biocapteur OPH qui représente une détection directe des OPs, tous les autres biocapteurs mentionnés au dessus sont basés sur l'inhibition des enzymes. Cette méthode de détection implique une opération des plusieurs étapes y compris le temps d'incubation, réactivation / régénération d'enzyme avec un procédé de mesure indirecte nécessitant au moins 20 min d'analyse. En outre, ces enzymes sont inhibées par les neurotoxines, qui comprennent non seulement les pesticides organophosphorés mais aussi d'autres composés tels que les carbamates et les triazines. De ce fait, ces outils d'analyse ne sont pas sélectifs et ne peuvent pas être utilisés pour la quantification d'un composé organophosphoré ou une classe des pesticides, qui peut être nécessaire pour le suivi des processus de désintoxication, empêchant leur utilisation pour des applications réelles. Les lipases sont des enzymes importantes dans les systèmes biologiques, elles ont également été utilisées pour la détection des pesticides organophosphorés [22], ce sont des hydrolases atypiques capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycéridiques en milieux aqueux. Parmi les lipases, l'enzyme la plus connue est celle de *Candida Rugosa*. Le site catalytique de lipases est formé de la triade catalytique caractéristique des protéases dites à sérine et du trou "oxyanion". La triade catalytique est constituée de trois acides aminés Sérine-Histidine- Acide aspartique. Le trou oxyanion est constitué des deux acides aminés dont les groupements amides du squelette protéique stabilisent l'état de transition du substrat en formant avec lui deux liaisons hydrogènes. La triade catalytique est cachée sous un flap constitué de 26 résidus d'acides aminés.

Les lipases sont hétérogènes par leur origine, elles sont présentes dans nombreux tissus animaux et végétaux ainsi que chez micro-organismes [23-24] qui constituent une source importante de production de lipases à grande échelle, ce qui augmente leurs potentialités et conduisant à une large application des lipases dans la biotechnologie notamment dans l'industrie

pharmaceutique, agro-alimentaire et l'agrochimie [25-26-27]. En ce qui concerne l'immobilisation de lipase, différentes techniques ont été utilisées, notamment l'attachement covalent avec des supports actifs [28], le piégeage dans une matrice sol-gel [29], l'adsorption sur les surfaces des matériaux [30] et la réticulation avec le glutaraldéhyde [31]. Cette dernière est considérée comme l'une des plus simples techniques qui peut garantir la stabilité de l'enzyme.

Dans ce travail, nous proposons un biocapteur conductimétrique pour la détection directe et rapide des pesticides organophosphorés, préparé par l'immobilisation de la lipase de *Candida Rugosa* (CRL) sur la surface de micro-électrodes interdigitées d'or. Nous avons choisi d'immobiliser l'enzyme par réticulation à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde, méthode d'immobilisation commune à tous les capteurs développés dans cette thèse. Différents paramètres affectant la sensibilité du biocapteur enzymatique ont été optimisés. Les pesticides organophosphorés détectés sont le diazinon, le parathion méthyl et le paraoxon méthyl. Leurs formules et leurs structures sont présentées dans le Tableau II.1.

Tableau II.1: La structure et la formule moléculaire des pesticides organophosphorés détectés

<i>OPs</i>	<i>Formule moléculaire</i>	<i>Structure chimique</i>
<i>Diaiznon</i>	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	
<i>Parathion Méthyl</i>	$C_8H_{10}O_5NPS$	
<i>Paraoxon Méthyl</i>	$C_8H_{10}NO_6P$	

II.2 Matériel et méthodes :

II.2.1 Réactifs

La lipase de *Candida Rugosa* (CRL, type VII, ≥ 700 unit/ mg solide), l'albumine de sérum bovin (BSA), le glutaraldéhyde (GA) (grade II, 25% solution aqueuse), Na_2HPO_4 ($\geq 99\%$), NaH_2PO_4 ($\geq 99\%$), le glycérol ($\geq 99\%$), KH_2PO_4 ($\geq 99\%$), K_2HPO_4 ($\geq 98\%$), le polyhydrochlorure d'allylamine (PAH), la solution des nanoparticules d'or (10 nm, suspension stabilisée à 0.1 mM PBS) ont été achetées de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'éthanol ($\geq 96\%$) provenait de Fluka. Les pesticides organophosphorés utilisés ont été fournis par Sigma Aldrich y compris le diazinon, le parathion méthyl, le paraoxon méthyl, la triazine, le sevin (carbaryl), l'atrazine, la simazine. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenue à partir d'un système de purification Simplicity (Millipore).

II.2.2 le transducteur

Le transducteur utilisé est constitué de deux paires d'électrodes en or interdigitées fabriquées à l'Institut de Physique des Semi-conducteurs Lashkaryov (IPSL, Kiev, Ukraine), la première constituant l'électrode de référence et la seconde l'électrode de travail, la surface sensible de chaque électrode est d'environ 1 mm^2 (épaisseur de la couche d'or : 150 nm). Ces électrodes ont été fabriquées par dépôt sur un substrat en céramique ($5 \times 30 \text{ mm}$). Une couche intermédiaire de chrome (0,1 nm d'épaisseur) a été employée pour une meilleure adhérence de l'or. Chaque doigt de l'électrode est de $20 \mu\text{m}$ de large et 1mm de long, avec un espacement de $20 \mu\text{m}$ également entre les doigts. La partie sensible de chacune des deux électrodes est d'environ $1 \times 1,5 \text{ mm}$ [15] (figure II.1).

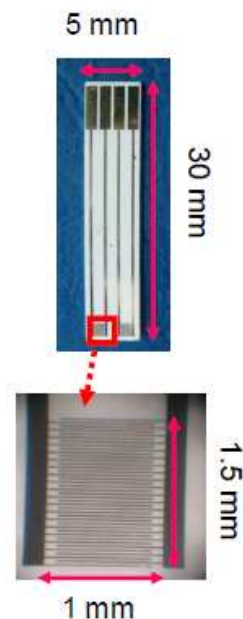


Figure II.1 : Photographie des électrodes interdigitées en or.

II.2.3 Préparation du biocapteur

Avant la manipulation, afin d'améliorer l'adhérence de la membrane à la surface de l'électrode et d'obtenir une surface propre et hydrophile, le transducteur est traité avec l'éthanol, ensuite, il est soigneusement rincé avec l'eau ultra pure et séché sous flux d'azote. Après cela, les pistes d'or conductrices des transducteurs sont recouvertes manuellement avec du vernis acrylique BlocJelt (ITW Spraytec, Asnières sur Seine, France) pour les isoler.

La membrane enzymatique est constituée à la surface du transducteur par réticulation de la lipase (CRL) en présence d'albumine de sérum bovin (BSA) dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde. Pour cela, deux mélanges ont été préparés, le premier est la solution enzymatique qui a été préparée par dispersion des nanoparticules d'or (*AuNPs*) dans 20 mM de solution tampon phosphate (pH = 7,2) contenant de la CRL 5% (m/v), de la BSA 5% (m/v), de glycérol 10% (m/v). 0.4 μ l de cette solution est homogénéisée et déposée sur la surface sensible d'une paire d'électrodes qui représente l'électrode de travail. La même solution est préparée, mais sans enzyme CRL (CRL remplacée par BSA) puis déposée sur l'électrode de référence (0.4 μ l également). Le capteur est ensuite placé 30 min dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde. Les membranes sont alors laissées sécher à l'air libre pendant 40 min à température ambiante ; elles sont stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

II.2.4 Mésures conductimétriques

Les mesures sont réalisées à température ambiante. Le capteur est plongé dans un bécher rempli de 5 ml de tampon phosphate 20 mM pH 5.2. Une tension alternative de faible amplitude (10 mV) et de fréquence 100 kHz est alors appliquée.

Le montage expérimental utilisé pour la mesure de conductivité au laboratoire est schématisé sur la figure II.2. Il permet une mesure différentielle entre une électrode de travail et une électrode de référence.

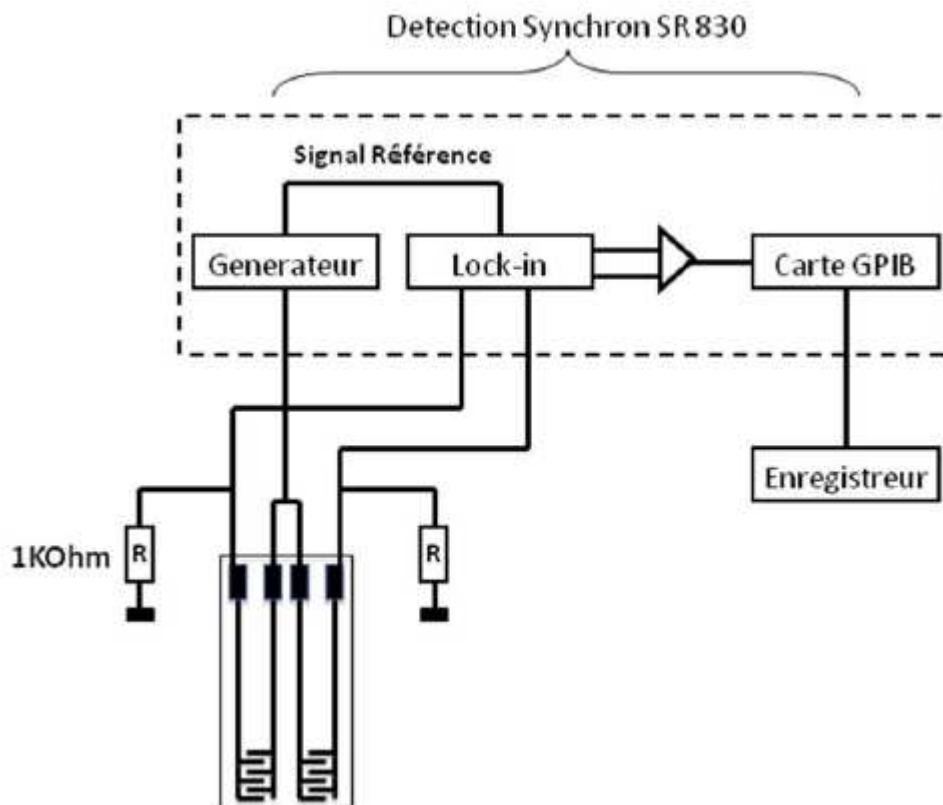


Figure II.2: Schéma du montage utilisé pour la mesure conductimétrique

La détection Synchrone SR 830 de Stanford Research (figure II.3) permet de fixer la phase à laquelle est mesuré le signal de sortie. En effet, la détection synchrone est utilisée chaque fois que l'on veut isoler un signal sinusoïdal en phase avec une sinusoïde de référence. Ainsi, le signal sinusoïdal de référence généré est transmis à l'électrode excitatrice de chaque paire. Les signaux sont ensuite filtrés par la technique du lock-in. Cette technique permet de filtrer un signal avec une bande passante arbitrairement faible centrée sur la fréquence du signal d'excitation [32]. Les signaux ainsi recueillis sont transmis à la détection synchrone qui fait la différence des deux signaux (électrode de référence et électrode de travail).

Cette mesure en mode différentiel permet de neutraliser tous les signaux non spécifiques liés, par exemple, à l'adsorption d'espèces chargées sur l'électrode. La différence de tension (dans notre cas de figure, proportionnelle avec un coefficient 1, à la différence de conductance) est transmise à un enregistreur ou à un ordinateur par l'intermédiaire d'une carte GBIP (figure II.3).



Figure II.3 : Vue générale du dispositif de mesure conductimétrique

Après la stabilisation du signal, différents volumes des pesticides sont ajoutés. La différence de signal entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est mesurée. Ce mode différentiel permet d'éliminer les interférences provenant de variations de conductivité non spécifiques.

II.3 Résultats et discussion :

II.3.1 Caractérisation électrochimique par la spectroscopie d'admittance

Pour obtenir des contrôles de l'immobilisation de l'enzyme, nous avons utilisé la spectroscopie d'admittance électrochimique comme technique de caractérisation afin de mesurer la conductivité des électrodes modifiées. En effet, cette technique permet de différencier les différents phénomènes qui peuvent avoir lieu dans une cellule électrochimique en fonction de la fréquence avec une grande précision. Ainsi, les phénomènes rapides tels que les transferts d'électrons se produisent à hautes fréquences, tandis que les phénomènes lents comme les transferts de masses et la diffusion sont mis en évidence à basses fréquences. Les mesures ont été effectuées dans une cellule de verre avec une configuration de deux électrodes dans un tampon PBS 20 mM (pH 5.2) dans une gamme de fréquences entre 100 kHz et 100 mHz à une température ambiante, en utilisant un analyseur d'admittance électrochimique "Volta Lab PGZ 402" (Hach Lange, France).

L'acquisition et le traitement des données sont effectués par le logiciel 'Volta Master 4' qui a été fourni par la même entreprise. Les spectres d'admission électrochimique pour (a) l'électrode nue, et (b) électrode modifiée sont représentés dans la figure II.4, Au regard de cette figure, une

évolution remarquable de spectre a été enregistrée suite à l'immobilisation de l'enzyme ce qui valide le procédé d'immobilisation proposé.

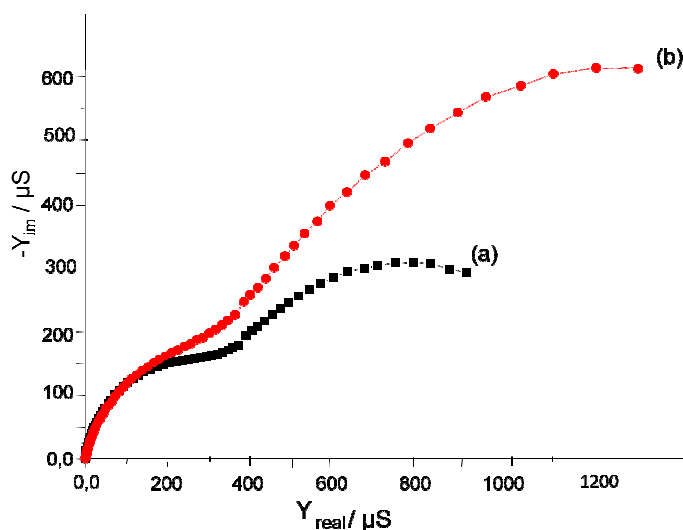
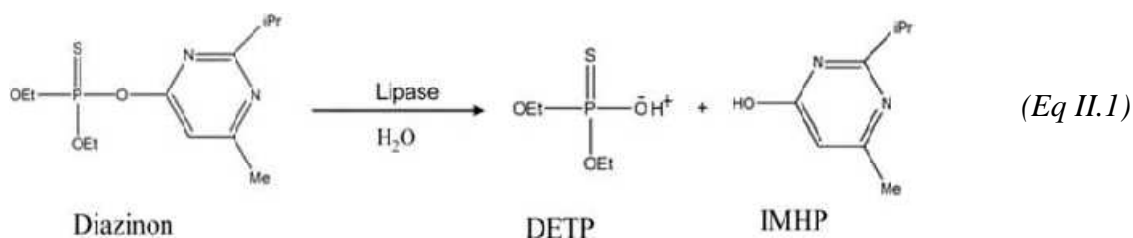


Figure II.4: les spectres d'admittance pour (a) électrode nue et (b) électrode modifiée. Mesures effectuées en présence de tampon PBS (pH= 5.2) dans une gamme de fréquence de 100 mHz à 100 kHz.

II.3.2 Optimisation des paramètres d'opération

La réponse du biocapteur enzymatique est optimisée en fonction des plusieurs paramètres tels que ; la quantité d'enzyme immobilisée sur le transducteur, le temps de réticulation, pH tampon phosphate et la température. Pour cela, on a effectué plusieurs expériences afin d'étudier l'effet de ces variables sur la réaction d'hydrolyse par la lipase, donc sur la réponse du biocapteur, en choisissant le diazinon comme substrat. CRL catalyse l'hydrolyse du diazinon en Diethyl phosphorothioic acid (DETP) et 2-isopropyl-4 methyl-6 hydroxypyrimidine (IMHP) selon l'équation (II.1).



II.3.2.1 Quantité de lipase (CRL)

Le comportement de l'enzyme lorsqu'elle est immobilisée sur une surface, peut cependant être tout-à-fait différent de celui qu'elle présente lorsqu'elle est libre en solution et dépend de sa

nature (protéine « dure » ou « molle ») [33]. La quantité d'enzyme déposée sur le capteur est donc un paramètre important qu'il est indispensable d'optimiser.

Dans ce travail, quatre biocapteurs ont été préparés, en faisant varier la quantité d'enzyme par dépôt de 0.4 μL de la solution CRL à 3, 5, 10 et 15% (m/v) de solide. Comme on peut le voir sur la figure II.5, une réponse stable et reproductible en conductance (un signal significatif) à l'équilibre a été obtenue après l'injection du diazinon pour une membrane enzymatique contenant 5% CRL. Avec 3% CRL, un bon signal a été obtenu mais il n'est pas assez stable. Par contre, un signal de faible stabilité a été obtenu lorsque on a utilisé un biocapteur contient 15% (m/v) de lipase. La mauvaise stabilité des réponses contenant des quantités élevées de lipase peut être due à des interactions entre certains sites de liaison de l'enzyme ou bien due à la formation des liaisons hydrophobes plus puissantes que celles déjà existantes, ce qui peut modifier la structure des protéines, et affecter son activité [31]. Cela signifie que 5% (m/v) de lipase est la charge enzymatique optimale qui permet de réaliser la réaction d'hydrolyse des pesticides organophosphorés et d'avoir le rendement optimal de l'activité enzymatique. Elle sera donc utilisée pour toutes les expériences ultérieures.

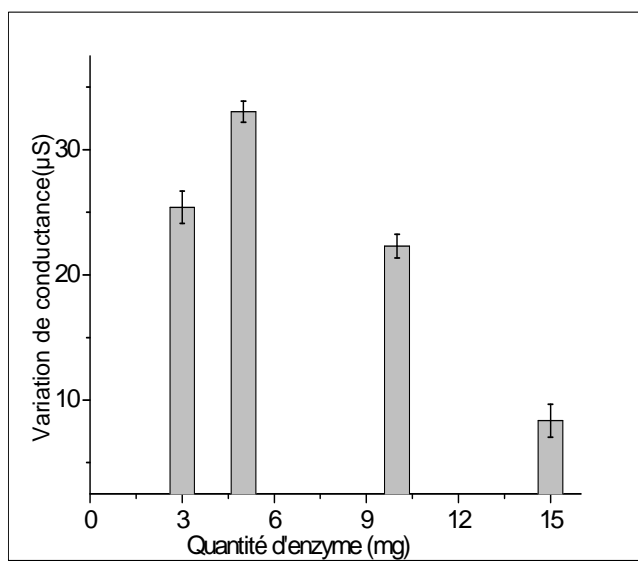


Figure II.5 : influence de la quantité d'enzyme sur la réponse du biocapteur.
Immobilisation : vapeur de GA : 30 min. Mesures dans du tampon PBS 20 mM, pH 5.2.

II.3.2.2 Influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur

Compte tenu que l'insuffisance du temps de réticulation d'une réaction entraîne une mauvaise stabilisation de l'enzyme, tandis que, un temps très élevé peut entraîner la formation d'un réseau polymérique très dense, ce qui provoque des modifications significatives dans la

confirmation d'enzyme, par conséquent une diminution de son activité [34]. Donc, il est vraiment important d'optimiser ce paramètre. Dans cette étude, la réaction a été réalisée à température ambiante et les biocapteurs ont été préparés, en utilisant des vapeurs de GA générées à partir d'une solution aqueuse commerciale à 25%, en faisant juste varier le temps de réticulation de 10 à 60 minutes. Comme montre la figure II.6, la variation de la conductance à l'équilibre après l'injection de 40 μM de diazinon augmente avec le temps de réticulation pour atteindre un maximum à 30 minutes (la meilleure stabilité du signal). Une baisse d'intensité du signal est observée au-delà de cette valeur due à la perte de la flexibilité de la lipase qui est nécessaire pour son activité. Afin d'obtenir le meilleur compromis entre la stabilité et la sensibilité du biocapteur, on a choisi la valeur de 30 min pour la suite des expériences.

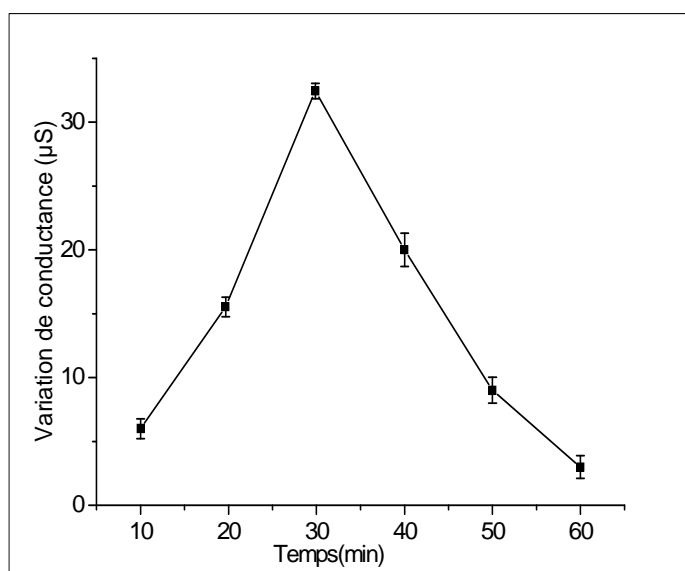


Figure II.6 : influence du temps de réticulation sur la réponse du biocapteur enzymatique. Mesures effectuées dans un tampon PBS 20 mM.

II.3.2. 3 Influence du pH du milieu

L'hydrolyse des OPs par l'activité catalytique de lipase est très dépendante du pH de la solution, ce dernier est un facteur pouvant avoir une influence sur la conformation de l'enzyme, donc il est nécessaire de déterminer le pH optimal qui aboutira la sensibilité maximal de ce biocapteur conductimétrique. Pour cette étude, la valeur de pH optimale pour un meilleur fonctionnement du biocapteur est de 5.2 (hydrolyse rapide et faible temps de réponse). On a également remarqué que la réaction d'hydrolyse est plus lente à pH 7 et 8, cela est dû à l'oxypyrimidine qui est le principal métabolite de diazinon dans l'eau et qui résiste l'hydrolyse

en milieu neutre et basique. Ainsi le rapport optimal de pH de ce biocapteur est en bon accord avec celui trouvé par Dimitrios Karpouzas et al [35]. Par conséquent, pH 5.2 est utilisé pour toutes les expériences ultérieures.

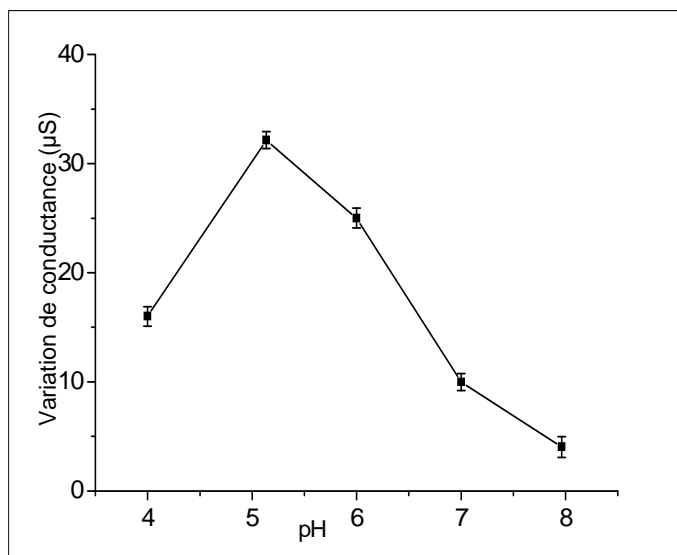


Figure II.7: Effet du pH sur la réponse du biocapteur enzymatique suite à l'injection du 40 µM de diazinon. Immobilisation : vap GA : 30 min. Mesures effectuées dans un PBS 20 mM.

II.2.2.4 Influence de la concentration en tampon

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.

Dans ce travail, nous avons évalué l'influence de la concentration en tampon phosphate sur le signal du biocapteur enzymatique dans la gamme 5- 30 mM. Comme on peut le voir sur la figure II.8, les concentrations situées dans le domaine 20-30 mM conduisent aux intensités maximales. La meilleure reproductibilité étant par ailleurs obtenue à une concentration en tampon de 20 mM, c'est cette concentration de mesure que nous avons choisie pour la suite de notre travail.

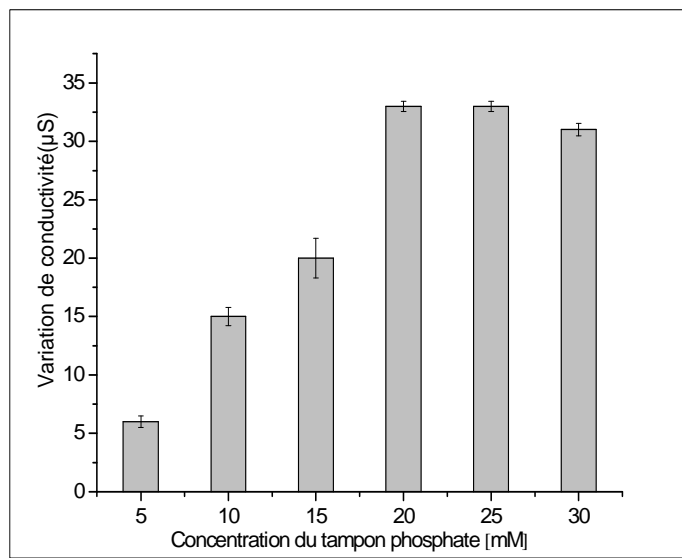


Figure II.8 : l'influence de la concentration du tampon sur la réponse du biocapteur CRL, [Diazinon]= 40µM dans du tampon phosphate pH 5.2

II.3.3 les caractéristiques analytiques

Les caractéristiques analytiques des du biocapteur développés ont été déterminées dans les conditions optimales définies précédemment.

II.3.3.1 Temps de réponse

La figure II.9 montre une réponse typique du biocapteur obtenue après addition de diazinon. L'injection de diazinon dans la cellule de mesure entraîne une augmentation rapide et significative de la conductivité due à la réaction d'hydrolyse enzymatique du diazinon par la lipase. L'équilibre est atteint après 6 min, le temps de réponse t_{90} est approximativement de 3 min. une allure de réponse et un temps de réponse semblables ont été obtenus suite à l'injection des deux autres pesticides organophosphorés, parathion méthyl et paraoxon méthyl.

Le temps de réponse de ce biocapteur directe à base de lipase (3 min) est court par rapport aux autres biocapteurs de cholinestérase qui sont toujours basés sur l'effet d'inhibition par les OPs, ce qui nécessitent beaucoup de préparation et plus de temps (temps d'inhibition, de réponse indirecte et de régénération) (Tableau II. 2).

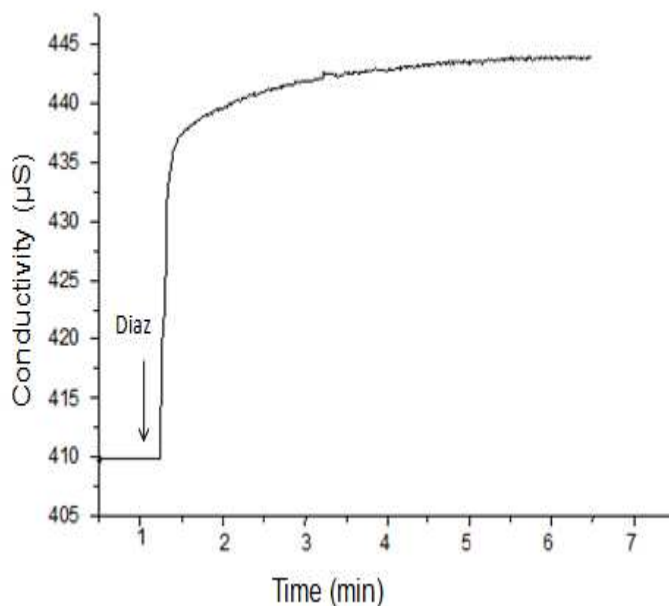


Figure II.9 : Réponse typique du biocapteur conductimétrique.
 [diazinon] = 40 µM, pH 5.2, Température 23°C ± 2°C.

II.3.3.2 Gammes linéaires et limites de détection

La figure II.10 présente l'évolution de la réponse du biocapteur enzymatique en fonction de la concentration de OPs suivant ; (a, b) injection du diazinon en présence et en absence des *AuNPs* respectivement, (c) parathion méthyl et (d) paraoxon méthyl. La variation de conductance a été enregistrée à l'état d'équilibre du biocapteur, trois mesures ont été effectuées à chaque niveau de concentration.

Ainsi que le montre la figure, la présence des nanoparticules d'or (*AuNPs*) a amélioré la performance du biocapteur, elles amplifient le signal et la réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à 40 µM avec une limite de détection de 0.2 µM. De plus, elles renforcent sa sensibilité qui est de l'ordre de 0.85 µS/µM diazinon, plus élevée que celle obtenue sans nanoparticules d'or : 0.44 µS/µM diazinon (courbe (b)), ce qui confirme le rôle positif joué par *AuNPs*.

De la même façon, la réponse du biocapteur est linéaire de 0.1- 40 µM de concentration de parathion méthyle et jusqu'à 50 µM pour le paraoxon méthyle avec une limite de détection de 0.1 µM. la limite de détection obtenue comme étant la concentration conduisant à un rapport signal sur bruit. La sensibilité de ce biocapteur enzymatique vis-à-vis du parathion méthyl et paraoxon méthyl est de 1.05 µS. µM⁻¹ et 1.38 µS.µM⁻¹ respectivement.

La limite de détection de ce biocapteur CRL est supérieure à celles des biocapteurs développés avec *Arthospira platensis* [19] et d'acétylcholinésterase (AChE) [16] pour la détection des pesticides (Tableau II.2). Cependant, ces biocapteurs sont basés sur l'inhibition d'AChE qui

nécessitent plusieurs étapes y compris le temps d'incubation (minimum 20 min) et la réactivation / régénération d'enzyme avec des mesures indirectes. De plus les biocapteurs AChE ne sont pas sélectif (la détection des OPs, carbamates, triazines). Une détection directe et rapide des OPs peut être obtenue avec ce biocapteur conductimétrique à base de CRL et on obtient une limite de détection inférieure à celle obtenue auparavant du biocapteur directe à base de Organophosphorus Hydrolase (LOD : 0.5 μM) [18]. Cette performance est suffisante pour permettre un suivi des pesticides organophosphorés dans les eaux usées industrielles.

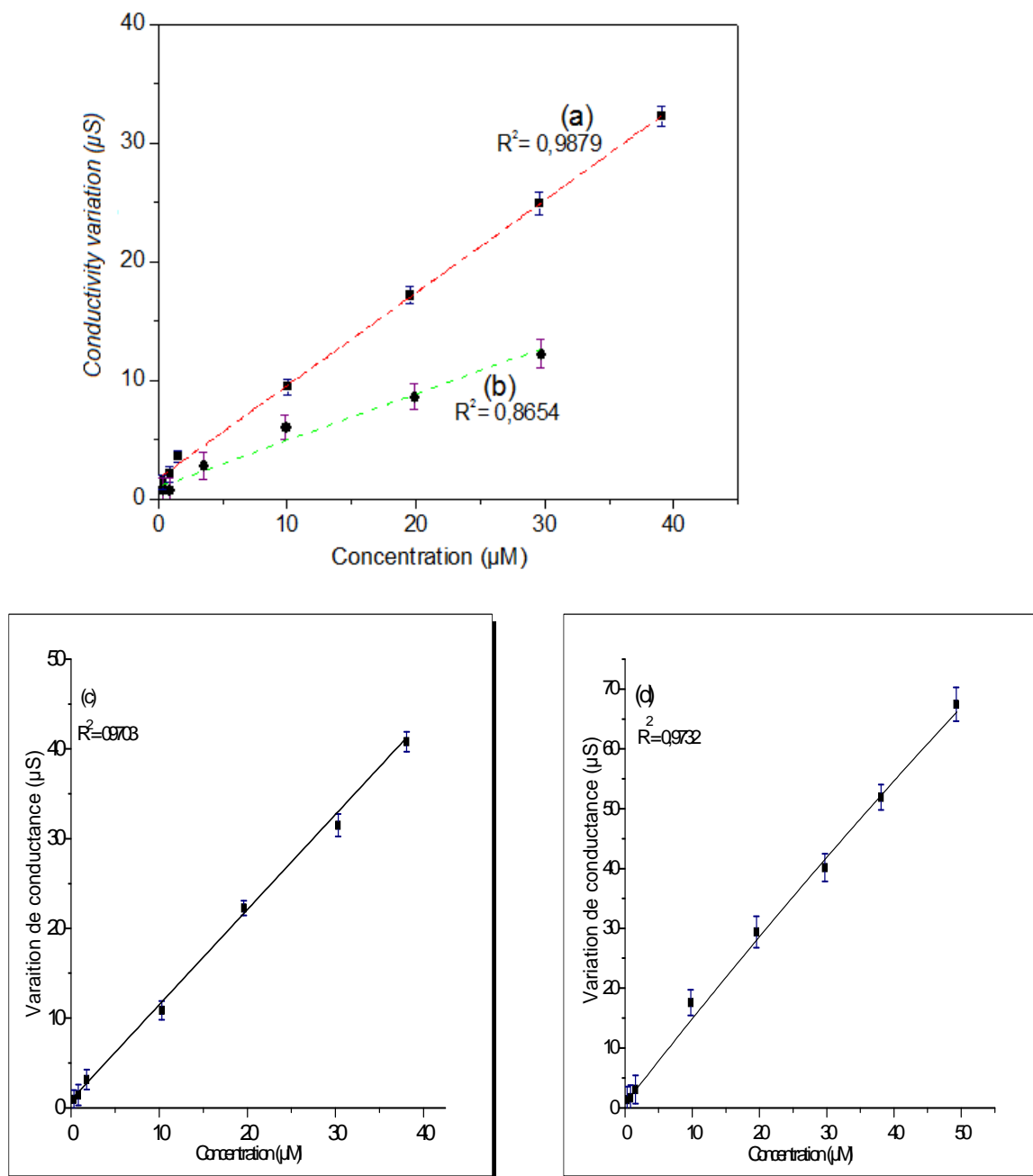


Figure II.10 : Evolution de la réponse du biocapteur en fonction de la concentration de OPs ; (a, b) injection de diazinon respectivement en présence et en absence des AuNPs, (c) parathion méthy et (d) paraoxon méthy. Mesures effectuées en présence du tampon PBS 20 mM, pH 5.2,

Tableau II.2 : Performances analytiques de quelques biocapteurs pour la détection des pesticides organophosphorés étudiés.

Analyte cible	Transduction	Linéarité	LOD	Microorganisme	Temps de mesure (min)	Référence
Parathion Méthyl	Conductimétrique	5-100 μM	5 μM	AchE	20	[17]
Parathion Méthyl	Conductimétrique	10-100 μM	10 μM	BuchE	20	[17]
Parathion Méthyl	Voltammétrie cyclique	10-70 ppb	26.32 ppb	Lipase (CRL)	25	[22]
Parathion Méthyl	Amperométrique	0.8-2 μM	0.8 μM	OPH	/	[18]
Parathion Méthyl	Conductimétrique	/	10^{-20} M	<i>Arthrospira platensis</i>	33	[19]
Parathion Méthyl	Voltammétrie cyclique	2-80 μM	0.5 μM 281.5	E-coli (OPH)	/	[36]
Malathion	Voltammétrie cyclique	100-900 mM	μM	Lipase (CRL)	25	[37]
Diazinon	SiQDs	/	$2.22 \cdot 10^{-10}$ M	AchE, ChOx	20	[16]
Paraoxon Méthyl	Potentiométrique	1-50 μM	1 μM	BchE	20	[17]
Paraoxon Méthyl	Conductimétrique	5-50 μM	5 μM	AchE	20	[17]
Paraoxon Méthyl	Conductimétrique	0.5-50 μM	0.5 μM	AchE	20	[17]
Paraoxon Méthyl	Conductimétrique	/	10^{-18} M	<i>Arthrospira platensis</i>	33	[19]
Triazine	Conductométrique	/	10^{-20} M	<i>Arthrospira platensis</i>	33	[19]

AchE : Acétylcholinestérase, **BuchE** : Butyrylcholinestérase, **OPH** : Organophosphorus hydrolase, **Chox** : Choline oxidase, **E-coli** : Escherichia coli.

II.3.3.3 Reproductibilité et stabilité

La reproductibilité de la réponse de ce biocapteur conductimétrique a été testée pour chaque concentration avec trois capteurs différents. Le coefficient de variation obtenu à partir de trois mesures effectuées est bon, il varie entre 1,5% et 4 % dans l'intervalle de concentrations étudiées.

La stabilité de stockage à long terme est l'un des facteurs clés du capteur pour être adapté à une application de contrôle des procédés en ligne. Un biocapteur a été fabriqué suivant le protocole décrit précédemment et sa réponse a été mesurée à plusieurs reprises sur une période de 3 semaines pour une solution de 40 μM de diazinon. Entre temps, le biocapteur a été stocké à 4 °C dans un tampon phosphate 20 mM, (pH 7.4). Comme le montre la figure II.11, le biocapteur est stable sur une longue période, le signal est resté très stable, en conservant plus de 95% de sa réponse initiale pendant 3 semaines, une diminution jusqu'à 50 % de la réponse a été observée après 30 jours. Cette excellente stabilité de conservation dépasse celles signalées auparavant du biocapteur ampérométrique à base de tyrosinase (10 jours) [38] et celui de *Sphingomonas sp* (18 jours) [39], montrant que la technique d'immobilisation d'enzyme ainsi que le protocole de conservation sont efficaces.

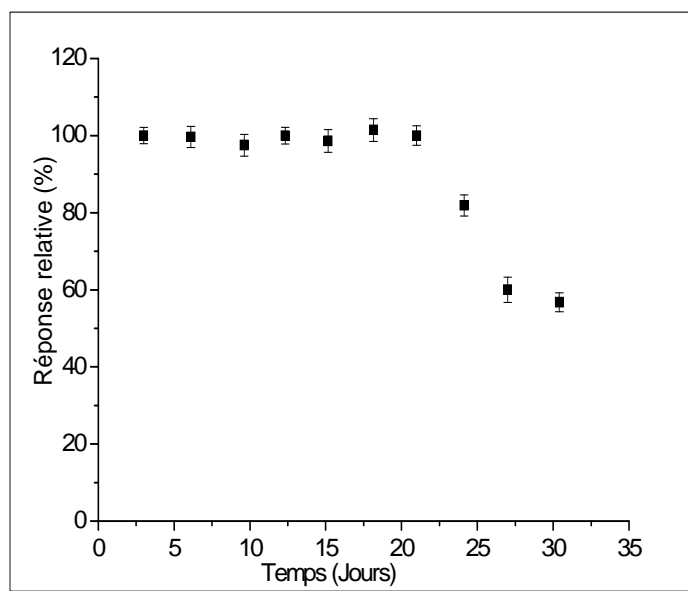


Figure II.11 : Etude de la stabilité du biocapteur. Les électrodes sont stockées à 4°C dans du tampon phosphate 20 mM pH 7.4 entre les mesures. Les mesures sont effectuées à 23°C \pm 2°C dans du tampon phosphate pH = 5.2 pour 40 μM de diazinon.

II.3.3.5 Sélectivité

La sélectivité est un critère important pour n'importe quel outil analytique. Pour cela, nous avons réalisé une étude d'interférence avec d'autres types de pesticides ; les carbamates et les triazines qui ont une concentration égale à celle des organophosphorés ainsi que le principal métabolite du diazinon (oxypyrimidine). L'étude a été réalisée en utilisant le biocapteur CRL, pour une concentration de 40 μ M des interférents. Comme on peut le voir sur la figure II.12, aucune des substances évaluées, n'affecte de manière significative le signal du biocapteur. Ce degré élevé de sélectivité pour les composés organophosphorés est un avantage significatif ; le présent biocapteur sera idéal pour l'application en ligne dans les procédés de détoxification pour le traitement des eaux usées produites lors de la production et de la consommation des pesticides organophosphorés.

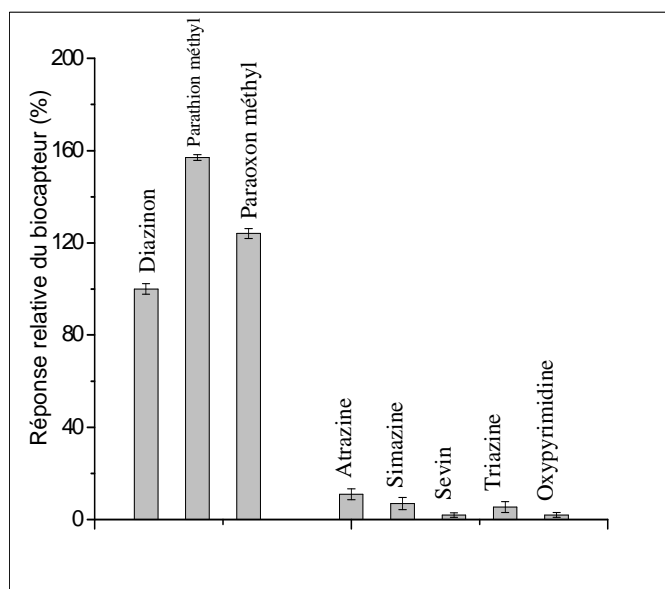


Figure II.12 : Comparaison des réponses du biocapteur CRL obtenues en présence d'éventuelles substances interférentes. Les mesures ont été réalisées dans un tampon PBS 20 mM, pH 5.2.

II.3.4 Application à des échantillons d'eau réels

Le biocapteur enzymatique a également été évalué pour la détection des OPs dans des échantillons d'eau réelle. Ces derniers ne nécessitent qu'une seule étape de dilution, afin d'adapter les concentrations dans la gamme linéaire de la courbe de calibration. L'eau de rivière La Chaudanne – Lyon a été dopée par le diazinon. Le pH a été ajusté à 5.2, les échantillons ont été filtrés et analysés sous 24h après la collecte. Le tableau II.3 résume les résultats obtenus, on peut constater que les résultats obtenus sont en bon accord avec les résultats théorique. Ce qui

valide l'utilité potentielle de ce biocapteur pour une application pratique pour la détection des pesticides organophosphorés dans l'eau.

Tableau II.3 : Analyse des échantillons d'eaux dopés avec le diazinon.

<i>Diazinon [μM]</i>	<i>ΔG Buffer (μS)</i>	<i>ΔG River water (μS)</i>	<i>Taux de recouvrement (%)</i>
5	3.11	3.35	107
20	17.01	17.17	101
40	33.46	32.78	98

ΔG : la variation de conductance (μS)

II.4 Conclusion

Cette partie de notre travail a été consacrée à l'optimisation d'un biocapteur conductimétrique utilisant CRL comme biorécepteur pour une détection rapide des pesticides organophosphorés, nous avons choisi trois insecticides qui sont classés parmi les OPs les plus utilisés dans le monde. L'utilisation des micro-électrodes d'or interdigitées a permis d'atteindre une bonne sensibilité tout en garantissant une bonne adhésion de la biomembrane. Une limite de détection de $0.1 \mu\text{M}$ a été obtenue. En outre, ce biocapteur CRL permet une détection directe avec un temps de mesure très court (3 min) par rapport aux procédures classiques. Avec une sélectivité significative aux OPs, Le biocapteur a été appliqué avec succès à la quantification de diazinon dans l'eau de rivière, ce qui démontre le bon fonctionnement du biocapteur proposé pour des applications pratiques dans l'analyse des eaux usées.

Partie "B"

*Chapitre II : Développement d'un biocapteur impédimétrique à base des SAMs pour la détection de diazinon en milieux aqueux : Etude comparative entre lipase de *Candida Rugosa* et la lipase du pancréas de porc.*

II.1 Introduction

Dans cette partie de travail, nous avons réalisé une étude comparative entre deux types de lipase : issue d'une source microbienne de *Candida Rugosa* (CRL) et l'autre à base d'une source animale ; extraite du pancréas de porc (PPL), afin de comparer leurs performances vers une application biocapteur pour la détection des pesticides organophosphorés. Comme la partie précédente, on a choisi le diazinon comme substrat, en utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique tant que mode de détection. Les transducteurs utilisés pour cette étude sont les électrodes d'or qui possèdent des propriétés remarquables.

L'or est l'un des matériaux conducteurs les plus utilisés de par sa résistance à l'oxydation [40] et de par ses capacités à réagir avec un grand nombre de molécules. C'est notamment le cas des thiols, des composés à base de soufre (formule générale R-SH), pour lesquels il présente une grande affinité [41]. Ces interactions sont à la base des méthodes de fonctionnalisation et modification de surface sur le principe de monocouches auto-assemblées. On notera que les SAMs ne sont pas spécifiques aux surfaces d'or puisqu'elles peuvent se former sur d'autres surfaces métalliques telles que l'argent [42], le cuivre [43], le palladium [44] ou encore le platine [45].

L'autre avantage des surfaces d'or, c'est qu'elles se caractérisent aisément par des méthodes optiques notamment (ellipsométrie, spectroscopie infrarouge, mesure d'angle de contact...) et la résonance de plasmons de surface, ce qui permet de suivre les modifications apportées en surface de manière précise.

La formation de SAMs par immersion de la surface d'or dans une solution d'alcanethiol est la méthode la plus utilisée car très facile à mettre en oeuvre. Le thiol est alors généralement mis en solution dans de l'éthanol ou un mélange eau-éthanol à des concentrations comprises entre 1 et 10 mM pendant 12 heures à 48 heures, pour atteindre une bonne organisation moléculaire. Les temps longs d'assemblage tendent à donner des structures cristallines compactes. Cette couche, lorsqu'elle est saturée, est composée de chaînes de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres de longueur, séparées d'environ 5 Å et inclinées d'un angle de 30 degrés par rapport à la normale à la surface.

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Réactifs

Tous les réactifs utilisés dans cette étude ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin, Fallavier, France) y compris lipase de *Candida Rugosa* (CRL, type VII, ≥ 700 unité /mg solide), lipase du pancréas de porc (PPL, type II, 30-90 unité/mg protéine), l'albumine de sérum bovin (BSA), le glutaraldéhyde (GA) (grade II, 25% solution aqueuse), Na_2HPO_4 ($\geq 99\%$), NaH_2PO_4 ($\geq 99\%$), le glycérol ($\geq 99\%$), éthanol ($\geq 96\%$), KH_2PO_4 ($\geq 99\%$), K_2HPO_4 ($\geq 98\%$), le diazinon, N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3(3-(dimethyl- amino) propyl) carbodiimide (EDC), thiol acide MHA (16mercaptophexa-decanoicacid). Acide sulfurique (96%), peroxyde d'hydrogène (30%), ferrocyanure de potassium ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$). L'éthanol (99%) a été fourni par Fluka. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenue à partir d'un système de purification Simplicity (Millipore).

II.2.2 le transducteur

Dans cette partie de travail, nous avons utilisé des plaquettes (Si/SiO_2) revêtues d'or, avec une épaisseur d'environ 300 nm, comme des électrodes de travail sur laquelle les processus électrochimiques à explorer. Une couche de résine est déposée sur la surface d'or afin de la protéger durant la découpe et le stockage. Ces électrodes d'or ont été fournies par le LAAS (Toulouse), (figure III.13).

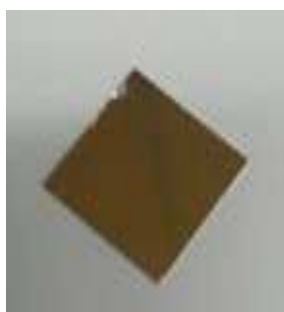


Figure II.13: Photographie des électrodes carrées en or.

II.2.3 Mesures électrochimiques

Toutes les mesures électrochimiques de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et de la voltammétrie cyclique (CV) ont été réalisées avec un potentiostat-galvanostat Voltalab 80 PGZ 402, connecté à un ordinateur pour le pilotage des appareils et l'acquisition et le

traitement des données et avec une cellule électrochimique en verre d'un volume de 5 ml à trois électrodes : une électrode de travail (BDD), une électrode de référence et une contre-électrode. Toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées à température ambiante dans une cage de Faraday pour éviter les parasites électriques (Figure II.14).

Pour les mesures d'impédance, cet appareil sert à la fois à générer le signal sinusoïdal avec l'amplitude et la fréquence désirées et à extraire les parties réelles et imaginaires de l'impédance du système étudié. L'analyseur d'impédance est piloté par un ordinateur à l'aide du logiciel "Volta Master " et les spectres de Nyquist ont été traités à l'aide du logiciel Zview (ScribnerAssociate, Inc) qui permet la construction de circuits électriques équivalents et l'ajustement des spectres à l'aide de ces circuits.

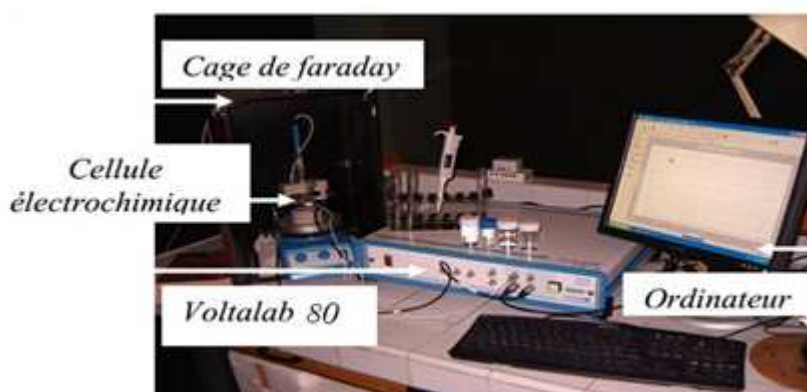


Figure II.14: Montage expérimental utilisé pour les mesures électrochimiques.

➤ **La cellule électrochimique :**

Les mesures électrochimiques ont été effectuées dans une cellule électrochimique en verre (Verre Equipements, Collonges au Mont d'Or, France) à trois électrodes de volume 5 ml (figure IV.3). La géométrie de cette cellule permet une disposition bien déterminée des trois électrodes, elle est conçue pour assurer une distance constante entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Dans la partie inférieure de la cellule, on notera, par ailleurs, l'existence de deux ouvertures de positions opposées destinées pour positionner l'électrode de travail et la contre-électrode de platine alors que la partie supérieure de la cellule permet de positionner l'électrode de référence.

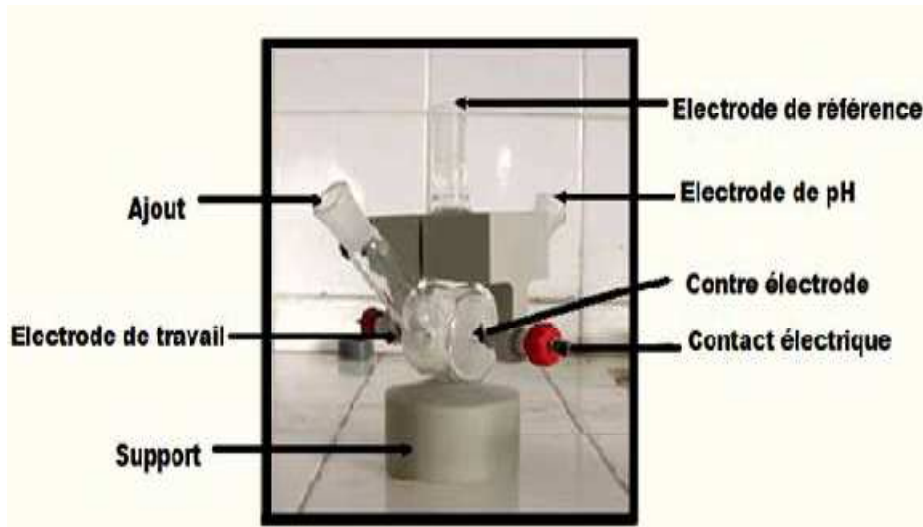


Figure II.15: la cellule électrochimique

- **L'électrode de référence** : est une électrode au calomel saturée dont le potentiel est constant, de marque Radiometer- Analytical SA (Villeurbanne, France).



Figure II.16 : Electrode de référence

- **L'électrode auxiliaire (la contre électrode)**: est une plaque en platine massif dont la surface active, lorsqu'elle est fixée sur la cellule, grâce à un joint torique, est de l'ordre de $0,52 \text{ cm}^2$. La surface est plus grande que celle de l'électrode de travail pour négliger son impédance et pour que la contre-réaction puisse se dérouler sans perturber le système.
- **L'électrode de travail** : sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer.

II.2.4 Protocole de nettoyage

La propreté du milieu ainsi que le matériel utilisé est une étape préliminaire pour réussir les manipulations. Après la fermeture des trous de la cellule électrochimique avec du parafilm, une solution d'acide sulfochromique est versée dans la cellule pour la nettoyer. La cellule est ensuite rincée avec de l'eau distillée puis séché à l'étuve. Pour les électrodes en or, le nettoyage se fait en deux étapes ; une première étape consiste à enlever la couche de résine sur la surface d'or, l'électrode est alors trempée dans l'acétone pendant 10 min sous ultrasons.

Ensuite, elle est séchée sous flux d'azote (N_2). Dans une deuxième étape, l'électrode est nettoyée par un mélange "piranha". Cette solution est composée de 7 volumes d'acide sulfurique concentré (96%), H_2SO_4 , avec 3 volumes de l'eau oxygénée, H_2O_2 . L'échantillon est laissé 5 min dans la solution. Après ce traitement, l'électrode est rincée abondamment à l'eau ultra-pure puis l'éthanol absolu et séchée sous un flux d'azote.

II.3 Préparation des biocapteurs

II.3.1 fonctionnalisation de l'électrode d'or

L'électrode d'or a été incubée dans une solution de thiol-acide (MHA) de concentration 10 mM dissout dans l'éthanol, pendant 12 heures, à une température de 4°C, ce qui permet la formation d'une monocouche auto assemblée (SAM) sur la surface de l'électrode, puis, elle a été rincée avec l'éthanol afin d'éliminer les molécules de thiol non liées.

Les monocouches résultantes qui se terminent par des groupes acides carboxyliques peuvent être ensuite activées par le mélange [EDC/NHS] de 0,1 mol. l^{-1} pendant 1 heure. L'électrode prétraitée a été rincée avec du PBS et a été séchée sous flux d'azote.

II.3.2 Immobilisation d'enzyme

10 μ l d'une solution enzymatique contenant CRL 5% (m/v), BSA 5%, glycérol 10% (m/v), solution de tampon phosphate 90% (m/v), 20 mM, pH = 7,2 a été homogénéisée et déposée sur la surface sensible de l'électrode prétraitée. La même solution a été préparée avec l'enzyme PPL ; 10 μ l a également été homogénéisée et déposée sur une autre électrode de travail. Les capteurs sont ensuite placés 30 min dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde. Les membranes sont alors laissées sécher à l'air libre pendant 40 min à température ambiante, après, elles sont stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

II.4 Résultats et Discussions

II.4.1 Caractérisation impédimétrique

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une technique de caractérisation permettant la mesure de la conductivité du substrat modifiée, ainsi, de différencier les différents phénomènes qui peuvent avoir lieu dans une cellule électrochimique en fonction de la fréquence avec une grande précision. Ainsi, les phénomènes rapides tels que les transferts d'électrons se produisent à hautes fréquences, tandis que les phénomènes lents comme les transferts de masses et la diffusion sont mis en évidence à base fréquences. Dans ce travail, les mesures ont été effectuées dans une solution de tampon phosphate (PBS) 20 mM, pH 5.2. En appliquant un potentiel de -0.4 V dans une gamme de fréquence comprise entre 100 kHz et 100 mHz. Les diagrammes de Nyquist obtenus après formation du SAM, attachement d'enzyme et l'injection du diazinon sont présentés dans la figure II.17. Comme on peut le voir, une augmentation d'un facteur 2.5 de R_p a été observée après la formation de la première couche, se qui reflète essentiellement les faibles propriétés conductrices des SAMs [46]. Par contre, l'injection de diazinon a généré une diminution d'un facteur d'un 1.5 de l'impédance et du diamètre de demi-cercle de diagrammes de Nuquist. Cet effet a été déjà observé dans une étude précédente avec un biocapteur potentiométrique [47], ce qui confirme que l'hydrolyse du diazinon induit une redistribution de charge à l'interface électrode fonctionnalisée/ électrolyte et modifie la conductivité de la membrane enzymatique.

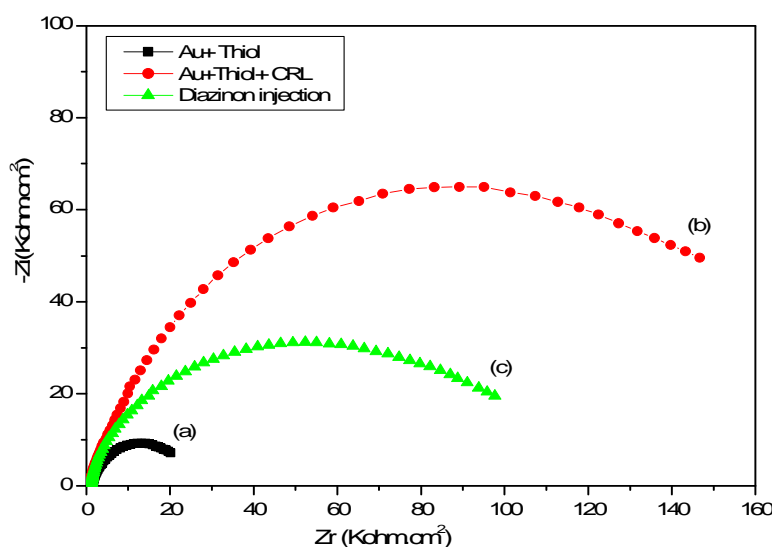


Figure II.17: Diagrammes de Nyquist obtenus en présence de 20 mM PBS, pH 5.2 dans une gamme de fréquence de 100 mHz – 100 kHz : (a) or modifiée par thiol acide, (b) or modifiée-enzyme et (c) après l'injection de diazinon.

II.4.2 Réponse de biocapteur enzymatique

La réponse de biocapteur enzymatique de CRL a été mesurée après l'injection des différentes concentrations du diazinon, en présence d'un PBS, pH 5.2, (figure II.18). Les spectres de Nyquist indiquent une diminution significative de l'impédance, en corrélation avec la diminution de R_p après chaque addition de diazinon pour des concentrations comprises entre 2-50 μM . Alors pour des concentrations plus élevées que 50 μM , un effet de saturation a été observé. La diminution de R_p est attribuée à l'augmentation des charges ioniques à l'interface apportée par l'hydrolyse du diazinon, ce qui augmente considérablement la capacité interfaciale.

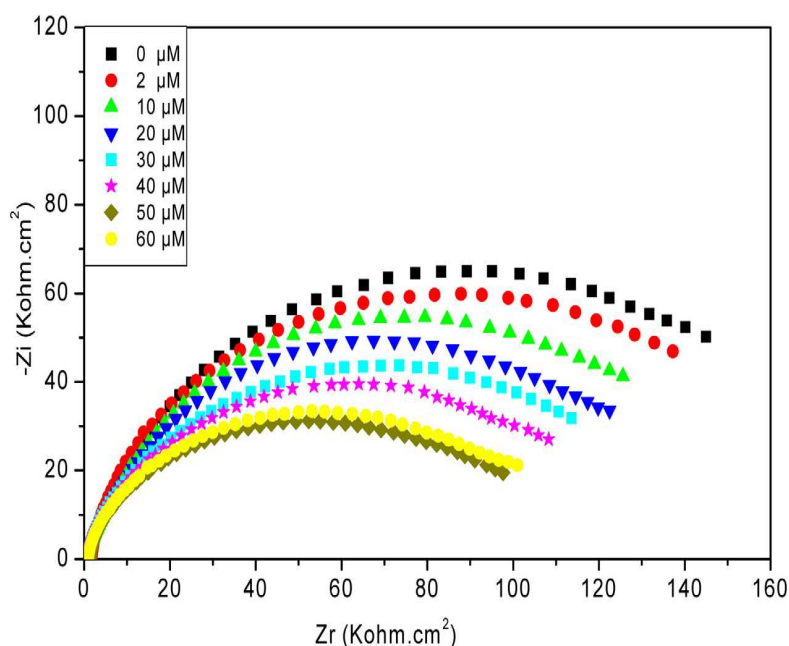


Figure II.18 : influence de la concentration de diazinon sur la réponse du biocapteur impédimétrique CRL. Mesures effectuées dans PBS 20 mM, pH 5.2, à un potentiel de -400 mV et une gamme de fréquence de 100 mHz- 100kHz.

Le comportement électrique de ce système électrochimique, les modifications apportées à l'interface électrode/électrolyte, peuvent être représentées de façon analogue par un circuit électrique équivalent. Ce circuit équivalent est appliqué pour ajuster les données expérimentales et extraire les informations nécessaires sur les paramètres électriques responsables de la variation impédimétrique. Les spectres de Nyquist obtenus peuvent être modélisés par le circuit électrique classique de Randles, y compris les deux éléments résistifs R_s et R_p , dans lequel la double couche capacitive a été remplacée par CPE, en présence de l'impédance de Warburg (Z_w), (figure II.19). R_s correspond à la résistance ohmique de l'électrolyte et R_p est la résistance de transfert de charge entre la solution et la surface d'électrode de travail en absence de toute espèce redox. Z_w correspond à l'impédance de Warburg, qui est un élément spécifique de

diffusion électrochimique. **CPE** est un élément à phase constante qui est lié à la capacité de l'interface électrode de travail /électrolyte, elle reflète la non idéalité de la double couche due à la rugosité et la porosité du biofilm, qui peut être exprimée sous la forme suivante :

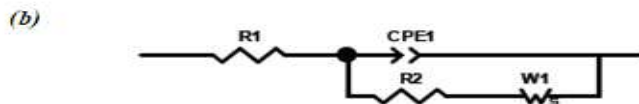
$$Z(\omega) = CPE^{-1} (j\omega)^{-n}$$

Où

ω : est une fréquence angulaire

n : un paramètre décrivant l'écart par rapport à un condensateur idéal, variant de 0 à 1 [21].

La valeur de n était 0.95 pour l'électrode nue et comprise entre 0.86 et 0.91 après modification, reflétant une légère déviation à l'idéalité et un comportement plutôt capacitif correspond au CPE.



II.4.3 Linéarité, limite de détection

Comme le montre la figure II.20, $|R_p - R_{p0}|$ augmente linéairement avec la concentration de diazinon jusqu'à 50 μM pour les deux biocapteurs développés, avec des sensibilités de 0,78 $\text{k}\Omega / \mu\text{M}$ diazinon et 0,49 $\text{k}\Omega / \mu\text{M}$ diazinon pour les capteurs à base de CRL et PPL respectivement. Alors, la meilleur limite de détection est donc obtenue avec le biocapteur à base de source microbienne (CRL) qui est de l'ordre de 10 nM, inférieur de celle obtenue (0,1 μM) avec le biocapteur de PPL à base du source animale.

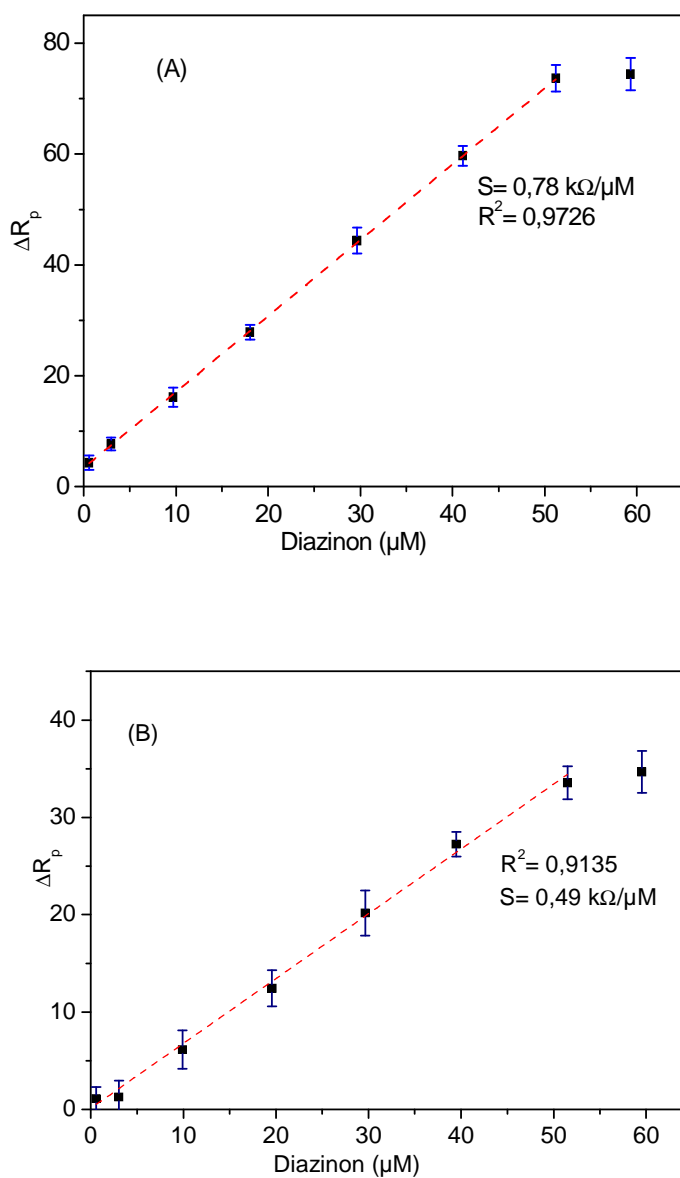


Figure II.20 : Influence de la concentration de diazinon sur la variation de la résistance de polarisation des biocapteurs impédimétriques, (A) à base de CRL et (B) à base de PPL.

II.5 Conclusion

Dans cette partie de travail, nous avons fait une étude comparative entre deux types de lipase de différentes source : microbienne (CRL) et animal (PPL). Ces deux types de lipases sont les plus utilisés dans les domaines d'application de lipase. Afin d'attribuer les meilleurs performances analytiques, nous avons proposé une autre méthode d'immobilisation d'enzyme à base des mono couches auto assemblées. Les résultats trouvés montrent que la lipase issue d'une source microbienne est plus active et performante pour une application biocapteur

Références

- [1] Martorell. D, Cespedes. F, Martinez-Fhbregas. E, Alegret. S, *Anal. Chim. Acta* 1997, 337, 305-313.
- [2] Dzyadevych. S.V, Chovelon. J.M, *Mater.Sci. Eng.C* 2002, 21, 55- 61.
- [3] Raghu.P, Madhusudana Reddy. T, Kumara Swamy. B.E, Chandrashekar. B.N, Reddaiah. K, Sreedhar.M, *Electroanal. Chem* 2012, 665, 76-82.
- [4] Osterauer. R, Kohler. H, *Aquat. Toxicol* 2008, 86, 485- 494.
- [5] Gangbazo. G, Cluis. D, Bernard.C, *Vect. Environ* 1999, 32, 36-45.
- [6] Humenik. F. J, Smelon. M.D, Dressing. S, *Environ. Sci. Technol* 1987, 21, 737-742.
- [7] Line. D.E, Osmond. D.L, Coffey. S, McLaughlin. R.A, Gale. J.A, Spooner. J, *Water. Environ. Res* 1997, 69, 844-860.
- [8] Loague. K, Corwin. D.L, Ellesworth. T.R, *Environ. Sci. Technol* 1998, 32, 130-133.
- [9] Cabello. G, Valenzuela. M, Vilaxa. M, Duran. A, Rudolph. V, Herpic. I, Calaf. G, *Environ. Health. Perspect* 2001, 5, 471-479.
- [10] Gordon. C, Mack. C, *Toxicol. Environ.Health* 2003, 66, 291-304.
- [11] Kramer. R, Wellman,S. E, Rockhold. R, Baker. R.C, *Biomed .Sci* 2002, 9, 311-320.
- [12] Lebailly. P, Niez. E, Baldi. I, *Oncol* 2007, 9, 361-369.
- [13] Leonardo.C.C, Hancock. P, Fussell.R.J, Keely, B.J, *Chromatogr.A* 2006, 1103, 94-101.
- [14] Hall.G, Mourer. C, Shibamoto. T, *Agric.Food .Chem* 1997, 45, 145- 148.
- [15] Jaffrezic-Renault. N, Dzyadevych. S.V, *Sensors* 2008, 8, 2569-2588.
- [16] Yi. Y, Zhu. G, Liu. C, Huang. Y, Zhang. Y, Li. H, Zhao. J, Yao. S, *Anal. Chem* 2013, 85, 11464-11470.
- [17] Dzyadevych. S.V, Soldatkin. A.P, Arkhypova. V. N, El'skaya. A.V, Chovelon. J. M, Georgiou. C.A, Martelet. C, Jaffrezic-Renault. N, *Sens. Actuators. B* 2005, 105, 81-87.
- [18] Deo. R.P, Wang. J, Block. I, Mulchandani. A, Joshi. K. A, Trojanowicz. M, Scholz. F, Chen.W, Lin.Y, *Anal. Chem. Acta* 2005, 530, 185-189.
- [19] Tekaya. N, Saiapina.O, Ben ouda. H, Lagarde. F, Ben ouda. H, Jaffrezic-Renault. N, *Environ. Pollut* 2013, 178, 182-188.
- [20] Pogacnik. L, Franco. M, 1999. *Biosen.Bioelectron.* 14, 569 – 578.

- [21] Yin.H, Ai.S, Xu.J, Shi.W, Zhu.L, 2009.Electroanal. Chem 637, 21-27.
- [22] Gangadhara Reddy. K, Madhavi. G, Kumara Swamy. B.E, Reddy. S, Viyaya. A, Reddy. B, Medhavi. V, Mol. Liq 2013, 180, 26-30.
- [23] Pandey. A, Benjamin. S, Nigam. P, Krieger. N, Soccol. T, Biotechnol. Appl. Biochem 1999, 29, 119-131.
- [24] Gupta. R, Gupta. N, Rathi. P, Appl. Microbiol. Biotechnol 2004, 64, 763-781.
- [25] Jaeger. K.E, Reetz. M.T, Trends. Biotechnol 1998, 16, 396-403.
- [26] Schmid.R.D, Verger.R, Angew. Chem. Int. Ed 1998, 37, 1608-1633.
- [27] Jaeger. K.E, Dijkstra. B.W, Reetz. M.T, Annu. Rev. Microbiol 1999, 53, 315-351.
- [28] Chang. S.W, Shaw. J.F, Yang. K.H, Chang. S.F, Sheih. C. J, Bioresour.Technol 2008, 99, 2800-2805.
- [29] Bellezza. F, Cipiciani. A, Costantino.U, Mol. Catal. Enzym. B 2003, 26, 47-56.
- [30] Reetz. M. T, Zonta. A. Simpelkapt. J, Biotechnol. Bioeng 1996, 49, 527-531.
- [31] Kartal. F, Janseen. M. H, Hollmann. F, Sheldon. R. A, Kilinc. A, Mol. Catal. Enzym. B 2011, 71, 85-89.
- [32] Auvray, J. Traitement des signaux. Techniques de l'ingénieur, traité Mesures et contrôle 1987, R 305, 1- 31.
- [33] Talbert.J. N, Goddard. J.M, *Colloids Surf. B : Biointerfaces* 2012, 93, 8-19.
- [34] Migneault. I, Dartiguenave. C, Vinh. J,M..Bertrand. G, Waldron. K.C, Liq. Chromatogr 2008,31, 789 -806.
- [35] Dimitrios Karpouzas. G, Singh. K.B, Adv Microb Phys 2006 51, 134-137.
- [36] Kumar. J, D'Souza. S. F, Biosens. Bioelectron 2011, 26, 4289 - 4293.
- [37] Gangadhara Reddy. K., Madhavi. G, Kumara Swamy. G, Mol. Liq 2014, 198, 181-186.
- [38] Taminto de Albuquerque.Y. D, Franco Ferreira. L, Anal. Chim. Acta 2007, 596, 210- 221.
- [39] Kumar. J, D'Souza. S.F, Biosens. Bioelectron 2010, 26, 1292-1296.
- [40] Chesters. M. A, Somorjai. G.A, Surface Sci 1975, 52, 21-28.
- [41] Nuzzo. R.G, Allara. D.L, *Amer. Chem. Soci* 1983, 105, 4481-4483.
- [42] Bandyopadhyay. K, Mayya. K.S, VijayamohananM, , Sastry. M, Electron. Spectroc. Related. Phenomena 1997, 87, 101-107.
- [43] Appa Rao. B.V, Iqbal. M. Y, Sreedhar .B, Electrochem. Acta 2010, 55, 620-631.

- [44] Love. G. C, Wolfe. D.B, Haasch. R, Chabinye. M.L, Paul. K. E, Whitesides. G. M, Nuzzo. R. G, Amer. Chem. Soc 2003, 125, 2597-2609.
- [45] Li. Z, Chang. S.C, Williams. R.S, Langmuir 2003, 19, 6744-6749.
- [46] Chen. H ,Heng. C.K, Puiu, P.D, Zhou, X. D, Lee. A.C, Lim. T, Anal.Chem.Acta 2005, 554, 52–59.
- [47] Mulchandani. A,Chen. W,Mulchandani. P, Wang. J, Rogers. K. M. Biosens.Bioelectron 2001, 16, 225–230.

Chapitre III

**Développement d'un biocapteur
impédimétrique pour la détermination de
phospholipase A₂**

Chapitre III: Développement d'un biocapteur impédimétrique pour la détermination de la phospholipase A₂

III.1 Introduction

La phospholipase A₂ (PLA₂) est une enzyme importante qui se trouve dans la plupart des tissus des mammifères ainsi que dans les venins d'insectes et de serpents [1-2]. Ces derniers contiennent de grandes quantités de mélittine, qui joue le rôle d'activateur des phospholipases A₂.

(PLA₂) est une hydrolase qui libère spécifiquement l'acide gras, estérifiant l'hydroxyle gras du carbone 2 du glycérol d'un phosphoglycéride pour donner un lysophospholipide [3]. Lorsque l'acide gras libéré de la position 2 du glycérol est l'acide arachidonique, la métabolisation de celui-ci par une cyclo-oxygénase ou une lipoxigénase conduit à des eicosanoïdes, parmi lesquels des prostaglandines et des leucotriènes, qui sont des médiateurs de l'inflammation [4]. C'est l'une des raisons des réactions inflammatoires violentes qui accompagnent les morsures de serpents et les piqûres d'insectes. Certaines isoformes des phospholipases A₂ pourraient favoriser, la genèse de l'athérome [5], d'autres seraient protectrices [6]. Cette enzyme a été rapportée d'avoir plusieurs avantages car elle représente une large gamme des effets biologiques, plusieurs études ont montré un effet puissant de PLA₂ contre plusieurs maladies comme ; le paludisme, l'athérosclérose et ses séquelles cliniques [7-8-9], les tumeurs cancérogènes [10]. En outre, une spécificité trouvée pour la phospholipase A₂ de venin l'abeille et de serpent qu'elle a un effet puissant pour l'inhibition de l'activité du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [11]. Néanmoins, de nombreuses études ont été rapportées le rôle pathogène de PLA₂, ils ont montré qu'une concentration élevée de cette enzyme est étroitement associée à plusieurs maladies telles que ; polyarthrite rhumatoïde, ischémie, l'épilepsie [12], et à la mise en cause à des troubles neuropsychiatriques [13]. Il est donc nécessaire de trouver des techniques d'analyse efficaces, faciles à mettre en œuvre et permettant une détection rapide de PLA₂.

Pour effectuer l'analyse de PLA₂, il s'agit essentiellement de HPLC [14-15], cette technique est par ailleurs très performante mais nécessite du temps, une instrumentation sophistiquée et des opérateurs bien formés. Les biocapteurs peuvent constituer une alternative intéressante permettant une détection rapide de PLA₂. À notre connaissance, un seul biocapteur électrochimique a été développé pour la quantification de lipoprotéine associée de PLA₂ (Lp-PLA₂) [16], il a été basé sur l'alcool oxydase pour la détection de l'oxydation d'alcool issue

d'une réaction d'hydrolyse d'une chaîne carboxylique des esters. Par contre ce biocapteur ne permet pas d'avoir une détermination exacte de PLA₂. Dans ce travail, nous nous proposons une nouvelle stratégie pour une détermination directe et rapide de PLA₂, par le développement d'un biocapteur enzymatique basé sur le signal électrochimique de la lécithine (substrat) en utilisant la transduction impédimétrique. Afin d'aboutir les meilleurs performances, deux types de PLA₂ ont été testés ; la première a été extraite de venin de l'abeille et la deuxième de venin de serpent,. Les enzymes ont été immobilisées par réticulation dans une atmosphère saturée de glutaraldéhyde en présence des nanoparticules d'or.

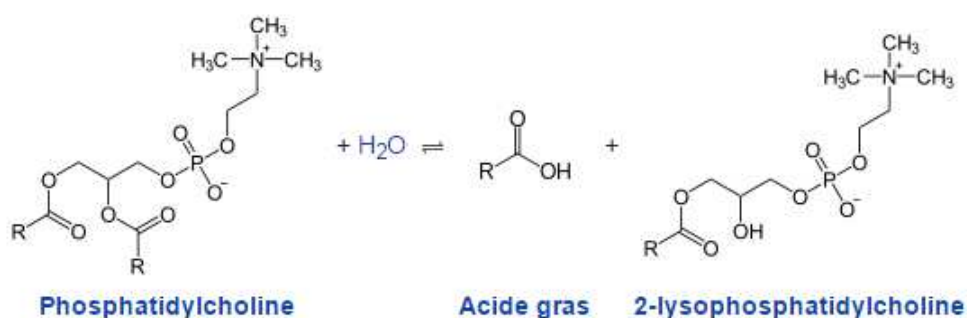


Figure III.1 : Réaction d'hydrolyse de lécithine par la phospholipase A₂.

III.2 Matériels et méthodes

III.2.1 Réactifs

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité > 18 MΩ.cm) obtenue à partir d'un système de purification MilliQ. Phospholipase A₂ de venin de l'abeille (1775 Unité/ mg solide), phospholipase A₂ extraite de *Naja mossambica mossambica* (> 1600 unité/ mg solide), L- α-phosphatidylcholine (lécithine) extraite de jaune d'œuf, type XVI.E (≥99 %), le glutaraldéhyde (GA) (grade II, 25% de solution aqueuse), Na₂HPO₄ (≥99%), NaH₂PO₄ (≥99%), le glycérol (≥99%), KH₂PO₄ (≥99%), K₂HPO₄ (≥98%), la solution des nanoparticules d'or (10 nm, suspension stabilisée à 0.1 mM PBS) ont été achetées de Sigma Aldrich (Saint Quentin, Fallavier, France). Ethanol (≥ 96%) provenait de Fluka. Enzyme PLA₂ extraite de *Naja Cobra* est provenait de Thaïlande.

III.2.2 le transducteur

Dans cette partie de travail, nous avons utilisé le même transducteur utilisé dans le chapitre précédent (Partie II.B). Ces transducteurs sont des plaquettes (Si/SiO₂) revêtues d'or, avec une

épaisseur d'environ 300 nm, une couche de résine est déposée sur la surface d'or afin de la protéger durant la découpe et le stockage. Ces électrodes d'or ont été fournies par le LAAS (Toulouse).

III.2.3 Nettoyage de l'électrode

La première étape de nettoyage consiste à enlever la couche de résine sur la surface d'or; pour ce faire la plaquette d'or est immergée dans l'acétone dans un bain à ultrason pendant 15 minutes. La surface est ensuite séchée sous un flux d'azote (N_2).

L'électrode est ensuite plongée 5 minutes dans une solution de piranha, cette solution est composée d'un mélange d'acide sulfurique à 98% et d'eau oxygénée à 35 % (H_2SO_4/H_2O_2 , 70.30 v/v). Le mélange est très exothermique. L'échantillon est ensuite rincé abondamment avec de l'eau ultrapure.

III.2.4 Elaboration des biocapteurs

La membrane enzymatique est constituée à la surface du transducteur par réticulation des phospholipase A_2 (PLA_2) en présence d'albumine de sérum bovin (BSA) dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde. Pour cela, deux biocapteurs ont été préparés ; le premier capteur a été préparé par la dispersion des nanoparticules d'or ($AuNPs$) dans 10 mM de solution tampon phosphate (pH = 7,2) contenant du PLA_2 extraite de venin de l'abeille 0.5% (m/v), BSA 2% (m/v), glycérol 3% (m/v). 10 μ l de cette solution est homogénéisée et déposée sur la surface sensible de l'électrode prétraitée. La même solution est préparée avec l'enzyme PLA_2 de venin de serpent (Naja Cobra), puis elle a également été homogénéisée et déposée sur une autre électrode de travail. Les capteurs sont ensuite placés 30 min dans une atmosphère saturée en vapeurs de glutaraldéhyde. Les membranes sont alors laissées sécher à l'air libre pendant 40 min à température ambiante, après, elles sont stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

III.2.4 Mesures électrochimiques

Les mesures de l'impédance électrochimique et de la voltammétrie cyclique sont réalisées en utilisant le dispositif expérimental et l'instrument décrit dans le chapitre précédent (Chapitre II.B). Toutes les mesures de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) sont effectuées à température ambiante avec une cage faradique, dans une solution tampon phosphate 10 mM, pH 7.4 avec une gamme de fréquence allant de 100 mHz- 100 kHz. Les mesures de la

voltammétrie cyclique (CV) sont réalisées en présence de couples redox $8\text{mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, dissout dans PBS, le potentiel a été balayé entre $-0,4\text{ V}$ et $0,6\text{ V}$.

III.3 Résultats et discussions

III.3.1 Caractérisation par la voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique d'une espèce électroactive telle que $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ est un outil précieux pour tester la barrière cinétique et l'échange électrochimique à l'interface. La barrière cinétique entrave le processus de transfert d'électrons et devient de plus en plus grande quand l'épaisseur augmente et que la densité des défauts de la barrière diminue. La figure III.2 présente la caractérisation électrochimique par la voltamétrie cyclique de l'électrode d'or nue et modifiée, en présence de couples redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, le potentiel a été balayé entre $-0,4\text{ V}$ et $0,6\text{ V}$, avec une vitesse de balayage de 100 mV/s . Comme il est clair dans les voltamogrammes, les pics d'oxydation et de réduction du couple redox sont visibles en raison du fort taux d'échange avec l'électrode d'or nue. Après le dépôt de la membrane enzymatique, une forte diminution de l'intensité de courant caractérisée par la disparition des pics d'oxydoréduction, ce que l'on peut attribuer à la diminution du transfert d'électrons à travers la membrane enzymatique de PLA_2 .

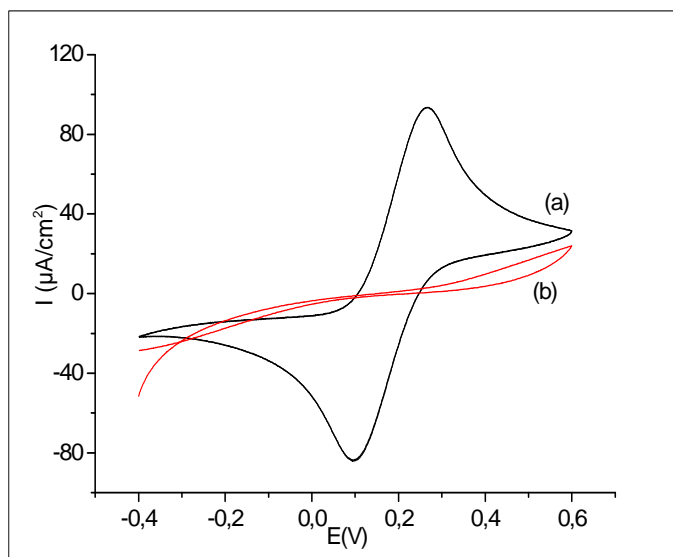


Figure III. 2: Voltammogrammes cycliques en présence de $8\text{ mM } \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, de l'électrode nue (a), après dépôt de la membrane PLA_2 . Vitesse de balayage 100 mV/s .

III.3.2 Caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique

Les diagrammes d'impédance de l'or nu et de l'électrode couverte par l'enzyme immobilisée ont aussi été déterminés en appliquant un potentiel de $-0,4V$ et en faisant varier la fréquence dans la gamme de 100 mHz à 100 kHz. Ce potentiel a été choisi parce qu'il présente la plus basse résistance de transfert de charge de la dernière couche de l'élaboration de biocapteurs, qui est l'immobilisation de la phospholipase A_2 . Les résultats montrent une augmentation significative du diagramme d'impédance après la modification de l'électrode d'or qui correspond à une augmentation de la résistance de transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte.

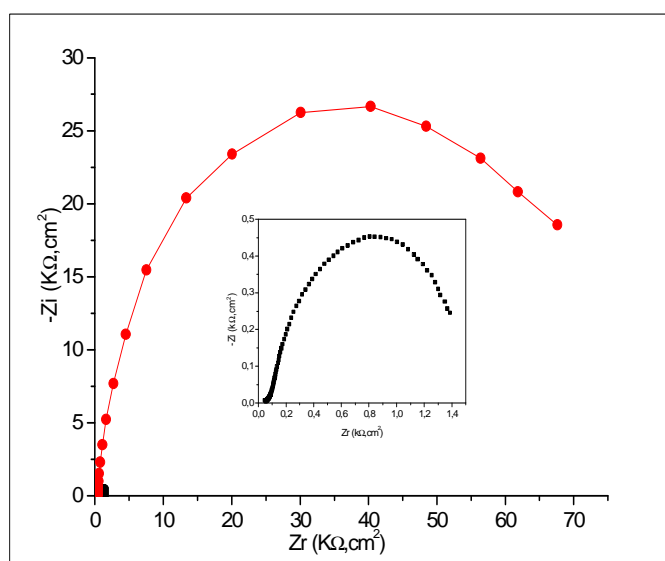


Figure III.3 : Diagrammes de Nyquist de l'électrode d'or avant (a) et après (b) le dépôt de la membrane enzymatique de PLA₂. Les mesures ont été effectuées dans un tampon PBS 10 mM, pH 7.4 à -0.4V.

III.3.3 Influence de la quantité d'enzyme fixée sur la réponse des biocapteurs

Des expériences ont été réalisées sur les deux types de biocapteurs afin de déterminer la quantité optimale d'enzyme à fixer pour obtenir le signal maximal. Pour cela, quatre biocapteurs impédancemétriques ont été préparés avec différentes quantités d'enzymes, les réponses ont été mesurées suite à l'ajout de 10^{-6} M de lécithine.

La figure III.4 montre que la réponse du biocapteur augmente avec la quantité d'enzyme jusqu'à 0.5 mg puis diminue au-delà. Un accroissement de la charge de PLA₂ favorise la réaction enzymatique mais une densité trop élevée empêche la diffusion et sert à la formation des liaisons hydrophobes plus puissantes que celles déjà existantes, ce qui modifie la conformation

de l'enzyme et entraîne une diminution de la réponse du capteur et augmente son temps de réponse.

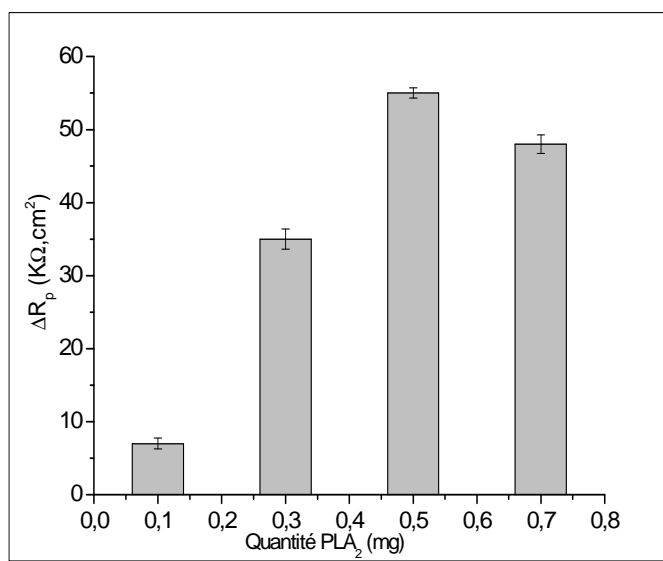


Figure III.4 : Effet de la quantité d'enzyme (mg) sur la réponse du biocapteur impédimétrique. Injection de 10^{-6} M de lécithine dans du PBS (10 mM) pH 7.4 à une température de 20 ± 3 ° C.

III.3.4 Caractéristiques analytiques

III.3.4.1 Linéarité, limite de détection

La figure III.5 montre l'influence de la concentration de lécithine sur la réponse des biocapteurs (a) à base de PLA₂ extraite du venin de serpent et (b) à base de PLA₂ extraite du venin de l'abeille, Nous avons remarqué une augmentation de l'impédance lorsque la concentration de lécithine augmente. Cette variation peut être attribuée à la génération de composés chargés, suite à l'hydrolyse de la lécithine qui provoque des changements de la conductivité à proximité de l'interface biofilm/ transducteur. En outre, nous avons observé clairement que l'augmentation de la concentration en lécithine augmente la résistance du transfert de charge, caractérisée par l'augmentation du diamètre de demi-cercle. Cette augmentation pourrait résulter d'un changement de la conformation de l'enzyme suite à son interaction avec le substrat.

Le comportement électrique de ce système électrochimique, les modifications apportées l'interface électrode/électrolyte, peuvent être représentées de façon analogue par un circuit électrique équivalent. Ce circuit équivalent est appliqué pour ajuster les données expérimentales et extraire les informations nécessaires sur les paramètres électriques responsables de la variation

impédimétrique. Les spectres de Nyquist obtenus peuvent être modélisés par le circuit électrique présenté dans la figure III.6, y compris les deux éléments résistifs R_s et R_p , dans lequel la double couche capacitive a été remplacée par CPE en présence de l'impédance de Warburg (Z_w). R_s correspond à la résistance ohmique de l'électrolyte et R_p est la résistance de transfert de charge entre la solution et la surface d'électrode de travail en absence de toute espèce redox. Z_w correspond à l'impédance de Warburg, qui est un élément spécifique de diffusion électrochimique.

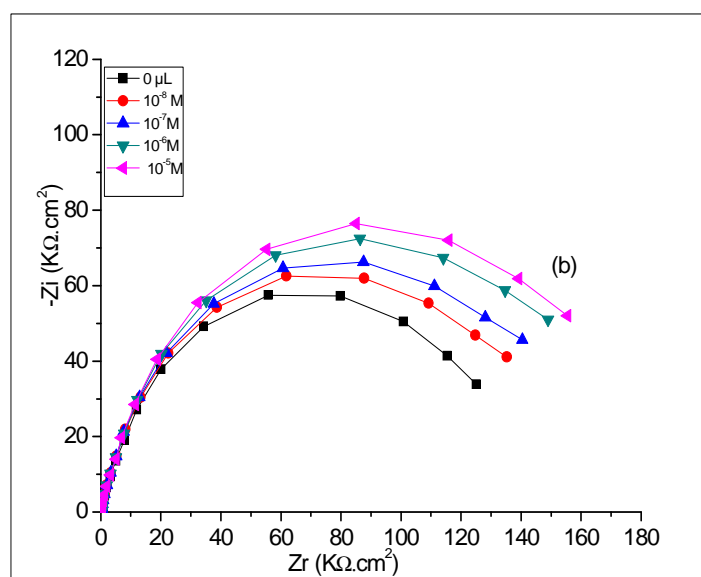
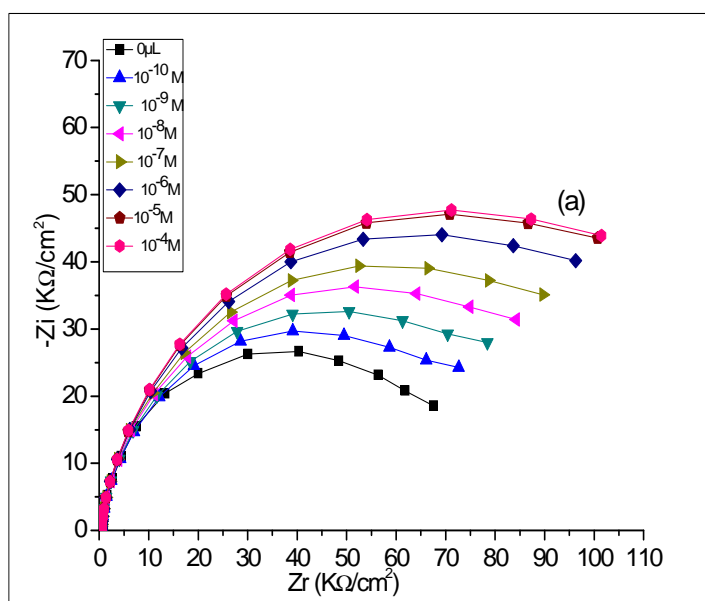


Figure III.5: Influence de la concentration de lécithine sur la réponse des biocapteurs impédimétriques (a) à base de PLA₂ du venin de serpent et (b) PLA₂ du venin de l'abeille. Mesures effectuées dans un tampon PBS 10 mM, pH 7.4, à un potentiel de -0.4 V et une gamme de fréquence de 100 mHz- 100kHz.

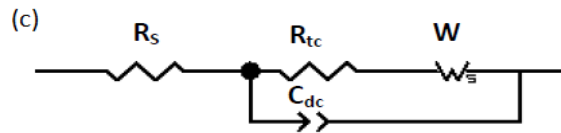


Figure III.6 : Circuit électrique équivalent.

En reportant la variation relative de la résistance de polarisation $\Delta R_p / R_{p0}$ en fonction de la concentration de lécithine, on obtient les courbes de calibration des biocapteurs, sachant que la variation ΔR_{p0} pour chaque concentration a été calculée par rapport à la valeur R_p avant l'injection de lécithine. Ainsi que le montre la figure III.7, la réponse du biocapteur de PLA₂ du venin serpent présente une large gamme de linéarité de 10^{-10} M jusqu'à 10^{-5} M avec un facteur de corrélation de l'ordre de 0.99586. Le domaine de linéarité obtenu par ce capteur est bien plus large que celui du biocapteur à base du PLA₂ de venin de l'abeille qui est de 10^{-8} M à 10^{-5} M. La limite de détection 10^{-11} M obtenue comme étant la concentration conduisant à trois fois le rapport signal sur bruit (S/N=3) est donc trouvée avec le premier biocapteur et elle est de loin beaucoup bien inférieure à celle du capteur du venin de l'abeille qui a été de 10^{-9} M.

La reproductibilité de la réponse du biocapteur impédimétrique a été testée sur différents biocapteurs pour quatre niveaux de concentration dans la gamme de 10^{-10} - 10^{-5} M. Le coefficient de variation déterminé avec trois mesures est très bon car il se situe entre 5% et 6% dans l'intervalle de concentrations étudiées.

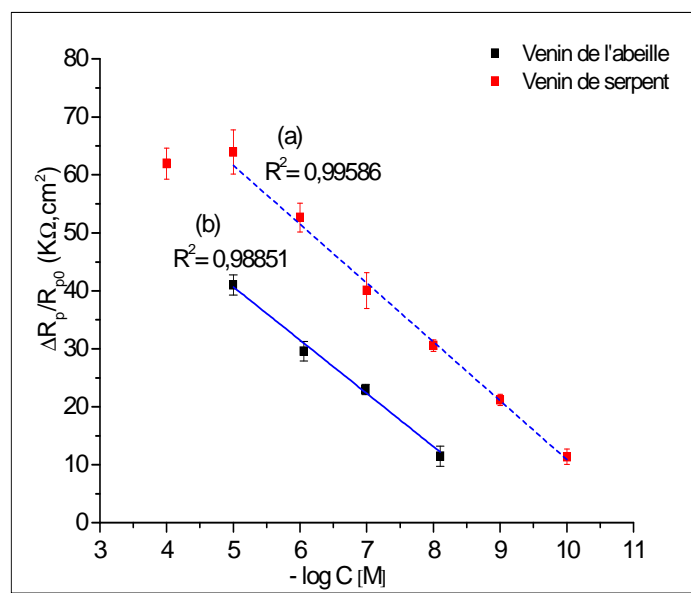


Figure III.7 : Courbes de calibration des biocapteurs impédimétrique de PLA₂
(a) venin de serpent, (b) venin de l'abeille.

III.3.4.2 Injection de cobra Naja et de cobra mossambica mossambica

Afin de déterminer l'activité enzymatique de PLA₂, nous avons fixé la concentration de lécithine à 10⁻⁶ M et nous avons injecté différentes aliquotes de l'enzyme. Pour ce faire, 0.002 g de cobra Naja est dissout dans 125 µl PBS, pH 7.4, ensuite elle est diluée 100 fois pour avoir le domaine de linéarité. Nous avons refait le même protocole avec l'enzyme Naja cobra mossambica mossambica (Thaïlande). L'influence de la concentration d'enzyme sur la réponse de biocapteur est présentée dans la figure III.8, les spectres de Nyquist obtenus montrent une diminution de l'impédance avec l'augmentation de la quantité d'enzyme injectée, ce que l'on attribue, à l'influence de l'activité enzymatique de PLA₂ présente dans le venin de serpent (effet de compétition).

Comme le montre la figure III.9, $\Delta R_p / R_{p0}$ augmente linéairement avec la concentration du PLA₂ de Cobra mossambica mossambica commerciale et représente une gamme linéaire de 10-400 ng correspondant à 16- 640 unités, plus large que celle obtenue avec PLA₂ du cobra Naja de Thaïlande qui à une linéarité de 100 à 300 ng. Bien que nous ne connaissons pas l'activité spécifique de cette PLA₂, nous pouvons en déduire qu'elle est plus faible que celle de PLA₂ de cobra mossambica mossambica.

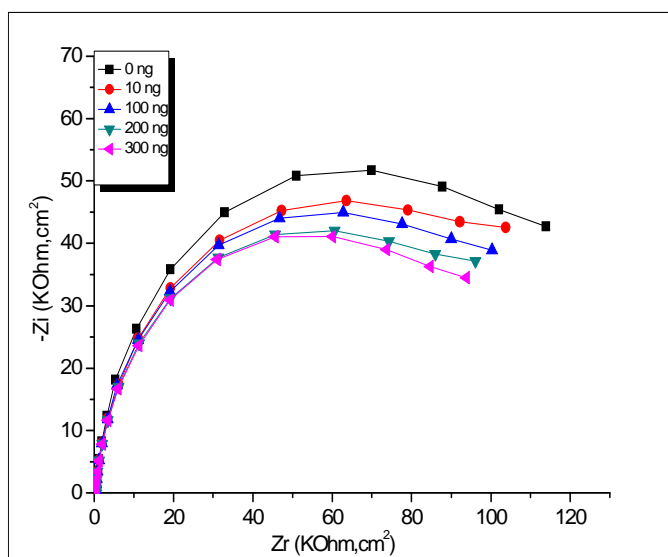


Figure III.8 : Influence de la quantité de PLA₂ (Cobra Naja, Thaïlande) sur la réponse du biocapteur impédimétrique. Mesures effectuées dans PBS 10 mM, pH 7.4, à un potentiel de -0.4V et une gamme de fréquence de 100 mHz- 100kHz.

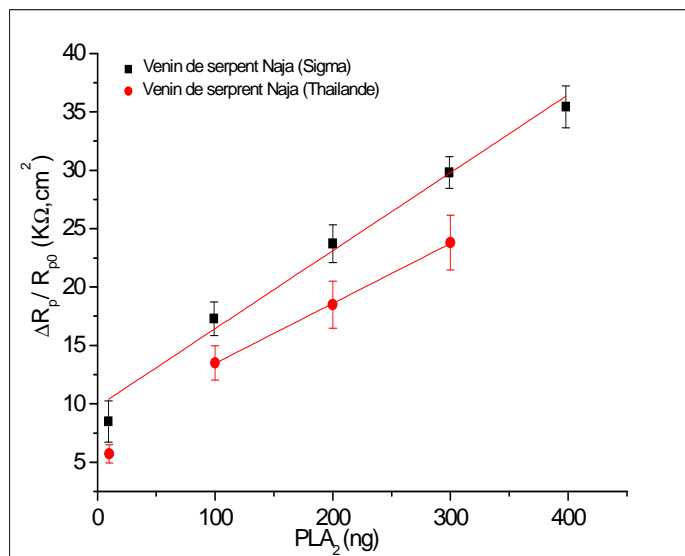


Figure III.9 : Courbes de calibration du biocapteur impédimétrique de PLA₂

III.4 Conclusion

Dans cette partie de travail, nous avons développé un biocapteur impédimétrique original pour la détermination de phospholipase A₂. Deux types de biocapteurs ont été testés ; PLA₂ du venin de l'abeille et du venin de serpent (Naja Cobra). Les résultats trouvés montrent que PLA₂ extraite de Naja cobra est plus active, permettant d'obtenir une limite de détection de l'ordre de 10⁻¹¹ M avec une large gamme de linéarité et une bonne reproductibilité.

Ce biocapteur a également été utilisé pour la détermination de l'activité de la PLA₂ dans un venin de serpent et sera également utilisé pour la détection de la PLA₂ dans des boissons énergisantes.

Références

- [1] Nicolas. J.P, Lin.Y, Lambeau. G, Ghomashchi. F, Lazdunski. M, Gelb .M.H, Biol. Chem 1997, 272, 7173–7181.
- [2] Kini. R .M, Toxicon 2003, 42, 827- 840.
- [3] Scott. D.L, White. S. P, Otwinowski. Z, Yuan. W, Gelb. M. H, Sigler. P .B, Science 1990, 250 1541-1546.
- [4] Dennis. E. A, Biol. Chem 1994, 269, 13057-13060.
- [5] Argiolas. A, Pisano .J.J, Bio. Chem 1993, 258, 13697-13702.
- [6] Ait. Oufella. H, Herbin. O, Lahoute. C, Coatrieux. C, Loyer. X, Laurans. L, Arterioscler Thromb. Vasc. Biol 2013, 33, 466-473.
- [7] Stafforini. D. M, McIntyre. T .M, Zimmerman. G .A, Prescott. S. M, Rev. Clin. Lab. Sci 2003, 40, 643–672.
- [8] Ross. R, New Engl. J. Med 1999, 340, 115–126.
- [9] Dos Santos. M.C, Assis. E.B, Moreira. T.D, Pinheiro. J, Fortes-Dias. C.L, Toxicon 2005, 46, 958–961.
- [10] Bennett. D .T, Deng. X. S, Yu. J .A, Bell. M. T, Mauchley. D .C, Meng. X, Brett. Reece. T, Fullerton. D. A, Weyant. M. J, Ann. Thorac. Surg 2014, 98, 439-446
- [11] Fenard. D, Lambeau. G, Maurin. T, Lefebvre. J. C, Doglio. A, Mol. Pharmacol 2001, 60, 341- 347.
- [12] Farooqui. A. A, Ong. W. Y, Horrocks. L. A, Pharmacol. Rev 2006, 58, 591- 620.
- [13] Bella. J. G, McKinlaya. E. E , Dicka. J. R , MacDonaldb. D. G, Boyleb. R. M, Glenb. A.C, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 2004, 71, 201-204.
- [14] Diz Filho. E.B.S, Marangoni. S, Toyama. D.O, Fagundes. F.H.R, Oliveira. S.C.B, Fonseca. F.V, Calgarotto. A.K, Joazeiro. P.P, Toyama. M.H, Toxicon 2009, 53, 104-114.
- [15] Van der Laat. M, Fernández.J, Durban.J, Villalobos. E, Camacho. E, Calvete. J.J, Lomonte. B, Toxicon 2013, 73, 71-80.
- [16] Liao. W. Y, Liub. C.C, Wang. C, Sens. Actoators. B 2008, 134, 993-999.

Chapitre IV

**Développement d'un biocapteur
électrochimique pour la détection de
Bisphénol A**

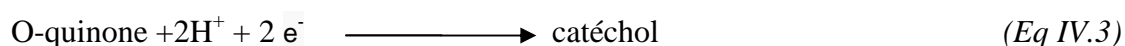
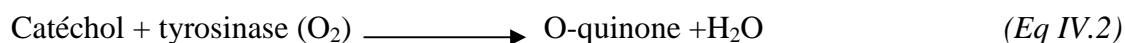
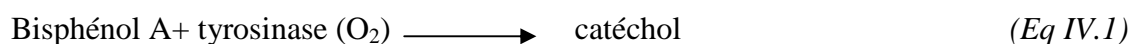
*Chapitre IV : Développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection de Bisphénol A***IV.1 Introduction**

Le Bisphénol A (BPA) est un composé organique largement utilisé comme monomère dans la production des polycarbonates et de résines époxyde [1-2-3] qui sont employés principalement dans les contenants plastiques alimentaire, les enduits de surface des récipients pour l'eau et la nourriture, les biberons, les canettes et l'électroménager [4-5], Il est également utilisé comme un antioxydant dans les plastifiants, et en tant qu'un inhibiteur de polymérisation dans le Polychlorure de vinyle (PVC). Le bisphénol A est présent sous forme libre dans un grand nombre de tickets de caisse (papier thermique) et dans le recyclage de papier [6]. Néanmoins, sa toxicité est un grave problème qui affecte l'environnement et la santé humaine [4-7-8], Le BPA constitue un perturbateur endocrinien œstrogéno-mimétique, capable de mimer les hormones naturelles [9-10], et conduisant à des effets négatifs sur la santé, il s'agit notamment des maladies cardiaques, de diabète, des problèmes de reproduction pour les deux sexes (male et femelle), des malformations génitales [3-11-12-13-14]. En 2008, le groupe Lang a rapporté que l'accumulation de BPA dans le corps humain a été étroitement associée au cancer [15]. En outre, en raison de ces effets néfastes en particulier sur les enfants et les nourrissons, le Canada et la France ont interdit l'utilisation de BPA dans les biberons en 2010 [16-17], suivie par la Chine, les Etats unies et la commission européenne en 2011 [18-19-20].

Le bisphénol A est massivement produit et dispersé dans l'environnement par les eaux usées, provenant principalement des sites de fabrication ou de décharges des plastiques, provoquant ainsi la pénétration du BPA dans les eaux de surfaces [7-8-21]. D'un point de vue environnemental, il est nécessaire de limiter et de contrôler le BPA, mais également d'être en mesure de déterminer sa concentration et ses produits de dégradation dans les eaux, et de développer des stratégies de traitement appropriées. Pour cela, différentes méthodes d'analyse sont disponibles comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) [22], la chromatographie en phase liquide [23], la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [24]. Ces méthodes sont très performantes mais nécessitent du temps de préparation des échantillons, une instrumentation sophistiquée et des opérateurs bien formés. Les biocapteurs peuvent constituer une alternative intéressante permettant une détection rapide et in-situ du bisphénol A. De nombreux biocapteurs électrochimiques de BPA ont été développés en utilisant différents biorécepteurs tels que les enzymes [25-26], les aptamères [27],

les anticorps [28], les peptides [15] et les bactéries [29]. Parmi ces biomolécules, l'enzyme tyrosinase a été utilisée pour la détermination de BPA. En présence de l'oxygène dissout, la tyrosinase catalyse l'oxydation du BPA en O-quinone, produit d'oxydation du catéchol (Eq IV.1-2). Ensuite, l'O-quinone générée peut être réduite électrochimiquement à faible potentiel sans aucun médiateur potentiel, le signal de réduction obtenue est normalement utilisé pour la détermination du BPA (Eq IV.3) [30].

Dans cette étude, nous avons mis à profit cette réaction pour le développement d'un biocapteur électrochimique et comparé ses performances à celles déjà présentées précédemment. Des électrodes en diamond dopé au bore (BDD) qui possèdent des propriétés remarquables et uniques ont été évoluées. Par ailleurs, nous avons décidé d'adapter un nouveau mode d'immobilisation afin d'augmenter l'activité catalytique et la stabilité de l'enzyme. L'élaboration du biocapteur consiste à fonctionnaliser la surface de BDD par le greffage électrochimique d'un sel de diazonium, et à utiliser des nanotubes de carbones afin d'améliorer la conductivité électrique de surface. L'objectif était d'aboutir une meilleure limite de détection et une meilleure durée de vie du biocapteur.



IV.2 Matériels et méthodes

IV.2.1 Réactifs

Comme précédemment, toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenue à partir d'un système de purification MilliQ. La tyrosinase ($\geq 1000 \text{ uniét /mg}$ solide, extraite de champignons), le nitrite de sodium (NaNO_2) $\geq 97\%$, le Chlorure d'hydrogène (HCl), le glutaraldéhyde (GA) (grade II, 25% de solution aqueuse), le phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4), le phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4), Hydroxysuccinimide (NHS), *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC), l'acide sulfurique, l'acide nitrique, le bisphénol A ($\geq 99\%$), le phénol $\geq 99\%$, le 2- nitrophénol, 4-nitrophénol, Cd^{+2} , KNO_3 , Cu^{+2} , Ni^{+2} ont été fournis par Sigma- Aldrich. Le 4-aminobenzylamine et l'éthanol $\geq 99\%$ ont été achetés respectivement chez Acros Organics et chez Fluka. Des nanotubes de carbone multi feuillets (Munt Wallled Carbon Nanotubes MWCNTs) ont été fabriqués à l'Institut Matériaux Microélectronique Nanosciences de Provence (Toulon, France). Ces MWCNTs sont fonctionnalisés avec des groupements carboxyles (COOH) et ont un diamètre intérieur de 20 nm et un diamètre extérieur de moins de 100 nm.

IV.2.2 le transducteur

Dans cette partie de travail, nous avons choisi le transducteur en diamant dopé au bore (BDD) qui est considéré comme un excellent matériau pour différentes applications en raison de ses propriétés physiques et chimiques particulières telles que sa haute résistivité électrique, sa forte conductivité thermique [31], sa grande résistance à la corrosion [32], son inertie chimique, son extrême dureté ou encore sa transparence optique. Ce matériau a été largement étudiés pour des applications environnementales, biomédicales, et électroanalytiques, en particulier pour la quantification de traces de substances biochimiques dans le corps humain et de composés nocifs dans les eaux polluées [33-34-35], car il possède plusieurs propriétés remarquables et uniques, qui le rend supérieur aux autres matériaux d'électrodes, citons par exemple :

- Une large fenêtre de potentiel électrochimique en milieu aqueux et non-aqueux [36]. La largeur de cette fenêtre diminue suivant la qualité du film et l'incorporation d'impuretés de carbone non-diamant de type sp^2 .

- Une très faible capacité de la double-couche, et un courant résiduel faible et stable, ce qui conduit à un bon rapport signal sur bruit, permettant la réalisation des mesures rapides avec l'amélioration de la sensibilité pour la détection de faibles concentrations [37].
- Une reproductibilité élevée du signal obtenu avec une stabilité de la réponse à long terme, et une forte tendance à résister à la désactivation [38].
- Une biocompatibilité avec une excellente résistance à l'encrassement de l'électrode [37].
- Une transparence optique dans les régions de l'UV/visible et de l'IR du spectre électromagnétique, une propriété particulièrement intéressante pour des mesures spectro-électrochimiques.

L'électrode de diamant dopé au bore utilisée dans cette étude a été élaborée par la société Neocoat (La Chaux-de-Fonds, Suisse). Un film de diamant polycristallin d'une épaisseur de 300 nm, dopé au bore d'une concentration comprise entre 7000 à 8000 ppm, est déposé par la technique de dépôt chimique en phase vapeur (CVD) sur une couche de silicium recouvert par deux couches isolantes ; une couche d'oxyde de silicium et une autre de nitrure de silicium ($\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$). L'épaisseur totale est de 0,5 mm (Figure IV.1). La surface active de l'électrode de travail est de l'ordre de $0,07 \text{ cm}^2$ (définie par un joint torique).

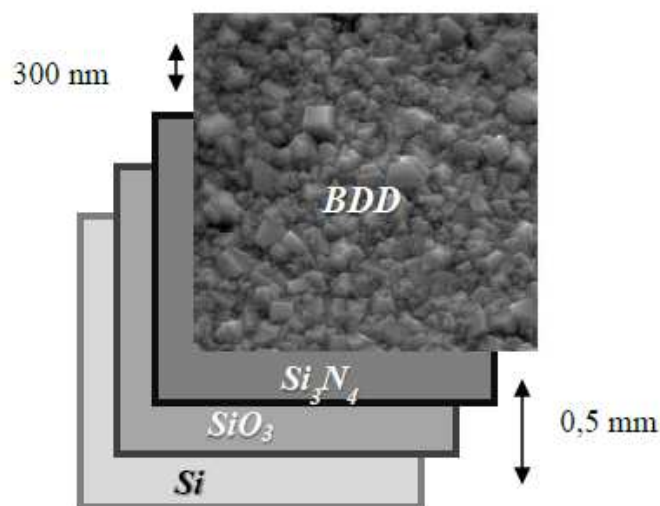


Figure IV.1 : la structure d'une électrode BDD

IV.2.3 Mesures électrochimiques

Toutes les mesures électrochimiques de la spectroscopie d'impédance électrochimique et de la voltammétrie cyclique sont réalisées en utilisant le dispositif expérimental et l'instrument décrit dans le chapitre II (partie B). Toutes les mesures de la voltammétrie cyclique (CV) sont

effectuées à température ambiante avec une cage faradique. Les mesures de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) sont réalisées en présence de couples redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, dissout dans PBS [8 mM], avec une gamme de fréquence allant de 100 mHz- 100 kHz à 195 mV.

IV.2.4 Caractérisation de surface par la microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM) permet de cartographier les surfaces avec une précision pouvant aller jusqu'à l'angström et y d'étudier des interactions ou des déformations dynamiques sur des échelles inférieures au micromètre. La microscopie à force atomique (AFM) a été réalisée en milieu ambiantes en utilisant un observateur Nano (CSI Société, France), avec une résolution maximale de $110 \mu\text{m}^2$. Les mesures ont été effectuées en mode tapping avec une pointe silicium (Europa, Allemagne) ayant une raideur d'environ 75 N/m et une fréquence de 200- 400Hz. Le rayon de la pointe est $< 10 \text{ nm}$, les échantillons ont été analysés dans une zone ($5 \times 5 \mu\text{m}$).

IV.2.5 Préparation de biocapteur

IV.2.5.1 Nettoyage de l'électrode BDD

Avant utilisation, l'électrode de BDD est prétraitée avec l'éthanol, ensuite, elle est soigneusement rincée avec l'eau ultra pure et séché sous flux d'azote.

IV.2.5.2 Fonctionnalisation de la surface de BDD par la génération *in-situ* de sel diazonium

L'étape la plus importante pour la construction d'une électrode modifiée est la fonctionnalisation du transducteur, cette étape est réalisée par la réduction électrochimique du sel de diazonium généré *in-situ*. Pour se faire, le diazonium a été synthétisé dans une cellule électrochimique par l'addition de 0.1 M NaNO_2 à une solution électrolyte contenant 2 mM de 4-aminobenzylamine (4-ABA) et 0.5M HCl à 4°C . Ensuite le mélange a réagit pendant 5 min avant la réduction électrochimique, en utilisant la voltammétrie cyclique qui est la technique généralement adoptée pour la réduction électrochimique du diazonium, car elle permet d'observer au mieux les phénomènes réactionnels lors de la fonctionnalisation de surface. Le potentiel a été varié dans une gamme de 0.6 à -1V. Après le greffage électrochimique, l'électrode a été rincée avec de l'eau ultrapure.

Ce dépôt électrochimique du sel de diazonium substitué par un groupement NH_2 (4-ABA) implique des réactifs simples et ne nécessite pas comme les méthodes classiques de greffage l'isolement et la purification du sel diazonium dissous dans les solutions acides [39].

IV.2.5.3 Immobilisation d'enzyme

Les MWCNTs sont dispersés dans un tampon phosphate pH 7 contenant 0.4 M EDC et 0.1 M NHS, le mélange réagit pendant 90 min afin de réaliser l'activation des groupements carboxyles. Ensuite, une solution enzymatique contenant 0.3 mg de tyrosinase (20 μ L) dissout dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7 plus 5 μ l des MWCNTs sont soigneusement homogénéisées, puis, 10 μ l de ce mélange est déposée sur la surface de l'électrode modifiée par le greffage électrochimique, le capteur est ensuite placé dans une atmosphère saturée de glutaraldéhyde pendant 10 min. le biocapteur est alors gardé à sec à 4° C jusqu'à son utilisation. Il est par ailleurs conservé à 4°C dans un tampon phosphate 10 mM pH 7 entre deux jours de mesure. Le schéma IV.2 résume les étapes de préparation du biocapteur.

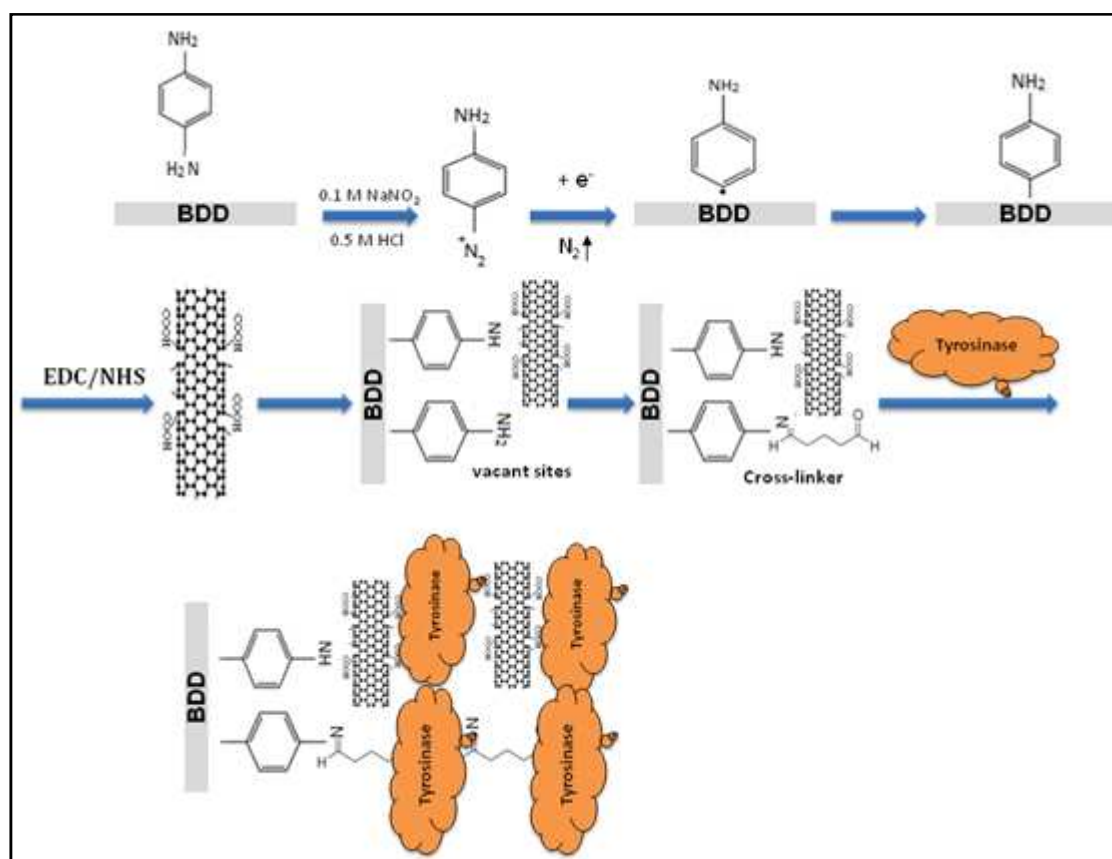


Figure IV.2: les étapes de préparation du biocapteur.

IV.3 Résultats et Discussions

IV.3.1 Réduction électrochimique du sel diazonium

La Figure IV.3 présente le voltammogramme issue d'une réduction électrochimique du sel diazonium généré in situ par une réaction de 4 ABA avec NaNO_2 dans une solution de HCl , avec une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, et une gamme de potentiel variant de 0.6 à -1 V.

Au premier cycle, la variation du courant en fonction du potentiel appliqué, présente une vague de réduction localisée vers -0.4 V. Ce courant correspond à la réduction du sel diazonium en solution qui conduit à la formation de radicale amine. À partir de deuxième cycle de balayage, le courant de réduction diminue dramatiquement. Cette chute du courant au cours des balayages ultérieurs témoigne la passivation de l'électrode de travail et résultant de la formation d'un film isolant sur la surface du BDD.

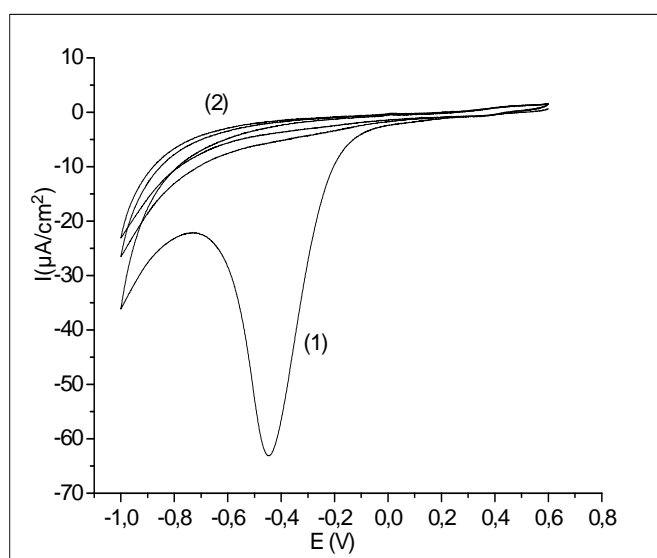


Figure IV.3: Voltammogramme de la réduction électrochimique du sel de diazonium, (1) premier balayage, (2) balayages ultérieures. La Vitesse de balayage : $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

IV.3.2 Caractérisation électrochimique

IV.3.2.1 Caractérisation par la voltammétrie cyclique (CV)

la figure IV.4 présente les voltammogrammes enregistrés pour les différentes étapes d'élaboration de notre biocapteur dans une solution de $8 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ dissout dans le PBS, avec une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Comme on peut le voir sur la figure, les pics d'oxydo-réduction du couple redox sont visibles pour l'électrode nue (courbe a), une diminution

dramatique du courant après le greffage électrochimique du sel de diazonium (courbe b) par rapport à l'électrode nue, et une disparition des pics de la sonde redox suite à l'immobilisation de l'enzyme (courbe c), ce qui est attribué à la passivation de l'électrode modifiée, qui par conséquent empêche l'accès des électrons à la surface du BDD à travers la barrière interfaciale de film enzymatique.

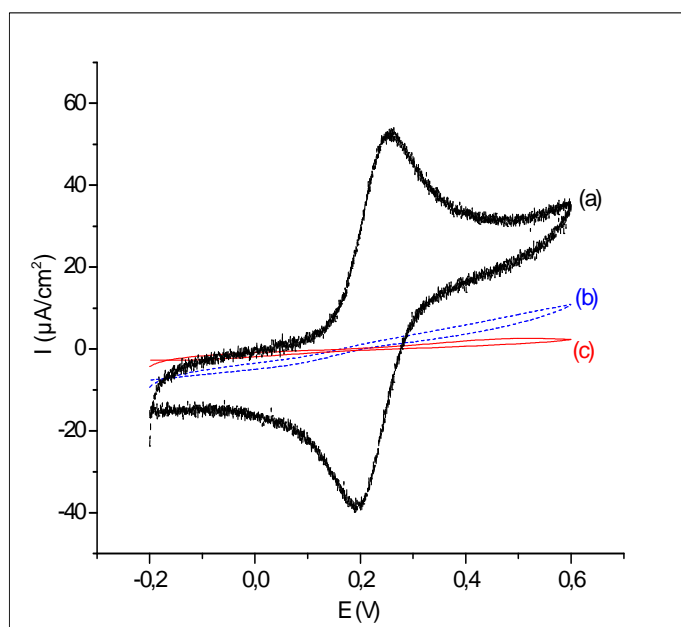


Figure IV.4 : Voltammogrammes cycliques de l'électrode BDD nue (a), modifiée par greffage électrochimique (b) et après le dépôt de la membrane enzymatique (c) en présence de 8mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

IV.3.2.2 Caractérisation impédimétrique (EIS)

Pour obtenir des contrôles d'immobilisation supplémentaires, nous avons utilisé la spectroscopie d'impédance électrochimique comme technique de caractérisation afin de mesurer la conductivité de surface du substrat modifié. Les mesures ont été effectuées dans une solution de 8 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ dissout dans le PBS, en appliquant un potentiel de 195 mV sur une gamme de fréquence comprise entre 100 kHz et 100 mHz. Les diagrammes de Nyquist obtenus sont représentés dans la figure IV.5, on remarque bien que le diamètre des demi-cercles augmente de manière significative après chaque étape d'élaboration du biocapteur, traduisant une augmentation de la résistance de transfert de charge (R_{tc}) expliquée par la diminution du transfert d'électrons à l'interface électrode/ électrolyte.

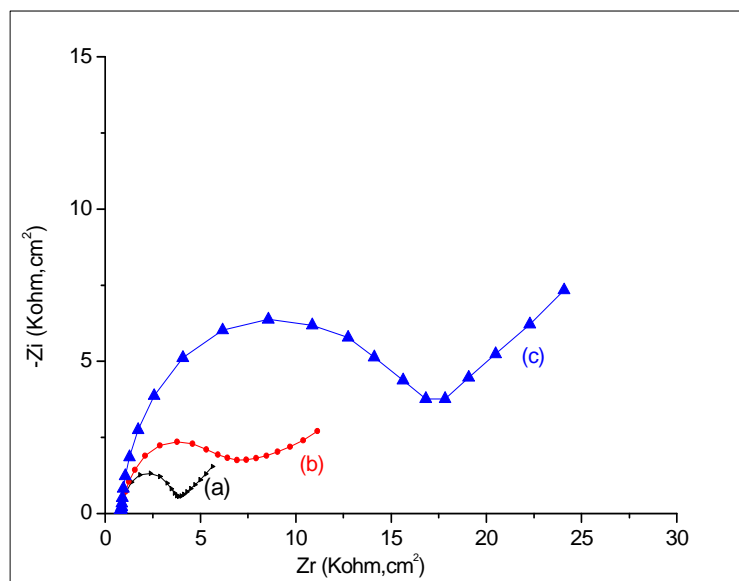


Figure IV.5 : Diagrammes de Nyquist de l'électrode BDD nue (a) de la BDD modifiée par greffage électrochimique (b) et après dépôt de la membrane enzymatique (c) en présence de 8mM de $[Fe(CN_6)]^{3-/4-}$ dans une gamme de fréquence de 100 mHz – 100 kHz à 195 mV.

Le comportement électrique de ce système électrochimique et les modifications apportées à l'interface électrode/électrolyte, peuvent être représentés de façon analogue par un circuit électrique équivalent. Ce circuit équivalent est appliqué pour ajuster les données expérimentales et extraire les informations nécessaires sur les paramètres électriques traduisant la variation impédimétrique. Les spectres obtenus ont été modélisés par le circuit équivalent de Randles, qui est la combinaison d'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_w) représentant le phénomène de diffusion des espèces redox.

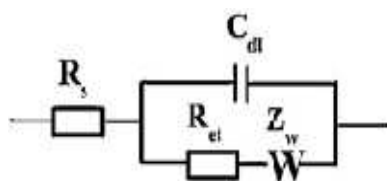


Figure IV.6: Circuit équivalent de Randles.

IV.3.2.3 Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM)

Les topographies de la surface de l'électrode BDD ont été observées par AFM en mode tapping dans une zone de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ de substrat. La figure IV.7 (a), (b) montre successivement

les images de la topologie de l'électrode BDD nue et modifiée avec le film diazonium-MWCNT-tyrosinase. La figure IV.7 (a) montre la structure micro-cristalline des électrodes BDD où la taille moyenne des cristaux est de l'ordre de 200 nm avec un facteur de rugosité de 5 nm. Après le dépôt de la membrane enzymatique (Figure IV.7 (b)), la surface de l'électrode modifiée est relativement lisse, ce qui indique la formation d'un film homogène et dense, recouvrant la structure micro-cristalline des électrodes BDD. La rugosité (RMS) obtenue est de l'ordre de 3 nm.

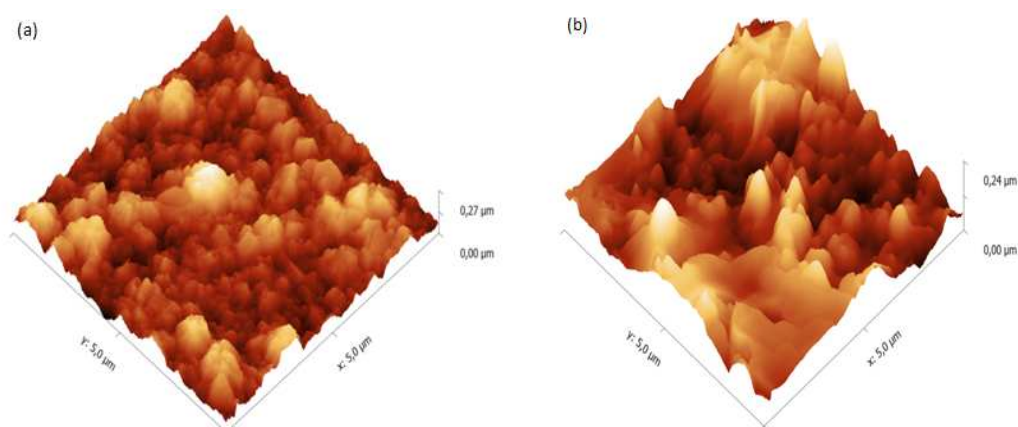


Figure IV.7: images AFM représente la morphologie de surface de l'électrode BDD nue (a) et après dépôt de la membrane enzymatique (b).

IV.3.3 Caractéristiques analytiques

IV.3.3.1 Gamme de linéarité, limite de détection et reproductibilité

Les voltammogrammes cycliques présentés sur la figure IV.8 montrent la réponse du biocapteur enzymatique obtenue après l'injection des différentes concentrations de BPA dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7.2. La concentration de BPA dans la solution peut être quantifiée par la mesure du signal électrochimique qui correspond à la réduction électrochimique des espèces d'O-quinone libérés à la surface de l'électrode BDD.

Nous avons observé une augmentation de courant de réduction lorsque la concentration de BPA augmente, avec un pic de réduction localisé à -1.1V ce qui est attribuée à la réduction électrochimique d'O-quinone issue de l'oxydation de catéchol par la tyrosinase.

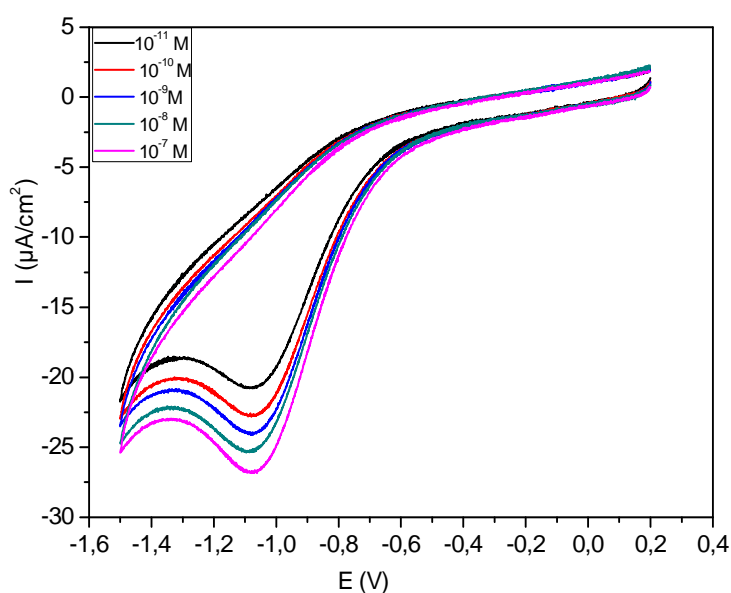


Figure IV.8 : Voltammogrammes cycliques obtenus après l'injection de BPA dans un PBS 10 mM, pH 7.2.

En portant la densité de courant (I) en fonction du logarithme de la concentration en BPA, on obtient la courbe de calibration. Comme le montre la figure IV.9, la réponse du biocapteur est linéaire entre 10^{-11} M et 10^{-7} M avec une très bonne sensibilité de $1.81 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ et une limite de détection de l'ordre de 10^{-11} M. Cette limite de détection est de loin beaucoup plus basse que les valeurs rapportés dans la littérature pour les autres biocapteurs basés sur la tyrosinase ou celles des capteurs chimiques (Tableau IV.1). On l'attribue à l'utilisation des MWCNTs, conférant un microenvironnement biocompatible pour l'enzyme et aux électrodes BDD, permettant un transfert d'électrons rapide, aussi, le protocole de préparation du biocapteur qui conserve l'activité catalytique de tyrosinase et par conséquent facilite la réaction enzymatique désirée.

La reproductibilité de la réponse du biocapteur développé a été testée sur quatre biocapteurs différents à trois niveaux de concentration dans la gamme de 10^{-11} - 10^{-7} M. Le coefficient de variation déterminé avec trois mesures est très bon, car il se situe entre 7.7 % et 9% dans l'intervalle de concentrations étudiées.

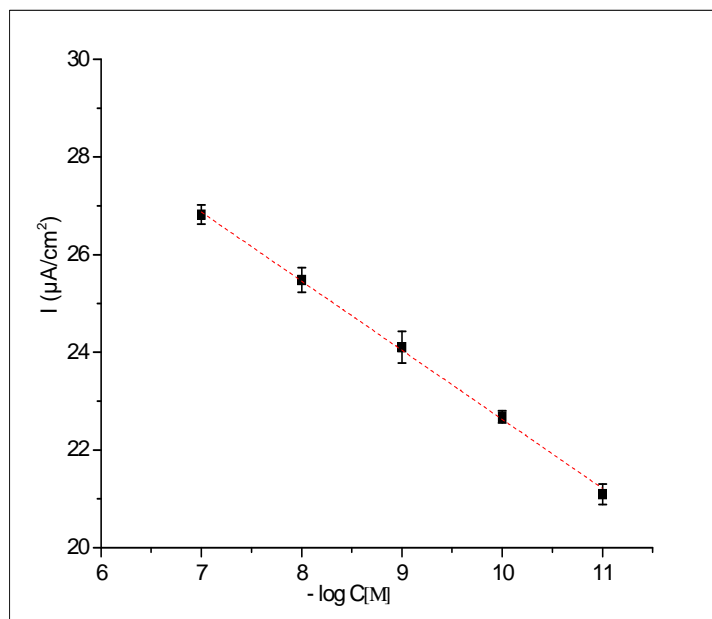


Figure IV.9 : Courbe de calibration de biocapteur enzymatique à BPA.

IV.3.3.2 Sélectivité et stabilité

Afin d'évaluer la sélectivité du biocapteur enzymatique, nous avons déterminé sa réponse vis-à-vis différentes substances potentiellement interférents tels que le 2-nitrophénol, 4-nitrophénol et le phénol et certains ions inorganiques (Ni^{+2} , Cd^{+2} , KNO_3 , Cu^{+2}). Nous avons trouvé qu'une concentration 20 fois plus élevée que celle de BPA (0.1 μM) du 2- nitrophénol, du 4-nitrophénol et des ions inorganiques n'affecte pas le signal du biocapteur, au contraire, l'interférence du phénol est significative, (signal égal à 75 % par rapport de celui du BPA).

La stabilité du biocapteur au stockage a été testée sur une période de 7 semaines, en conservant le capteur dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7.2 à 4 °C après chaque utilisation. L'évolution de la réponse du capteur en fonction du temps est présentée sur la figure IV.10 la réponse du biocapteur s'avère stable pendant une durée de 5 semaines, puis le signal diminue. Au bout de 49 jours, il reste néanmoins encore égal à 80 % du signal initial. Le biocapteur mis au point dans ce travail a une durée de vie plus longue que celles rapportées dans la littérature [15-25-42-47]. Cette grande stabilité du biocapteur développé est attribuée à la forte liaison de la tyrosinase avec l'électrode BDD ainsi qu'à la haute stabilité chimique et électrochimique du BDD.

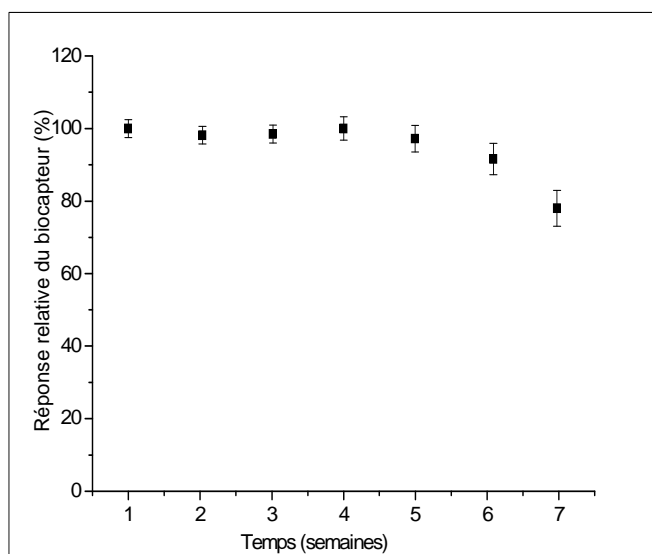


Figure IV.10 : Stabilité de stockage du biocapteur enzymatique, $[BPA] = 0.1 \mu M$ dans un PBS 10 mM, pH 7.2.

Tableau IV.1: Performances analytiques de quelques capteurs électrochimiques pour la détection de Bisphénol A.

Configuration de biocapteur	Gamme linéaire (M)	Limite de détection (M)	References
Tyr-diazonium-MWCNTs/ BDD	$1.10^{-11} - 1.10^{-7}$	10^{-11}	Ce travail
Tyr-poly (thionine)/ GCE	---	$2.3.10^{-5}$	[25]
Tyr-SWCNT/ CPE	$1.10^{-7} - 1.2.10^{-5}$	2.10^{-8}	[26]
Tyr/BDD	---	10^{-6}	[30]
CoPc-CPE	$8.75.10^{-8} - 1.25.10^{-5}$	1.10^{-8}	[40]
Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/GCE	$4.10^{-5} - 4.10^{-4}$	$2.2.10^{-5}$	[41]
Polyglutamic acid-MWCNT-NH ₂ / GCE	$1.10^{-7} - 1.10^{-5}$	2.10^{-8}	[42]
MWCNTs/ GCE	$1.10^{-8} - 1.10^{-5}$	5.10^{-9}	[43]
MWCNT-mélanine/GCE	$1.10^{-8} - 4.08.10^{-5}$	5.10^{-9}	[44]
Tyr-AuNPs/ SPCE	$4.2.10^{-8} - 3.6.10^{-5}$	1.10^{-8}	[45]
Tyr- NiNPs/ SPCE	$9.1.10^{-7} - 4.8.10^{-5}$	$7.1.10^{-9}$	[45]
Tyr- Fe ₃ O ₄ / SPCE	$2.2.10^{-8} - 4.0.10^{-5}$	$8.3.10^{-9}$	[45]
Titania-Nafion -MWCNT/ GCE	$1.10^{-8} - 5.10^{-6}$	9.10^{-10}	[44]

- **GCE :** Glassy carbon electrode (Electrode de carbone vitreux).
- **SPCE:** Screen- printed electrode (Electrode imprimée par écran).
- **SWCNT:** Single- walled carbon nanotube (nanotubes de carbone mono-feuillet)
- **CPE:** Carbon paste electrode (Electrode à pate de carbone).

IV.3.4 Détermination de BPA dans des échantillons d'eaux dopés

Le biocapteur a été utilisé pour la détermination du BPA dans des échantillons d'eaux réels (rivière la Chaudanne- Lyon), les échantillons sont filtrés, ensuite dopés avec différentes concentrations de BPA (dans la gamme linéaire de la courbe de calibration). Le tableau IV.2 résume les résultats obtenus. On peut constater que les résultats obtenus étaient en bon accord avec les valeurs théoriques, indiquant une bonne précision ce qui valide de le grand potentiel du biocapteur proposé pour la détection de BPA dans des échantillons d'eau naturels.

Tableau IV.2 : Analyse des échantillons d'eaux dopés avec BPA.

<i>Concentration Ajoutée</i> ($-\log C [M]$)	<i>Concentration trouvée</i> ($-\log C [M]$)	<i>Recouvrement</i> (%)
11	11.40	103.7
10	09.53	95.4
07	07.21	103.08

IV.4 Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons développé un biocapteur à base de tyrosinase pour la détermination du Bisphénol A dans un milieu aqueux. Ce biocapteur a permis une détection sensible et très stable de BPA avec une limite de détection très basse de 10^{-11} M. La méthode proposée pour l'élaboration de biocapteur qui consiste à la fonctionnalisation de la surface des électrodes BDD par le greffage électrochimique du sel de diazonium, ainsi qu'à l'utilisation des nanotubes de carbone pour l'immobilisation d'enzyme, a permis d'avoir des meilleures performances analytiques, en particulier en termes de la limite de détection et de stabilité. La réponse obtenue est linéaire dans le domaine de 10^{-11} - 10^{-7} M.

Le biocapteur a par ailleurs été appliqué avec succès à la détermination du BPA dans des échantillons d'eau réels, ce qui montre le grand potentiel de la méthode proposée pour des applications pratique dans le traitement des eaux.

Références

- [1] Podlipna. D, Cichna-Markl. M. Eur. Food. Res.Technol 2007, 224,629– 634.
- [2] Soto. A.M, Sonnenschein. C, Nat. Rev. Endocrinol 2010, 6, 363- 370.
- [3] Rubin. B.S, Steroid. Biochem. Mol. Biol 2011, 127, 27- 34.
- [4] Grain. DA, Eriksen. M, Iguchi.T, Jobling.S, Laufer. H, Le blanc. GA, Guillette.LJ, *Reprod. Toxicol* 2007, 24, 225-239.
- [5] Hideyuki. Y, Hajime. H, Hitoshi. N, Masatoshi. Y, *Anal. Chem. Acta* 2003, 488, 211-221.
- [6] Geens. T, Aerts. D, Berthot. C, Bourguignon. J, Goeyens. L, Lecomte. P, Maghuin-Rogister. G, Pironnet. A, Pussemier. L, Scippo. M, Loco. J.V, Covaci. A, *Food Chem. Toxicol* 2012, 50, 3725–3740.
- [7] Erler. C, Novak. J *Pediatr.Nurs* 2010, 25, 400- 407.
- [8] Rogers. J.A, Metz. L, Yong. V. W, *Mol. Immunol* 2013, 53, 421-430.
- [9] Deblonde. T, Cossu .C, Harteman. P, *Hyg. Environ. Health* 2011, 214, 442- 448.
- [10] Fan. J, Guo. H, Liu. G, Peng. P, *Anal. Chem. Acta* 2007, 585, 134- 138.
- [11] Wang. Q. X, Wang.Y.H, Liu. S.Y, Wang. L. H, Gao. F, Sun. W, *Thin. Solid. Films* 2012, 520, 4459- 4464.
- [12] Cabaton. N.J, Wadia. P.R, Rubin. B.S, Zalko. D, Schaeberle. C.M, Askenase. M.H, Gadbois. J.L, Tharp. A.P, Sonnenschein. C, Soto. A.M, *Environ. Health. Perspect* 2011, 119, 547-552.
- [13] Wolstenholme. J.T, Rissman. E.F, Connelly.J.J, *Horm. Behav* 2011, 59, 296- 305.
- [14] Tharp. A.P, Maffini. M.V, Hunt.P.A, VandeVoort. C.A, Sonnenschein.C, Soto. A.M, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012, 109, 8190–8195.
- [15] Yang. J, Kim. S.E, Cho. M, Yoo. I.K, Choe. W-S, Lee. Y, *Biosens. Bioelectron* 2014, 61, 38- 44.
- [16] Wu. L, Deng. D, Jin. J, Lu. X, Chen. J, *Biosens.Bioelectron* 2012, 35, 193-199.
- [17] Loi n° 2010-729 du 30 juin 2010 tendant à suspendre la commercialisation de biberons produits à base de bisphénol A (1), *Legifrance, JORF n°0150 du 1 juillet 2010, 11857. ELI:*
<http://legifrance.gouv.fr/eli/loi/2010/6/30/SASX1008554L/jo/texte>.
- [18] Gao. Y, Cao. Y, Yang. D, Luo. X, Tang.Y, Li. H, *Hazard. Mater* 2012, 199-200, 111- 188.
- [19] Wolstenholme. J.T, Edwards. M, Shetty. S. R, Gatewood. J. D, Taylor. J .A, Rissman. E, Connelly. J.J, *Endocrinol* 2012, 158, 3828 –3838.
- [20] *Journal officiel de l'Union européenne, Directive 2011/8/UE de la Commission du 28 janvier 2011.*
- [21] Ballesteros-Gómez. A, Rubio. S, Pérez-Bendito. D, *Chromatogr. A* 2009, 1216, 449- 469.

- [22] Lin. C. Y, Fuh. M.R, Huang. S.D, Sep. Sci 2011,34, 428–435.
- [23] Mohammad. R, Yadollah. Y, Shahab. S, Ali. E, Mojtaba. S, Chromatogr A 2009, 1216, 1511-1514.
- [24] Zhang. J, Cooke. J.M, Curran. I. H, Goodyer. C.G, Cao . X. L, Chromatogr B 2011, 879, 209-214.
- [25] Dempsey. E, Diamond. D, Collier. A, Biosens.Bioelectron 2004, 20, 367- 377.
- [26] Mita. D.G, Ettanasio. A, Arduini. F, Diano. N, Grano.V, Bencivenga. U, Rossi. S, Amine. A, Moscone. D, Biosens. Bioelectron 2007, 23, 60- 65.
- [27] Kang. B, Kim. J. H, Kim. S, Yoo. K. H., Appl. Phys. Lett 2011, 98, 103- 108.
- [28] Piao. M. H, Noh. H. B, Rahman. M. A, Won. M. S, Shim. Y. B, Electroanalysis 2008, 20, 30- 37.
- [29] Hahn. T, Tag. K, Riedel. K, Uhlig. S, Baronian. K, Gellissen. G, Kunze. G, Biosens. Bioelectron 2006, 21, 2078-2085.
- [30] Notsu. H, Tatsuma.T, Fujishima. A, Electroanal.Chem 2002, 523, 86- 92.
- [31] Yamamoto. Y, Imai. T, Tanabe. K, Tsuno. T, Kumazawa. Y, Fujimori. N, Diamond. Relat. Mater 1999, 6, 1057-1061.
- [32] Swain. G. M, Electrochem. Soc 1999, 141, 3382 -3393.
- [33] Andrade. L.S, Moraes. M.C, Rocha-Filho. R.C, Fatibello-Filho. O, Cass. Q.B, Anal. Chim. Acta 2009, 654, 127-135.
- [34] Granger. M.C, Witek. M, Xu. J.S, Wang. J, Hupert. M, Hanks. A, Koppang. M.D, Butler. J. E, Lucazeau. G, Swain. G.M, Anal. Chim. Acta 2000, 72, 3793-3801.
- [35] Chailapakul. O, Siangproh. W, Tryk. D.A, Sens. Lett 2006, 4, 2737-2748.
- [36] Yoshimura. M, Honda. K, Kondo. T, Uchikado. R, Einaga. Y, Rao. T. N, Tryk. D.A, Fujishima. A, Diamond. Relat. Mater 2002, 11, 67- 74.
- [37] Trouillon. R, O'Hare. D, Electrochim. Acta 2010, 55, 6586- 6595.
- [38] Zhou. Y, Zhi. J, Talanta 2009, 79, 1189- 1196.
- [39] Baranton. S, Bélanger. D, Phys. Chem. B 2005, 109, 24401- 24410.
- [40] Yin. H.S, Zhou.Y.L, Ai. S.Y, Electroanal. Chem 2009, 626, 80- 88.
- [41] Mazzotta. E, Malitesta. C, Margapoti. E, Anal. Bioanal. Chem 2013, 405, 3587- 3592.
- [42] Lin. Y, Liu. K, Liu. C, Yin. L, Kang. Q, Li. L, Li. B, Electrochim. Acta 2014, 133,492-500.

- [43] Li. J, Kuang. D, Feng. Y, Zhang. F, Liu. M, *Microchim. Acta* 2011, 172, 379-386.
- [44] Li.Y, Gao. Y, Cao. Y, Li. H, *Sens. Actuators. B* 2012 171- 172, 726- 733.
- [45] Alkasir. R.S.J, Ganesana. M, Won. Y.H, Stanciu. L, Andreescu.S, *Biosens. Bioelectron* 2010, 26, 43- 49.
- [46] Kim. B.K, Kim. J.Y, Kim. D.H, Choi. H.N, Lee. W.Y, *Bull. Korean. Chem. Soc* 2013, 34, 1065-1069.
- [47] Yu. X, Chen.Y, Chang. L, Zhou. L, Tang. F, Wu. X, *Sens. Actuators. B* 2013, 186, 648-656.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au développement de biocapteurs enzymatiques pour la détection des polluants en milieu aqueux en utilisant trois types de transducteurs électrochimiques ainsi que différentes techniques électrochimique.

Nous avons, dans un premier temps, développé deux biocapteurs à base de lipase de *Candida Rugosa*, l'un conductimétrique et l'autre impédimétrique pour la détection des pesticides organophosphorés ; diazinon, parathion méthyle et paraoxon méthyle. Nous avons montré dans le biocapteur conductimétrique l'importance du contrôle et de la maîtrise des différentes étapes de fabrication des biocapteurs, en passant par la préparation de la solution enzymatique, sa conservation, le choix des conditions d'immobilisation, de conservation du biocapteur et de mesure. Tous ces paramètres jouent un rôle primordial sur les performances des outils analytiques développés, en particulier sur leur temps de réponse, leur sensibilité, leur reproductibilité, leur stabilité. Ce biocapteur a permis d'effectuer une détection directe des organophosphorés avec un temps de réponse très court (3 min) comparant aux méthodes classiques d'analyses mais aussi par rapport aux autres biocapteurs précédemment rapportés dans la littérature. Une application sur des échantillons réels a été réalisée avec succès.

Dans la partie suivante de ce chapitre, nous avons effectué une étude comparative entre deux types différents de lipase ; une source microbienne de *Candida Rugosa* et l'autre extraite du pancréas de porc (source animale). Nous avons montré que la lipase issue d'une source microbienne est plus active et plus performante pour une application biocapteur.

Dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur impédimétrique pour la détermination de l'activité de la phospholipase A₂ en se basant sur le signal électrochimique de la réaction enzymatique sur la lécithine. Deux types de PLA₂ ont été testés ; la première a été extraite de venin d'abeille et la deuxième de venin de serpent (*Cobra mossambica mossambica*). Les enzymes ont été immobilisées par réticulation dans une atmosphère saturée de glutaraldéhyde en présence des nanoparticules d'or pour l'amélioration de la conductivité électrique. Nous avons obtenu les meilleures performances analytiques en utilisant PLA₂ de venin de serpent avec laquelle on a pu avoir une limite de détection de l'ordre de 10⁻¹¹M avec une bonne sensibilité et reproductibilité.

Dans la dernière partie de travail, nous avons élaboré un biocapteur à base de tyrosinase pour une détection rapide de bisphénol A, en utilisant la technique de voltammétrie cyclique. Des électrodes en diamant dopé au bore (BDD) qui possèdent des propriétés remarquables et uniques ont été utilisées. Par ailleurs, afin d'augmenter l'activité catalytique et la stabilité de l'enzyme, nous nous avons adopté une autre méthode d'immobilisation qui consiste à la modification électrochimique des surface de BDD par le greffage du sel de diazonium avec l'utilisation des nanotubes de carbone multi-feuillets. Nous avons montré que l'ajout des nanotubes de carbone conduit à l'amélioration des performances analytiques des biocapteurs, en particulier sa limite de détection et sa stabilité. Ces caractéristiques sont meilleures que celles des biocapteurs déjà rapportés dans la littérature. Le biocapteur a enfin été appliqué avec succès à la quantification de BPA dans plusieurs échantillons d'eaux réels, ce qui démontre le bon fonctionnement du biocapteur de BPA proposé pour des applications dans le domaine de traitement des eaux.

Ce travail avait permis de travailler sur deux aspects importants pour améliorer les performances des biocapteurs : le mode d'immobilisation du biorécepteur (réticulation, liaison covalente, fonctionnalisation chimique et électrochimique du transducteur) et sur l'aspect transduction par l'utilisation de microélectrodes de types et géométries différents avec différentes techniques électrochimiques de transduction. Il faudra travailler encore avec les nanomatériaux comme les nanotubes de carbone, les nanoparticules d'or pour la conception des biocapteurs. Lors de ce travail on s'est intéressé plutôt au développement des outils d'analyse rapide, facile à mettre en œuvre, avec une bonne stabilité de stockage, destinés au contrôle environnemental en particulier pour le traitement des eaux. Une extension vers la sécurité a été menée en détectant l'activité de l'enzyme PLA₂ issue du venin de serpent, montrant ainsi l'amplitude des domaines d'application des biocapteurs.

Annexe

Annexe

Liste des publications et communications scientifiques

1. Publications et articles soumis

Nedjla Zehani, Rochdi Kherrat, Sergei V Dzyadevych, Nicole Jaffrezic- Renault. A microconductometric biosensor based on lipase extracted from *Candida Rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2015, DOI: 10.1080/03067319.2015.1036864.

Nedjla Zehani, Sergei V Dzyadevych, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic- Renault. Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases. Frontiers in Analytical Chemistry, 2014, Volume 2, DOI: 10.3389/fchem.2014.00044.

Nedjla Zehani, Philippe Fortgang, Mohamed Sadek Lachgar, Abdullatif Baraket, Madjid Arab, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic-Renault. Highly sensitive electrochemical biosensor for Bisphenol A detection based on diazonium- functionalized boron doped diamond modified with multi walled carbon nanotubes- tyrosinase hybrid film, soumise à Biosensors and Bioelectronics 2015.

2. Conférences nationaux et internationaux

Nedjla Zehani, Sergei V Dzyadevych, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic- Renault, Ultra sensitive conductometric biosensor for online measurements of organophosphate pesticides, Matériaux et applications aux dispositifs capteurs (MADICA), El Mahdia, 5-7 Novembre 2014.

Nedjla Zehani, Philippe Fortgang, Mohamed Sadek Lachgar, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic- Renault, Electrochemical biosensor based on tyrosinase modified boron doped diamond electrodes for the detection of bisphenol A. 2nd international conference on bioinspired and biobased chemistry & materials, Nice, 15-17 Octobre 2014.

Nedjla Zehani, Philippe Fortgang, Mohamed Sadek Lachgar, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic- Renault, Highly sensitive bisphenol A biosensor based on boron doped diamond electrodes. Journée de printemps de la société chimique de France, Chambéry 12 Juin 2014.

Nedjla Zehani, Philippe Fortgang, Mohamed Sadek Lachgar, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic-Renault, Detection of Bisphenol A in water by a new enzymatic biosensor based on diazonium-tyrosinase- carbon nanotube nanocomposite, Electrochemistry at the nanoscale from basic aspects to applications (Elecnano), Paris, 26-28 Mai 2014.

Nedjla Zehani, Sergei V Dzyadevych, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic- Renault, A novel conductometric biosensor for the detection of diazinon based on lipase from *Candida Rugosa* enzyme, 6th black sea basin conference on analytical chemistry, Trabzon, 10-14 Septembre 2013.

Nedjla Zehani, Rochdi Kherrat, Nicole Jaffrezic-Renault, Elaboration d'un biocapteur enzymatique pour la détection des pesticides organophosphorés, Matériaux et applications aux dispositifs capteurs (MADICA), Sousse, 7-9 Novembre 2012.