

UNIVERSITE DE MONASTIR
FACULTE DES SCIENCES DE
MONASTIR

& ECOLE CENTRALE DE
LYON



Thèse en Co-tutelle

Présentée devant

La Faculté des Sciences de Monastir

Pour obtenir le grade de

Docteur de la Faculté des Sciences de Monastir et de l'Ecole Centrale de Lyon

*Spécialité : **Chimie***

Présentée et soutenue publiquement le 01 Novembre 2006

Par

Houcine BARHOUMI

Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale

Devant la commission d'examen :

Président	<i>Mr. Moncef Msaddek</i>	<i>Pr. à la Faculté des Sciences de Monastir</i>
Rapporteurs	<i>Mr. Joël Davenas</i>	<i>Directeur de recherche CNRS</i>
	<i>Mr. Taoufik Boubaker</i>	<i>M.C. à la Faculté des Sciences de Monastir</i>
Examineurs	<i>Mr. Mohamed Baker Rammah</i>	<i>Pr. à la Faculté des Sciences de Monastir</i>
	<i>Mr. Claude Martelet</i>	<i>Pr. à l'Ecole Centrale de Lyon</i>
	<i>Mme. Nicole Jaffrezic-Renault</i>	<i>Directrice de recherche CNRS</i>

Je dédie ce travail

À la mémoire de mon grand Père Mohamed

À mes parents

À mes frères et mes sœurs

À tous ceux qui me sont chers

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.

Albert Einstein

Remerciements

L'auteur du présent manuscrit a bénéficié du soutien financier du programme CMCU (Comité Mixte franco-tunisienne pour la Coopération Universitaire) et MIRA (Mobilité Internationale en Rhône-Alpes).

Que ces organismes soient remerciés.

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire de Physique et Chimie des Interfaces (**LPCI**) de la Faculté des Sciences de Monastir et le laboratoire "**CEGELY**" de l'Ecole Centrale de Lyon.

Mes premiers remerciements s'adressent conjointement et tout naturellement aux directeurs de ces laboratoires, Monsieur **Hafedh Ben OUADA** Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir et Madame **Nicole JAFFREZIC-RENAULT** Directrice de recherche CNRS pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes. Je leur suis également reconnaissant pour leurs disponibilités et leurs qualités humaines qui m'ont permises de travailler dans les meilleures conditions.

Les mots ne suffiraient pas pour exprimer toute ma reconnaissance envers Monsieur **Claude MARTELET** Professeur à l'Ecole Centrale de Lyon et Monsieur **Mohamed Baker RAMMAH** Professeur à la Faculté des Sciences de Monastir d'avoir accepté d'être les directeurs de ma thèse et pour la qualité de leurs encadrements, leurs compétences, leurs conseils, leurs disponibilités et leurs qualités humaines qui m'ont permises de mener à bien cette thèse.

J'exprime ma grande gratitude à Monsieur **Abderazzak MAAREF** Maître assistant à la Faculté des Sciences de Monastir pour avoir encadré mon travail depuis le DEA et accepté d'être mon co-encadreur pendant ces années de thèse. C'est grâce à lui que je me suis lancé dans le domaine des capteurs physicochimiques. La liberté qu'il m'a accordée et les responsabilités qu'il m'a confiées m'ont permis d'atteindre une maturité professionnelle que je n'aurais pas imaginée auparavant.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **Moncef MSADDEK** Professeur à la faculté des Sciences de Monastir pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté d'être examinateur et de présider le jury de cette thèse.

Je suis très reconnaissant envers Monsieur **Jöel DAVENAS** Directeur de recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon 1 et Monsieur **Taoufik BOUBAKER** Maître de Conférence à la Faculté des Sciences de Monastir pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Leurs commentaires et leurs questions m'ont permis de clarifier ma rédaction et m'ont donné de nouvelles pistes de réflexion.

Mes remerciements vont également à Monsieur **Serge COSNIER** et Madame **Christine MOUSTY** directeurs CNRS de m'avoir permis d'effectuer des stages au sein du laboratoire d'Electrochimie Organique et de Photochimie Redox de l'Université Joseph Fourier de Grenoble, ainsi que l'ensemble du service de m'avoir accueilli. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à Madame **Isabelle RICO-LATTES** directrice de recherche CNRS au laboratoire des " interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique " (IMRCP), CNRS-Université Toulouse 3 et Monsieur le Professeur **Claude FORANO** du laboratoire des matériaux inorganiques de l'Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand pour leur collaboration fructueuse et d'avoir mis à ma disposition les matériaux polymères et inorganiques pour réaliser une grande partie de ce travail.

Un grand merci à tous les doctorants et les docteurs que j'ai côtoyés durant cette thèse pour l'apport de la bonne humeur et pour leur encouragement : Sami Lakdhar, Chaker TLILI et Saloua CHELLY (Tunisie), Massaoud BENOUNIS (Algérie), Yanxia HOU (Chine), Rita EMIRKHANIAN (Libanon).

Je ne terminerai pas mes remerciements sans avoir une pensée sympathique pour tous les chercheurs du LPCI, qui savent si bien rendre agréable le cadre de travail.

Merci enfin à toute ma famille, à tous mes amis des départements de chimie et de physique. Que ceux ou celles que j'ai pu momentanément oublier aujourd'hui, veuillent bien me pardonner. Ils me reviendront nécessairement à ma mémoire et me feront regretter mon ingratitude momentanée.

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
ADN	Acide désoxyribonucléique
ISFET	Ion sensitive filed effect transistor
EIS	Electrolyte isolant semiconducteur
P	Produit
E	Enzyme
S	Substrat
ES	Complexe enzyme-substrat
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_m	Potentiel maximal
E_a	Energie d'activation
R	Constante des gaz parfaits
T	Température absolue
ECS	Electrode au calomel saturé
KD	Kilo Dalton
V_{FB}	potentiel de bande plate
W_{sc}	Travail de sortie du semi-conducteur
$(W_S)_{réf}$	Travail de sortie de l'électrode de référence
$E_F (réf)$	Niveau de Fermi de l'électrode de référence
E_C	Energie de bande de conduction
E_V	Energie de bande de valence
E_{Fsc}	Niveau de Fermi du semiconducteur
E_{vide}	Energie du vide
E_{iF}	Niveau de Fermi intrinsèque du semiconducteur
Ψ_0	Potentiel de surface
PEH	Plan externe de Helmholtz
ξ	Potentiel zêta
V	Polarisation continue
q	Charge élémentaire
N	Dopage du semi-conducteur
ϵ_{sc}	Permittivité relative du semi-conducteur
ϵ_0	Permittivité relative du vide.

Liste des abréviations

C_i	Capacité de l'isolant
C_T	Capacité totale de la structure EIS
C_{cs}	Capacité de la couche sensible
C_a	Capacité de la couche adsorbée
γ_{LG}	Tension superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide
γ_{SG}	Tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur
γ_{SL}	Energie libre inter faciale entre le solide et le liquide
Θ	Angle de contact
Π_{SV}	Pression d'étalement du liquide sur le solide
W_{SL}	Travail d'adhésion entre le solide et le liquide
γ^d	Composante due à la dispersion
γ^i	Composante due aux interactions dipôle - dipôle induites
γ^p	Composante due aux interactions dipôle - dipôle
γ^{ad}	Composante due aux liaisons hydrogène
γ^e	composante due aux interactions accepteur-donneur d'électrons
γ^h	Composante due aux interactions électrostatiques
γ^{ab}	Composante acido-basique de l'énergie de surface
γ^{lw}	Composante de Lifshitz van der Waals
γ^+	Composante acide de l'énergie de surface
γ^-	Composante basique de l'énergie de surface
pH_i	pH de charge nulle
BSA	Albumine de sérum bovin
TPPTS	Monophosphine trisulfonée
ENIS	Enzyme-isolant-semiconducteur
GA	Glutaraldéhyde
δ_m	Epaisseur du polymère
δ_d	Epaisseur de la couche limite de diffusion
K	Coefficient de partage
C_m	Concentration de l'espèce chimique dans le polymère
C_s	Concentration de l'espèce chimique dans la solution

Liste des abréviations

D_s	Coefficient de diffusion de l'espèce considérée dans la solution
P_s	Perméabilité de la solution
P_m	Perméabilité de la membrane
n	Nombre d'électrons échangés lors de la réaction d'oxydo réduction
F	Constante de Faraday
A	Surface active de l'électrode tournante
ν	Viscosité cinématique du solvant
ω	Vitesse angulaire
CV	Carbone vitreux
i_{lim}	Courant limite
NADH	Nicotinamide Adénine di-nucléotide
AFM	Microscopie à force atomique
RMS	Facteur de rugosité
GOD	Glucose oxydase
POD	Peroxydase
ODN	Oligonucléotides
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique

Sommaire

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre I

Les biocapteurs : Principe de base et généralités

I - Historique et définition des biocapteurs.....	4
I.1 - L'élément sensible du biocapteur (récepteur)	5
I.1.1 – Les enzymes	6
I.1.2 – Les anticorps	7
I.1.3 – L'ADN (acide désoxyribonucléique).....	8
I.1.4 – Les micro-organismes	9
I.2- L'élément physique du biocapteur (transducteur)	9
II- Principales méthodes d'immobilisation du biorécepteur	10
II.1- L'adsorption physique.....	12
II.2- L'entrapement physique	12
II.3- Couplage covalent	12
II.4- La réticulation	13
II.5- Langmuir-Boldgett (LB)	14
III- Sites actifs et mécanisme réactionnel.....	14
III.1- La cinétique enzymatique en phase homogène.....	15
III.2- La cinétique enzymatique en phase hétérogène.....	19
III.2.1- Effets de l'immobilisation sur les propriétés intrinsèques de l'enzyme	19
III.2.2- Phénomènes physiques liés à la présence d'une phase solide.....	20
III.2.3- Paramètre affectant la vitesse d'une réaction enzymatique	21
III.2.3.1- Concentration en enzyme.....	22

III.2.3.2- Concentration en substrat.....	22
III.2.3.3- Concentration en produit.....	22
III.2.3.4- Effet de la température	23
III.2.3.5- Effet de pH.....	24
III.2.4- Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique.....	25
IV- Différentes méthodes électrochimiques de détection	26
IV.1- Méthode ampérométrique	26
IV.2- Méthode potentiométrique.....	28
IV.3- Méthode voltamétrique	29
V- L'uréase et la structure ChemFEC	30
V.1- L'urease.....	30
V.1.1- Définition et caractéristiques	30
V.1.2- l'urée	32
V.2- L'évolution de l'état de l'art concernant les technique d'immobilisation de l'uréase	32
V.3- La structure ChemFEC ou EIS.....	37
V.3.1- Définition et principe de fonctionnement.....	37
V.3.2- Mesures capacitives et notion de potentiel de bande plate.....	38
V.3.3- Interface solide-liquide : théorie de la double couche	40
V.3.4 –Phénomènes de surface : adsorption physique	43
Conclusion	45
Bibliographie.....	47

Chapitre II

*Traitement chimique et caractérisations des surfaces par
la technique de mouillabilité*

Introduction	54
I- Propriétés énergétiques de surface	54
I.1- Effet du traitement chimique sur l'état de surface.....	56
I.2- Effet du nettoyage sur l'état de surface	57

I.3- Mesure de l'angle de contact sous atmosphère vide.....	58
I.3.1- Caractère hydrophile/hydrophobe	58
I.3.2- Energie de surface	59
I.4- Mesure de l'angle de contact sous atmosphère saturée en vapeur de solvant	62
I.5- Etude de la variation de l'angle de contact en fonction de pH	63
I.6- Mesure de l'hystérèse	65
I.6.1- Cas de nitrure de silicium	67
I.6. 2- Cas de l'oxyde de silicium.....	67
Conclusion	68
Bibliographie.....	69

Chapitre III

*Immobilisation de l'uréase dans des polymères latex
biodégradables : biocapteur d'urée*

Introduction	70
I- Présentation des matrices d'immobilisation	71
II- Substrat transducteur et technique de fonctionnalisation	73
II.1- Immobilisation de l'uréase à la surface de l'électrode Si/SiO ₂ /Si ₃ N ₄	73
II.2- Caractérisations électrochimiques.....	74
II.3- Choix de l'électrolyte support.....	77
II.4- Performances des différents biomembranes élaborées.....	77
II.4.1- Réticulation de l'uréase dans une matrice de BSA	78
II.4.2- Réticulation de l'uréase dans des polymères latex	81
II.4.3- Effet du contre ion sur l'interaction uréase-polymère.....	84
II.5- Mouillabilité des biomembranes: Effet de la réticulation au vapeurs de GA	85

II.6- Etude de la perméabilité des différentes biomembranes utilisées.....	87
II.6.1- Rappels sur les mesures de perméabilité.....	87
II.6.2- Détermination du courant limite de diffusion	89
II.7- Suivi du re-largage de l'uréase immobilisée par spectroscopie UV-visible.....	94
II.8- Détermination du paramètre cinétique, K_m	97
Conclusion.....	98
Bibliographie.....	100

Chapitre IV

Encapsulation de l'uréase dans un matériau synthétique Zn-Al hydroxyde doubles lamellaires : biocapteur d'urée

Introduction	103
I- Structure du matériau hydroxyde double lamellaire (HDL)	104
I.1- Différentes méthodes de synthèse du matériau HDL	105
I.1.1- Coprécipitation directe.....	105
I.1.2- Echange anionique	105
I.1.3- Reconstruction	105
I.2- Préparation du matériau hôte $Zn_3Al(OH)_8DS.nH_2O$	106
I.3- Intercalation de l'uréase dans le matériau HDL	106
I.3.1-Etape de reconstruction	107
I.3.2-Etape d'échange anionique	107
I.4- Caractérisation structural du matériau HDL par DRX et spectroscopie IR	107
II- Fonctionnalisation de la structure SiO_2/Si_3N_4 avec le matériau nanohybride ZnAl-uréase.....	111
II.1- Dépôt du matériau nanohybride ZnAl-uréase sur la structure SiO_2/Si_3N_4	111
II.2- Performances analytiques de la structure $SiO_2/Si_3N_4/ZnAl$ -uréase	111

II.3- Stabilité des biocapteur élaborés suivant les deux procédures d'immobilisation	115
II.4- Caractérisation de la structure SiO ₂ /Si ₃ N ₄ /ZnAl-uréase par spectroscopie d'impédance Z(Ω).....	117
II. 5- Modélisation des phénomènes d'interfaces.....	120
III- Etude des matrices ZnAl-uréase obtenue par coprécipitation	124
III.1- Préparation des matrices ZnAl-uréase	124
III.2- Caractérisations du matériau ZnAl-uréase obtenu par coprécipitation.....	124
III.2.1- Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	124
III. 2.2- Etude texturale des phases obtenues par coprécipitation	126
III.3- Etude de la perméabilité des phases obtenues par coprécipitation	127
III.4- Etude des biocapteurs d'urée à base des phases ZnAl-uréase obtenues par Coprécipitation	128
Conclusion	131
Bibliographie.....	133

Chapitre V

***Immobilisation de l'uréase dans le polypyrrole par
interaction avidine-biotine: biocapteur d'urée***

Introduction	136
I- Préparation du poly(pyrrole-biotine) par voie chimique	137
I.1- Mise en évidence de la réaction de polymérisation chimique	138
I.1.1- Eude par voltamétrie cyclique	138
I.1.2- Observation par microscopie à force atomique (AFM)	139
I. 2- Structure "sandwich " Si/SiO ₂ /Si ₃ N ₄ /Pyrrole-biotin/avidine/ biotine-uréase	140
I.2. 1- Complexe "avidine-biotine"	140
I.2. 2- Immobilisation de l'uréase par interaction "avidine-biotine"	141
I.2.3- Formation de la structure "sandwich"	142

I.2.4- Contrôle de la mouillabilité de l'électrode modifiée.....	143
II- Caractérisation de la structure "sandwich" par mesures capacitives.....	146
II.1- Effet de l'EDTA sur l'activité de l'uréase	147
II.2- Effet de la température sur l'activité de l'uréase.....	148
II.3- Suivre de l'interaction avidine-biotine par mesures capacitives.....	151
Conclusion	156
Bibliographie.....	157

Conclusion générale	160
----------------------------------	------------

Annexes	164
----------------------	------------

Introduction générale

Introduction générale

La détection ainsi que l'évaluation de l'activité d'une espèce chimique ou/et biochimique, présente dans les milieux biologiques ou dans l'environnement, nécessite de disposer des moyens d'analyses très performants et souvent coûteux. Une alternative consiste à concevoir des dispositifs possédant des caractéristiques équivalentes en termes de fiabilité, simplicité, rapidité, sélectivité ceci à un moindre coût. Parmi ceux-ci, les microsystèmes et capteurs, issus des techniques de la microélectronique permettent d'envisager des productions massives, pouvant ainsi constituer une alternative prometteuse.

Ainsi, ces dernières années ont vu l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs. Ces nouveaux moyens d'analyses ont connus un essor tout à fait remarquable grâce aux besoins de plus en plus pressants des différents secteurs touchant à la chimie et à la biochimie (environnement, alimentation, pharmacie, sécurité domestique et industrielle, diagnostic médical...). De manière générale, la conception d'un biocapteur se base sur l'association d'une macromolécule biologique faisant office de récepteur à un transducteur physique. Les propriétés de reconnaissance moléculaire de la biomolécule choisie confèrent une sélectivité à l'interaction biomolécule-analyte cible. Cette interaction est, grâce au transducteur, à l'origine d'un signal électrique, optique ou autre, facilement mesurable, qui après traitement peut être directement corrélé à la concentration de l'analyte cible.

Cependant, malgré une très forte demande et l'intense activité de recherche, très peu de réalisations commerciales ont vu le jour. La difficulté majeure, qui freine le développement industriel de ces biocapteurs, est liée aux problèmes de dénaturation et de stabilité de la molécule biologique fixée sur la surface du transducteur au cours de l'étape de fonctionnalisation. 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 de la molécule de reconnaissance sans que sa spécificité en soit altérée par la sévérité des contraintes de la fonctionnalisation.

En général, trois types de molécules biospécifiques peuvent jouer le rôle de récepteur, donnant naissance respectivement à des capteurs enzymatiques, immunocapteurs et biopuces: les enzymes, les immunoespèces (anticorps, antigène) et les acides nucléiques (ADN). Dans

Introduction générale

le cas du capteur enzymatique la mesure de l'analyse s'effectue par l'intermédiaire de la détection d'un produit de la réaction chimique catalysée par l'enzyme. Le principe de détection des capteurs immunologiques (immunocapteurs) repose sur les modifications physico-chimiques de la couche sensible, induites par la formation des complexes immuns. En outre, le principe de fonctionnement des biopuces est basé sur le phénomène d'hybridation.

Notre travail de thèse porte sur le développement d'un capteur enzymatique à base d'uréase en vue de l'analyse d'urée, cette dernière ayant un grand intérêt biologique. L'augmentation de son taux dans le sang est généralement liée à une altération rénale. On s'est intéressé à l'optimisation de nouvelles matrices organiques et inorganiques pour l'immobilisation de l'uréase dans l'optique de la réalisation d'un biocapteur sensible à l'urée et de haute performance tant de point de vue sensibilité que stabilité. Notre travail est subdivisé en cinq chapitres :

Le premier chapitre est constitué d'une revue bibliographique donnant une présentation générale des biocapteurs. Cette étude bibliographique décrit brièvement les différentes composantes impliquées dans la construction des biocapteurs, ainsi que les principaux mécanismes liés à leur fonctionnement. L'aspect enzymatique ainsi que les différentes matrices utilisées pour l'immobilisation de l'uréase au cours de ces dernières années sont également présentés.

Le deuxième chapitre est consacré aux traitements chimiques et à l'étude par les techniques de mouillage des surfaces d'oxyde de silicium et de nitrure de silicium, dans le but d'optimiser un protocole de nettoyage. En effet, ce dernier constitue une étape clé dans l'élaboration d'un biocapteur.

On décrira dans le troisième chapitre l'utilisation de nouvelles matrices de type polymères latex biodégradables pour l'immobilisation de l'uréase en présence d'un agent de réticulation: le glutaraldéhyde. Ces matrices contenant l'enzyme sont déposées sur un transducteur isolant-semiconducteur (IS) $\text{Si/SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ en vue de l'obtention d'un biocapteur d'urée. La sensibilité

Introduction générale

des biocapteurs développés vis-à-vis de l'urée est évaluée par mesure électrochimiques C(V). L'activité de l'enzyme immobilisée a été testée par spectroscopie UV-visible suivant la méthode de Worthington: oxydation du NADH par la glutamate déshydrogénase en présence d'ion NH_4^+ généré par l'hydrolyse de l'urée au niveau du site actif de l'uréase. Deux méthodes de caractérisations ont été utilisées sur différentes matrices uréase/polymère : voltamétrie à balayage linéaire et technique de mouillage. La première méthode permet de caractériser la perméabilité de la couche sensible vis-à-vis du substrat (urée) et la seconde permet d'évaluer l'effet de la réticulation sur la mouillabilité des différents composites uréase-polymères déposés sur la surface de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄.

Le quatrième chapitre est consacré à la description et l'immobilisation de l'uréase dans un matériau inorganique HDL (hydroxydes doubles lamellaires) de type Zn-Al-X (X = Cl⁻ ou DS (dodecyl sulfate)). Le matériau nanohybride HDL-uréase est obtenu soit par échange directe, adsorption physique ou par coprécipitation. Ceci dans le but d'obtenir un système d'intercalation bio-inorganique donnant naissance à des biomembranes présentant à la fois une sensibilité et une stabilité améliorées. Avant de transférer ces composites HDL/uréase pour la réalisation d'un biocapteur à urée, des mesures de perméabilité et spectroscopiques (UV-Visible, FTIR et DRX) ont été effectuées dans le but de contrôler l'activité de l'enzyme et d'évaluer la structure du matériau HDL modifié. Des mesures de capacité-potential et d'impédance Z(w) ont permis l'évaluation du fonctionnement du biocapteur sensible à l'urée.

Enfin, le dernier chapitre porte sur l'immobilisation de l'uréase selon un nouveau procédé basé sur l'interaction spécifique non covalente "avidine-biotine". La matrice d'immobilisation est formée par le polypyrrole biotinylé obtenu par polymérisation chimique sur la surface de l'électrode isolante IS. L'homogénéité de la couche polymérisée a été observée par AFM (microscopie à force atomique). L'uréase biotinylée est ensuite fixée à la surface du biopolymère poly(pyrrole-biotine) par pontage à l'aide de molécules d'avidine. La sensibilité du système "sandwich" polypyrrole-biotin/avidine/biotine-uréase construit sur la surface de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄ vis-à-vis de l'urée est évaluée par mesures capacitatives C (V).

Chapitre I

***Les biocapteurs: Principe de
base et généralités***

Chapitre I

Les biocapteurs: Principe de base et généralités

I- Historique et définition des biocapteurs

L'histoire des capteurs chimiques, parmi lesquels les biocapteurs, représente un sous groupe très connu, qui débute en 1960 suite aux premiers travaux réalisés par Clark et Lyon pour la détection du glucose [1]. Ces études ont été approfondies vers 1967 suite à la naissance du premier biocapteur réalisé par Updicke et Hicks [2]. Ce biocapteur est une électrode à enzyme pour le dosage du glucose basée sur l'immobilisation de la glucose-oxydase dans un gel de polyamide. A la naissance du premier capteur biologique, la réalisation de ces dispositifs était simple et basée sur l'immobilisation physique de l'enzyme soluble à la surface d'un transducteur électrochimique. Quelques années plus tard, ces systèmes sont devenus de plus en plus complexes suite au couplage direct de l'enzyme avec le transducteur ce qui peut réduire partiellement ou totalement son activité biologique. Pour cette raison, il était important de mettre au point des méthodes d'immobilisation de l'enzyme qui perturbent le moins possible ses propriétés catalytiques. Avant d'aller plus loin il semble nécessaire de poser la question clé:

Qu'est ce qu'un biocapteur ?

Plusieurs définitions et terminologies ont été utilisées pour définir un biocapteur [3,4] ; de façon générale, un biocapteur biochimique ou capteur biologique est un dispositif analytique qui se situe à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Les composantes essentielles du biocapteur incluent un élément de reconnaissance moléculaire

qui constitue le biorécepteur et une composante physique qui constitue ce qu'on appelle le transducteur. L'élément sensible est constitué par un matériau biologique chargé de reconnaître sélectivement l'espèce spécifique qu'on désire analyser (analyte). En outre, plusieurs entités biologiques sont susceptibles d'être employées telles que les enzymes, les anticorps, les antigènes, les cellules, les tissus, l'ADN..... . En général, le transducteur joue le rôle d'un traducteur en convertissant les interactions ou les reconnaissances physico-chimiques entre le biorécepteur et la substance cible en un signal électrique, optique ou chimique (Figure I-1).

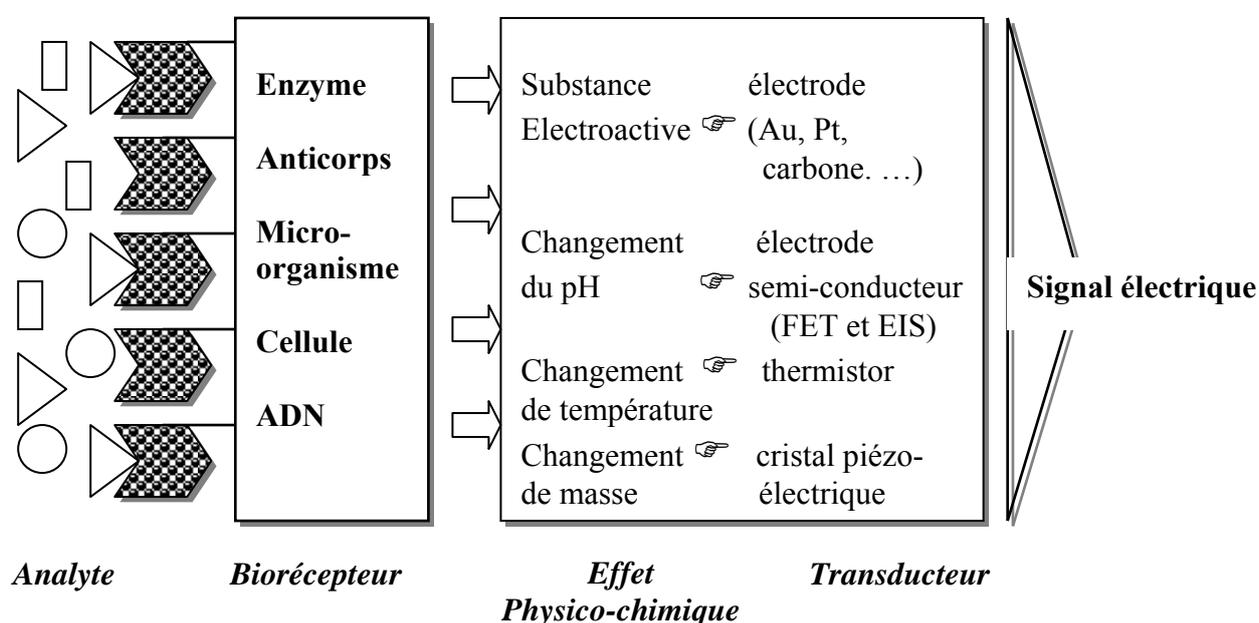


Figure I-1 : Principe de fonctionnement des biocapteurs.

I.1 - L'élément sensible du biocapteur (récepteur)

L'élément sensible ou biorécepteur constitue l'élément clé dans la conception d'un biocapteur. Plusieurs entités biologiques ont été testées pour l'élaboration d'une grande variété de capteurs biologiques. Parmi ces capteurs, on rencontre les capteurs enzymatiques, les capteurs immunologiques, les capteurs cellulaires et les capteurs ADN ou biopuces qui sont respectivement, à base d'enzymes, d'anticorps ou d'antigènes, de cellules et d'ADN (acide désoxyribonucléique). Il est aussi important de présenter les principales classes de biomolécules utilisées comme récepteurs pour la réalisation de biocapteurs.

I.1.1 – Les enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires composées d'un nombre élevé d'acides aminés. Elles jouent un rôle très important dans la catalyse des réactions se déroulant au sein des cellules [5,6]. Leurs propriétés fondamentales et leurs spécificités les rendent bien adaptées à la conception de biocapteurs sélectifs. Les enzymes sont capables d'augmenter la vitesse d'une réaction jusqu'à dix millions de fois sans être consommées ou altérer les produits finaux de la réaction [7,8]. Il existe plusieurs types d'enzymes regroupées selon le type de la réaction de catalyse. On distingue six groupes d'enzymes [9]:

1- Les oxydoréductases : Ce sont des enzymes qui transfèrent des électrons, seuls ou accompagnés de protons d'un donneur à un accepteur. Ce dernier peut être de l'oxygène. Dans ce groupe, on différencie trois catégories:

- les oxydases: elles oxydent le substrat à l'aide de l'oxygène de l'air ;
- les peroxydases: elles oxydent les substrats aux dépens des peroxydes, de sorte qu'il ne se dégage jamais d'oxygène dans ces réactions ;
- les déshydrogénases: elles détachent l'hydrogène du substrat (donneur) et peuvent le transférer à diverses molécules qui jouent le rôle d'accepteurs comme l'oxygène par exemple.

2- Les hydrolases : Ces enzymes interviennent dans les réactions d'hydrolyses et elles scindent divers composés. On distingue : les protéases, les carbohydrases, les estérases.

3- Les transférases : Ce sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe d'une molécule à une autre. Le groupe transféré peut être très variable: carboxyle, méthyle, amine, groupement phosphoré...

4- Les isomérases : Ces enzymes sont impliquées dans la catalyse des réarrangements intramoléculaires qui peuvent concerner une stéréoisomérisation (forme cis transformée en trans), aussi bien qu'une conversion d'un aldéhyde en cétone.

5- Les lyases : Ces enzymes catalysent la formation d'une double liaison sur un substrat en déplaçant un groupe chimique. La double liaison peut s'établir entre deux atomes

de carbone ou un atome de carbone et un atome différent (oxygène, azote, soufre ou halogène).

6- Les ligases : Ce type d'enzymes est impliqué dans la catalyse des réactions de synthèse, en utilisant les nucléosides phosphatases riches en énergie, ce qui s'accompagne de la formation d'une liaison entre deux atomes de carbone ou un atome de carbone et un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote. La [figure I-2](#) montre la structure tertiaire d'une protéine.

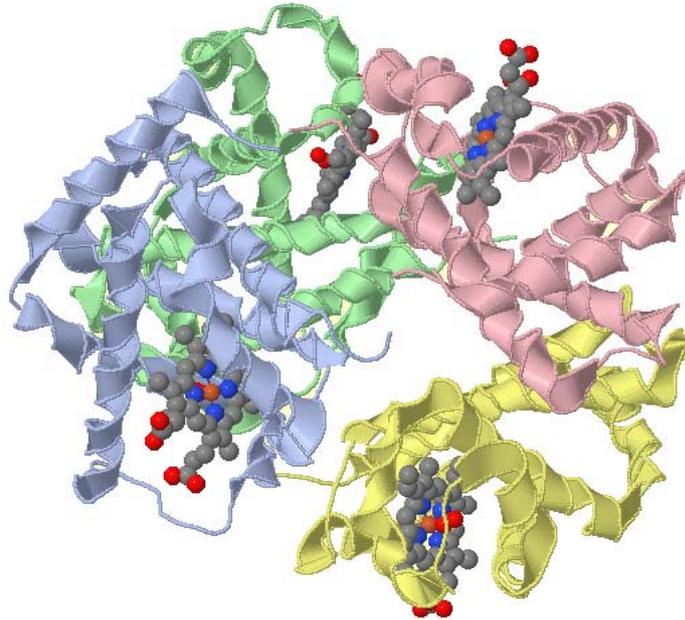


Figure I-2 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine [10].

Il faut souligner que seules les enzymes provoquant des réactions détectables sur un transducteur seront utilisables pour la conception d'un biocapteur.

I.1.2 – Les anticorps :

Les anticorps comptent également parmi les biorécepteurs utilisés pour la conception d'un biocapteur. Ces anticorps ou immunoglobulines sont des protéines qui possèdent des sites capables de reconnaître spécifiquement une substance cible, qui constitue l'antigène correspondant. A l'inverse de la biocatalyse, le couplage immunologique n'implique pas de produits de réaction ou de consommation de substrat. La détection actuelle des anticorps est basée sur des méthodes de marquage permettant de suivre l'interaction anticorps-antigène.

Les biocapteurs utilisant l'anticorps comme biorécepteur suscitent un grand intérêt quant à la détection immunologique directe, c'est à dire sans molécules marquées. La mise au

point d'une méthode d'interaction antigène-anticorps suppose que l'on puisse mesurer un signal physique induit par la formation du complexe immunitaire. Trois types de détection ont été utilisés : optique [11], piézoélectrique [12] et électrochimique [13]. Dans ce dernier cas, il a été montré la possibilité d'une détection immunologique directe et en temps réel grâce à des mesures d'impédances électrochimiques. La structure générale d'un anticorps est donnée sur la figure I-3.

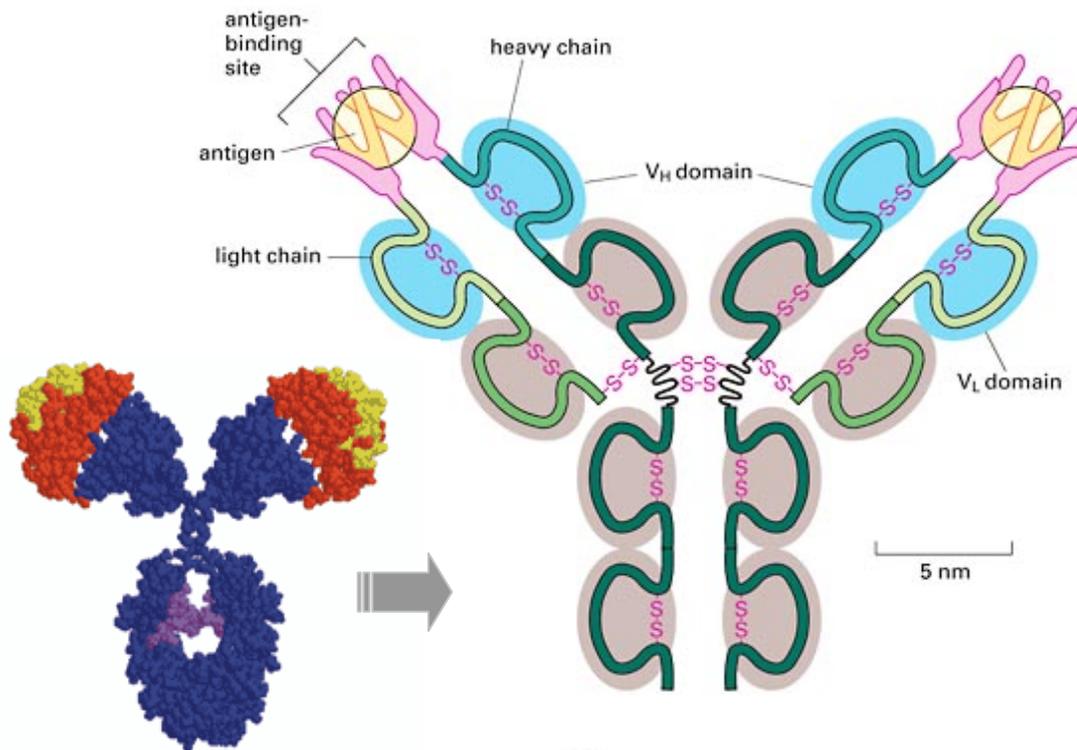


Figure I-3 : Structure schématique d'une molécule d'anticorps (IgG) [14].

I.1.3 – L'ADN (acide désoxyribonucléique)

L'ADN renferme l'information nécessaire pour la synthèse des protéines. En plus de son rôle comme biomolécule d'intérêt biologique, elle a suscité l'attention des chercheurs pour la mise au point de biocapteurs d'ADN servant à l'analyse in situ des gènes. Ces capteurs d'ADN ou biopuces (microréseau à base d'ADN) offrent une nouvelle technologie qui exploite l'appariement de deux oligonucléotides complémentaires et même la possibilité d'identifier la séquence d'un gène et de détecter des mutations génétiques. Ces biopuces à ADN ont bouleversé ce domaine en offrant aux chercheurs la possibilité de réaliser des milliers d'analyses génétiques en parallèle, que ce soit dans le domaine du diagnostic, du

génotypage, de la pharmacogénomique ou de l'analyse globale de l'expression des gènes [14]. La figure I-4 montre la structure 3D de l'ADN.



Figure I- 4 : Structure en double hélice de l'ADN.

I.1.4 – Les microorganismes

L'utilisation de microorganismes ou de cellules entières pour la conception de biocapteurs est parfois envisagée. Pour remédier aux problèmes posés par les enzymes, la solution est d'utiliser directement le tissu ou le microorganisme contenant l'enzyme dans un environnement déjà optimisé par la nature. La stabilité et l'activité de ces enzymes dans la cellule sont plus grandes que celle des enzymes purifiées.

I.2- L'élément physique du biocapteur (transducteur)

Plusieurs types de transducteurs ont été proposés pour l'élaboration de biocapteurs. Parmi les transducteurs les plus fréquemment utilisés, on peut citer le FET (Field Effect Transistor) [16,17], les structures IS (Isolant-Semiconducteur) [18-21], les électrodes métalliques notamment l'or [22,23], le platine [24-26], l'argent [27,28], le carbone vitreux [29,30], les fibres optiques [31,32] et les électrodes interdigitées [33-36].

Comme nous avons signalé auparavant, le transducteur va assurer la transduction du signal émis par le biorécepteur en contact de la substance cible. Cependant, suivant le type de la réaction et les substances libérées ou consommées, on choisira le transducteur approprié.

Dans le [tableau I-1](#) nous présentons le lien entre reconnaissance biologique et mode de transduction.

Tableau I-1 : Relation entre reconnaissance biologique et mode de transduction

Espèce de reconnaissance	Effet de la reconnaissance	Mode de transduction	Transducteur
Système enzymatique	Modification de la concentration	Ampérométrie	Electrodes ampérométriques
		Potentiométrie	Electrodes potentiométriques
	Modification du potentiel redox	Potentiométrie	Electrodes potentiométriques ISFET
	Modification de la conductivité	Conductimétrie	Cellule conductimétrique
	Chaleur de réaction	Thermométrie	Thermistor, thermocouple
Immunoespèces	Modification optique	Biocapteurs optiques	Fibre optique Interféromètre
	Modification de masse	Biocapteurs Piézoélectriques	Microbalance à quartz Onde acoustique de surface (SAW)
	Modification des propriétés électriques	Immunocapteurs Capacitifs et impédimétriques	Electrodes métalliques Hétérostructures de type Si/SiO ₂ , Si/SiO ₂ /Si ₃ N ₄ ,.....

II- Principales méthodes d'immobilisation du biorécepteur

Dans la construction d'un biocapteur, l'immobilisation du biorécepteur sur la surface du transducteur est une étape cruciale. En effet, le but principal est de fixer l'élément biologique à la surface de l'électrode permettant de ce fait, une utilisation à long terme de l'enzyme tout en maintenant son activité biologique [37]. D'ailleurs, dans le cas de la fixation des enzymes, plusieurs conditions doivent être respectées telles que :

- l'activité de l'enzyme doit être maintenue ;
- le substrat doit pouvoir pénétrer facilement dans la couche pour accéder à l'emplacement actif de l'enzyme ;
- le transfert de masse du substrat et des molécules de produit par la couche immobilisée ne doit pas être gêné.

Les techniques d'immobilisation peuvent être divisées en six classes principales [38], à savoir l'adsorption physique, l'inclusion, le confinement, le couplage covalent, la réticulation et la technique Langmuir-Boldgett comme le montre la figure I-5.

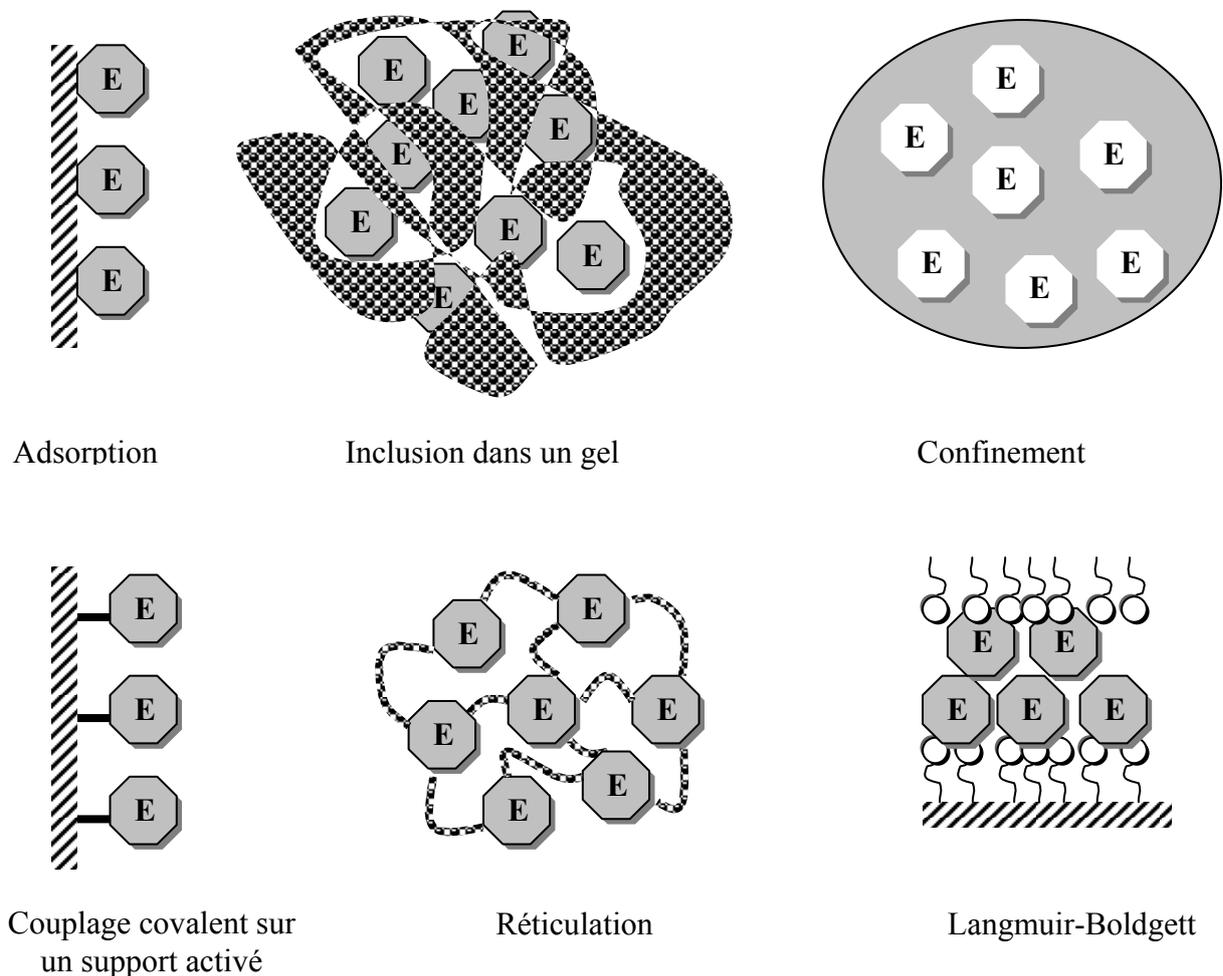


Figure I-5 : Méthodes d'immobilisation d'une enzyme.

II.1- L'adsorption physique

La fixation des biomolécules par adsorption physique est la méthode la plus simple. Au début, cette méthode d'immobilisation a été largement employée pour fixer une molécule à la surface solide [39-41]. L'adhésion de l'entité biologique à la surface du transducteur est basée sur des interactions électrostatiques multiples : électrostatique pur, hydrophobe, van-der-Waals ou des liaisons hydrogènes. En revanche, les inconvénients potentiels de cette méthode d'immobilisation sont liés au changement de conformation de la biomolécule et sa dénaturation qui est due au processus d'adsorption. En outre, la désorption peut se produire en raison des changements de pH, de la force ionique et de la température.

II.2- L'inclusion physique

Cette technique consiste à incorporer la biomolécule dans un gel organique (polymère) ou inorganique (argile) [42], un polymère (conducteur ou non conducteur) ou derrière une membrane semi-perméable [43]. Les pores du réseau polymère doivent être assez grands pour permettre la diffusion libre des substrats et des produits mais à condition de maintenir l'enzyme dans le réseau. Les polymères conducteurs peuvent être électriquement conducteurs (le polypyrrole, le polyaniline,...), conducteurs redox (hydrogel, nafion modifié,...) ou des polymères non conducteurs. Par inclusion, la biomolécule se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques ou inorganiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de la biomolécule grâce à une porosité suffisante du gel. Cette technique est cependant limitée par la taille des pores du gel favorisant ainsi le relargage des biomolécules de faible poids moléculaire. Dans cette méthode, l'activité de la biomolécule dépend du microenvironnement local de l'entité biologique immobilisée (pH, force ionique, problèmes de diffusion).

II.3- Couplage covalent

Le couplage covalent conduit à des liaisons fortes entre la biomolécule et la surface du transducteur. En effet, cette technique d'immobilisation exige la présence de groupements fonctionnels sur la surface du transducteur. Ces groupements sont en général de type carboxylique (-COOH), amine (-NH₂), hydroxyle (-OH) ou thiol (-SH) et n'étant que peu

réactifs chimiquement, d'où la nécessité de les activer ou les traiter par des réactifs appropriés pour réagir dans des conditions douces avec les groupements fonctionnels de la biomolécule n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire. Les principaux agents activateurs sont les carbodiimides, le bromure de cyanogène, les sels de diazonium, les isocyanates, les thiols [44]. Cette technique d'immobilisation permet l'obtention de membranes monomoléculaires, des liaisons stables et des contraintes diffusionnelles limitées. Cependant, parmi les inconvénients du couplage covalent, on peut citer la nécessité d'une surface de transducteur facilement fonctionnalisable pour obtenir finalement un grand nombre de sites actifs.

II.4- La réticulation

La réticulation des biomolécules à la surface d'un support solide ou à d'autres biomolécules par l'utilisation d'un agent de réticulation augmente la stabilité du biocapteur. Parmi les agents polyfonctionnels, le glutaraldéhyde qui est le plus souvent utilisé sous sa forme liquide ou vapeur [45,46]. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amine des enzymes pour former des pontages covalents (cross-linking) "enzyme-enzyme". Cependant, on distingue deux modes de réticulation des biomolécules ; soit entre elles, soit en faisant intervenir d'autres protéines inactives. Le couplage enzyme-enzyme aboutit à des biocapteurs stables mais les biomolécules immobilisées de cette manière perdent une partie de leurs activités du fait de la rigidification de la structure tridimensionnelle. Pour remédier à ce problème, une nouvelle stratégie consiste à co-réticuler, par exemple, l'enzyme (E) avec une autre protéine inactive (P) telle que l'albumine. L'introduction de cette protéine améliore la répartition des masses des différentes protéines et permet une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. La [figure I-6](#) montre le principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde.

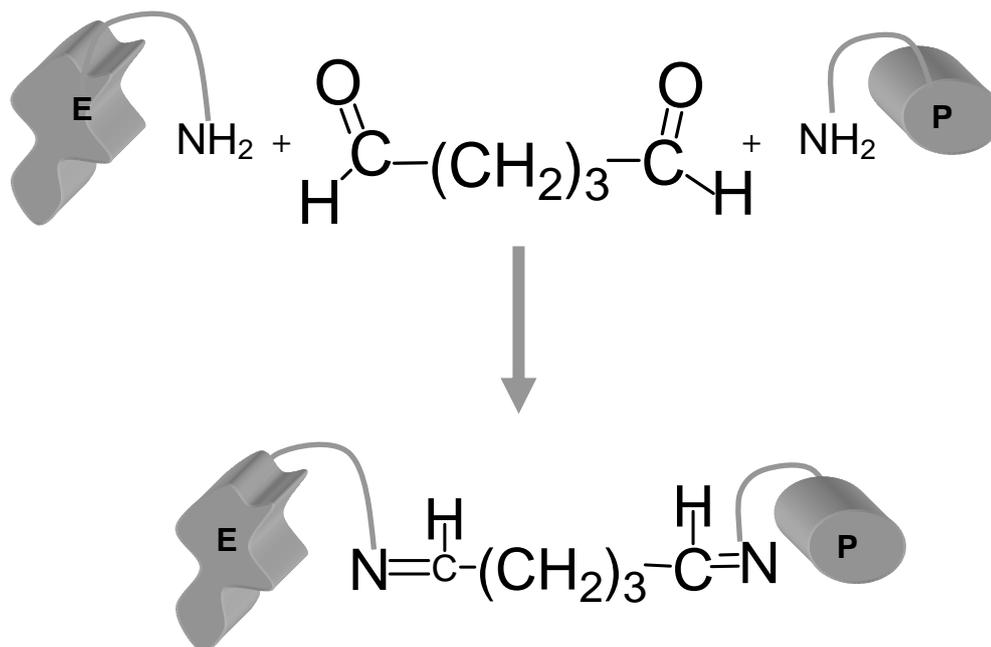


Figure I-6 : Le principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde.

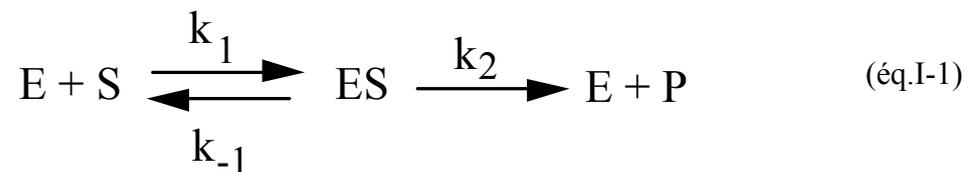
II.5- Langmuir-Boldgett (LB)

Cette technique consiste à emprisonner des molécules d'enzymes entre deux monocouches de composés amphiphiles (tensio-actifs) grâce à la force électrostatique. Les films sont constitués d'une à plusieurs monocouches assemblées en un arrangement ordonné de molécules amphiphiles (Figure I-5). Ces films ordonnés créent une matrice inerte dans laquelle, l'enzyme peut être immobilisée. Cette méthode est une technique douce pour l'immobilisation d'enzyme ; elle permet de contrôler les édifices moléculaires mais des problèmes de stabilité peuvent être constatés (durée de vie de seulement quelques jours) [47].

III- Sites actifs et mécanismes réactionnels

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 [48], 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 ES. Cette liaison chimique possède une durée de vie bien

déterminée; dès qu'elle se forme elle se casse rapidement pour donner naissance à un produit **P**. Ces événements se produisent à une vitesse de 10^3 à 10^6 fois/minute/molécules d'enzyme, lorsque cette dernière se trouve dans ses conditions optimales. Ces constatations dérivent de la théorie de Michaelis et Menten développée en 1913 qui tient compte de la modélisation de l'aspect cinétique enzymatique. Cette théorie se base sur une équation typique qui note la relation entre l'enzyme, le substrat, les produits et les intermédiaires [49]. En effet, Michaelis et Menten ont montré que la réaction catalytique passe par la formation d'un complexe enzyme-substrat (ES) dit complexe de Michaelis (équation I-1):



E, S, ES et P sont respectivement l'enzyme, son substrat, le produit intermédiaire et le produit de la réaction. Cette théorie caractérise l'enzyme libre et dans ce cas, on parle de la cinétique enzymatique en phase homogène. Dans le cas où l'environnement de l'enzyme change suite aux phénomènes d'adsorption ou d'immobilisation, on parle de la cinétique enzymatique en phase hétérogène.

III.1- La cinétique enzymatique en phase homogène

La dissociation du complexe ES en enzyme libre E et en produit P est considérée comme étant l'étape limitante du processus global. On peut écrire que la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la vitesse de disparition du substrat mais aussi à la vitesse d'apparition du produit P :

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad (\text{éq.I-2})$$

avec :

$$- \frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \quad (\text{éq.I-3})$$

et

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (\text{éq.I-4})$$

On peut alors écrire :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = k_m \quad (\text{éq.I-5})$$

k_m est appelée constante de Michaelis, elle a la dimension d'une concentration et s'exprime comme $[S]$ par une molarité. Cette constante dépend de la nature de l'enzyme et correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre une vitesse réactionnelle égale à la moitié de la vitesse maximale V_{\max} (Figure I-7).

La détermination de k_m permet d'avoir une idée sur la constante de dissociation du complexe enzyme/substrat ES. k_m représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat ; des valeurs de k_m très faibles traduisent une forte affinité de l'enzyme pour son substrat.

Si $[E_T]$ est la concentration totale de l'enzyme, alors la concentration en enzyme libre dans la solution est donnée par l'équation :

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (\text{éq.I-6})$$

En combinant les équations (I-5) et (I-6), on arrive à :

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{k_m + [S]} \quad (\text{éq.I-7})$$

En introduisant (I-7) dans l'équation (I-4), l'expression de cette dernière devient :

$$v = k_2 \frac{[E][S]}{k_m + [S]} \quad (\text{éq.I-8})$$

En posant l'hypothèse que la vitesse de la réaction est maximale quand tous les sites catalytiques sont saturés, on peut écrire :

$$[ES] = [E_T] \quad (\text{éq.I-9})$$

donc

$$V_m = k_2 [E_T] \quad (\text{éq.I-10})$$

La combinaison des équations (I-8) et (I-10) permet d'écrire l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{v_m [S]}{k_m + [S]} \quad (\text{éq.I-11})$$

La représentation graphique de l'équation (I-11) permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (Figure I-7).

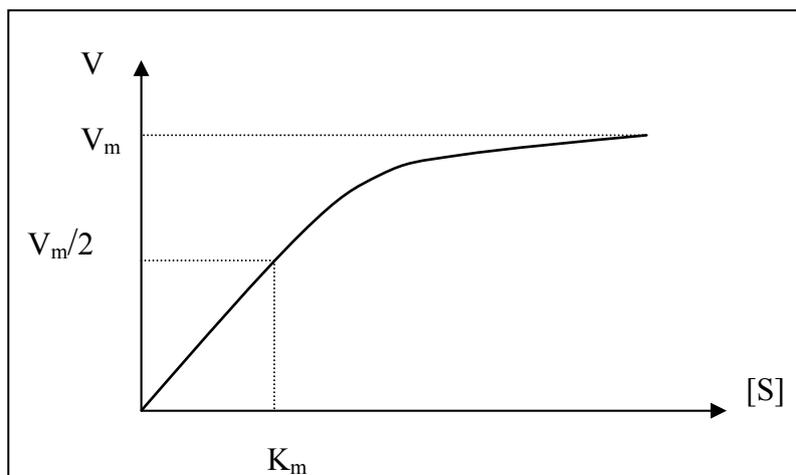


Figure I-7 : Evolution de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat [49].

La détermination graphique des paramètres cinétiques V_m et k_m n'est pas toujours très précise. Pour cette raison, d'autres méthodes ont été proposées pour permettre la linéarisation de l'équation (I-11) de Michaelis-Menten :

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m} \quad (\text{éq.I-12})$$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. Une autre représentation a été proposée par Eadie-Hofstee. Cette représentation s'obtient en écrivant l'équation (I-12) sous la forme suivante :

$$V \cdot K_m + V [S] = V_m [S] \quad (\text{éq.I-13})$$

En divisant les deux membres par $K_m [S]$, on obtient :

$$\frac{V}{[S]} = \frac{V_m}{K_m} - \frac{V}{K_m} \quad (\text{éq.I-14})$$

La traduction graphique des équations (I-12) et (I-14) est donnée par la [figure I-8](#).

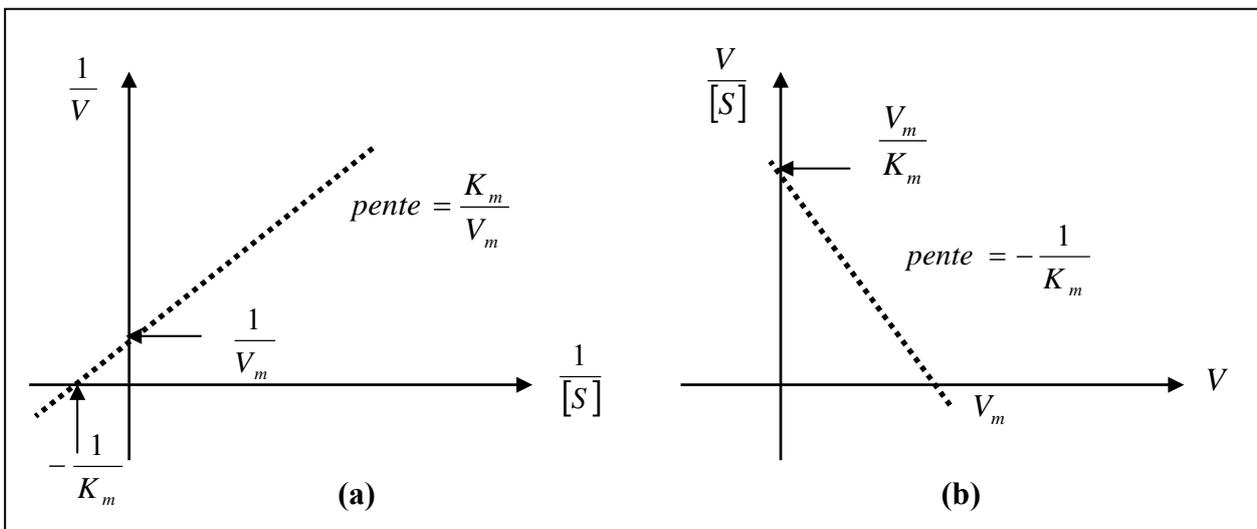


Figure I-8 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten : lineweaver-Burk (a) et d' Eadie Hofstee (b).

III.2- La cinétique enzymatique en phase hétérogène

Dans le cas où l'enzyme est liée à une surface, son comportement cinétique peut différer de manière significative de celui de la même enzyme libre dans la solution. En effet, l'immobilisation des enzymes conduit à la mise en œuvre d'une phase hétérogène solide contrairement à l'enzyme libre où toutes les molécules sont identiques et réparties de manière uniforme dans le milieu réactionnel où on est en présence :

- d'une phase liquide contenant le substrat ;
- d'une phase solide (matériau d'immobilisation) contenant l'enzyme.

Les propriétés d'une enzyme peuvent être modifiées par le choix approprié du protocole d'immobilisation, méthode identique peut avoir des effets sensiblement différents sur différentes enzymes. Ces changements peuvent être dus à des modifications de conformation dans l'enzyme suite au procédé d'immobilisation, ou à la présence et à la nature de la surface d'immobilisation. Pour cette raison, par rapport à la cinétique en milieu homogène, il faut tenir compte de deux nouveaux aspects :

- l'un concernant l'enzyme : la modification de ses propriétés intrinsèques du fait de l'immobilisation ;
- l'autre concernant la présence de la phase solide, ce qui impose de considérer des phénomènes physiques particuliers.

III.2.1- Effets de l'immobilisation sur les propriétés intrinsèques de l'enzyme

L'immobilisation de l'enzyme sur un support crée des modifications des propriétés cinétiques des enzymes. Ce changement cinétique peut être dû, soit à la modification de la conformation des enzymes, soit à la création d'empêchements stériques limitant l'accessibilité du substrat au site catalytique de l'enzyme.

Au cours du processus d'immobilisation, les molécules d'enzymes peuvent être liées au support ou entre elles par un nombre variable de liaisons (covalentes ou non covalentes) et avoir subies des distorsions plus ou moins importantes de leurs structures tridimensionnelles (Figure I-9).

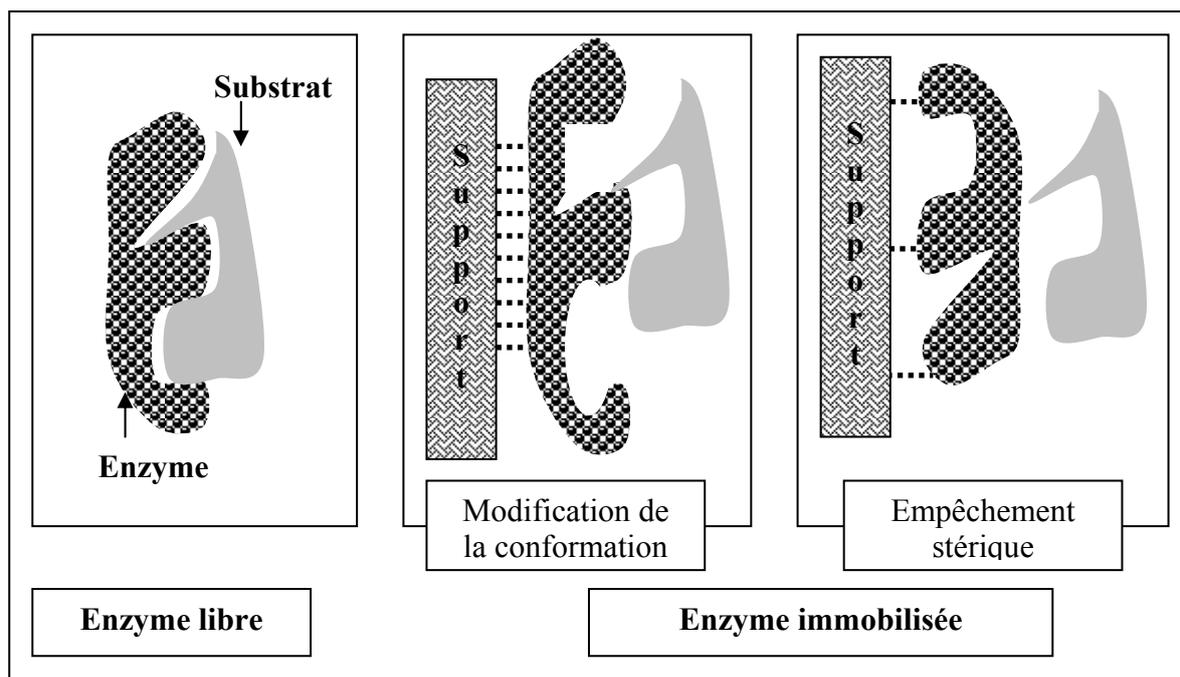


Figure I-9 : *Modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme due à son immobilisation.*

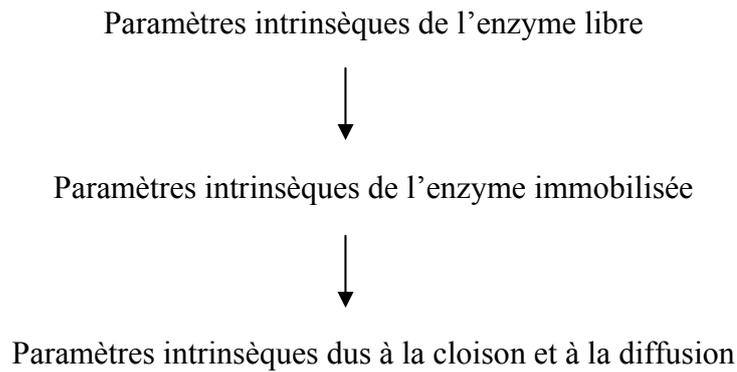
III.2.2- Phénomènes physiques liés à la présence d'une phase solide

En catalyse hétérogène, les paramètres caractérisant le mélange réactionnel n'auront pas la même valeur en tous points. Ceci est dû à l'interaction entre les réactifs et la phase solide, ou à la difficulté de diffusion des réactifs depuis la phase liquide vers l'enzyme située dans ou sur une trame solide. D'une manière générale, la concentration du substrat ne sera pas la même au sein de la phase liquide (macro-environnement) et au voisinage immédiat de l'enzyme (micro-environnement).

On distingue deux types de phénomènes de transfert de matière :

- les transferts de matières externes qui concernent les transferts s'effectuant de la solution à la surface du support et vice versa par diffusion et convection.

- les transferts de matières internes qui concernent ceux s'effectuant à l'intérieur d'un support poreux, d'un gel ou d'une membrane, par diffusion. Pour cette raison, les lois cinétiques sont différentes dans le micro et le macro-environnement ce qui nous laisse accéder par l'étude d'une enzyme immobilisée qu'à une valeur moyenne des paramètres cinétiques : on parle de cinétique apparente. En effet, le rapport entre les paramètres de l'enzyme libre et de celle immobilisée se traduit de la façon suivante :



III.2.3- Paramètres affectant la vitesse d'une réaction enzymatique

Les facteurs qui réduisent l'énergie d'activation accélèrent la réaction chimique. Cependant, d'autres facteurs peuvent produire un effet sur l'énergie d'activation ; par contre, ils peuvent influencer sur la vitesse de la réaction. Parmi ces facteurs, on peut citer la concentration de l'enzyme, la concentration du substrat, la concentration des produits, la température et le pH [48]. La [figure I-10](#) montre l'influence d'un catalyseur sur l'énergie d'activation d'une réaction chimique.

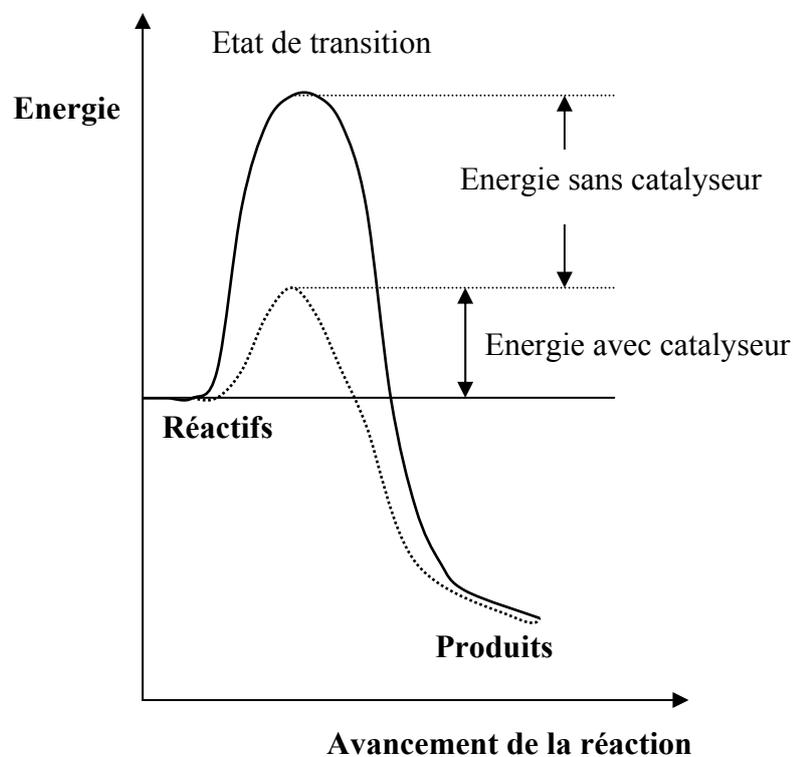


Figure I-10 : Diagramme d'énergie d'activation d'une réaction catalysée et non catalysée [48].

Cette figure traduit le rôle majeur de l'enzyme dans la réduction de l'énergie d'activation ce qui entraîne l'accélération de la réaction chimique. Pour cette raison, beaucoup de paramètres peuvent influencer l'activité de l'enzyme au cours du déroulement de la réaction chimique.

III.2.3.1- Concentration en enzyme

La réaction d'équilibre entre l'enzyme et son substrat est très rapide [50]. 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. Cette vitesse V , dépend de la concentration totale de l'enzyme $[E]_0$:

$$V = k [E]_0 \quad (\text{éq.I-15})$$

avec k une constante de proportionnalité.

III.2.3.2- Concentration en substrat

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 (figure I-7) demeure linéaire pour de faibles concentrations jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur maximale pour les hautes concentrations.

III.2.3.3- Concentration en produit

Au cours de la réaction enzymatique, un composé intermédiaire de type enzyme-produit peut apparaître. Le mécanisme réactionnel est donné par :



Souvent, le produit formé par la réaction enzymatique entraîne l'inhibition du processus de catalyse suite à des effets d'interaction entre l'enzyme et le produit. Ce dernier peut se lier au site actif ou à une autre partie de l'enzyme, ce qui provoque l'altération de sa structure tridimensionnelle, et par suite l'inhibition de la réaction enzymatique [51].

III.2.3.4- Effet de la température

En général, une élévation de la température entraîne une augmentation de la vitesse de la réaction enzymatique. Cependant, il existe une zone de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température est déterminée par la mesure des variations de la vitesse de la réaction en fonction de la température du milieu (Figure I-11). Le changement d'activité enzymatique en fonction de la température résulte de deux effets antagonistes.

- d'une part, l'activation des réactions chimiques par la chaleur se traduit par l'augmentation de l'agitation des molécules qui, avec l'élévation de la température, va accroître la fréquence de collisions entre le substrat et l'enzyme (zone A) ;

- d'autre part, la dénaturation de la protéine enzymatique par la chaleur va modifier, voire détruire, les structures tertiaires et quaternaires de la protéine globulaire et donc faire passer l'enzyme d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité (zone B).

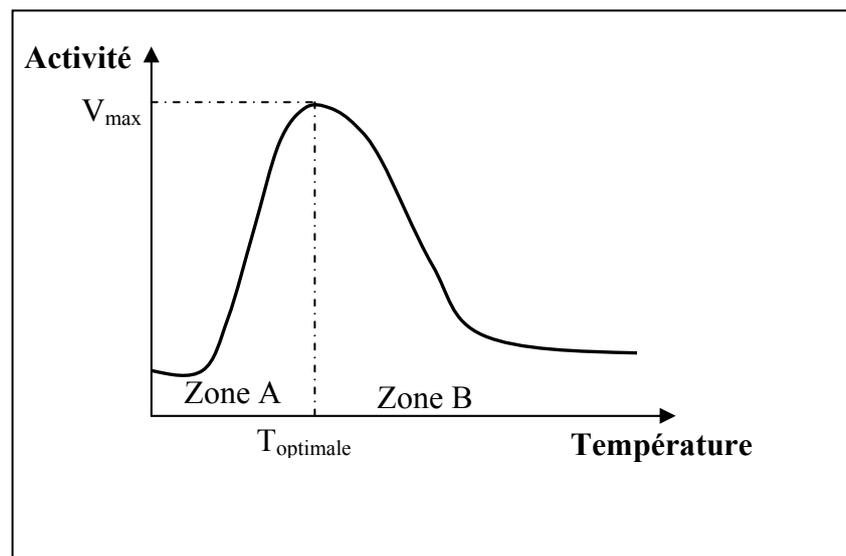


Figure I-11 : Effet de la température sur l'activité enzymatique. Activation par la chaleur (zone A), dénaturation thermique (zone B).

La variation de température suit la loi empirique d'Arrhénius qui permet de prévoir l'effet de la température sur la constante de vitesse de la réaction (k) et de déterminer ainsi une énergie d'activation (E_a). Cette loi est donnée par la relation suivante :

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{ou} \quad \ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A \quad (\text{éq.I-17})$$

Où

A est une constante ;

R est la constante des gaz parfaits ;

T est la température absolue en K.

III.2.3.5- Effet du pH

L'enzyme est une macromolécule constituée par des acides aminés ayant des groupements fonctionnels ionisables. L'état d'ionisation de ces acides aminés dépend du pH [48]. Ce dernier a une influence sur la nature des réactifs et des produits. Lorsque les groupes catalytiques de l'enzyme sont altérés, la réaction enzymatique n'atteint pas son état de transition normale, et ceci peut provoquer le blocage du processus de catalyse. La figure I-12 montre l'effet du pH sur l'activité de l'enzyme.

Dans le cas où le pH est égal au pK_a de la réaction de l'un des groupes catalytiques d'un site enzymatique, les molécules d'enzymes sont actives à 50 %.

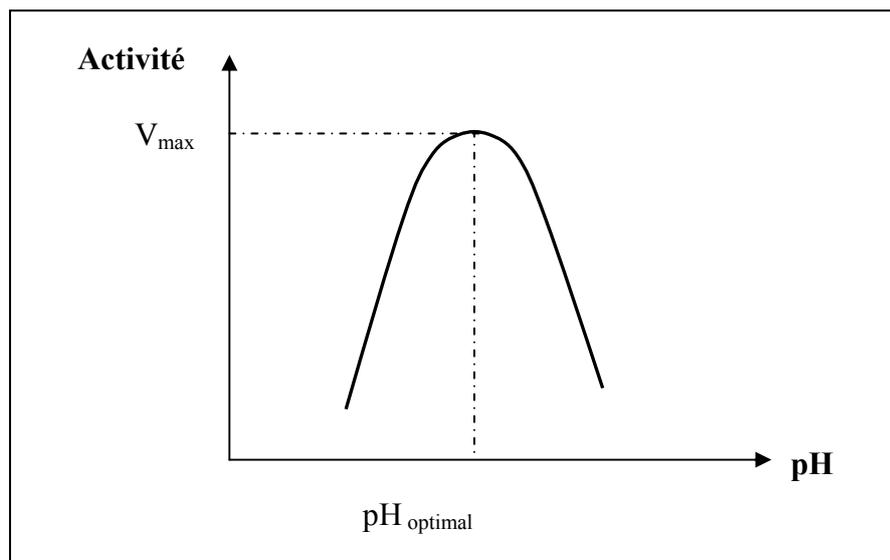


Figure I-12 : Effet du pH sur l'activité enzymatique [49].

III.2.4- Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique

Les réactions enzymatiques peuvent être inhibées par certaines molécules ou ions. Ces espèces chimiques peuvent bloquer ou provoquer la distorsion géométrique des sites actifs des enzymes. En effet, l'inhibition tend à empêcher l'accès des substrats aux sites catalytiques, ce qui diminue le nombre d'enzymes impliquées dans le processus de catalyse. Dans ce contexte, des études ont été menées pour étudier l'effet des inhibiteurs tels que les molécules et les cations métalliques sur l'activité enzymatique comme l'uréase [52,53], la glucose oxydase [54], ... Les inhibiteurs se scindent en plusieurs groupes, les inhibiteurs compétitifs, incompétitifs et non compétitifs.

- *Les inhibiteurs compétitifs* : Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique. La réaction enzymatique est bloquée, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformé par l'enzyme, soit parce que la position de groupement chimique sur l'inhibiteur rend impossible sa reconnaissance par le site actif.

Certains inhibiteurs compétitifs ne sont pas des analogues du substrat, et leur mode d'action est différent. L'inhibiteur ne se fixe pas sur le site actif, mais sur un autre site de liaison de l'enzyme. La fixation de l'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site de liaison du substrat, empêchant la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Inversement, la liaison du substrat sur l'enzyme empêche la fixation de l'inhibiteur: Ces deux molécules s'excluent mutuellement.

- *Les inhibiteurs incompétitifs* : Un inhibiteur incompétitif ne se lie sur l'enzyme qu'après fixation du substrat et empêche la formation des produits. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme et empêche la réaction. Comme son nom l'indique, un inhibiteur incompétitif n'entre pas en compétition avec un substrat sur son site de fixation. En revanche, dans les réactions enzymatiques à plusieurs substrats, les inhibiteurs incompétitifs peuvent se fixer sur le site de liaison d'un des substrats. Par exemple, l'inhibition par le substrat est un cas particulier de l'inhibition incompétitive où deux molécules de substrat peuvent se lier à l'enzyme, mais ne peuvent pas être transformées en produit.

- *Les inhibiteurs non compétitifs* : Un inhibiteur non compétitif peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influence pas la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat.

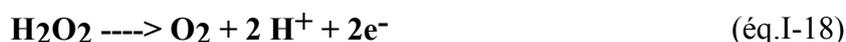
IV- Différentes méthodes électrochimiques de détection

La classification des capteurs électrochimiques s'effectue en fonction de la méthode de détection utilisée pour l'analyse du composé d'intérêt chimique ou biologique. Le type de reconnaissance moléculaire (enzyme-substrat) détermine le type de transducteur et par suite la méthode de caractérisation qui est, en général, de type ampérométrique, potentiométrique ou voltamétrique. A côté de ces méthodes électrochimiques, on peut citer d'autres méthodes rarement appliquées pour la caractérisation des capteurs enzymatiques comme la méthode optique, [55] conductimétrique [56], spectrophotométrique [57], calorimétrique [58], piézo-électrique [59],...

IV.1- Méthode ampérométrique

Cette méthode de caractérisation est souvent appliquée aux biocapteurs qui sont en général élaborés par immobilisation d'une enzyme à la surface d'une électrode métallique (platine, or, argent, graphite). Les espèces électroactives consommées ou produites lors de la réaction enzymatique vont être détectées à potentiel constant via leur oxydation ou leur réduction à la surface de l'électrode.

L'intensité du courant induit est directement proportionnelle à la concentration en solution du substrat (Figure I-13). L'exemple le plus fréquent est la détection de l'oxygène consommé, à l'aide d'une électrode de Clark [1] (électrode à diffusion gazeuse) ou la détection du peroxyde d'hydrogène produit. En se plaçant à un potentiel positif par rapport à une électrode de référence (+0.6, +0.7 V/ECS), le peroxyde d'hydrogène s'oxyde suivant la réaction suivante :



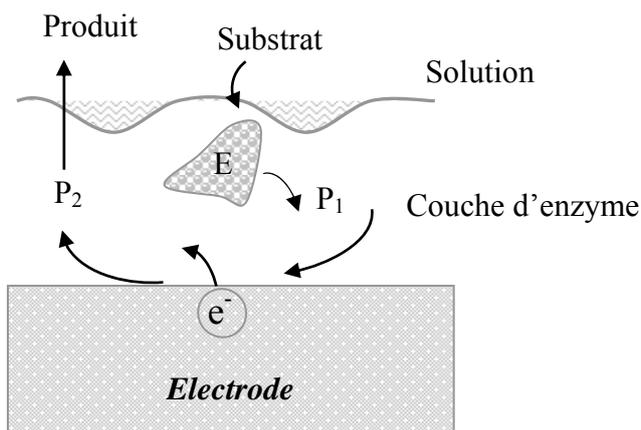


Figure I-13 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique.

Dans le [tableau I-2](#) ci-dessous, sont regroupées quelques substances détectées par des biocapteurs ampérométriques.

Tableau I-2 : Analytes détectés par des biocapteurs caractérisés par la technique Ampérométrique.

Analyte	Références
Lactate	60
Phosphate	61
Catechol	62
3-hydroxybutyrate	63
Choline	64
Acetyl choline	65
NADH	66
Hypoxanthine	67
Eau oxygénée (H ₂ O ₂)	68
Alanine	69
Acide urique et acide ascorbique	70
L-glutamate	71
ADP	72
Cholesterol	73
p-cresol	74
Acide Lactique	75
Cyanide	76
Créatine	77
Aspartame	78
Glucose	79
L-malate	80
Phénol	81

IV.2- Méthode potentiométrique

Les techniques potentiométriques impliquent la mesure, à courant constant ou nul, de la différence de potentiel qui s'établit entre une électrode de mesure et une électrode de référence de potentiel constant (le plus souvent on utilise l'électrode au calomel saturé $E^\circ = 244 \text{ mV}_{/ENH}$ ou l'électrode argent/chlorure d'argent $E^\circ = 222 \text{ mV}_{/ENH}$, avec ENH : électrode normale à hydrogène). Cette différence de potentiel est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'espèce déterminant le potentiel et elle est donnée par l'équation de Nernst:

$$E = E^0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \log a_i \quad (\text{éq.I-19})$$

où: E^0 est le potentiel normal de l'électrode
 R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
 T = 298 °K, la température absolue
 n est la charge de l'espèce déterminant le potentiel
 F est la constante de Faraday ($96487 \text{ Coulomb.mol}^{-1}$)
 a_i est l'activité de l'espèce déterminant le potentiel

L'électrode potentiométrique la plus utilisée est l'électrode de pH. C'est la composition particulière de sa membrane constituée d'un verre spécial, échangeur de protons, qui lui confère sa sensibilité. En modifiant de façon adéquate la composition du verre, on peut obtenir des électrodes spécifiques à d'autres ions (Na^+ , K^+).

Il existe également des électrodes potentiométriques à diffusion gazeuse. Ces électrodes permettent de mesurer dans la solution la pression partielle d'un gaz dissout. Elles sont constituées d'une électrode de pH et d'une membrane hydrophobe perméable aux gaz. Entre l'électrode de verre et la membrane hydrophobe est placée une solution de remplissage dont la composition dépend de la nature du gaz que l'on veut détecter. Le gaz diffuse à travers la membrane et entre en contact avec la solution de remplissage, modifiant ainsi le pH de celle-ci. On distingue ainsi l'électrode à CO_2 (électrode de Séveringhaus) et l'électrode à NH_3 . En combinant ces différentes électrodes (pour la détection ionique et la détection d'espèces gazeuses) avec une enzyme, on développe des biocapteurs. Il faut, bien entendu, choisir judicieusement l'enzyme pour que les produits consommés ou générés par la réaction

enzymatique soient détectables par l'électrode. Le [tableau I-3](#) montre différents substrats pouvant être détectés par les électrodes potentiométriques.

Tableau I-3 : *Espèces détectées par des biocapteurs caractérisés par la technique potentiométrique.*

Analyte	Références
Glycérol	82
Glucose	83
Pénicilline	84
Urée	85
L-Glutamine	86
Nitrite	87
Nitrate	88
L-acide glutamique	89
Amygdaline	90
Pesticide	91

IV.3- Méthode voltamétrique

Actuellement, il existe un grand choix de techniques voltamétriques essentiellement caractérisées par la forme du potentiel appliqué qui est dépendante de l'information (analytique, cinétique ou thermodynamique) que l'on veut extraire du système rédox [92].

Comme la plupart des mesures électrochimiques, la technique voltamétrique nécessite la présence de trois électrodes (référence, travail et auxiliaire). Le principe de cette technique électrochimique est basé sur la mesure du courant anodique ou cathodique suite à l'oxydation ou à la réduction d'une espèce électroactive.

La concentration de l'analyte à détecter est proportionnelle au pic de courant d'oxydation ou de réduction des espèces électroactives. Le [tableau I-4](#) montre les analytes qui ont été analysées par des biocapteurs utilisant la voltamétrie comme système de détection.

Tableau I-4 : Espèces détectées par des biocapteurs basés sur la technique de voltamétrie.

Analyte	Voltamétrie	Références
Glucose	cyclique	93
NADH	cyclique	94
Ethanol	cyclique	95
Xanthine	cyclique	96
Lactate	cyclique	93
Choline	cyclique	93
Cholesterol	cyclique	97
Oxalate	cyclique	98
Paracétamol	pulse	99

V-L'uréase et la structure ChemFEC

V.1- L'uréase

V.1.1- Définition et caractéristiques

L'uréase est la première enzyme qui a été cristallisée en 1926 [100]. Cette enzyme catalyse la réaction de dégradation d'urée en ammonium et en dioxyde de carbone [101], selon la réaction ci-dessous :



Cette enzyme peut être isolée à partir des plantes, des microorganismes ou du sol. La [figure I-14](#) montre la structure tridimensionnelle d'une molécule d'uréase "Jack-Beans" :

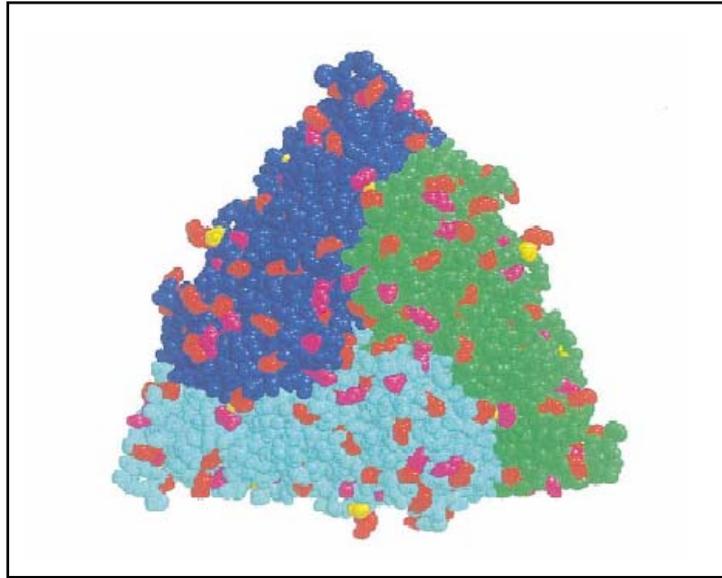


Figure I- 14 : Structure 3D de l'uréase jack-beans [102].

Le site actif de l'uréase dans lequel s'effectue la dégradation de l'urée contient deux atomes de nickel entourés par les acides aminés impliqués dans la réaction de catalyse. La figure I-15 montre la structure du site actif obtenue par dynamique moléculaire.

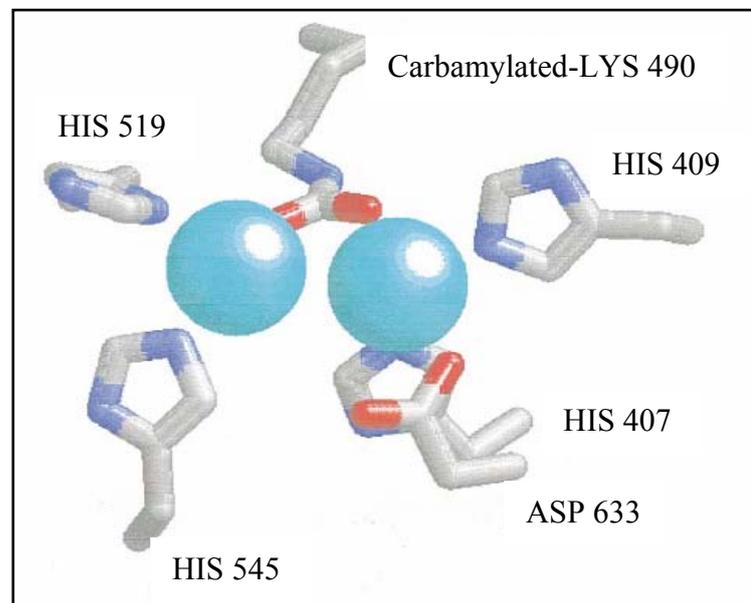


Figure I- 15 : Site actif de l'uréase Jack Beans [102].

Les principales caractéristiques de l'uréase sont :

- Masse moléculaire de l'uréase de Jack-Beans : 480,000 KD [103].

- pH optimal : 7.4 [104].
- Point isoélectrique : 5.1 [105].
- Constante cinétique : $K_m = 1.3 \text{ mM}$ [104].
- Spécificité : l'uréase est une enzyme spécifique de l'urée [106].

V.1.2- L'urée

L'urée est le produit final de la dégradation par le foie des acides aminés provenant des protéines d'origine alimentaire et s'élimine par le rein [107]. L'azote provenant de la combustion des acides aminés parvient au foie sous forme d'ammoniaque (produit toxique) qui se transforme ensuite en urée (produit non toxique). En effet, l'urée possède un taux normal dans l'organisme entre 0,15 et 0,40 g/l dans le sang et de 1 à 2,5 g dans l'urine. Une augmentation de la concentration de l'urée dans le sang ou une diminution de cette concentration dans les urines traduit un déficit de fonctionnement des reins et correspond à une insuffisance rénale.

La détermination de l'urée dans des fluides biologiques est importante pour évaluer le bon fonctionnement des reins ainsi que pour la surveillance du taux d'urée durant la dialyse rénale. Les méthodes conventionnelles pour le dosage de l'urée sont basées sur la formation d'un complexe coloré soit avec l'urée [108] soit avec l'ammoniaque [109].

V.2- L'évolution de l'état de l'art concernant les technique d'immobilisation de l'uréase

Plus de trentaine d'années se sont écoulées pour aboutir à un biocapteur d'urée à partir du concept de son immobilisation sur un support solide [110-111]. Le [tableau I-5](#) résume l'évolution de l'état de l'art concernant les techniques d'immobilisation de l'uréase.

Le tableau I-5 : *Evolution de l'état de l'art concernant les techniques d'immobilisation de l'uréase.*

Années	Techniques d'immobilisation	Références
1984	<ul style="list-style-type: none"> • Goldfinch et Lowe ont immobilisé l'uréase dans le bleu de bromothymol en présence de glutathione à la surface d'un capteur pH. 	[112]

1988	<ul style="list-style-type: none"> • Yerian et al ont réussi la fixation covalente de l'uréase sur une surface d'une membrane de cellulose. 	[113]
1989	<ul style="list-style-type: none"> • Un capteur d'urée a été conçu par Luo et Walt suite à l'immobilisation de l'uréase à la surface d'une fibre optique à l'aide d'un couplage avidine-biotine. 	[114]
1995	<ul style="list-style-type: none"> • Shi-Hul et al ont immobilisé l'uréase dans une membrane de poly-m-phénylènediamine déposée par électropolymérisation sur une surface d'or d'un cristal de quartz. • Schalkhamme et al ont développé un capteur d'urée à base d'uréase. Cette dernière a été incorporée dans le polyvinylpyrrolidone photo structuré à la surface d'un métal dont le but est de créer une couche ayant des propriétés optiques. • Zhylyak et al Boubriak et al ont utilisé le sérum albumine bovine pour immobiliser l'uréase en présence de vapeur du glutaraldéhyde. Ces biomembranes ont été déposées sur une électrode d'or interdigitée et sur un transistor à effet de champs (ISFET) respectivement pour la détection des ions et de l'urée. • Par la technique Langmuir-Boldgett (LB), Paddeu et al ont immobilisé l'uréase sous forme de monocouche à la surface d'une électrode Si/SiO₂/Si₃N₄ en présence du glycidoxypropyltriméthoxysilane (GOPTS). • Mascini et al ont développé un capteur optique à base d'uréase immobilisée par de l'acétate de cellulose sur une fibre optique. • Walcerz et al, R. Koncki et al, ont utilisé le polychlorure de vinyle modifié par le 1,4-diaminobutane et le carboxilate dont le but d'immobiliser l'uréase de manière covalente à la surface d'une électrode sensible au pH. • Pozniak et al ont étudié les propriétés physico-chimiques de l'uréase immobilisée dans une membrane à base de polysulphone modifié. 	<p>[115]</p> <p>[116]</p> <p>[117,118]</p> <p>[119]</p> <p>[120]</p> <p>[121,122]</p> <p>[123]</p>

1996	<ul style="list-style-type: none"> • Kazanskaya et al ont développé une membrane photo sensible à base d'uréase incorporée dans le polyéthylène téréphthalate. Cette membrane est déposée sur un transistor à effet de champs pour détecter l'urée et les ions ammonium. [124] • Adeloju et al ont incorporé l'uréase dans le polypyrrole par électropolymérisation à la surface d'une électrode de platine. [125] • Osaka et al ont utilisé un complexe de polyion-uréase adsorbé sur le polypyrrole électropolymérisé à la surface d'une électrode de platine. [126] 	
1997	<ul style="list-style-type: none"> • Steinschaden et al ont immobilisé l'uréase dans le poly (2-hydroxyéthyle méthacrylate) déposé sur une électrode de platine. [127] • Godjevargova et al ont immobilisé l'uréase dans une membrane à base d'acrylonitrile modifié par le 2-diméthylaminoéthyl méthacrylate et l'acide diacrylamido-2-méthylpropane sulfonique. [128] • Volotovskiy et al ont utilisé le Nafion pour immobiliser l'uréase à la surface d'un transistor à effet de champs. [129] 	
1998	<ul style="list-style-type: none"> • Chellapandian et al ont étudié l'activité de l'uréase immobilisée dans un copolymère formé par le chitosane et le poly (glycidyl méthacrylate). [130] • Fahmy et al ont étudié les propriétés physico-chimiques et l'effet des ions métalliques sur l'activité de l'uréase immobilisée dans une matrice de cellulose modifiée par le diéthylaminoéthyle. [131] • Rejikumar et al ont étudié l'effet de l'agent de couplage (glutaraldéhyde) sur l'activité de l'uréase immobilisée dans le poly (vinylalcool). [132] 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Dans le même contexte, Marzadori et al ont étudié les propriétés cinétiques de l'uréase immobilisée par adsorption dans une matrice minérale d'hydroxyapatite (phosphate de calcium). 	[133]
1999	<ul style="list-style-type: none"> • Kayastha et al ont étudié l'extraction de l'uréase et son immobilisation dans l'alginate de calcium. • Laska et al ont immobilisé l'uréase dans une matrice formée par la polyaniline préparée par oxydation chimique. 	[134] [135]
2000	<ul style="list-style-type: none"> • Hearn et al ont optimisé l'encapsulation de l'uréase dans le poly (méthylène co-guanidine) déposé sur une membrane d'alginate. • Jyh-Ping chen et al ont étudié l'activité de l'uréase immobilisée dans une matrice d'hydrogel formé par le poly (<i>N</i>-isopropylacrylamide-<i>co</i>-<i>N</i>-acryloxysuccinimide-<i>co</i>-2-hydroxyéthyl méthacrylate). • Won-Yong Lee et al ont utilisé la technique sol-gel pour immobiliser l'uréase dans l'orthosilicate de tétraméthyle (TMOS) déposé sur une électrode de platine. 	[136] [137] [138]
2001	<ul style="list-style-type: none"> • Krajewska et al ont immobilisé l'uréase dans une matrice de chitosane. Dans ce travail, ils ont étudié l'inhibition de l'uréase par les ions Ni^{2+}, F^- et l'acide acétohydroxamique. • Yang et al ont piégé l'uréase en présence du glutaraldéhyde à la surface d'une matrice de poly(acrylonitrile) préalablement hydrolysée. • Alkan et al ont étudié l'entrapement de l'uréase dans un polymère de polypyrrole déposé par électropolymérisation sur une électrode de platine recouverte préalablement par un block de copolymère contenant le thiophène et le polyméthylméthacrylate. 	[139] [140] [141]

2002	<ul style="list-style-type: none"> • Ayhan et al ont étudié l'activité de l'uréase immobilisée dans le poly(éthylène glycol diméthacrylate/2-hydroxy méthacrylate). • Singhal et al ont immobilisé l'uréase dans le poly (N-vinyl carbazole) déposé par la technique Langmiur-Boldgett sur une électrode d'ITIO (indium-étain-oxyde). • Akgol et al ont étudié l'activité de l'uréase immobilisée dans le polyamide. • Par la technique Langmuir-Boldgett, Yanxia Hou et al ont développé un capteur d'urée par immobilisation de l'uréase à la surface d'une électrode Si/SiO₂ préalablement modifiée par l'octadecylsilane. 	<p>[142]</p> <p>[143]</p> <p>[144]</p> <p>[145]</p>
2003	<ul style="list-style-type: none"> • G. Bayramoglu et al ont immobilisé l'uréase dans le poly(hydroxyéthylméthacrylate-co-glycidylméthaneacrylate). Dans ce travail, ils ont montré que la réticulation de l'uréase en présence du glutaraldéhyde se fait préférentiellement par réaction de ce dernier avec les groupements -NH₂ qu'avec les groupements -SH de l'uréase. • Soldatkin et al ont immobilisé l'uréase dans une matrice composée de poly(vinylalcool)/SbQ (styrylpyridinium) déposé sur un transistor à effet de champs (ISFET) pour fabriquer un biocapteur d'urée. 	<p>[146]</p> <p>[147]</p>
2004	<ul style="list-style-type: none"> • Luo et al ont piégé l'uréase dans un composite formé par le polyaniline et le Nafion déposés sur une électrode d'or. • Lakard et al ont utilisé le polyéthylènimine pour immobiliser l'uréase sur une électrode de platine selon deux procédures. Ces dernières consistent à adsorber physiquement ou réticuler l'enzyme par le glutaraldéhyde dans les pores du polymère utilisé. • Limbut et al ont immobilisé l'uréase dans des matrices inorganiques définies par le silica gel et le verre poreux. 	<p>[148]</p> <p>[149]</p> <p>[150]</p>

2005	<ul style="list-style-type: none"> • Rajesh et al ont attaché, d'une manière covalente, l'uréase dans le poly(N-3-aminopropylpyrrole-co-pyrrole) déposé par électropolymérisation sur une électrode d'ITO dont le but de réaliser un biocapteur d'urée. • Liang et al ont adsorbé l'uréase sur des nanoparticules de polystyrènes via le développement des nanoparticules biocatalytiques. • Kuralay et al ont développé une électrode enzymatique à base d'uréase adsorbée dans une matrice de poly(vinylferrocénium) déposée par oxydation électrochimique sur une électrode de platine. 	<p>[151]</p> <p>[152]</p> <p>[153]</p>
------	---	--

V.3- La structure ChemFEC ou EIS

V.3.1- Définition et principe de fonctionnement

La structure ChemFEC (structure capacitive à effet de champs) ou EIS (électrolyte/isolant/semi-conducteur) est l'association d'un milieu liquide défini par l'électrolyte à un isolant en contact avec un matériau semi-conducteur (figure I-16).

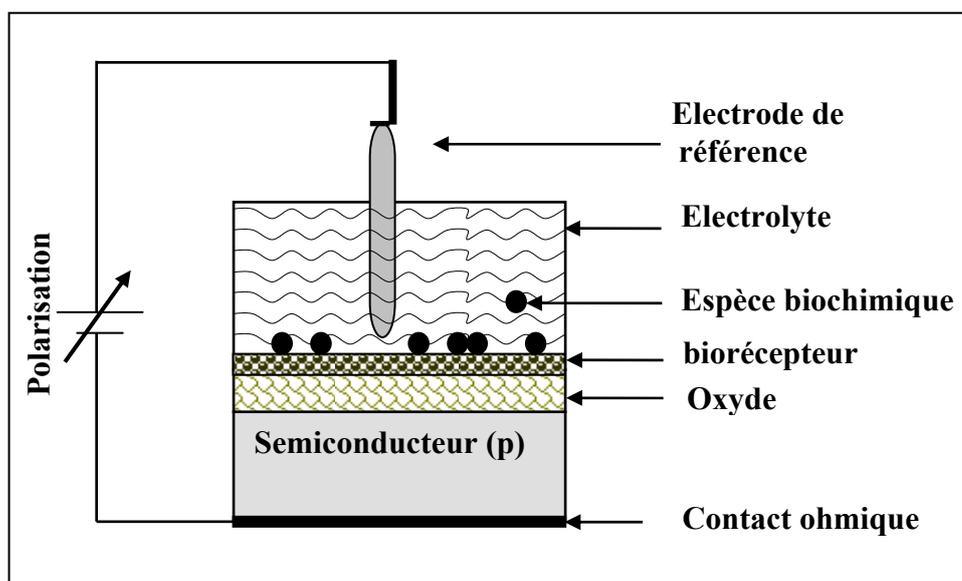


Figure I-16 : Structure ChemFEC fonctionnalisée par une biomembrane.

La structure EIS est analogue à la structure MIS (métal-isolant-semiconducteur) dans laquelle le métal est remplacé par l'électrolyte et une électrode de référence. Comparativement au métal, les porteurs de charges dans l'électrolyte sont les ions souvent solvatés qui ont une dimension importante par rapport aux électrons. Le principe de fonctionnement de cette structure est le suivant : l'effet de champ est gouverné par des interactions spécifiques à l'interface couche ionosensible/électrolyte. Quand une espèce est adsorbée à cette interface, il se crée une variation de la charge de surface. La chute de potentiel (Ψ_0) à cette interface en fonction de l'activité de l'ion à doser dans la solution, modifie la courbure des bandes du semi-conducteur en provoquant le déplacement du potentiel de bande plate V_{FB} . Dans ce qui suit, nous utiliserons la structure EIS comme transducteur dans la fabrication d'un biocapteur d'urée pour différentes matrices d'immobilisation (organiques et inorganiques).

V.3.2- Mesures capacitives et notion de potentiel de bande plate : ΔV_{FB}

- Mesures capacitives

Les mesures capacitives consistent à mesurer la capacité totale de la structure EIS (électrolyte-isolant-semiconducteur) en fonction de la polarisation et à fréquence fixe. La [figure I-17](#) montre la variation de la capacité totale (C_T) en fonction de la polarisation V .

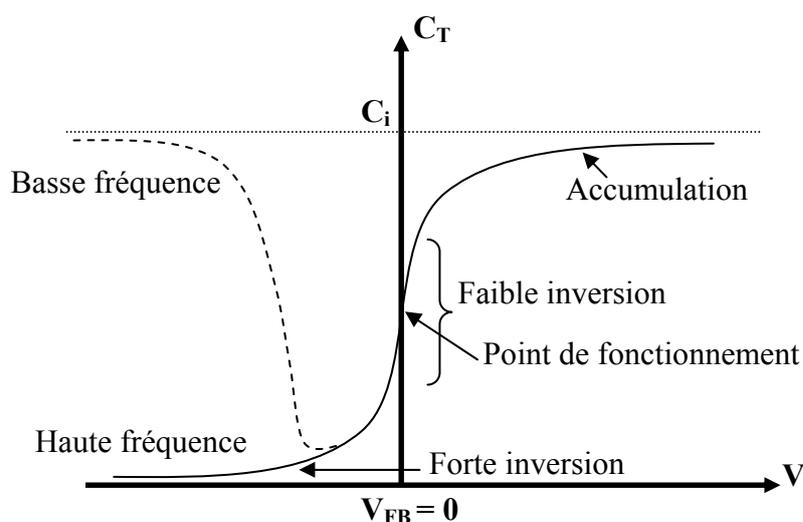


Figure I-17: Caractéristique $C(V)$ d'une structure EIS, idéale en haute fréquence et en basse fréquence pour un semi-conducteur type p.

- Potentiel de bande plate (flat band potential): V_{FB}

La valeur de ce potentiel est donnée par la relation de Mott-Schottky [155], développée pour les structure MIS et généralisée aux structures EISs (Figure I-18). Le régime dans lequel le potentiel de bande plate est défini est le régime de désertion (faible inversion) qui encadre le point de fonctionnement (voir figure I-17).

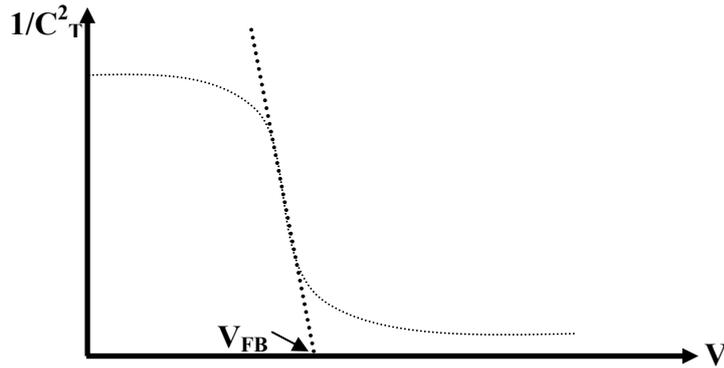


Figure I-18 : Variation de la quantité $1/C_T^2$ en fonction de V_{ECS} .

Pour bien comprendre la notion de potentiel de bande plate, il faut étudier en détail l'effet de la polarisation sur le diagramme énergétique de la structure EIS [154]. Le ΔV_{FB} est défini comme étant la polarisation qu'il faut appliquer pour faire disparaître la courbure des bandes d'énergie du semiconducteur et atteindre la configuration dite de bande plate (figure I-19).

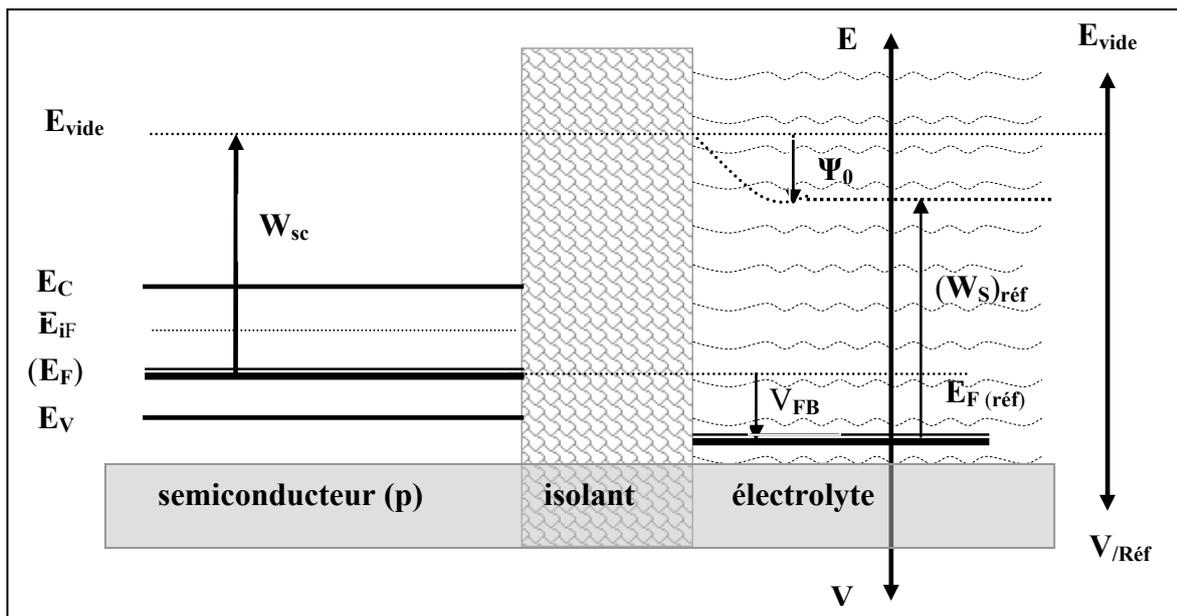


Figure I-19 : Diagramme de bande plate d'une structure EIS

avec : W_{sc} le travail de sortie du semi-conducteur, $(W_s)_{réf}$ le travail de sortie de l'électrode de référence, $E_{F (réf)}$ le niveau de Fermi de l'électrode de référence, E_C l'énergie de bande de conduction, E_V l'énergie de bande de valence, E_{Fsc} le niveau de Fermi du semiconducteur, E_{vide} l'énergie de vide, et E_{iF} niveau de Fermi intrinsèque du semiconducteur.

D'après le schéma ci-dessus, on peut relier le potentiel de bande (V_{FB}) plate à la chute de potentiel dans l'électrolyte désigné par Ψ_0 (éq.I-21).

$$V_{FB} = - (W_s)_{réf} + \Psi_0 + (W_s)_{sc} \quad (\text{éq.I-21})$$

Plus la chute de potentiel dans l'électrolyte est importante, plus les phénomènes à la surface seront importants et le potentiel de bande plate sera bien défini.

V.3.3- Interface solide-liquide : théorie de la double couche

A l'interface entre une surface chargée et une solution électrolytique, il existe une couche de solution, notée "double couche", possédant des propriétés différentes de celles du réservoir électrolytique. En effet, plusieurs modèles successifs ont été élaborés pour décrire cette double couche [155].

Le premier modèle proposé est attribué à Helmholtz. Ce dernier, a montré que les ions en solution se répartissent près de la surface solide en deux couches unique, à la manière d'un condensateur plan. La première couche du côté du solide est simplement occupée par des molécules de solvant (eau le plus souvent). L'orientation des dipôles dépend de la nature de la surface solide, alors que la deuxième couche est réservée aux ions solvatés. Le plan qui passe par le centre de ces ions est nommé le plan externe de Helmholtz (PEH). La distance notée δ , entre la surface solide chargée et le plan PEH est très faible, puisque typiquement de l'ordre de quelques longueurs atomiques. La chute de potentiel Ψ_0 entre l'oxyde et la solution dans ce cas est linéaire (Figure I-20), et l'interface est équivalent du point de vue électrique à un condensateur plan parallèle. En fait, si ce modèle est valable pour le respect de la neutralité électrique du système global (électrolyte + surface solide), il s'avère être insuffisant car il ne prend pas en compte l'énergie thermique et donc la diffusion des ions en solution.

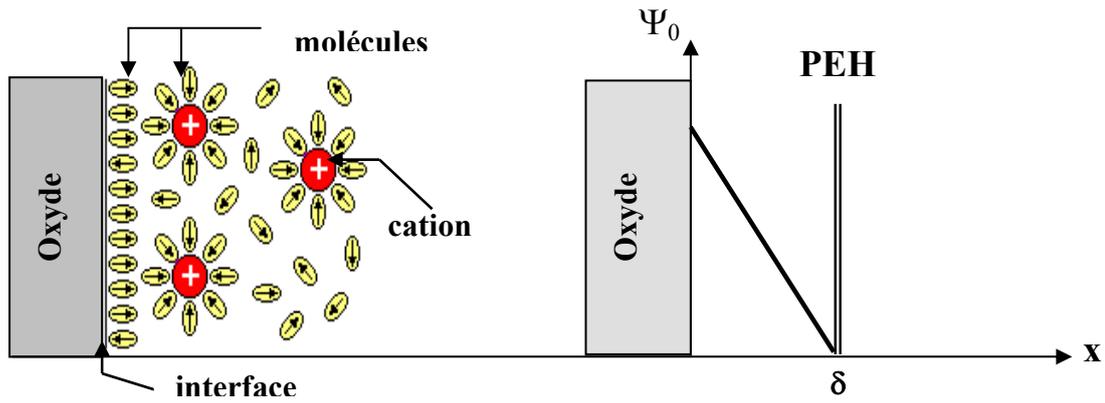


Figure I-20 : *Distribution des espèces chargées et variation du potentiel de surface selon Helmholtz.*

Gouy et Chapman proposent un second modèle, plus élaboré, intégrant la compétition entre l'interaction électrostatique ion/interface et l'énergie de diffusion thermique des ions dans le liquide [156]. Ils ont proposé un modèle où les ions qui forment la charge électrique de la surface du côté de la solution ne sont plus localisés en totalité dans le plan de Helmholtz mais ont une distribution décroissante avec la distance de la surface solide. En effet, les ions se répartissent dans une couche diffuse qui pénètre relativement loin dans l'électrolyte entre quelques nanomètres et un micron suivant les cas. La variation du potentiel électrostatique dans la couche diffuse suit une forme générale plus complexe et elle décroît avec la distance d de l'électrode en tendant asymptotiquement vers zéro (Figure I-21).

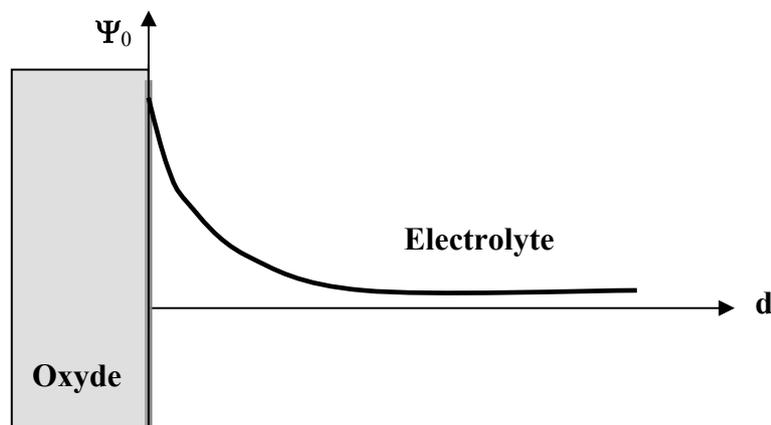


Figure I-21 : *Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse.*

Un troisième modèle plus élaboré provient d'une combinaison des deux modèles précédents. Dans ce modèle, Stern considère deux couches d'ions dans l'électrolyte : donnée par une première couche de contre-ions immobiles est présente au contact direct de l'interface chargée. On l'appelle "couche compacte" et elle est suivie d'une seconde couche d'ions mobiles dans l'électrolyte appelée "couche diffuse". Le plan de jonction entre les deux couches est appelé "plan de cisaillement". On nomme potentiel zêta (ξ), le potentiel de la surface du plan de cisaillement. A cause de l'immobilité des ions de la couche compacte, c'est ξ et non pas Ψ_0 qui intervient dans les phénomènes électrocinétiques prenant des effets à l'interface solide-liquide. Le schéma récapitulatif de la [figure I-22](#) illustre le modèle global de "Gouy-Chapman-Stern" simplifié.

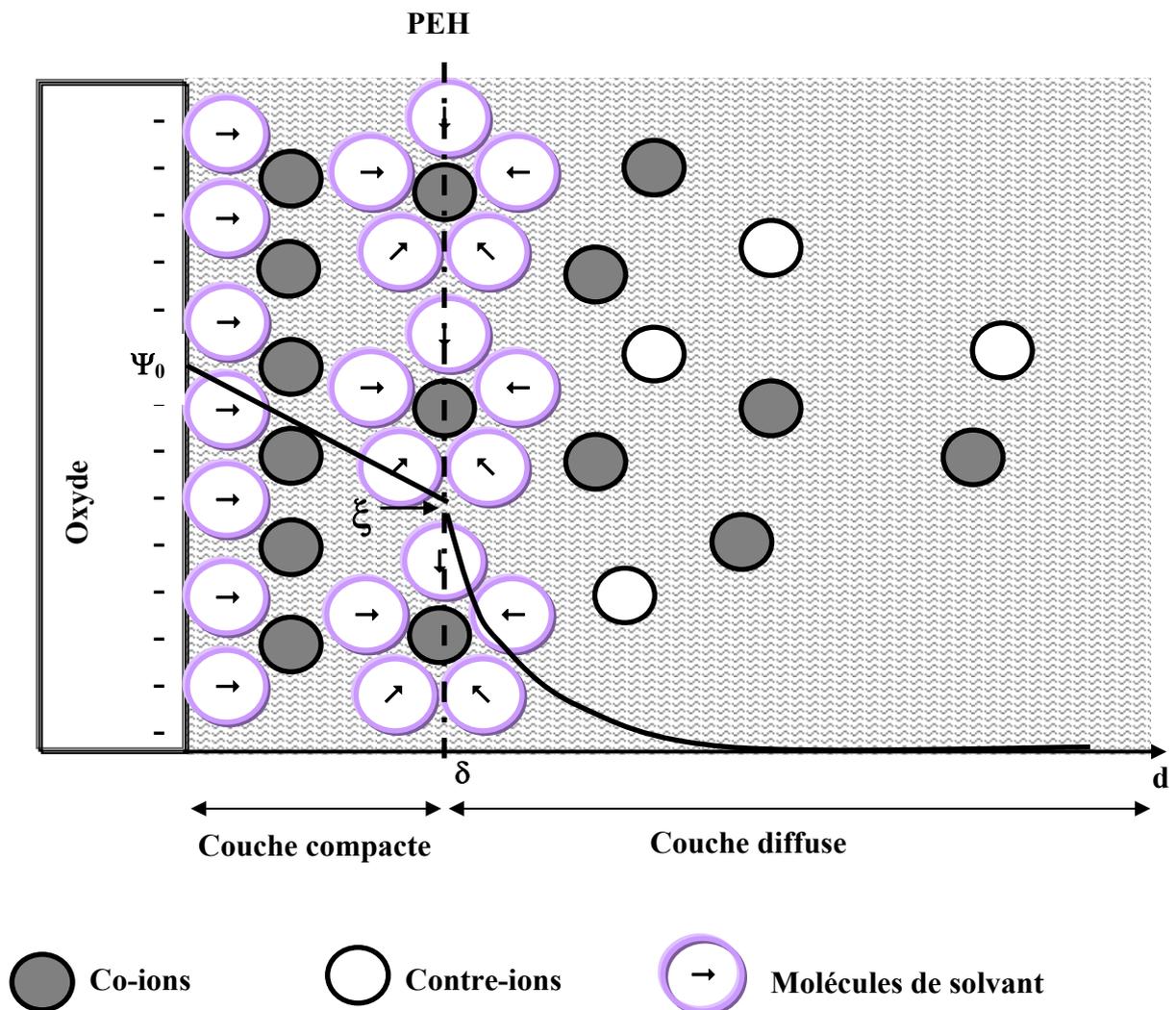


Figure I-22 : Répartition des charges à l'interface solide/liquide selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern.

V.3.4- Phénomènes de surface : adsorption physique

A la suite du contact de la surface de l'isolant nue ou fonctionnalisée par une membrane sensible avec le milieu aqueux conducteur, il y aura accumulation de charges par adsorption à la surface, donc modification de l'état de surface qui peut être à l'origine de deux phénomènes de nature différente.

α - Effet de charge :

Ce phénomène se traduit par l'adsorption de charges à la surface de l'isolant qui influence le potentiel de surface. Cet effet de surface induit le changement du potentiel de bande plate V_{FB} . La valeur de ce potentiel est donnée par la relation de Mott-Schottky [155], développée pour les structure MIS et généralisée aux structures EIS. Le régime dans lequel le potentiel de bande plate est défini est le régime de désertion (faible inversion).

$$V - V_{FB} = \frac{qN\varepsilon_0 \varepsilon_{sc}}{2C_i^2} \left[\left(\frac{C_i}{C_T} \right)^2 - 1 \right] \quad (\text{éq.I-22})$$

avec:

- V : polarisation continue appliquée à la structure.
- q : charge élémentaire.
- N : dopage du semi-conducteur.
- ε_{sc} : permittivité relative du semi-conducteur.
- ε_0 : permittivité relative du vide.
- C_i : capacité de l'isolant/unité de surface.
- C_T : capacité totale de la structure EIS/unité de surface.

Toute variation de charges à la surface de l'isolant influence la courbure de bande du semiconducteur relative à un effet de champs, par suite sur la variation du potentiel de bande plate qui se traduit par le décalage de la caractéristique $C(V)$, représenté sur la [figure I-23](#).

β - Effet capacitif :

Ce phénomène s'observe dans le régime d'accumulation, c'est le régime dans lequel on estime la valeur de la capacité de l'isolant. La variation de la capacité en accumulation est à l'origine de la modification de l'épaisseur de l'isolant, et ceci à la suite d'accrochage des espèces chimiques de grande taille à la surface de la couche sensible (Figure I-24). L'augmentation de l'épaisseur de la couche accrochée entraîne la diminution de la capacité totale en accumulation (Figure I-23). Le modèle de la double couche qui a été traité antérieurement, nous permet d'écrire la relation suivante :

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_{cs}} + \frac{1}{C_a} \quad (\text{éq.I-23})$$

avec :

- C_{cs} : capacité de la couche sensible
- C_a : capacité de la couche adsorbée.

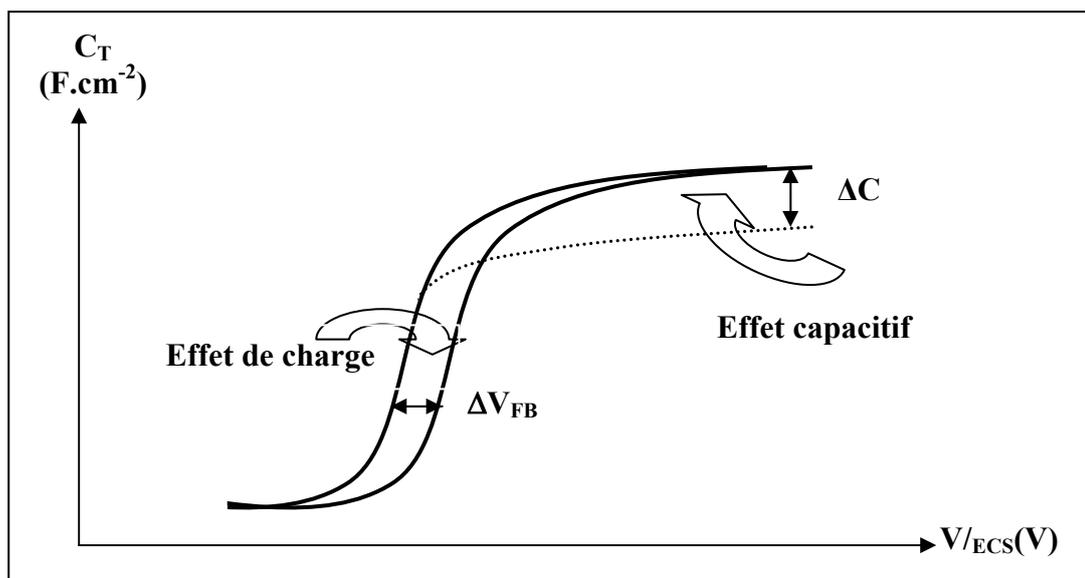


Figure I-23 : Différents types de modifications à l'interface électrolyte/isolant.

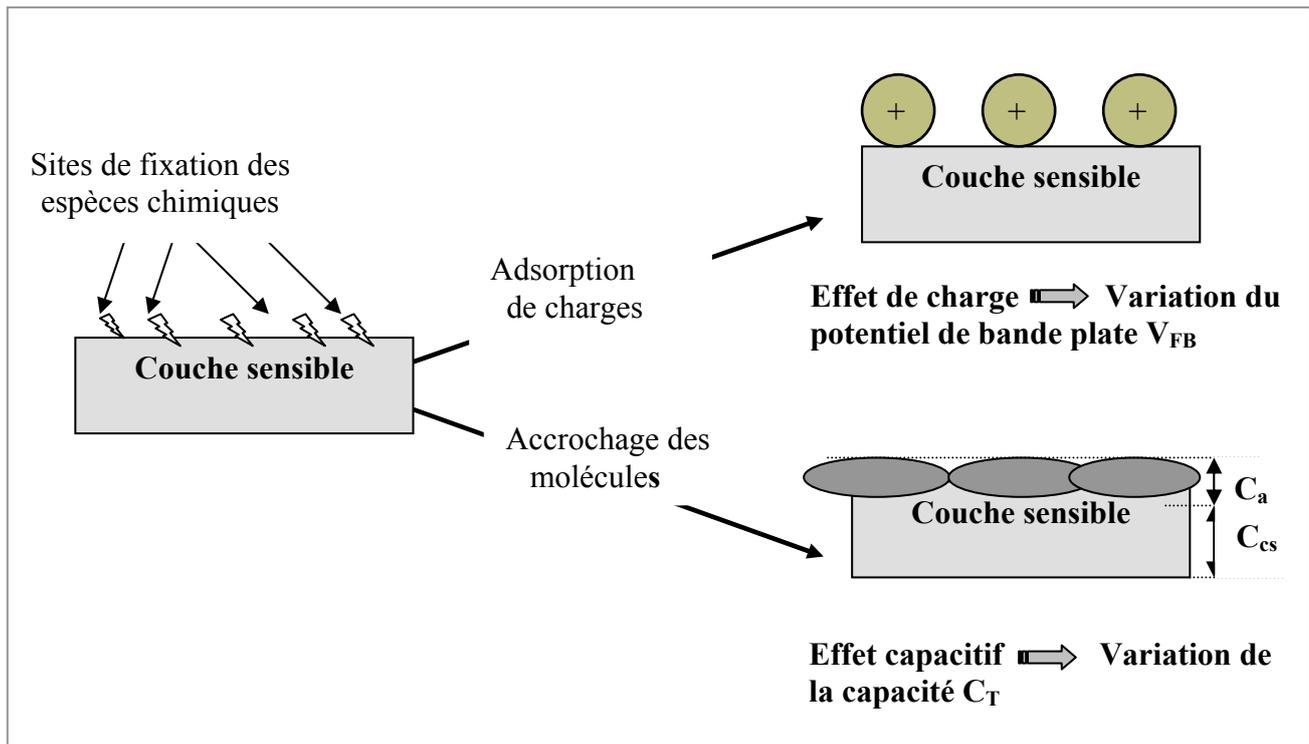
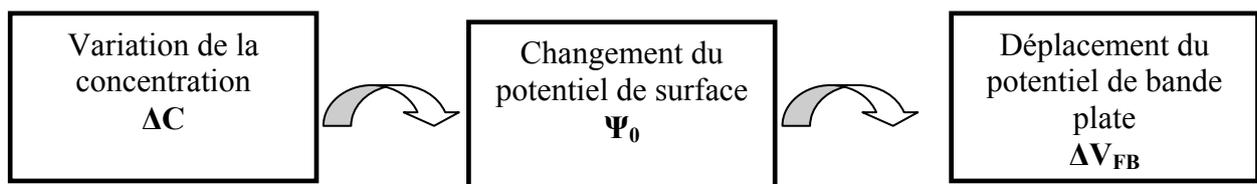


Figure I-24 : Schéma descriptif de l'effet de charges et de l'effet capacitif.

Le principe de fonctionnement de la structure ChemFEC peut être résumé par le schéma suivant :



Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié les principales composantes impliquées dans la construction d'un biocapteur. Parmi ces composantes, les enzymes qui sont largement employées malgré leur coût relativement important. De nombreux biocapteurs enzymatiques ont été développés dans les laboratoires et certains ont été commercialisés. Cependant, la

dénaturation de l'enzyme immobilisée et le manque de stabilité durable du capteur sont souvent les plus problématiques.

Nous avons décidé d'utiliser un capteur de pH de type ChemFEC sur lequel, est immobilisée l'uréase. Ce capteur a été appliqué à la détection de l'urée. L'élaboration et la caractérisation de ce capteur seront discutées dans les prochains chapitres.

Références bibliographiques du chapitre I

- [1] L. C. Lyons. Ann. NY Acad., Sci **102** (1962) 29.
- [2] S. J. Updicke, G. Hicks., Nature, **214** (1967) 986.
- [3] S. P. J. Higson, S. M. R. Reddy and P. M. Vadgama., Engineering Science and Education Journal (1994) 41.
- [4] C. R. Keese and I. Giaever., IEEE Engineering in Medicine and Biology (1994) 435.
- [5] E. J. Frew, O. A. H. Hill., Anal Chem **59** (1987) 933.
- [6] G. A. Splittgerber., J. Chemical Education **62** 11 (1985) 1008.
- [7] O. Moe. R. Cornelius., J. Chemical Education **65** 2 (1988) 137.
- [8] I. S. West., Chemstry in Britain December (1988) 1220.
- [9] J. Stolkowski., Les Enzymes, 6^o édition (1983)
- [10] http://sti-bio.scola.ac-paris.fr/pedago/proteines/html/structure_prot.html
- [11] P.B. Daniels, J.K. Deacon, M.J. Eddowes, D.G. Peddley., Sensors and Actuators **15** (1988) 299.
- [12] K.A. Davis et T.R. Leary., Anal. Chem **61** (1989) 1227.
- [13] H. Maupas., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon, Spécialité électronique (1995)
- [14] G. Bidan, M. Billon, T. Livache, P. Mailley, A. Roget., l'actualité chimique - novembre-décembre 2003
- [15] <http://www.gnis-pedagogie.org/pages/docbio/chap4/4.htm>
- [16] V. Volotovskiy, Y. J. Nam. N. Kim., Sensors and Actuators B **42** (1997) 233.
- [17] A.P. Soldatkin, V. Volotovskiy, A.V. El'skaya, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet., Analytica Chimica Acta **403** (2000) 25.
- [18] H. Berney, J. West, E. Haefele, J. Alderman, W. Lane, J. K. Collins., Sensor and Actuat. B-Chem. **68** (2000) 100.
- [19] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet., Synthetic Met. **90** (1997) 205.
- [20] F. Wei, B. Sun, Y. Guo, X. Sheng Zhao., Biosensors and Bioelectronics **18** (2003) 1157.
- [21] F. Abdelmalek, M. Shadaram, H. Boushriha., Sensors and Actuators B **72** (2001) 208.
- [22] S. Yang, C. Salehi, P. Atanasov, E. Wilkins., Anal Letter **29** (1996) 1081.
- [23] E. Csoregi, C. P. Quinn, D. W. Schmdtke, S. E. Linqvist, M. V. Pishko, L. Ye, I. Katakis, J. A. Hubbel. A. Heller., Anal Chem **66** (1994) 3131.
- [24] L. C. Clark, L. K. Noyes, T. A. Grooms. C. A. Gleason., Clin Biochem **17** (1984) 288.

- [25] W. Kerner, M. Kiwit, B. Linke, F. S. Keek, H. Zier, E. F. Pfeiffer., *Biosensors and Bioelectronics* **8** (1993) 473.
- [26] J. C. Pickup, D. J. Claremont, G. W. Shaw., *Acta Diabetol* **30** (1993) 143.
- [27] R. Xiangling, M. Xianwei, C. Dong, T. Fangqiong, J. Jun., *Biosensors and Bioelectronics* **21** (2005) 433.
- [28] T.W.H. Oates, L. Ryves, M. M. M. Bilek, D.R. McKenzie., *Sensors and Actuators B* **109** (2005) 146.
- [29] S. Cosnier, J. J Fombon, P. Labbe', D. Limosin., *Sens. Actuators B* **59** (1999) 134.
- [30] S. Sotiropoulou, V. Gavalas , V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis., *Biosensors and Bioelectronics* **18** (2003) 211.
- [31] M. R. Wadkins, P. Joel. Golden, F. S. Ligler., *Analytical Biochemistry* **232** (1995) 73.
- [32] P. Corbisier, D. Lelie, B. Borreman, A. Provoost, V. Lorenzob, N. L. Brownc, J. R. Lloydc, J. L. Hobmanc, E. Cso»regid, G. Johanssond, B. Mattiasson., *Analytica Chimica Acta* **387** (1999) 235.
- [33] T. Wessa, M. Rapp, H. J. Ache., *Biosensors & Bioelectronics* **14** (1999) 93.
- [34] O. Tamarin, C. Dejous, D. Rebière, J. Pistre, S. Comeau, D. Moynet, J. Bezia., *Sensors and Actuators B* **91** (2003) 275.
- [35] A. Steinschaden, D. Adamovi, G. Jobst, R. Glatz, G. Urban., *Sensors and Actuators B* **44** (1997) 365.
- [36] M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Ph. Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic- Renault., *Sensors and Actuators B* **111** (2005) 390.
- [37] C. Bourdillon, M. J. Laval, D. Thomas. *J. Electrochem Soc: Electrochemical Science and technology* **706** Avril (1986).
- [38] K. Mosbach., *Methods in Enzymology : Immobilized Enzymes*. Academic Press New York (1976)
- [39] M. G. Boutelle, C. Stanford, M. Fillenz, W. J. Albery, P. Batlett., *Neuroscience Letter* **72** (1986) 283.
- [40] E. Csoregie, L. Gorton, D. Pfeiffer., *Anal Chim Acta*. **319** (1996) 79.
- [41] G. Palleschi, A. P. F. Turner., *Anal Chim Acta*. **234** (1990) 459.
- [42] J.L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé., *Talanta* **44** (1997) 2209.
- [43] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, P. J. Worsfold., *Analytica Chimica Acta* **201** (1987) 363.
- [44] W. Göpel., *Sensors: a comprehensive survey*. Vol.3. Chemical and biochemical sensors. VCH Weinhein (1991)

- [45] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi. S. Alegret., *Sensors and Actuators B* **69** 2000 153.
- [46] Y. G. LI, X. Y. Zhou, L. J. Feng. Z. Jiang and L.Ma., *Analytica Chimica Acta* **382** (1999) 277.
- [47] K. Wan, J. M. Chovelon. N. Jaffrezic-Renault., *Talanta* **52** (2000) 663.
- [48] G. A. Splittgerber., *J. Chemical Education* 62 Issue **11** (1985) 1008.
- [49] W. P. Atkins., *Physical Chemistry*. 3rd Ed Oxford University, Press New York (1982).
- [50] M. E. D'urso, R. P. Coulet., *Analytica Chimica Acta* **239** (1999) 105.
- [51] K. Armes, S. P. Camp., *Biology* 2nd ED CBS College Publishing New York (1982).
- [52] A. Juskiewicz, A. Zaborska, A. Laptas, Z. Olech., *Food Chemistry* **85** (2004) 553.
- [53] Z. Amtul, M. Rasheed, M. I. Choudhary, S. Rosanna, K. M. Khan, Atta-ur-Rahman. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **319** (2004) 1053.
- [54] J. Bao, K. Furumoto, M. Yoshimoto, K. Fukunaga, K. Nakao., *Biochemical Engineering Journal* **13** (2003) 69.
- [55] P.B. Daniels, J.K. Deacon, M.J. Eddowes, D.G. Peddley., *Sensors and Actuators* **15** (1988) 299.
- [56] A. S. Jdanova, S. Poyard, A. P. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault and C. Martelet., *Analytica chimica Acta* **321** (1996) 35.
- [57] A. M. Azevedo, D. Miguel, F. Prazeres, J. M.S. Cabral, L. P. Fonseca., *Biosensors and Bioelectronics* **21** (2005) 235.
- [58] Y. Zhang, S. Tadigadapa., *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2004) 1733.
- [59] K.A. Davis et T.R. Leary., *Anal. Chem* **61** (1989) 1227.
- [60] C. Hyun Yoon, K. Hak-Sung., *Analytica Chimica Acta* **336** (1996) 57.
- [61] Y. Udnana, I.D. McKelvie, M.R. Grace, J. Jakmunee , K. Grudpan., *Talanta* **66** (2005) 461.
- [62] H. Zhang, A. Galal, J. F. Rubinson, I. Marawi, T. H. Ridgway, S. K. Lunsford, H. Zimmer, H. B. Mark Jr., *Electrochimica Acta* **43** 1998 3511.
- [63] G. Palleschi, H.S. Rathore, M. Mascini., *Analytica Chimica Acta* **209** (1988) 223.
- [64] M. Aminur Rahman, D. Park, Y. Shim., *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2004) 1565.
- [65] S. Lin, C.- Liu, T. Choua., *Biosensors and Bioelectronics* **20** (2004) 9.
- [66] A. Salimi., R. Hallaj, M. Ghadermazi., *Talanta* **65** (2005) 888.
- [67] L. Mao, K. Yamamoto., *Analytica Chimica Acta* **415** (2000) 143.
- [68] A. Vijayakumar, E. CsOregi , T. Ruzgas, L. Gorton., *Sensors and Actuators B* **37** (1996) 97.
- [69] M. Gilis, H. Durliat, M. Comtat., *Analytica Chimica Acta* **355** (1997) 235.

- [70] H.R. Zarea, F. Memarzadeh, M. Mazloun. Ardakani, M. Namazian, S.M. Golabi., *Electrochimica Acta* **50** (2005) 3495.
- [71] E. Zilkha, T.P. Obrenovitch, A. Koshy, H. Kusakabe, H.P. Bennetto., *Journal of Neuroscience Methods* **60** (1995) 1.
- [72] C. Fu, L. Song, Y. Fang., *Analytica Chimica Acta* **399** (1999) 259.
- [73] S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie., *Analytica Chimica Acta* **448** (2001) 27.
- [74] J. Li, L.S. Chia, N.K. Goh, S.N. Tan., *Analytica Chimica Acta* **362** (1998) 203.
- [75] A. Curulli, F. Valentini, S. Orlanduci, M.L. Terranova, G. Palleschi., *Biosensors and Bioelectronics* **20** (2004) 1223.
- [76] K. Kolodsick, T. Ramstad., *Analytica Chimica Acta* **313** (1995) 75.
- [77] J. Schneider, B. Grhdig, R. Renneberg, K. Cammann, M.B. Madaras, R.P. Buck d, K.-D. Vorlop., *Analytica Chimica Acta* **325** (1996) 161.
- [78] Feng Qu, Zhu-Hua Qi, Ke-Na Liu, Shi-Fen Mou., *Journal of Chromatography A* **850** (1999) 277.
- [79] K. Yamamoto, H. Zenga., Y. Shen, M. Ahmed, T. Kato., *Talanta* **66** (2005) 1175.
- [80] A. M. Gue, H. Tap, P. Gros, F. Maury., *Sensors and Actuators B* **82** (2002) 227.
- [81] A. J. azka, T. Ruzgas, L. Gorton., *Talanta* **66** (2005) 1219.
- [82] K. Aiok, H. Uchida, T. Katsube, Y. Ishimaru, T. Iida., *Analytica Chimica Acta* **471** (2002) 3.
- [83] A. Sekia, S. Ikedaa, I. Kuboa, I. Karubeb., *Analytica Chimica Acta* **373** (1998) 9.
- [84] G. Luca, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, A. N. Araujo, J. L. F.C. Lima., *Analytica Chimica Acta* **366** (1998) 193.
- [85] D. P.A. Correia, J. M.C.S. Magalhaes, A. A.S.C. Machado., *Talanta* **67** (2005) 773.
- [86] B. Paczosa-Bator, J. Migdalski, A. Lewenstam., *Electrochimica Acta* **51** (2006) 2173.
- [87] S. S.M. Hassan, S. A.M. Marzouk, H. E.M. Sayour., *Talanta* **59** (2003) 1237.
- [88] J. Gallardo, S. Alegret, M. d. Valle., *Sensors and Actuators B* **101** (2004) 72.
- [89] A. Merkoci, S. Braga, E. Fàbregas. Alegret., *Analytica Chimica Acta* **391** (1999) 65.
- [90] K. Wang, J. Xu, K.Tang, H. Chen., *Talanta* **67** (2005) 798.
- [91] M.J. Schoëning, M. Arzdorf, P. Mulchandani, W. Chen, A. Mulchandani., *Sensors and Actuators B* **91** (2003) 92.
- [92] R. D. O'Neill., *Analyst* **119** (1994) 767.
- [93] C. A. Marquette., Loïc J. Blum., *Biosensors and Bioelectronics* **20** (2004) 197.
- [94] H. R. Zare, N. Nasirizadeh, S. Golabi, M Namazian, M. Mazloun-Ardakani, D.

- Nematollahi., *Sensors and Actuators B* **114** (2005) 610.
- [95] A. Curulli, F. Valentini, S. Orlanduci, M.L. Terranova, G. Palleschi., *Biosensors and Bioelectronics* **20** (2004) 1223.
- [96] J. M. Zen, Y.Y. Lai, H. H. Yang, A. Senthil Kumar., *Sensors and Actuators B* **84** (2002) 237.
- [97] R. Bilewicz, P. Rowinska, E. Rogalska., *Bioelectrochemistry* **66** (2005) 3.
- [98] P. A. Fiorito, Susana I. C. de Torresi., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **581** (2005) 31.
- [99] R. N. Goyal, V. K. Gupta, M. Oyama, N. Bachheti., *Electrochemistry Communications* **7** (2005) 803.
- [100] J.B. Sumner, The isolation and crystallization of the enzyme urease, *J. Biol., Chem* **69** (1926) 435.
- [101] S. Ciurli, S. Mangani., Nickel-containing enzymes, in: I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Handbook on Metalloproteins*, Marcel Dekker, NewYork, (2001) 669.
- [102] H. El-Sherif, P.L. Martelli, R. Casadio, M. Portaccio, U. Bencivenga, D.G. Mita., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **14** (2001) 15.
- [103] W. Fishbein, J. Daly., *Proc Soc Exp Biol. Med* **134** (1970) 1083.
- [104] S. Cesareo, S. Langton., *FEMS Microbiol Lett* **99** (1992) 15.
- [105] H. L. Mobley, B. D. Jones, J. L. Penner., *Clin Microbiol* **25** 2302.
- [106] W. Fishbein, P. Carbone. *J. Biol., Chem* **240** (1965) 2407.
- [107] *Dictionnaire Encyclopédique Alpha*, **23**, Grammont S. A. Suisse (1982).
- [108] R. M. Archibald., *J. Biol. Chem* **157** (1945) 507.
- [109] M. W. Weatherburn., *Anal. Chem* **39** (1967) 163.
- [110] D. James, B. Pring., *Clin Chim Acta* **62** (1975) 435.
- [111] Y. Nakamoto, I. Karube, S. Suzuki. *J Exp Biol Med* **53** (1975) 595.
- [112] M.J Goldfinch, C.R Lowe., *Anal. Biochem* **138** (1984) 430.
- [113] T.D. Yerian, G.D. Christian, J. Ruzicka., *Anal. Chim. Acta*, **204** (1988) 7.
- [114] S. Luo, D.R. Walt., *Anal Chem* **61** (1989) 1069.
- [115] S. Shi-Hul, X. Yuan-Jin, N. Li-Hua. Y. Shou-Zhuo., *Talanta* **42** (1995) 469.
- [116] T. Schalkhammer, C. Lobmaier, F. Pittner, A. F. R. Aussenegg, A. Leitner, H. Brunner., *Sensors and Actuators B* **24** (1995) 166.
- [117] G.A. Zhylyak, S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya., *Sensors and Actuators B* **24** (1995) 145.
- [118] O.A. Boubriak, A.P. Soldatkin, N.F. Starodub, A.K. Sandrovsky, A.K. El'skaya.,

- Sensors and Actuators B **26** (1995) 429.
- [119] S. Paddeu, A. Fanigliulo, M. Lanzi, T. Dubrovslq, C. Nicolini., Sensors and Actuators B **24** (1995) 876.
- [120] M. Mascini., Sensors and Actuators B **29** (1995) 121.
- [121] I. Walcerz, R. Koncki, E.Leszczynska, S. Glab., Analytica Chimica Acta **315** (1995) 289.
- [122] R. Koncki, G. J. Mohr, O. S. Wolfbeis., Biosensors and Bioelectronics **10** (1995) 653.
- [123] G. Pozniak, B. Krajewska, and Witold Trochimczuk., Biomaferiols **16** (1995) 129.
- [124] N. Kazanskaya, A. Kukhtin, M. Manenkova, N. Reshetilov, L. Yarysheva, O. Arzhakova, A. Volynskii, N. Bakeyev., Biosensors and Bioelectronics **11** (1996) 253.
- [125] S. B. Adeloju, S. J. Shaw, Gordon G. Wallace., Analytica Chimica Acta **323** (1996) 107.
- [126] T. Osaka, S. Komaba, M. Seyama, K. Tanabe., Sensors and Actuators B **35** (1996) 463.
- [127] A. Steinschaden, D. Adamovic, G. Jobst, R. Glatz, G. Urban., Sensors and Actuators B **44** (1997) 365.
- [128] T. Godjevargova, A. Dimov., Journal of Membrane Science **135** (1997) 93.
- [129] V. Volotovskiy, Y. J. Nam, N. Kim., Sensors and Actuators B **426** (1997) 233.
- [130] M. Chellapandian, M. R. V. Krishnan., Proces Biochemistry **33** (1998) 595.
- [131] A. Fahmy, V . B. Bagos, T. M. Mohammed., Bioresource Technology **64** (1998) 121.
- [132] S. Rejikumar, S. Devi., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **4** (1998) 61.
- [133] C. Marzadori, S. Miletti, C. Gessa, S. Ciurli., Soil Biol and Biochem **30** No 12 (1998) 1485.
- [134] A. M. Kayastha, N. Das., Biochemical Education **27** (1999) 114.
- [135] J. Laska, J. Wodarczyk, W. Zaborska., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **6** (1999) 549.
- [136] E. Hearn, R. J. Neufeld., Process Biochemistry **35** (2000) 1253.
- [137] Jyh-Ping Chen, Sy-Han Chiu., Enzyme and Microbial Technology **26** (2000) 359.
- [138] Won-Yong Lee, Seung-Ryeol Kim, Tae-Han Kim, Kang Shin Lee, Min-Chol Shin, Je-Kyun Park., Analytica Chimica Acta **404** (2000) 195.
- [139] B. Krajewska., W. I. Zaborska, M. Leszko., Journal of Molecular Catalysis B:

- Enzymatic **14** (2001) 101.
- [140] M. C. Yang, C. C. Lin., *Biomaterials* **22** (2001) 891.
- [141] S. Alkan, L. Toppare, U. Bakir, Y. Yagci., *Synthetic Metals* **123** (2001) 95.
- [142] F. Ayhan, H. Ayhan, E. Piskin, A. Tanyolas., *Bioresource technology* **81** (2002) 131.
- [143] R. Singhal, A. Gambhir, M.K. Pandey, S. Annapoorni, B.D. Malhotra., *Biosensors and Bioelectronics* **17** (2002) 697.
- [144] S. Akgol, Y. Yalcýnkaya, G. L. Bayramogclu, A. Denizli, M. Y. Arica., *Process Biochemistry* **38** (2002) 675.
- [145] Y. Hou, N. Jaffrezic-Renault, A. Zhang, J. Wan, A. Errachid, J. M. Chovelon., *Sensors and Actuators B* **86** (2002) 143.
- [146] G. Bayramoglu, H. Altýnok, A. Bulut , A. Denizli, M. Y. Arica., *Reactive and Functional Polymers* **56** (2003) 111.
- [147] A.P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault., *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2003) 131.
- [148] Yung-Chien Luo, Jing-Shan Do., *Biosensors and Bioelectronics* **20** (2004) 15.
- [149] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys., *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2004) 1641.
- [150] W. Limbut, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul, C. Limsakul, B. Wongkittisuksa., *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2004) 813.
- [151] Rajesh, V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto., *Reactive and Functional Polymers* **62** (2005) 51.
- [152] Z. Liang, C. Wang, Z. Tong , W. Ye, S. Ye., *Reactive and Functional Polymers* **63** (2005) 85.
- [153] F. Kuralay, H. Ozyoruk, A.a Yildiz., *Sensors and Actuators B* **109** (2005) 194.
- [154] Yves Stricot., Thèse de l'Ecole centrale de Lyon (1986).
- [155] Hurwitz and Lamy., " Propriétés électriques des interfaces chargées" Ed. Masson, (1978) 7 et 210.
- [156] D.C. Grahame., *Ann. Rev-physics. Chem.* **6** (1955) 337.

Chapitre II

*Traitement chimique et
caractérisation des surfaces
par la technique de
mouillabilité*

Chapitre II

Traitement chimique et caractérisation des surfaces par la technique de mouillabilité

Introduction

La mise en évidence de l'influence d'un traitement sur la propreté de la surface, ses propriétés chimiques ainsi que sa compatibilité vis-à-vis d'un matériau à adhérer n'est pas une tâche aisée. Les étapes préliminaires de la mise au point d'un traitement de surface particulier passent d'abord par diverses techniques de caractérisation de surface, plus simples à mettre en œuvre. Parmi ces techniques, l'observation de la mouillabilité du matériau par divers liquides (mesure de l'angle de mouillage) qui est très souvent utilisée pour mieux comprendre les phénomènes de surfaces et d'interfaces. En outre, l'interface solide-liquide joue un rôle primordial dans de nombreux processus tels que l'adhésion, la lubrification... .

Dans ce contexte, ce chapitre sera consacré à la caractérisation thermodynamique de la surface d'oxydes en se basant sur l'étude des interactions solide/liquides [1]. Il faut, en premier lieu, connaître la nature des forces se développant à la surface d'un solide ou d'un liquide permettant ainsi de déduire le caractère hydrophobe (faible énergie de surface) ou hydrophile (grande énergie de surface) et d'aboutir à la notion d'énergie libre afin de prévoir son comportement vis-à-vis de son environnement.

I- Propriétés énergétiques de surface

Les propriétés énergétiques de surface des différents oxydes sont étudiées par la méthode de la goutte posée. Un liquide sonde est déposé sur la surface à analyser et l'angle de

raccordement à la jonction des trois phases (solide, liquide et vapeur) est mesuré. Le profil de la goutte va varier en fonction des forces d'origine moléculaire (Van der Waals, liaisons «accepteur-donneur» d'électrons, électrostatiques et structurales) et d'origine topologique (de conformation).

Cette technique nous permet de déterminer :

- Le caractère hydrophile/hydrophobe des différentes surfaces.
- L'énergie libre totale des surfaces étudiées et ses composantes acide, base, polaire, apolaire, ...

La technique de mouillabilité est basée sur la détermination de l'angle de raccordement à la jonction des phases solide/liquide/vapeur. Cet angle de raccordement du liquide sur le solide est déterminé par les énergies superficielles du liquide et du solide (γ_{LG} , γ_{SG}) et interfaciales (γ_{SL}) des phases en équilibre suivant la relation de Young-Dupré [1]:

$$\gamma_{LG} \cos\theta + \gamma_{SL} - \gamma_{SG} = 0 \quad (\text{éq.II-1})$$

Avec :

γ_{SG} : la tension superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide.

γ_{SL} : l'énergie libre interfaciale entre le solide et le liquide.

γ_{LG} : la tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur.

θ : l'angle de contact.

La relation donnée par l'équation II-1 peut être représentée vectoriellement suivant le modèle de Young-Dupré (Figure II-1).

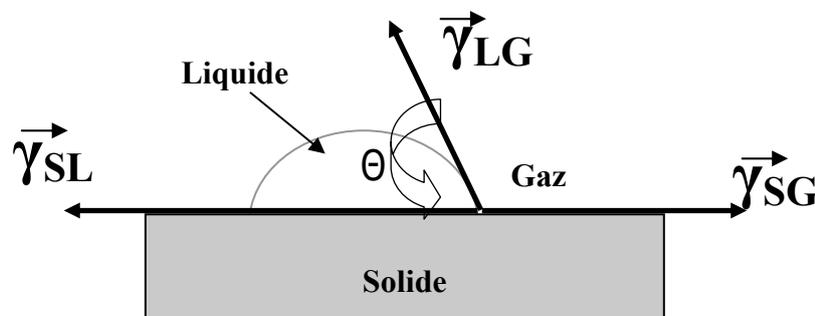


Figure II-1: Angle de mouillage d'un liquide sur une surface solide et équilibre des forces à l'interface air/liquide/solide.

I.1- Effet du traitement chimique sur l'état de la surface : Cas de SiO_2 et de Si_3N_4

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des surfaces de silice (SiO_2) et de nitrure de silicium (Si_3N_4). Ces dernières revêtent un grand intérêt aussi bien pour l'élaboration des dispositifs électrochimiques (capteurs) ainsi que pour celle des dispositifs électroniques (diode, transistor,...). En effet, l'état de surface joue un rôle primordial sur les performances d'un tel dispositif, notamment lorsqu'il est appliqué aux capteurs électrochimiques.

Pour la mesure de l'angle de contact, nous avons utilisé une méthode simple basée sur la photographie d'une goutte de dimensions définies à l'aide d'un appareil de la société GBX (France). Une goutte de $2\mu\text{L}$ d'un liquide sonde est déposée à l'aide d'une micro seringue. L'image de la goutte est enregistrée à l'aide d'une caméra vidéo (Figure II-2). L'angle de contact θ est déterminé à partir de l'enregistrement de la cinétique d'étalement de la goutte après le premier contact durant environ 15 secondes. La procédure de mesure est répétée plusieurs fois. Le tracé de l'angle en fonction du temps permet de déterminer l'angle à l'équilibre thermodynamique. C'est cet angle qui est utilisé dans les calculs de l'énergie de surface.

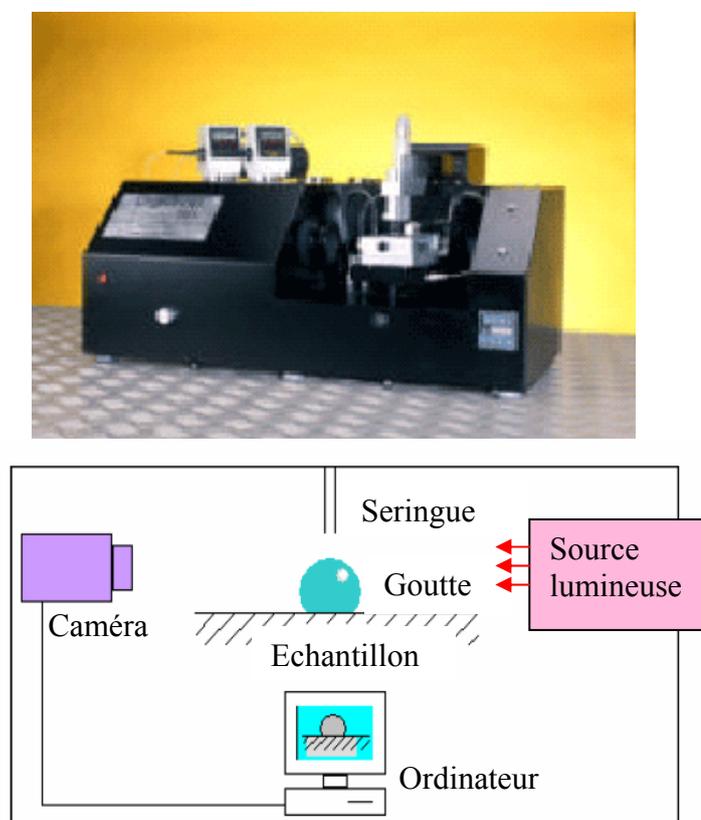


Figure II-2 : Appareil Digit Drop et *principe de mesure de l'angle de contact.*

I.2- Effet du nettoyage sur l'état de surface

La procédure de traitement chimique de surface utilisée dans notre travail joue un double rôle dont le premier consiste à dégraisser et nettoyer la surface de l'oxyde, et le second sert à l'activation des groupements superficiels de la surface. Généralement, la nature hydrophile ou hydrophobe d'une surface solide est décrite en terme de mouillabilité avec l'eau. En effet, la surface est considérée hydrophile si l'eau s'étale spontanément sur celle-ci ; ce qui conduit à une valeur d'angle de contact proche de zéro et un coefficient d'étalement ($\cos\theta$) supérieur à zéro.

Le coefficient d'étalement détermine, selon son signe, l'amplitude de l'étalement (mouillage) du liquide sur le substrat. Lorsque l'angle de contact est important ou que le coefficient d'étalement est inférieur à zéro, il qualifie la surface d'hydrophobe. La [figure II-3](#) montre l'étalement d'une goutte d'eau sur une surface de nitrure de silicium avant et après nettoyage. Dans le premier cas, nous remarquons que l'angle de contact de la goutte d'eau est important indiquant le caractère hydrophobe de la surface de nitrure de silicium.

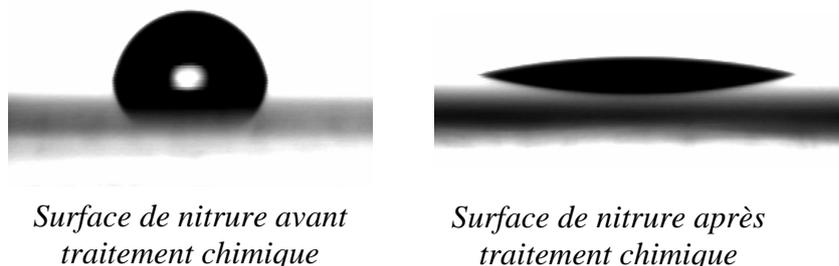


Figure II-3 : Images d'une goutte d'eau déposée sur la surface de nitrure de silicium.

L'hydrophobicité peut être expliquée par la présence d'impuretés (graisse, poussière,...) qui peuvent masquer la réactivité réelle de la surface de l'oxyde vis-à-vis de l'eau. Pour augmenter cette réactivité, il est nécessaire d'effectuer des traitements permettant de nettoyer la surface. Dans notre étude, nous avons utilisé trois solvants organiques (trichloréthylène, acétone et isopropanol) et un mélange sulfochromique (mélange de $K_2Cr_2O_7$ et d'acide sulfurique H_2SO_4) [2]. Les structures à base d'oxyde de silicium et de nitrure de silicium sont nettoyées par ultrasons dans l'ordre: trichloréthylène, acétone puis l'isopropanol.

I.3- Mesure de l'angle de contact sous atmosphère non saturée en vapeur de solvant

Trois liquides sondes ont été utilisés pour caractériser la surface : le diiodométhane (solvant apolaire), le formamide (solvant moyennement polaire) et l'eau (solvant polaire). Le caractère hydrophile ou hydrophobe de l'oxyde se détermine à partir de l'angle obtenu avec l'eau. Les propriétés énergétiques de surfaces (énergie, composante acide, composante basique, tension de surface...) des différents oxydes étudiés sont déterminées en utilisant le modèle de Van-Oss. Ce modèle permet d'accéder aux propriétés chimiques de la surface [3].

I.3.1- Caractère hydrophile/hydrophobe

Le caractère hydrophile d'une surface est généralement décrit en terme de mouillabilité avec l'eau. Dans notre étude, nous avons contrôlé le changement de mouillabilité de la surface dans le but d'optimiser un protocole de nettoyage adéquat permettant d'obtenir une surface propre et hydrophile. Les valeurs d'angle de contact obtenues en utilisant l'eau comme liquide sonde montrent que le mode de nettoyage influe fortement sur les propriétés de la surface.

L'histogramme donné par la [figure II-4](#) représente la variation de l'angle de contact des deux oxydes étudiés en fonction de l'étape de nettoyage. On remarque que les surfaces d'oxydes traitées à l'eau sont hydrophobes. Après un traitement chimique, on observe une diminution de l'angle de contact en fonction du processus de nettoyage. En outre, l'oxyde de silicium et le nitrure de silicium n'atteignent leurs caractères hydrophiles qu'après un traitement sulfochromique. En revanche, les effets des solvants organiques sur la qualité de surface sont faibles puisqu'ils agissent seulement sur la propreté et non sur l'hydrophilité de la surface.

Dans le cas de l'oxyde de silicium, le nettoyage par les solvants organiques ne fait qu'augmenter l'angle de contact. Ceci est sans doute dû aux traces de solvants qui s'adsorbent à la surface de l'oxyde de silicium sans être désorbées par simple rinçage à l'eau. Par ailleurs, la diminution de l'angle de contact dans le cas du nitrure de silicium montre sa faible affinité vis-à-vis des solvants organiques contrairement à l'oxyde de silicium. Ceci permet de conclure que le nettoyage avec les solvants organiques n'a qu'un effet limité. L'attaque sulfochromique suivie d'une étape d'hydratation régénère une surface très hydrophile. L'importance de l'étape d'hydratation a été observée dans le cas du nitrure de silicium

pendant 24 heures pour aboutir au même résultat que celui obtenu dans le cas de l'oxyde de silicium hydraté pendant 1 heure.

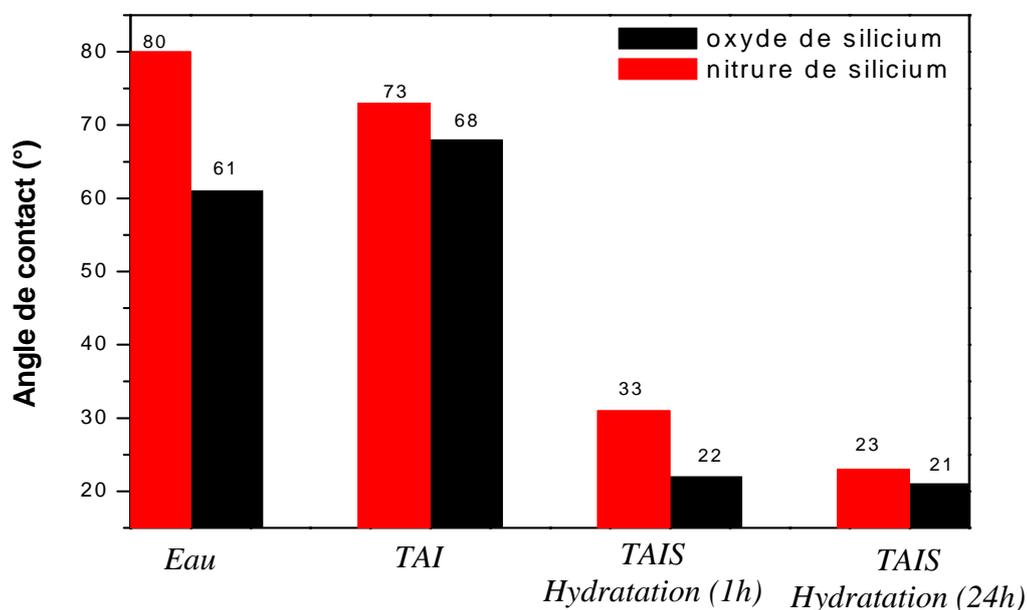


Figure II-4 : Mesures de l'angle de contact de différents oxydes après chaque étape de nettoyage.

Ce résultat conforte l'idée qui montre que la surface de nitrure de silicium en contact prolongé avec l'eau se rapproche de celle de l'oxyde de silicium [4]. L'augmentation du caractère hydrophile de la surface de l'oxyde après l'attaque sulfochromique est attribuée à la présence des groupements polaires silanols Si-OH à la surface de l'oxyde de silicium [5], et des groupements silanols Si-OH et silylamines Si-NH₂ à la surface de nitrure de silicium [6].

I.3.2- Energie de surface

L'énergie de surface d'un solide dans le vide/air est réduite suite à l'adsorption de vapeur du liquide. On a alors $\gamma_{sv} = \gamma_s - \Pi_{sv}$ avec Π_{sv} : la pression d'étalement du liquide sur le solide. Selon C.J. Van Oss, Π_{sv} est considérée comme négligeable [1]. Nous assimilerons par la suite γ_{sv} à γ_s . Lors du la dépôt d'une goutte de liquide sonde sur la surface, une interface est créée consommant une quantité d'énergie γ_{sl} . Le travail d'adhésion réversible

entre le solide et le liquide correspond au travail qu'il faut fournir pour séparer une unité d'air de l'interface solide/liquide en interfaces solide/vapeur et liquide/vapeur. Cette valeur est donnée par la relation de Dupré :

$$W_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - \gamma_{SL} \quad (\text{éq.II-2})$$

La combinaison des équations (1) et (2) conduit à la relation de Young-Dupré :

$$W_{SL} = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta) \quad (\text{éq.II-3})$$

F.M. Fowkes a proposé que la tension de surface d'un liquide polaire ou l'énergie libre de surface d'un solide polaire soit décomposée de la façon suivante [7] :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p + \gamma^h + \gamma^{ad} + \gamma^e \quad (\text{éq.II-4})$$

Avec :

γ : tension de surface du liquide ou l'énergie libre de surface.

γ^d : composante due à la dispersion.

γ^i : composante due aux interactions dipôle-dipôle induites

γ^p : composante due aux interactions dipôle-dipôle.

γ^h : composante due aux liaisons hydrogène.

γ^{ad} : composante due aux interactions accepteur-donneur d'électrons.

γ^e : composante due aux interactions électrostatiques.

Selon C.J. Van Oss et al, les trois premiers termes peuvent être combinés dans la composante de Lifshitz van der Waals [8]:

$$\gamma^{lw} = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p \quad (\text{éq.II-5})$$

Dans notre cas, nous supposons qu'il n'y a pas d'interactions électrostatiques. L'énergie libre de surface d'un solide ou la tension de surface d'un liquide s'écrit :

$$\gamma = \gamma^{lw} + \gamma^{ab} \quad (\text{éq.II-6})$$

Avec γ^{ab} : la composante acido-basique de l'énergie de surface.

Selon Van Oss et al, cette composante acido-basique peut s'exprimer en fonction de deux paramètres non additifs : la tension de surface accepteur d'électrons (γ^+ , composante acide de l'énergie de surface) et la tension de surface donneur d'électrons (γ^- , composante basique de l'énergie de surface) qui résultent respectivement des interactions des accepteurs et des donneurs d'électrons. Nous avons alors la relation suivante :

$$\gamma^{ab} = 2 \sqrt{(\gamma^+ \times \gamma^-)} \quad (\text{éq.II-7})$$

Le travail d'adhésion d'un liquide sur un solide, W_{SL} , s'écrit alors :

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_{LV} - \gamma_{SL} = 2 [\sqrt{(\gamma_S^{lw} \times \gamma_L^{lw})} + \sqrt{(\gamma_S^+ \times \gamma_L^-)} + \sqrt{(\gamma_S^- \times \gamma_L^+)}] = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta) \quad (\text{éq.II-8})$$

Cette équation comprend trois inconnues : γ_S^{lw} , γ_S^+ et γ_S^- qui seront déterminées en mesurant l'angle de contact de trois liquides sondes.

Les propriétés énergétiques de surface des différents oxydes étudiés ont été déterminées en utilisant le modèle de Van Oss qui est le plus approprié pour la surface solide [1]. Les trois liquides sondes utilisés sont: l'eau bidistillée, le formamide et le diiodométhane.

La [figure II-5](#) montre les profils d'étalement d'une goutte de solvant (dans son état d'équilibre) déposée sur la surface d'un substrat de nitrure de silicium.



Figure II-5 : Mouillage de la surface de nitrure de silicium en présence de différents liquides sondes.

Le [tableau II-1](#) regroupe les résultats de modification de la mouillabilité des surfaces de silice et de nitrure de silicium sous l'effet d'un traitement chimique.

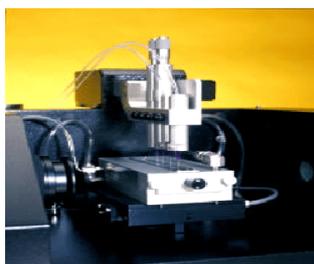
Tableau II-1 : Energie de surface et ses composantes selon le modèle de Van-Oss.

Nettoyage	Oxyde de silicium				Nitrure de silicium			
	$\Theta_{\text{Eau}} (^{\circ})$	Energie de surface (mJ/m ²)	γ_{OH^-} (mJ/m ²)	γ_{H^+} (mJ/m ²)	$\Theta_{\text{Eau}} (^{\circ})$	Energie de surface (mJ/m ²)	γ_{OH^-} (mJ/m ²)	γ_{H^+} (mJ/m ²)
Rinçage à l'eau	61	42.5	14,3	4,4	80	32.1	6,4	1,1
Trichloréthylène Acétone + Isopropanol (TAI)	68	39.1	9,7	4	73	36.1	8,4	2,6
TAI + Sulfochromique + hydratation (1h)	22	58.6	46,2	5,5	31	56.3	38,4	5,6
TAI + Sulfochromique + hydratation (24h)	21	59	44,8	5,8	23	58.3	44,6	5,5

D'après les résultats ci-dessus, on remarque que la valeur de l'énergie libre augmente avec le caractère hydrophile de la surface d'oxyde. Lorsque la surface de l'oxyde est non traitée, l'angle de contact est assez élevé, ce qui conduit à une énergie de surface faible. L'augmentation de cette énergie (diminution de l'angle de contact) s'observe après traitement chimique et hydratation de la surface et atteint une valeur maximale de 59 mJ/m². Au cours du traitement chimique, la surface de l'oxyde devient de plus en plus polaire. L'augmentation des composantes acides γ_{H^+} et basiques γ_{OH^-} après le traitement sulfochromique entraîne donc une augmentation des groupements superficiels Si-OH (amphotère) et Si-NH₂ (basique) à la surface des oxydes.

I.4- Mesure de l'angle de contact sous atmosphère saturée en vapeur de solvant

Dans ce cas, les mesures d'angle de contact sont effectuées dans une chambre à température réglable dont l'atmosphère est saturée en vapeur de solvant (Figure II-6). Le calcul théorique de l'énergie de surface et de ses composantes se fait à une température de 20°C. Pour cette raison, il a été nécessaire de fixer la température de la chambre à cette valeur.

**Figure II-6** : Chambre thermostatée

Les résultats des mesures d'angle de contact effectuées sous atmosphère saturée en vapeur de solvant pour des substrats d'oxyde de silicium et de nitrure de silicium sont regroupés dans le [tableau II-2](#).

Tableau II-2 : Angle de contact et différentes composantes en énergie (modèle de Van-Oss).

	Oxyde de silicium				Nitrure de silicium			
	$\Theta_{\text{Eau}} (^{\circ})$	Energie de surface (mJ/m ²)	γ_{OH^-} (mJ/m ²)	γ_{H^+} (mJ/m ²)	$\Theta_{\text{Eau}} (^{\circ})$	Energie de surface (mJ/m ²)	γ_{OH^-} (mJ/m ²)	γ_{H^+} (mJ/m ²)
Nettoyage								
Rinçage à l'eau	74	38.8	7.9	1	79	38.3	8.4	0.1
Trichloréthylène Acétone + Isopropanol (TAI)	75	42.8	5.4	1.6	78	36.3	6.6	0.6
TAI + Sulfochromique + hydratation (1h)	39	48.1	39.7	1.4	51	49.5	21	1.1
TAI + Sulfochromique + hydratation (24h)	32	55.6	37.8	1.8	33	57.4	35.6	2.4

Les résultats obtenus à la pression atmosphérique dans l'air ne sont pas en bon accord avec ceux obtenus sous atmosphère saturée en vapeur de solvant. Ceci montre bien l'effet de l'environnement gazeux sur l'étalement de la goutte à la surface de l'oxyde.

I.5- Etude de la variation de l'angle de contact en fonction du pH

Parmi les facteurs qui peuvent influencer la mouillabilité de la surface solide, on peut citer la température, l'humidité, le pH... Dans cette étude, nous avons étudié l'influence du pH sur la mouillabilité de la surface de l'oxyde. Pour la mesure d'angle de contact en fonction du pH, nous avons utilisé l'eau comme liquide test pour différentes valeurs de pH (ajustées par ajout de HCl ou NaOH). Fowkes et al [9-11], ont montré que lorsqu'une surface solide contient des sites acides, ces derniers interagissent fortement avec les sites basiques du liquide sonde. De même, une surface solide contenant des sites basiques interagit fortement avec les sites acides du liquide sonde. Berg [12], a expliqué le rôle significatif des interactions acide-base avec le liquide sonde en reliant quantitativement la contribution des interactions acide-base, γ^{ab} au travail général d'adhésion du liquide à la surface solide, W_{SL} .

L'histogramme de la [figure II-7](#) montre la variation de l'angle de contact en fonction du pH de la goutte d'eau déposée. Les mesures sont effectuées pour des substrats de nitrures de silicium et d'oxyde de silicium traités dans les mêmes conditions. La variation de mouillabilité de la surface de l'oxyde en fonction du pH de la goutte déposée est moins marquée pour le nitrure sauf à des valeurs élevées de pH. L'interaction des groupements chimiques de la surface avec les ions H^+ et OH^- de l'eau détermine le pouvoir mouillant du liquide à un pH donné.

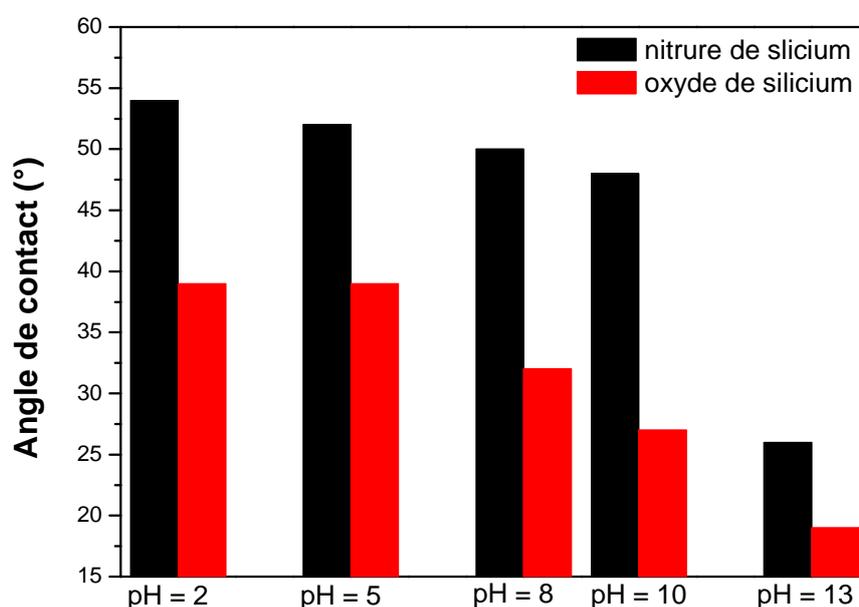
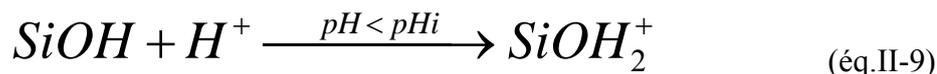


Figure II-7 : Variation de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur la surface de silice et de nitrure pour différentes valeurs de pH.

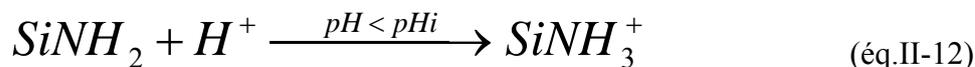
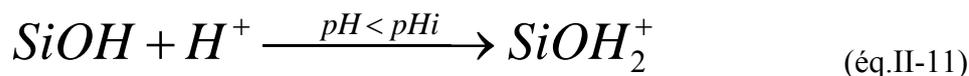
Dans le cas de l'oxyde de silicium et de nitrure de silicium, une forte variation de mouillabilité est observée pour des milieux très basiques.

Pour des pH acides, la variation de l'angle de contact en fonction du pH est presque constante. Ceci est dû au caractère hydrophobe de la surface de l'oxyde donné par la présence des groupements $Si-OH_2^+$ dans le cas de l'oxyde de silicium et des groupements $Si-OH_2^+$, $Si-NH_3^+$ dans le cas de nitrure de silicium. La modification de la mouillabilité observée dans la gamme des pH basiques est due au caractère hydrophile donné par la présence des groupements $Si-O^-$ dans le cas de la silice et les groupements $Si-O^-$, $Si-NH_2$, dans le cas du nitrure de silicium.

La réactivité de la surface d'oxyde est gouvernée par la répartition des charges entre la surface solide (oxyde) et le milieu liquide (goutte déposée). En outre, chaque oxyde est caractérisé par une valeur de pH_i correspondant à une charge nulle. Dans le cas de l'oxyde de silicium ($pH_i = 2$) on rencontre un seul site de type Si-OH à caractère amphotère et qui donne naissance selon Van den Berg et al aux équilibres suivants [13]:



Dans le cas du nitrure de silicium ($pH_i = 4$), la réactivité de la surface est déterminée par la présence des sites Si-NH₂ et Si-OH. En contact avec l'eau, ces derniers donnent naissance aux équilibres suivants [14,15] :



Ces types d'équilibres, qui se produisent à l'interface solide/liquide, peuvent expliquer le changement de la mouillabilité de la surface de l'oxyde en fonction du pH .

I.6- Mesure de l'hystérèse

L'hystérèse consiste à mesurer l'angle à l'avancée et au retrait de la goutte, ce qui permet d'obtenir des renseignements sur l'homogénéité physique ou chimique de la surface [16]. Dans ce travail, nous avons étudié l'hystérèse dans le cas de l'oxyde de silicium et du nitrure de silicium.

Les mesures ont été réalisées sur un tensiomètre à une température de 20°C. Le principe de mesure consiste à tremper et retirer l'échantillon (1cm²) perpendiculairement au

liquide sonde. Les trois liquides utilisés sont l'eau, le formamide et le diiodométhane. Le principe de mesure est donné par la [figure II-8](#).

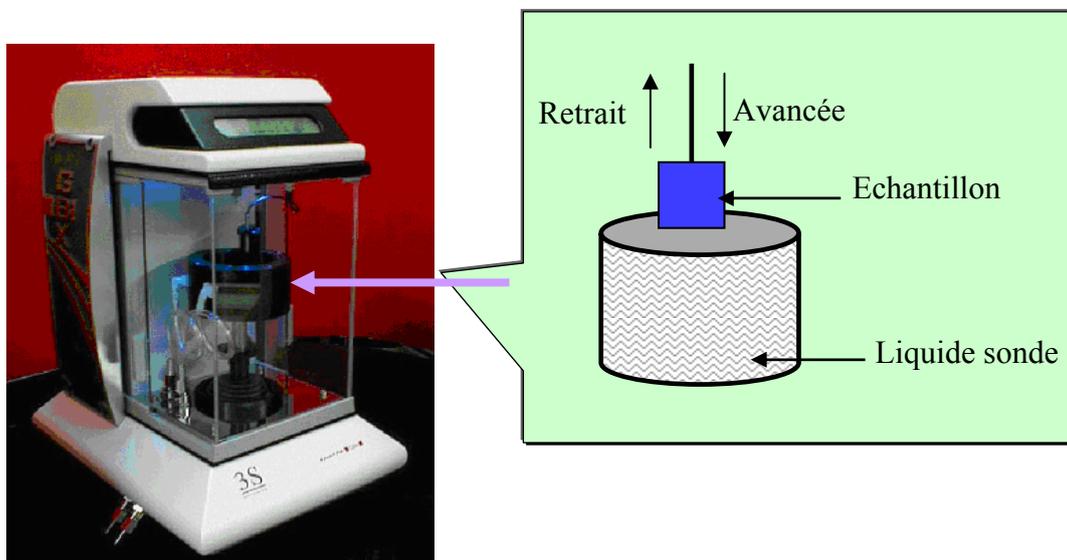


Figure II-8 : Appareil de mesure et principe de mesure de l'hystérèse.

La [figure II-9](#) montre la superposition de 5 cycles d'hystérèses obtenus pour un substrat de nitrure de silicium.

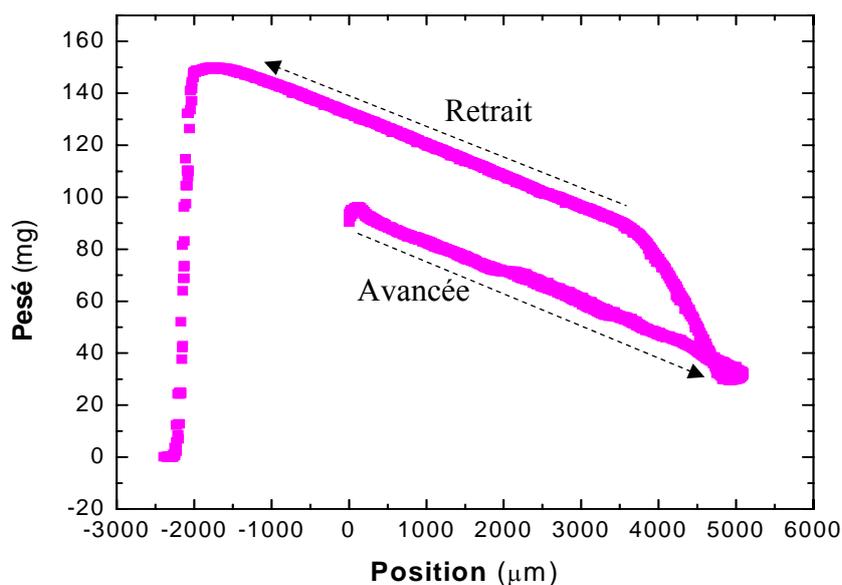


Figure II-9 : Courbes d'hystérèse de nitrure de silicium, 5 cycles.

En utilisant la relation classique $\Theta_{\text{avancée}} = R \Theta_{\text{retrait}}$, on peut déduire le facteur de rugosité R.

Si $R = 1$, la surface est non rugueuse. Si $R \neq 1$, la surface est rugueuse.

I.6.1- Cas du nitrure de silicium

Tableau II-3 : Angles à la retrait et à l'avancée pour différents solvants dans le cas de nitrure de silicium.

Liquide	$\theta_{\text{avancée}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{retrait}} (^{\circ})$	$\Delta\theta (^{\circ})$
Eau	67.5	58.7	8.4
Formamide	65	66.2	-1.2
Diiodométhane	54.3	53.2	1.1

I.6.2- Cas de l'oxyde de silicium

Tableau II-4 : Angles à la retrait et à l'avancée pour différents solvants dans le cas de l'oxyde de silicium.

Liquide	$\theta_{\text{avancée}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{retrait}} (^{\circ})$	$\Delta\theta (^{\circ})$
Eau	66.3	61.8	4.5
Formamide	59.3	60.7	-1.4
Diiodométhane	57.4	56.8	0.5

Les valeurs de R calculées pour le nitrure de silicium et l'oxyde de silicium sont respectivement 0.87 et 0.93. Ces valeurs permettent de conclure que la surface de nitrure de silicium est un peu plus rugueuse que celle d'oxyde de silicium. Ce résultat est en désaccord avec les données de la littérature où les surfaces des deux matériaux sont considérées comme

lisses. Les différences observées pour les valeurs de R peuvent sans doute être interprétées en termes d'hétérogénéité chimique.

Conclusion

La caractérisation de surfaces de divers matériaux par mesure d'angle de contact nous a permis de contrôler le changement de mouillabilité de la surface au cours d'un traitement chimique. Le changement des caractères thermodynamiques de la surface tels que l'hydrophilicité, la basicité ou l'acidité... modifie l'énergie libre de la surface. Cette énergie va jouer un rôle majeur au cours de l'adhésion d'une entité chimique ou biologique à la surface d'un matériau solide.

Ces études ont permis d'optimiser un protocole de nettoyage de la surface de nitrure de silicium utilisé par la suite pour l'élaboration d'un dispositif capteur et qui fera l'objet des chapitres III, VI et V.

Références bibliographiques du chapitre II

- [1] C.J. Van Oss., (1996), Forces interfaciales en milieu aqueux. Ed. Masson, Paris.
- [2] H. Barhoumi, A. Maaref, R. Mlika, C. Martelet, N. Jafferzic-Renault, L. Ponsoynet.,
Materials Science and Engineering C **25** (2005) 61.
- [3] Van Oss C.J., Ju L., M.K. Chaudhury, R.J. Good., Journal of Colloid and Interface
Science **182** (1989) 313.
- [4] H. Perrot., Thesis. Ecole Centrale de Lyon, France, 1990.
- [5] Y. Duvault-Herrera, N. Jaffrezic-Renault, P. Clechet, J. Serpinet, D. Morel., Colloids Surf.
50 (1990) 197.
- [6] B. Hajji, P. Temple-Boyer, J. Launay, T. do Conto, A. Martinez., *Microelectronics
Reability* **40** (2000) 83.
- [7] F.M. Fowkes. Attractive forces at interfaces., Industrial Engineering and Chemistry
56 (1964) 40.
- [8] C.J. Van Oss, R.J. Good, H.J. Busscher., Journal of Dispersion Sciences Technology, 11
- [9] G. Fourchet., Polymer Eng. Sci **35** (1995) 957.
- [10] F. M. Fowkes, D. O. Tishler, J. A. Wolfe, L. A. Lannigan, C. M. Ademu-John, M.
J. Halliwell., J. Polym. Sci. Chem. Ed. **22** (1984) 547.
- [11] W. Wu, R.F. Jr. Griese, C. J. van Oss., Powder Technology **89** (1996) 129.
- [12] J. C. Berg., Nordic Pulp and Paper Research Journal **1** (1993) 75.
- [13] A. Van den Berg, P. Bergveld, D. Reinhoudt, E. Sudholter., Sens Actuators **8** (1985) 129.
- [14] C. Fung, P. Cheung, W. Ko., IEEE Trans Electron Devices **33** (1986) 3.
- [15] D. Hame, L. Bousse, J. Shott, J. Meindl., IEEE Trans Electron Devices **34** (1987)
1700.
- [16] R. J. Good., Journal of Adhesion Science and Technology. **12** (1992) 1269.

Chapitre III

***Immobilisation de l'uréase
dans des polymères latex
biodégradables : biocapteur
d'urée***

Chapitre III

Immobilisation de l'uréase dans des polymères latex biodégradables : biocapteur d'urée

Introduction

Actuellement, une grande attention est portée sur la recherche de nouvelles stratégies d'immobilisation des enzymes. Ces dernières sont fortement impliquées dans la réalisation des biocapteurs et des bioréacteurs pour répondre aux attentes de plusieurs secteurs : alimentaire, clinique, pharmaceutique, agriculture, cosmétique...[1]. La phase critique dans ces domaines est l'optimisation des protocoles d'immobilisation sans que l'activité biologique soit altérée. Parmi ces enzymes, l'uréase qui a de nombreuses applications dans les domaines biomédicaux et alimentaires. Dans ce contexte, plusieurs biocapteurs d'urée ont été développés intégrant une grande variété de matrices organiques à base de polymères servant de support d'immobilisation de l'uréase. Par exemple, l'uréase a été immobilisée sur la surface de nombreux matériaux comme le poly(chlorure de vinyle) [2], le polygalacturonate [3], le poly(glycidyl méthacrylate) [4], l'acrylonitrile [5], le Nafion [6], l'alcool polyvinylique [7], la polyaniline [8], le poly(méthylène co-guanidine) [9], le poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N*-acryloxysuccinimide-*co*-2-hydroxyéthyl méthacrylate) [10], le nylon [11], le polyacrylonitrile [12], le chitosane [13], le polyamide [14], le poly(*N*-vinyl carbazole) [15], le poly(éthylène glycol diméthylacrylate/2-hydroxy éthylène méthacrylate) [16], le poly(hydroxyéthyle méthacrylate-*co*-glycidyl méthacrylate) [17], le poly éthylènimine

[18], le poly(éthylène glycol) [19], le poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) [20], la poly(vinylpyrrolidone) [21], le poly(vinylalcohol-polyacrylamide) [22], le poly(5-hydroxyméthyl-bicyclo[2.2.1]-hept-2-ène et dérivés cationiques de polynorbornène [23].

Dans ce chapitre, nous avons testé quatre polymères organiques pour immobiliser l'uréase à la surface d'une électrode IS (isolant-semiconducteur) en présence d'un agent de réticulation (le glutaraldéhyde) en vue du développement d'un biocapteur d'urée. Ces polymères latex biodégradables testés au cours de notre travail sont constitués par un polymère neutre fonctionnalisé par des groupements hydroxy (poly(5-hydroxyméthyl-bicyclo[2.2.1]-hept-2-ène)) et trois dérivés cationiques de poly(norbornène) qui diffèrent par l'entité anionique associée(chlorure, acétate et lactobionate). Les performances du biocapteur urée en dérivant ont été évaluées par des mesures électrochimiques capacité-potentiel C(V). En outre, nous avons utilisé la voltamétrie à balayage linéaire et la spectrophotométrie UV-Visible respectivement, pour étudier la perméabilité des matrices mises en jeu et contrôler l'activité de l'enzyme immobilisée au sein des polymères.

I - Présentation des matrices d'immobilisation

Avant d'utiliser les supports organiques, nous avons essayé tout d'abord un support classiquement utilisé dans l'immobilisation des enzymes qui est le BSA (Bovine Sérum Albumine) [24]. Les matériaux organiques testés au cours de notre travail sont donnés par la [figure III-1](#).

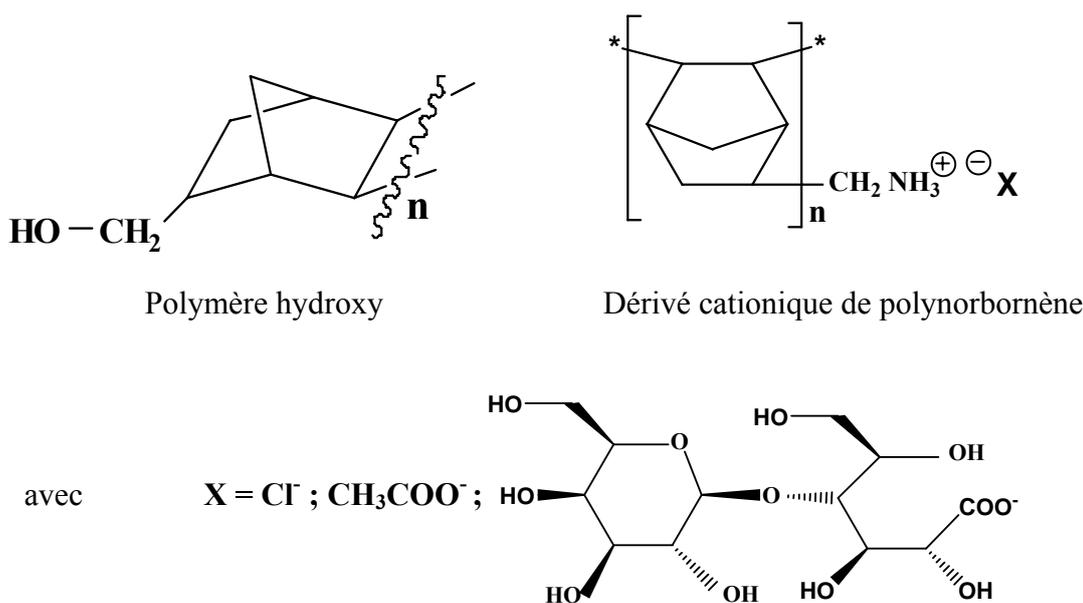


Figure III-1: Structure des matrices d'immobilisation.

Ces matériaux organiques ont été synthétisés au laboratoire des I.M.R.C.P (Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique) de l'Université Paul Sabatier Toulouse (France). Le chlorure de méthylène ammonium polynorbornène est obtenu selon la procédure adoptée par Serres et al [25], Noël et al [26], Franceschi et al [27]. Les autres dérivés de méthylène ammonium polynorbornène, comprenant des contre ions acétate et lactobionate sont obtenus après neutralisation du chlorure de méthylène ammonium polynorbornène par NaOH. Ensuite, le traitement par l'acide acétique ou l'acide lactobionique dans un mélange eau/méthanol (15/85, v/v) conduit à la formation du dérivé cationique préférentiel comme le montre la figure III-2. Le titrage des dérivés polycationiques obtenus par une solution de NaHCO₃ a permis d'estimer leurs degrés de protonation qui sont de l'ordre de 100, 70 et 50 % respectivement pour le polymère chlorure, acétate et lactobionate [28].

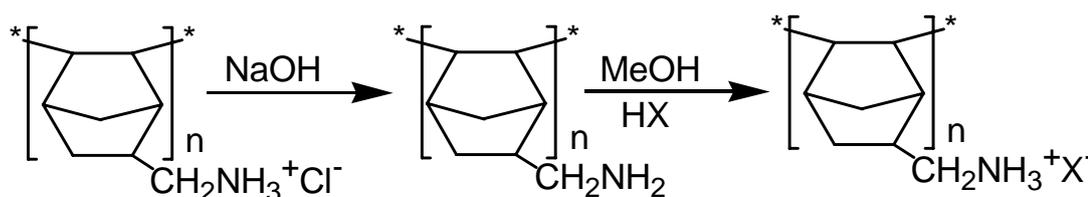


Figure III-2 : Schéma de synthèse des dérivés de polynorbornènes, X est un contre ion acétate ou lactobionate.

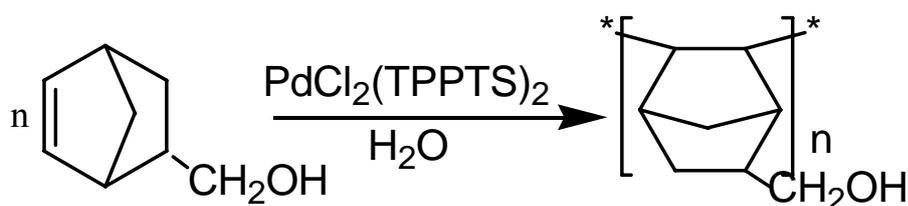


Figure III-3 : Polymérisation du polymère 5-hydroxyméthylbicyclo [2.2.1] hept-2-ène catalysé par $\text{PdCl}_2(\text{TPPTS})_2$.

Le polymère organique fonctionnalisé par les groupements hydroxy est obtenu selon la procédure décrite par L. Puech et al [29,30]. La polymérisation se fait en présence d'une monophosphine trisulfonée (TPPTS) comme le montre la figure III-3.

II- Substrat transducteur Si/SiO₂/Si₃N₄ et technique de fonctionnalisation

Le substrat étudié Si/SiO₂/Si₃N₄ provient de l'institut de Microélectronique de l'université de Neuchâtel (Suisse). Il est constitué par une plaque monocristalline de silicium de type p, d'orientation (100), d'épaisseur 400 µm et de résistivité 10 Ω cm, recouverte d'une couche de nitrure de silicium de 100 nm déposée par LPCVD (Low Pressure Chemical Vapour Deposition) à 750 °C avec un rapport NH₃/SiH₂Cl₂ égal à 12 et une vitesse de croissance de 15 Å/min. L'indice de réfraction de la couche déposée est de 1,99. Le contact électrique de la face arrière est assuré par un dépôt d'un mélange Indium/Galium de proportion 3/8:5/8.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé la technique d'étalement d'une couche mince contenant les biomolécules d'uréase (réticulées par des vapeurs de glutaraldéhyde dans une matrice organique adaptée) sur un wafer de silicium/nitrure par "spin-coating". Cette technique bien admise est largement employée pour la fabrication des biocapteurs et des micropuces électroniques. En effet elle présente de nombreux avantages : simplicité, facilité de mettre en oeuvre, de plus elle peut conduire à l'obtention de couches très uniformes [31].

II.1- Immobilisation de l'uréase à la surface de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄

La suspension de latex est obtenue après dispersion de 5% (w/v) de polymère dans un mélange eau/éthanol 33/67 (v/v) dans le cas du polymère hydroxy et 20/80 (v/v) dans le cas des polymères cationiques. Cette suspension de latex est mélangée avec une solution d'uréase (10g/L) solubilisée dans un tampon phosphate (KH₂PO₄) de concentration 20 mM et de pH 7.4. A ce mélange uréase-polymère (1/1:v/v), on ajoute 10% (v/v) de glycérol pour homogénéiser le mélange et éviter la formation des agrégats entre l'uréase et le polymère [32,33]. Le mélange uréase/polymère est ensuite placé à 4°C pendant 4 heures.

Avant fonctionnalisation de la surface de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄, il est indispensable d'effectuer un traitement de surface pour rendre cette dernière propre et hydrophile [34]. La surface de l'électrode est traitée en se basant sur le protocole décrit dans le deuxième chapitre dont on rappelle ici brièvement les étapes. La surface est nettoyée dans l'ordre par le trichloréthylène (15 min), l'acétone (10 min) et le 2-propanol

(10 min) à l'ultrason. Puis, la surface est activée par un mélange sulfochromique ($H_2SO_4 + K_2Cr_2O_7$), rincée à l'eau ultra-pure avant d'être séchée sous flux d'azote et stockée pendant 10 min à 70°C. Après l'étape de nettoyage, la surface (1cm^2) de l'électrode est fonctionnalisée par un dépôt de 20 μL du mélange uréase-polymère déposé par la méthode de "spin-coating" (1000 tour/min). Ensuite, la structure fonctionnalisée est placée dans une atmosphère saturée en vapeur de glutaraldéhyde pendant une durée de 15 à 30 min pour permettre la réticulation de l'uréase dans la matrice organique [35]. Enfin, la structure ENIS (enzyme-isolant-semiconducteur) élaborée est séchée pendant une nuit à la température ambiante. Les étapes d'élaboration du biocapteur sont résumées dans la figure III-4.

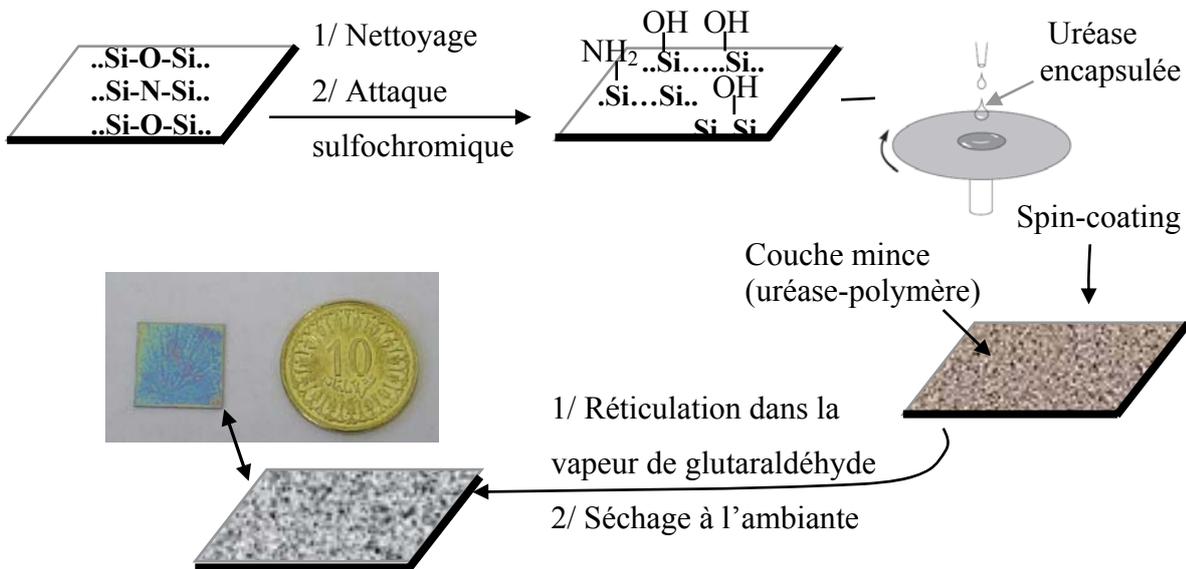
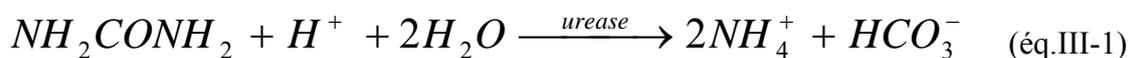


Figure III-4: Activation et procédure de fonctionnalisation de l'électrode.

II.2- Caractérisations électrochimiques : Mesures capacitives

Les structures obtenues dites ENIS (enzyme-isolant-semiconducteur) élaborées par "spin-coating" sont caractérisées par la méthode électrochimique capacité-potential (Figure III-5) dans le but d'évaluer la réponse du biocapteur en présence d'urée. La réaction d'hydrolyse d'urée en présence d'uréase est donnée par l'équation III-1:



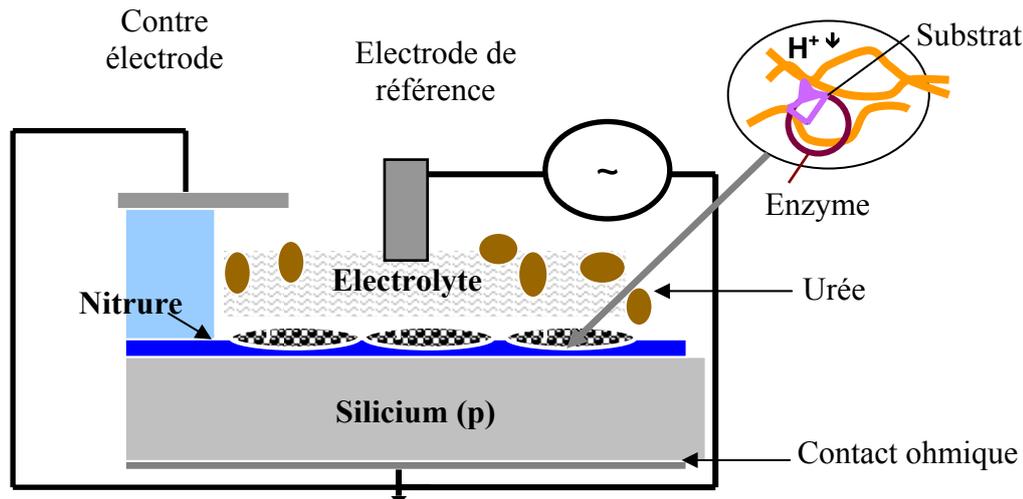


Figure III-5 : Structure ENIS (enzyme-isolant-semiconducteur)

Cette méthode de mesure électrochimique C(V) [36] consiste à utiliser une cellule électrochimique à trois électrodes : une électrode au calomel saturée (ECS) Ag/AgCl/KCl_{saturé} utilisée comme électrode de référence, une contre électrode en platine et une électrode de travail (le biocapteur). Les trois électrodes sont reliées à un analyseur (Voltalab 40). Ces mesures capacitatives sont effectuées à une fréquence de 10 kHz et une modulation de 10mV. Toutes les mesures expérimentales sont réalisées à température ambiante et à l'obscurité dans une cage de faraday pour éviter les charges photo-induites dans le semiconducteur. Le dispositif des mesures électrochimiques est donné sur la figure III-6.

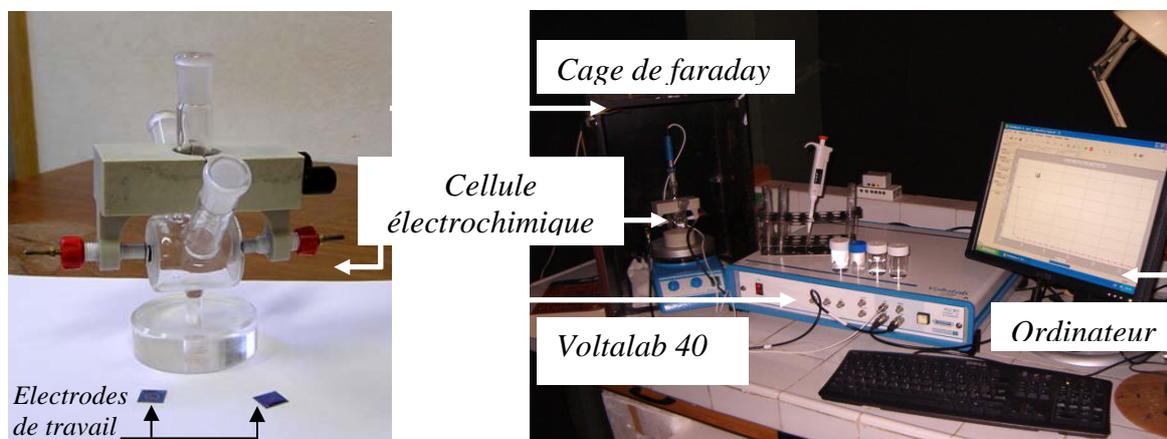


Figure III-6 : Appareillages de mesures électrochimiques.

La réponse du biocapteur élaboré en vue de la détection de l'urée se base sur la variation locale du pH à l'interface entre la biomembrane (uréase + polymère) et le transducteur (Si/SiO₂/Si₃N₄). Cette variation locale de pH provoque le changement du potentiel de bande plate V_{FB} ce qui se traduit par le déplacement des caractéristiques $C(V)$ le long de l'axe des potentiels. La [figure III-7](#) montre une caractéristique $C(V)$ pour les trois régimes de polarisation : accumulation, faible inversion et forte inversion. Le déplacement de la caractéristique $C(V)$ dépend de la charge piégée à l'interface biomembrane/Si₃N₄.

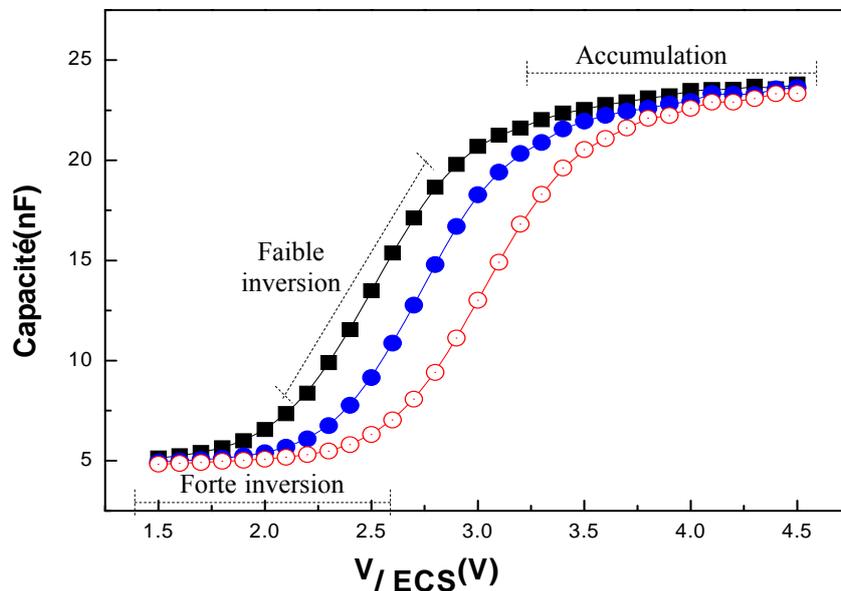


Figure III-7: Effet de la charge piégée sur le déplacement de la caractéristique $C(V)$,

● signal de référence, ■ charges négatives (OH^-), ○ charges positives (H^+).

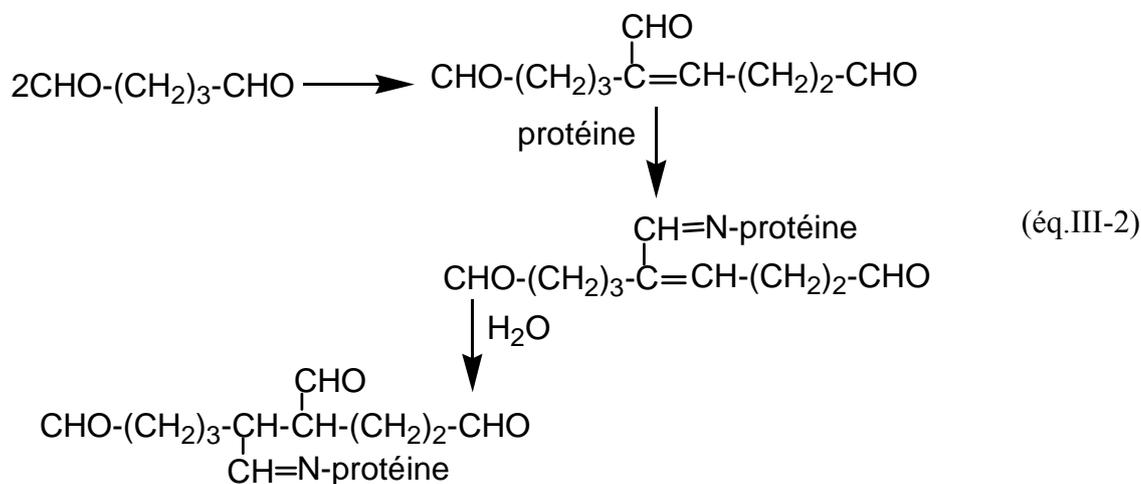
Le déplacement de la caractéristique $C(V)$ est obtenu par addition des ions H^+ et OH^- [37]. Dans ce travail, nous utilisons une réaction enzymatique induisant une variation du pH. En effet, la réaction d'hydrolyse de l'urée (équation III-1) génère des ions OH^- au sein de la biomembrane. Ces ions diffusent vers l'interface biomembrane/Si₃N₄ et provoquent le déplacement du potentiel de bande plate de l'électrode semiconductrice (déplacement des caractéristiques $C(V)$ vers les potentiels négatifs).

II.3- Choix de l'électrolyte support

Pour étudier le fonctionnement du biocapteur, le choix de l'électrolyte support joue un rôle crucial dans la détermination de ses performances analytiques. Soldatkin et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la nature de l'électrolyte support et de son pouvoir tampon sur le fonctionnement du biocapteur [38]. Dans notre travail, l'électrolyte support sélectionné est un tampon phosphate KH_2PO_4 5 mM, NaCl 70 mM, $\text{pH} = 7,4$.

II.4- Performances des différentes biomembranes élaborées

Dans le chapitre I, nous avons présenté la définition d'un biocapteur, celui-ci est constitué de deux composantes : le transducteur et le biorécepteur. On peut dire que le capteur devient un biocapteur si un biorécepteur est fixé sur sa surface, autrement dit le capteur est fonctionnalisé. Dans ce travail, nous avons biofonctionnalisé notre capteur (la structure IS) en utilisant un système enzyme/(protéine ou polymère) réticulé par le glutaraldéhyde (GA). La réaction avec le glutaraldéhyde en solution a été proposée par Richard et Knowles [39] ainsi que Mosan [40] (éq.III-2).



Le GA est un réactif bifonctionnel utilisé fréquemment pour le couplage des protéines. Il réagit avec les fonctions amines primaires et plus particulièrement avec les amines de la lysine des protéines. Le glutaraldéhyde, couramment employé en biochimie, permet donc de réticuler les protéines tout en conservant leur activité. Dans notre cas, des vapeurs de GA (Merck) ont été utilisées pour éviter toute réaction non contrôlée de polymérisation. Seul le monomère se vaporise [41].

II.4.1- Réticulation de l'uréase dans une matrice de BSA

La co-réticulation de l'uréase par le glutaraldéhyde en présence d'une protéine dite de charge l'albumine de sérum bovin (BSA) a été envisagée par Alexey P. Soldatkin et al [42]. Dans ce travail, le transducteur utilisé pour la conception du biocapteur à base d'uréase était constitué par un transistor à effet de champ (ISFET). Dans notre cas, ce transducteur a été remplacé par une structure bloquante de type Si/SiO₂/Si₃N₄ à laquelle est associée une biomembrane à base d'uréase/BSA déposée par "spin-coating" à partir d'un mélange uréase-BSA.

La composition de la membrane a été choisie en se basant sur les valeurs optimisées par Alexey P. Soldatkin et al [42]. (5 mg d'uréase + 5 mg de BSA solubilisé dans 100 µL d'un tampon à 20 mM de KH₂PO₄). Par ailleurs, du glycérol est rajouté dans la membrane pour améliorer sa plasticité et éviter les phénomènes de "retrait" de la membrane. Il est bien évident que l'enzyme n'était active que dans une certaine gamme de pH (chapitre I- influence de la température et du pH). Il est important de se placer à la valeur du pH permettant une activité catalytique optimale. Dans cette étude cela correspond à une valeur de pH égal à 7,4 [18,42,43].

La figure III-8 montre le spectre C(V) du système Si/SiO₂/Si₃N₄/uréase-BSA obtenu pour différentes concentrations en urée. Cette figure illustre bien le déplacement du signal C(V) vers les potentiels négatifs lorsque la concentration de l'urée augmente.

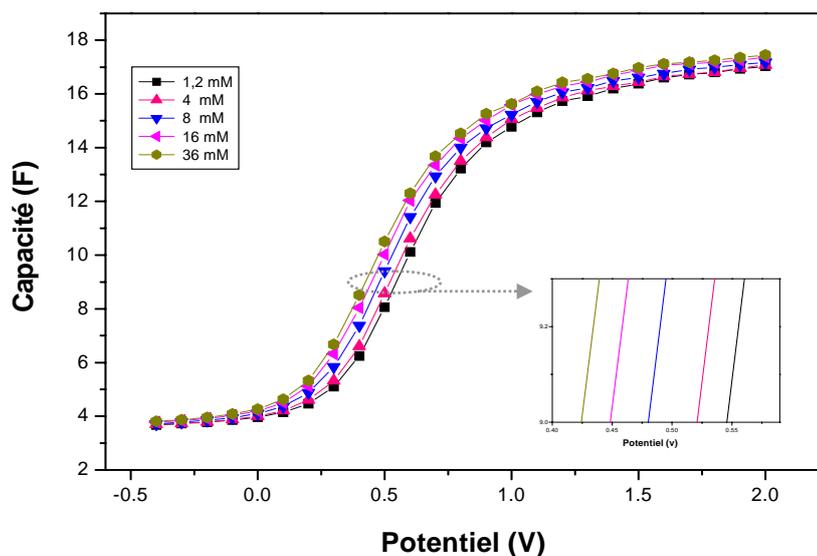


Figure III-8: Spectre C(V) de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/uréase-BSA en présence d'urée. Tampon K-phosphate 5 mM, pH=7,4.

La réponse du biocapteur vis-à-vis de l'urée a été évaluée en utilisant un tampon phosphate de concentrations variables : 1, 5 et 20 mM. La figure III-9 montre les courbes de calibrations donnant la variation du potentiel de bande plate en fonction de la concentration d'urée.

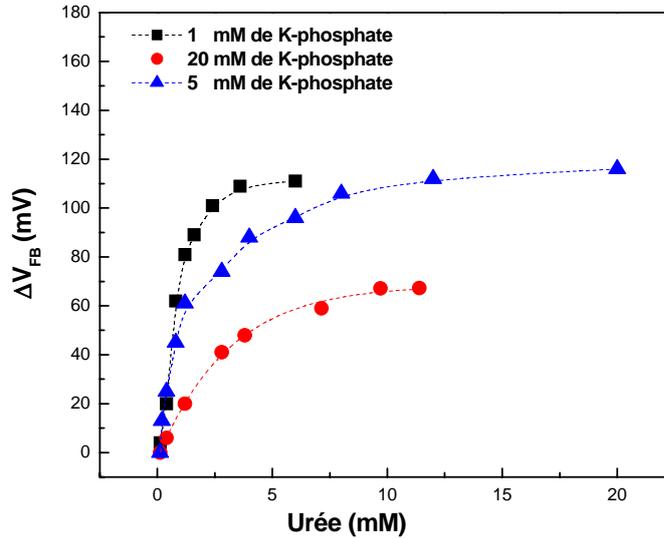


Figure III-9 : Courbes de calibrations de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/uréase-BSA en présence d'urée. Tampon K-phosphate 5 mM, pH=7,4.

Pour déterminer la sensibilité du biocapteur vis-à-vis de l'urée, nous traçons la caractéristique $\Delta V_{FB} = f(p[\text{urée}] = -\log[\text{urée}])$. Cette caractéristique a l'allure d'une sigmoïde obéissant à la loi de Nernst (équation III-3). Les courbes de sensibilités sont données par la Figure III-10.

$$\Delta V_{FB} = V_{FB_i} + \left(\frac{RT}{F} \right) \text{Log} [\text{urée}] \quad (\text{éq.III-3})$$

Avec V_{FB_i} le potentiel initial du semi-conducteur. R la constante des gaz parfaits, T la température absolue et F la constante de Faraday.

La réponse du biocapteur élaboré est caractérisée par les courbes de sensibilités ce qui permet de conclure que le système Si/SiO₂/Si₃N₄/uréase/BSA répond bien à l'addition de l'urée. Par ailleurs, cette réponse ne s'observe qu'au cours de quelques tests effectués sur la même structure et au bout d'une semaine elle se réduit à 60% de sa valeur initiale. Ceci peut s'expliquer par le re-largage des molécules d'uréase de la surface de

l'électrode vers l'électrolyte support [44]. En plus de sa faible durée de vie, le système uréase/BSA est caractérisé par une dynamique faible inférieure à 5 mM.

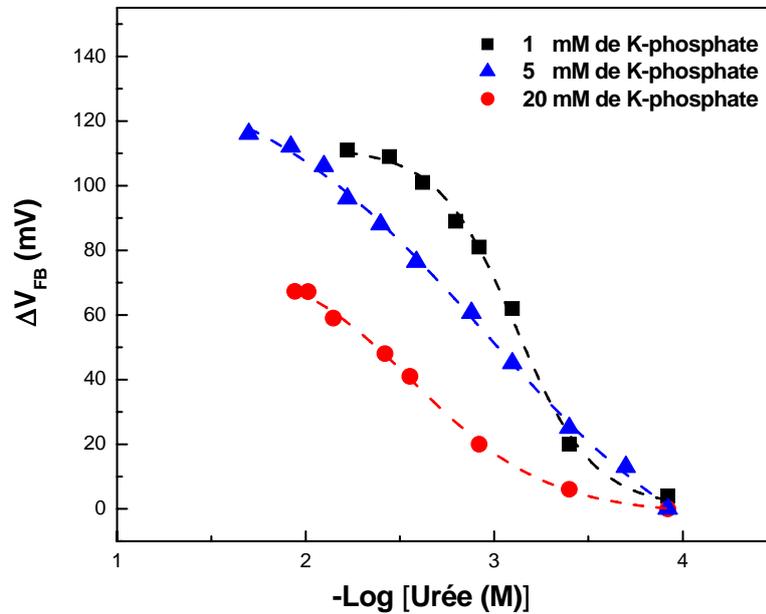


Figure III-10 : Caractéristiques de sensibilité de la structure $\text{Si/SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4/\text{uréase-BSA}$ en présence d'urée. Tampon K-phosphate 1, 5 et 20 mM, pH 7.4.

D'après les valeurs rassemblées dans le [tableau III-1](#), on remarque que le pouvoir tampon de l'électrolyte support a une forte influence sur les performances analytiques du biocapteur. On obtient une haute sensibilité suivie d'un domaine de linéarité étroit lorsqu'on travaille avec un électrolyte support de faible concentration (1mM). Dans le cas où la concentration de l'électrolyte augmente, la sensibilité diminue et le domaine de linéarité augmente. Pour cette raison, il était nécessaire d'optimiser la concentration de l'électrolyte support pour avoir les meilleures performances du dispositif capteur. Dans ce travail, toutes les mesures ont été effectuées avec un électrolyte support KH_2PO_4 de concentration 5 mM .

Tableau III-1 : Effet du pouvoir tampon sur les performances du biocapteur

	KH_2PO_4 (1mM)	KH_2PO_4 (5 mM)	KH_2PO_4 (20 mM)
Sensibilité (mV)	100	57	45
Domaine de linéarité (p[urée])	2.6-3.4	1.92-3.92	2-3.4

II.4.2- Réticulation de l'uréase dans des polymères latex

Bien que le polymère hydroxy a été déjà utilisé comme matrice d'immobilisation pour la construction d'un biocapteur à glucose, et au vu de sa bonne stabilité mécanique, surtout à la surface du platine [45] et sa haute biocompatibilité, nous l'avons réutilisé dans ce travail pour la construction d'un biocapteur d'urée. En plus de ce polymère latex, nous avons utilisé d'autres polymères latex chargés impliqués pour la première fois dans l'immobilisation des enzymes. L'optimisation de la procédure de dépôt du mélange latex-uréase sur le transducteur Si/SiO₂/Si₃N₄ est basée sur l'examen des réponses du biocapteur vis à vis de l'urée. Les conditions optimales de point de vue adhésion de la biomembrane et rétention de l'activité de l'enzyme mise en jeu après la construction du système Si/SiO₂/Si₃N₄/latex-uréase, sont obtenues au cours de l'étape de réticulation avec le glutaraldéhyde. La durée d'exposition des échantillons aux vapeurs de glutaraldéhyde a été optimisée pour une valeur de 15 min. L'addition de 10% de glycérol était d'une grande importance surtout dans l'homogénéisation du mélange latex-uréase et la plastification de la couche. De plus, elle évite la formation d'agrégats et améliore l'adhésion de la biomembrane sur la surface du transducteur semi-conducteur. La réponse potentiométrique de la structure fonctionnalisée par la couche bioactive est évaluée par les mesures capacité-potentiel C (V) dans un tampon phosphate KH₂PO₄ (5 mM, NaCl 70 mM, pH = 7.4).

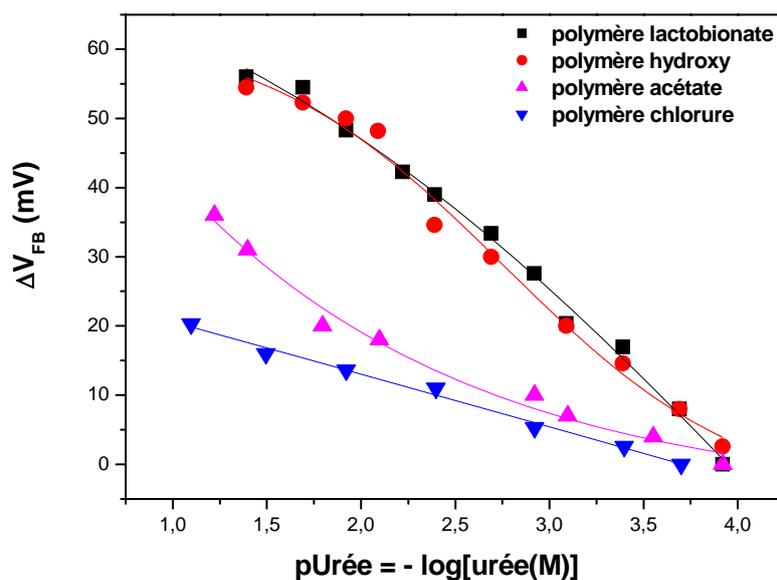


Figure III-11 : Courbes de sensibilités de la structure ENIS à base des biomembranes polymère-uréase. Tampon phosphate KH₂PO₄ (5 mM, NaCl 70 mM, pH = 7.4).

La [figure III-11](#) traduit les réponses des différents biocapteurs d'urée élaborés dans des conditions analogues en présence d'uréase immobilisée dans les polymères hydroxy, lactobionate, acétate et chlorure. La calibration des structures fonctionnalisées vis-à-vis de l'urée est effectuée dans la gamme de concentration de 10^{-4} à 10^{-1} M. Les performances analytiques (sensibilité, domaine de linéarité) de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ couplée aux différentes biomembranes latex-uréase sont reportées sur le [Tableau III-2](#).

Tableau III-2 : Performances des différentes biomembranes latex-uréase.

biomembranes	Sensibilité (mV)	Domaine de linéarité mV/p[urée]
uréase/polymère hydroxy	24	4 – 1.75
uréase/polymère lactobionate	22	4 – 1.5
uréase/polymère acétate	10	4 – 1.75
uréase/polymère chlorure	7	3.75 – 1

D'après les résultats du tableau ci-dessus, on constate que les structures fonctionnalisées par les biomembranes uréase-polymère hydroxy et uréase-polymère lactobionate ont respectivement des sensibilités de 24 et 22 mV/p[urée] et qui couvrent presque la même gamme de concentration de 10^{-4} à $10^{-1.5}$ M. Par ailleurs, des sensibilités médiocres de l'ordre de 10 et 7 mV/p[urée] ont été observées et qui sont attribuées respectivement aux structures fonctionnalisées par les biomembranes uréase-polymère acétate et uréase-polymère chlorure. Ceci peut être attribué à la désactivation de l'uréase au cours de son immobilisation dans les polymères acétate et chlorure contrairement aux autres polymères latex hydroxy et lactobionate. Pour expliquer les différents comportements des polymères impliqués dans le processus de fixation de l'uréase, nous avons optimisé les conditions d'élaboration de la couche biosélective. A titre d'exemple, nous avons étudié l'effet du glutaraldéhyde sur les performances des biocapteurs à base de polymère acétate et chlorure. La [figure III-12](#) montre les sensibilités des structures fonctionnalisées par les biomembranes uréase-acétate et uréase-chlorure élaborées en absence et en présence de vapeurs de glutaraldéhyde. Ces sensibilités sont obtenues en faisant varier la durée d'exposition de la biomembrane aux vapeurs de glutaraldéhyde

entre 15 et 30 min. Nous observons que lorsque le temps de réticulation par les vapeurs de glutaraldéhyde augmente, la sensibilité de la couche biosélective à l'urée diminue. Ce comportement peut être dû à l'augmentation du taux de réticulation qui rend le substrat (urée) inaccessible par les sites actifs de l'uréase ce qui freine les phénomènes de diffusion [46]. En effet, la meilleure sensibilité est obtenue pour des couches élaborées sans vapeurs de glutaraldéhyde essentiellement dans le cas du polymère acétate et chlorure.

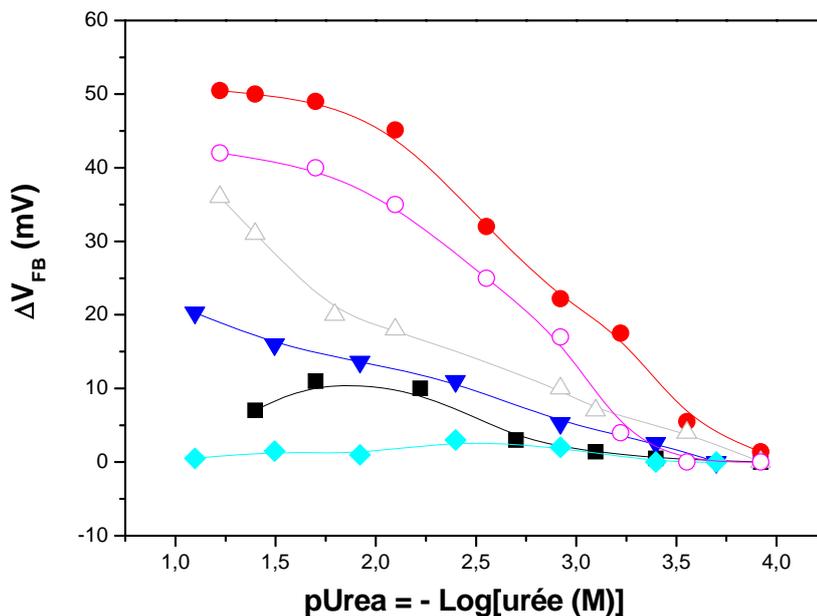


Figure III-12 : Courbes de sensibilités de la structure ENIS dans le cas des polymères chlorure et acétate. (◆) uréase-polymère chlorure 30 mn GA, (■) uréase-polymère acétate 30 mn GA, (▼) uréase-polymère chlorure 15 mn GA, (△) uréase-polymère acétate 15 mn GA, (○) uréase-polymère chlorure sans GA, (●) uréase-polymère acétate sans GA.

L'effet favorable du glutaraldéhyde comme agent de réticulation dans le cas des matrices à base des polymères hydroxy et lactobionate n'était pas observé dans le cas des matrices acétate et chlorure. Ceci peut être attribué à la structure du polymère et à sa capacité d'accueillir les molécules d'uréase par microencapsulation. En effet, la bonne stabilité de la réponse des biocapteurs à base des polymères chargés, contrairement au polymère hydroxy, est assurée par les ammoniums quaternaires. Ces derniers, assurent la bonne adhésion de la biomembrane et une meilleure rétention de l'activité enzymatique au cours du temps.

L'effet défavorable du glutaraldéhyde dans le cas du biocapteur à base de polymère uréase-acétate et uréase-chlorure peut être attribué à la taille des contre ions acétate et chlorure ce qui ne gêne pas l'interaction uréase-ammonium quaternaire. Cette interaction électrostatique forte rend inutile l'utilisation du glutaraldéhyde comme agent de réticulation même pour une faible durée. Dans le cas du biocapteur à base de polymère uréase-lactobionate, la longueur de la chaîne de l'entité anionique (lactobionate) joue le rôle d'un effet écran entre l'uréase et l'ammonium quaternaire ce qui affaiblit leur interaction. Par suite, l'utilisation du glutaraldéhyde paraît indispensable pour réticuler l'uréase dans les matrices à base de polymère lactobionate. D'autre part, l'échange ionique qui peut s'établir entre les ions de l'électrolyte et les contre ions acétate et lactobionate dans le cas des biomembranes non réticulées par le glutaraldéhyde, conduit à la formation des cavités plus importantes dans le cas du lactobionate. Le départ du contre ion rend la couche biosélective poreuse, ce qui facilite la re-largage des biomolécules d'uréase dans l'électrolyte support. Les valeurs des sensibilités des biomembranes à base des polymères acétate et chlorure non réticulées sont données par le [tableau III-3](#)

Tableau III-3 : Performances des couches uréase-acétate et uréase-chlorure non réticulées

Biomembranes	Sensibilité (mV)	Domaine de linéarité mV/p[urée]
uréase-polymère acétate	26	4 – 2
uréase-polymère chlorure	17	3.75 – 2

II.4.3- Effet du contre ion sur l'interaction uréase-polymère

Comme toute protéine, l'uréase est une enzyme caractérisée par un point de charge nul ou point isoélectrique ($P_i = 5.5$) situé au voisinage neutre de la valeur du pH correspondant à la neutralité. [47]. En effet, pour un pH égal à 7.4 (pH de travail), l'uréase se présente sous sa forme anionique ce qui lui permet d'interagir avec une charge positive. Dans notre cas, une forte interaction électrostatique peut se produire entre l'uréase et les groupements ammoniums des polymères cationiques. Contrairement au

polymère neutre, la présence des groupements hydroxy aboutit à une faible interaction avec l'uréase. Dans un travail antérieur [28], Asgatay et al. ont montré que l'interaction de ces polymères chargés en présence des différents contre ions (chlorure, acétate, lactobionate) avec l'ADN (adénosine dinucléotide) dépend de la taille du contre ion. En effet, la charge du polymère ainsi que l'interaction ADN-polymère augmente dans l'ordre avec le groupement lactobionate, acétate et chlorure. Ce comportement permet de supposer que la taille du contre ion influence l'interaction uréase-polymère ce qui modifie la conformation et les propriétés catalytiques de l'enzyme et par voie de conséquence les performances du biocapteur.

II.5- Mouillabilité des biomembranes : Effet de la réticulation aux vapeurs de GA

Comme il été mentionné dans le chapitre II, le suivi du changement de mouillabilité avant et après fonctionnalisation de la surface est d'une grande importance. Ceci permet d'avoir une idée sur le caractère hydrophile ou hydrophobe de la biomembrane déposée sur le transducteur. De plus, l'interface biomembrane/électrolyte joue un rôle primordial dans le processus de diffusion du substrat (urée) de l'électrolyte vers la couche biosensible.

L'histogramme de la figure III-13 illustre la variation de l'angle de contact en fonction du temps pour différentes biomembranes à base de composites polymère/uréase.

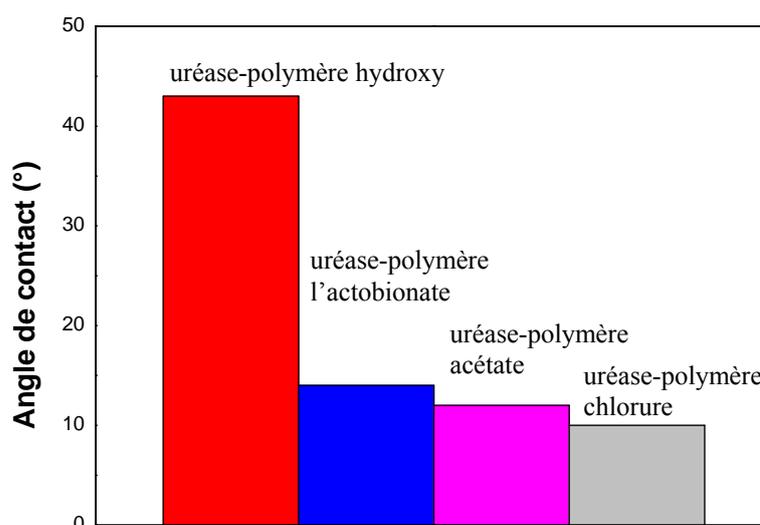


Figure III-13 : Angles de contact des différentes biomembranes polymère/uréase.

Les valeurs moyennes d'angles de contact θ_m , obtenues à partir des caractéristiques de mouillabilité des biomembranes déposées sur un substrat Si/SiO₂/Si₃N₄ sont de 43, 14, 12 et 10° respectivement pour les biomembranes hydroxy-uréase, lactobionate-uréase, acétate-uréase et chlorure-uréase. Ces résultats permettent de conclure que la biomembrane à base de polymère hydroxy possède une surface moins hydrophile que les biomembranes à base de polymères chargés. Le caractère fortement hydrophile des polymères chargés est favorisé par les entités cationiques et anioniques de chaque polymère.

De plus, nous avons étudié le changement de la mouillabilité des biomembrane en fonction de la durée d'exposition aux vapeurs de glutaraldéhyde. La [figure III-14](#) montre une augmentation brutale de l'angle de contact pour des durées ne dépassant pas 10 minutes dans le cas des biomembranes à base des polymères acétate et chlorure. Ceci permet de conclure que l'hydrophilicité diminue sous l'effet de la réticulation et la surface devient plus hydrophobe. Ceci peut être dû à la haute affinité de la biomembrane à base de polymère acétate et chlorure aux vapeurs de glutaraldéhyde. Ce dernier, peut masquer les charges de la biomembrane, ce qui rend la surface hydrophobe.

Dans le cas des biomembranes à base de polymère hydroxy et de polymère lactobionate, le changement de la mouillabilité de la surface change en fonction de la durée de réticulation tout en conservant le caractère hydrophile de la surface.

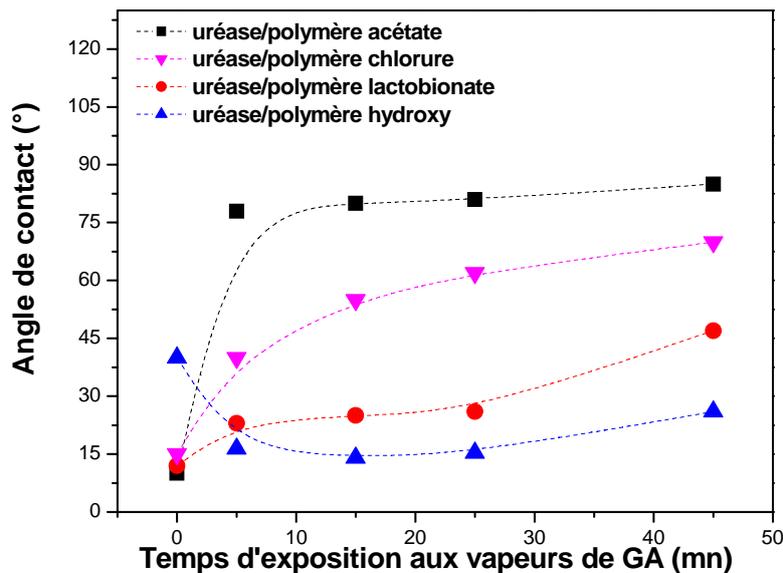


Figure III-14 : Variation de la mouillabilité des biomembranes en fonction de la durée de réticulation.

Les résultats donnés par la technique de mouillabilité sont en bon accord avec ceux obtenus par les mesures électriques. Lorsque les structures biofonctionnalisées sont fortement réticulées par les vapeurs de glutaraldéhyde, la flexibilité des chaînes du polymère diminue en fonction du taux de réticulation et la biomembrane acquiert une structure compacte et hydrophobe [48]. Cette nouvelle structure gêne l'accès de l'urée vers les sites actifs de l'enzyme, ce qui explique la faible réponse potentiométrique d'une structure fortement réticulée surtout dans le cas des biomembranes à base des polymères acétate et chlorure.

II.6- Etude de la perméabilité des différentes biomembranes

II.6.1- Rappels sur les mesures de perméabilité

Les mesures de perméabilité s'effectuent sur une électrode tournante sur laquelle on a, au préalable, déposé le polymère. Elle consiste en un disque en matériau conducteur (Platine, Carbone vitreux,.....) fixé à l'extrémité d'une tige isolante (Figure III-15).

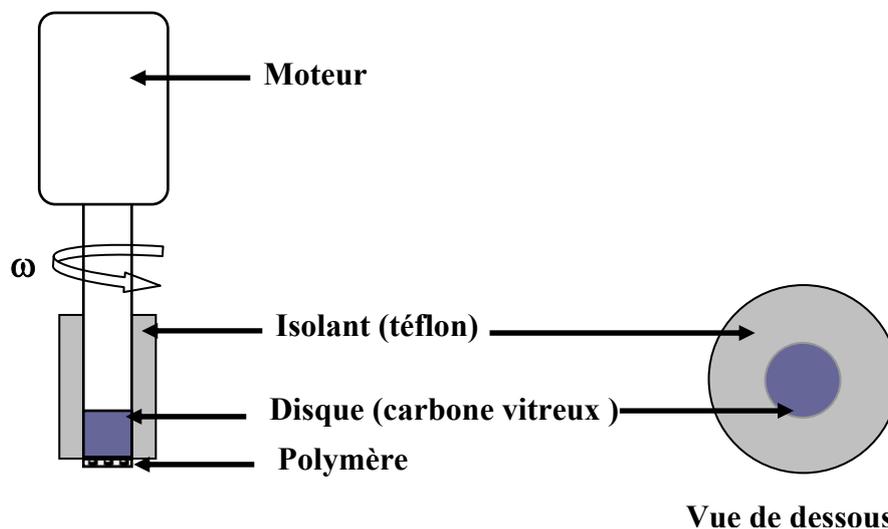


Figure III-15 : Schéma d'une électrode tournante utilisée pour les mesures de perméabilité.

L'utilisation d'une électrode tournante entraîne une convection forcée, on parle alors de systèmes hydrodynamiques. La façon la plus simple de décrire les systèmes

convectifs repose sur la notion de couche de diffusion. Cette notion suppose que la convection maintienne la concentration de chaque espèce chimique uniforme et égale à celle que l'on a au sein de la solution, jusqu'à une distance δ_d de l'électrode. (Figure III-16). A l'intérieur de la couche de diffusion ($\delta_m \leq x \leq \delta_d$) et à l'intérieur de la couche de polymère ($0 \leq x \leq \delta_m$), on admet qu'aucun mouvement de convection ne se produit et que le transfert de masse s'effectue uniquement par diffusion. Il s'agit maintenant de déterminer le courant de diffusion passant à travers la couche de diffusion et du polymère.

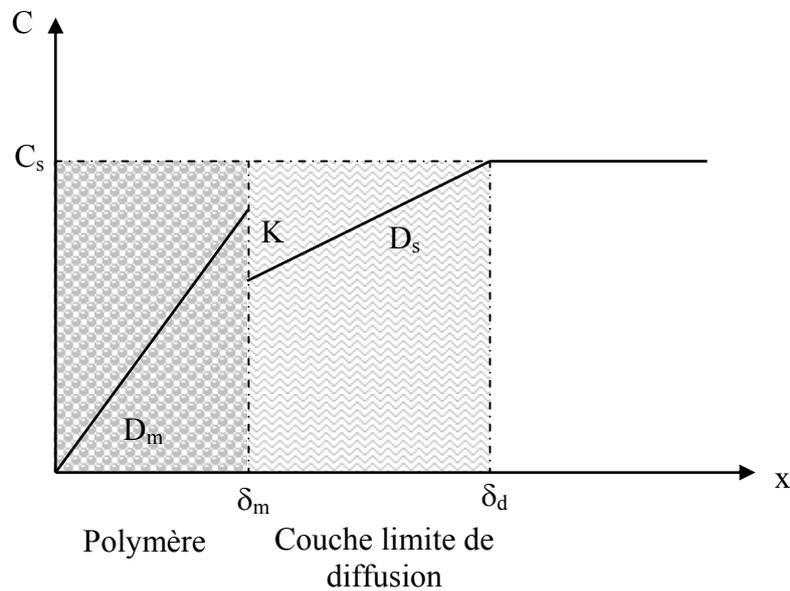


Figure III-16 : Profils des concentrations pour une électrode tournante modifiée par un polymère.

avec

K représente le coefficient de partage égale à C_m/C_s

C_m = Concentration de l'espèce chimique dans le polymère

C_s = Concentration de l'espèce chimique dans la solution

D_m représente le coefficient de diffusion de l'espèce considérée dans le polymère

D_s représente le coefficient de diffusion de l'espèce considérée dans la solution

δ_m représente l'épaisseur du polymère

δ_d représente l'épaisseur de la couche limite de diffusion

II.6.2- Détermination du courant limite de diffusion

La méthode utilisée pour déterminer la perméabilité est celle proposée par Gough et Leypoldt [49,50]. Cette méthode est basée sur l'approche de Koutecky-Levich décrit par l'équation ci-dessous:

$$i_d = i_L \left[\frac{1}{1 + p_s / P_m} \right] \quad (\text{éq.III-4})$$

où i_d représente le courant de diffusion, i_L le courant limite de Levich, P_s et P_m représentent respectivement la perméabilité de la solution et de la membrane formée par le polymère.

Le courant de Levich est le courant mesuré en absence de polymère sur l'électrode tournante. Il s'exprime par la relation suivante:

$$i_L = 0.62 n F A C_s D_s^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (\text{éq.III-5})$$

avec :

n le nombre d'électrons échangés lors de la réaction d'oxydo réduction, F la constante de Faraday qui est égale à 96500 C, A c'est la surface active de l'électrode tournante au contact de l'électrolyte, C_s la concentration de l'espèce s en solution, D_s c'est le coefficient de diffusion de l'espèce considérée dans la solution, ν la viscosité cinématique du solvant, ω la vitesse angulaire et P_m la perméabilité de l'espèce considérée dans le polymère.

La perméabilité de l'espèce dans la solution est donnée par:

$$P_m = \frac{D_s}{\delta_d} \quad (\text{éq.III-6})$$

avec δ_d , l'épaisseur de la couche limite de diffusion et elle est donnée par:

$$\delta_d = 1.61 D_s^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2} \quad (\text{éq.III-7})$$

La perméabilité de l'espèce dans la membrane est:

$$P_m = \frac{KD_m}{\delta_m} \quad (\text{éq.III-8})$$

En introduisant les équations (1), (2), (3) et (4) dans (1) on arrive à l'équation suivante:

$$\frac{1}{i_{\text{lim}}} = \frac{1}{0.62nFAC_s D_s^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2}} + \frac{\delta_m}{nFAKC_s D_m} \quad (\text{éq.III-9})$$

Dans ce travail, les mesures sont réalisées avec un potentiostat (Autolab, PGSTAT 100, Eco chimie) équipé d'un contrôleur de courant et de potentiel GPES. Ces mesures expérimentales sont effectuées dans une cellule à trois électrodes; une électrode de travail (carbone vitreux) de diamètre 3 mm connectée à un contrôleur de vitesse type EDI 101 T, une contre électrode en platine et une électrode de référence Ag/AgCl/KCl.

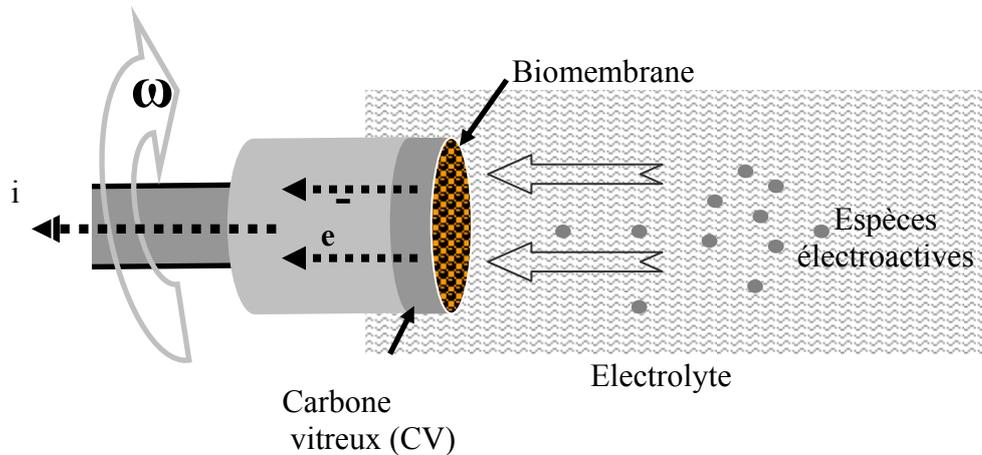


Figure III-17 : Schéma synoptique de la technique de voltamétrie linéaire.

L'électrolyte support utilisé est un tampon phosphate (5 mM, pH = 7,4) contenant l'hydroquinone (2 mM) comme espèce électroactive. Le principe de l'électrode tournante est résumé sur la [figure III-17](#).

L'équation (2) montre que le courant de Levich est proportionnel à $\omega^{1/2}$. On vérifie cela en traçant $1/i_{\text{lim}} = f(1/\omega^{1/2})$ pour le couple hydroquinone/quinone sur l'électrode tournante en l'absence de polymère. La [figure III-18](#) montre les voltammogrammes suite à

des balayages linéaires de l'électrode nue pour différentes vitesses de rotation (a) et la caractéristique de Koutecky-Levich (b).

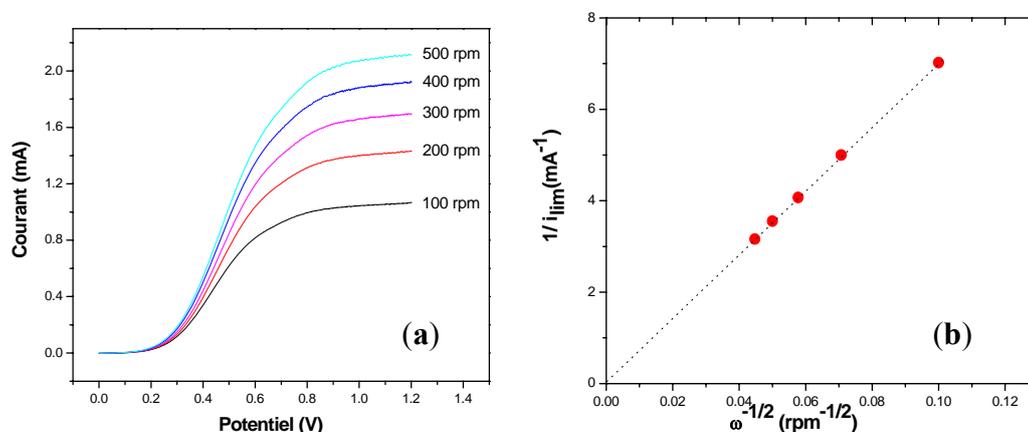


Figure III-18 : Spectre de voltamogrammes *sweep* linéaires (a) et caractéristique de Koutecky-Levich (b) de l'électrode nue. ($v = 10 \text{ mVs}^{-1}$, 2 mM hydrquinone dans un tampon phosphate 5 mM).

Dans le cas de l'électrode fonctionnalisée, l'étude se base sur les équations typiques introduites par Gough et Leyboldt donnant la variation du courant limite i_{lim} avec le transport de masse d'une électrode tournante fonctionnalisée par une membrane non électroactive [49,51].

L'enregistrement des voltamogrammes des électrodes fonctionnalisées par les biomembranes est réalisé en faisant varier la vitesse de rotation de l'électrode de 100 à 500 tr/min pour une vitesse de balayage $v = 10 \text{ mv.s}^{-1}$. Pour s'assurer de la réversibilité du phénomène de diffusion à travers les biomembranes étudiées, l'enregistrement des voltamogrammes s'effectue à des vitesses croissantes et décroissantes. La figure III-19 montre les voltamogrammes obtenus pour les biomembranes uréase-polymère acétate, uréase-polymère lactobionate et uréase-polymère hydroxy déposées sur une électrode de carbone vitreux (CV).

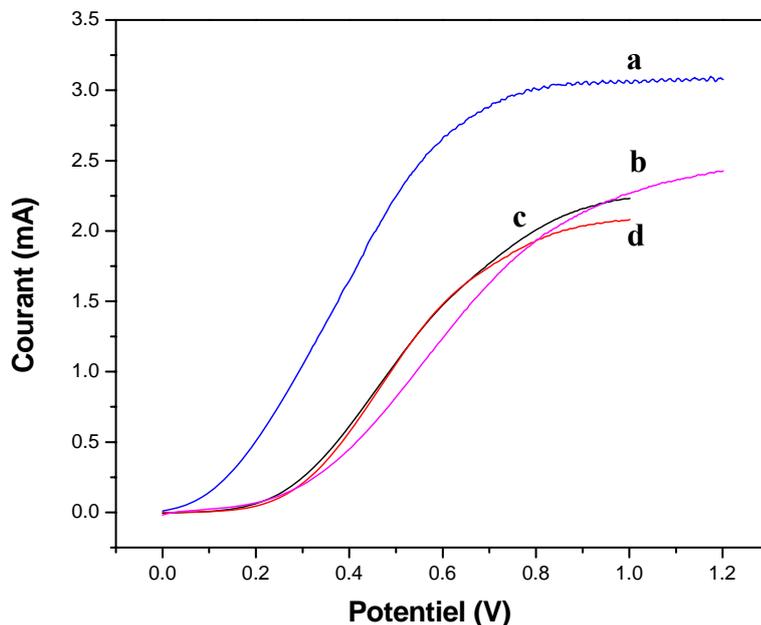


Figure III-19: Voltammogrammes de l'électrode nue et fonctionnalisée par les différentes biomembranes. (a) CV, (b) CV/uréase-acétate, (c) CV/uréase-hydroxy, (d) CV/uréase-lactobionate

Pour estimer la valeur de perméabilité (P_m), on trace la caractéristique $1/i_{lim}$ en fonction de $1/\omega^{1/2}$. Cette caractéristique présente un comportement linéaire et passe par l'origine si l'électrode est nue, dans le cas contraire c'est-à-dire en présence d'une membrane, la caractéristique possède la même pente que l'électrode nue et intercepte l'axe des ordonnées pour une valeur positive. Cette valeur nous permet de déterminer le coefficient de perméabilité P_m . Les voltammogrammes obtenus dans le cas des biomembranes à base du composite uréase/polymère sont comparés aux résultats donnés par l'électrode nue. En effet, après fonctionnalisation de l'électrode, on observe une diminution du courant limite suivie d'un redressement du signal vers les potentiels positifs suite au ralentissement du phénomène de diffusion à travers la biomembrane (Figure III-19).

Dans la même figure III-20, nous avons tracé les caractéristiques de Koutecky-Levich de l'électrode fonctionnalisée par les différentes biomembranes et de l'électrode nue pour comparaison.

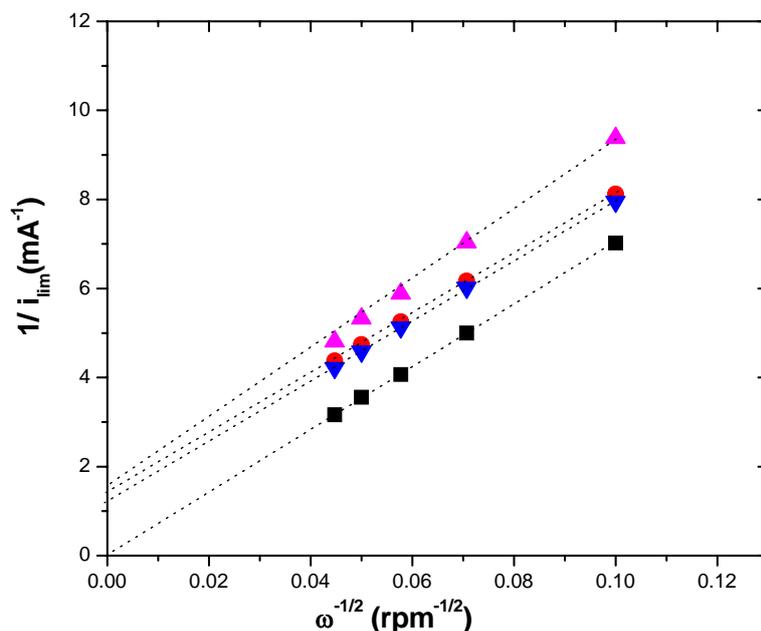


Figure III-20 : Représentation de Koutecky-Levich pour l'électrode nue et fonctionnalisée par les différentes biomembranes. Electrode nue (■) et fonctionnalisée : uréase-acétate (▲), uréase-hydroxy (▼) et uréase-lactobionate (●).
($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $\omega = 500 \text{ rpm}$).

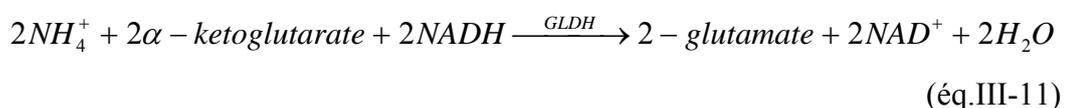
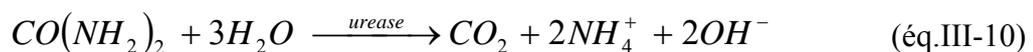
A partir des caractéristiques de Koutecky-Levich nous remarquons que les biomembranes étudiées sont perméables. Cette haute perméabilité est favorable pour l'amélioration des performances électriques des biocapteurs à base de polymères latex. Les valeurs de perméabilité obtenues pour les biomembranes uréase-polymère hydroxy, uréase-polymère lactobionate et uréase-polymère acétate sont regroupées dans le [tableau III-4](#). Nous remarquons que la biomembrane à base de polymère acétate-uréase est la plus perméable. Cette haute perméabilité est sans doute attribuable au départ du contre ion acétate au cours du contact de la biomembrane avec l'électrolyte, ce qui rend la biomembrane poreuse et donc facilite la diffusion du substrat dans la couche biosélective.

Tableau III-4 : Coefficients de perméabilité et courant limite des différentes biomembranes

Biomembranes	i_{lim} (mA)	P_m (cm.s ⁻¹)
Uréase-polymère acétate	0.242	$1.06 \cdot 10^{-2}$
Uréase-polymère lactobionate	0.207	$0.83 \cdot 10^{-2}$
Uréase-polymère hydroxy	0.222	$0.93 \cdot 10^{-2}$

II.7- Suivi du re-largage de l'uréase immobilisée par spectroscopie UV-Visible

L'activité de l'enzyme libre et immobilisée dans les différentes matrices a été testée par spectroscopie UV-Visible suivant la méthode de Worthington [52]. Cette méthode se base sur l'oxydation du NADH par le glutamate déhydrogenase en présence des ions NH_4^+ générés par l'hydrolyse de l'urée au niveau du site actif de l'uréase. La figure III-21 montre la variation de l'absorbance en fonction du temps au cours de la disparition du β -NADH (β -nicotinamide Adénine di-nucléotide) en présence des ions NH_4^+ obtenus au cours de la réaction d'hydrolyse de l'urée par l'uréase. Les mesures de l'activité enzymatique sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible Varian Cary 1. La cuve du spectrophotomètre contient une solution composée de 2.4 ml de tampon phosphate (0.1 M et pH = 7.6), 0.1 ml de l'adénosine -5'diphosphate (0.03 M), 0.1 ml de NADH (0.01 M), 0.1 ml de α -kétoglutarate (0.03 M), 0.1 ml d'urée (1M), 0.1 ml de GLDH (500 U/ml). Après stabilisation du mélange à 30°C, nous ajoutons 0.1ml d'uréase (1mg/mL). Les mécanismes réactionnels sont résumés dans les équations suivantes :



Avec: GLDH: L-Glutamique Dehydrogénase

La cinétique de l'uréase libre est donnée par les figures III-21-a et III-21-b.

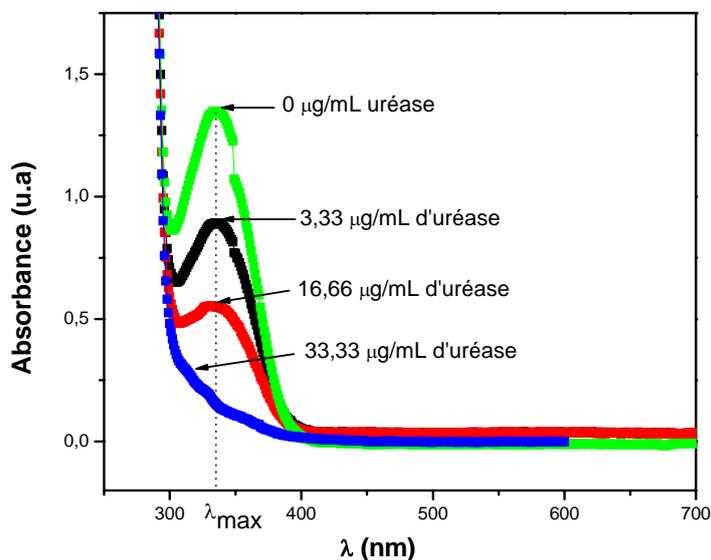


Figure III-21-a : Effet de l'uréase sur l'absorbance de NADH a $\lambda = 340$ nm.

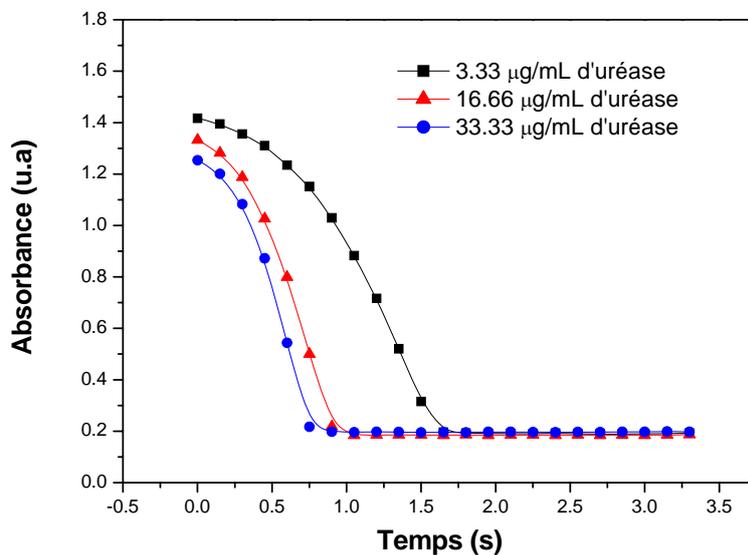


Figure III-21-b : Variation de l'absorbance de NADH en fonction du temps pour différentes concentrations d'uréase ajoutée.

L'activité de l'uréase se détermine à partir de la courbe cinétique donnée par la figure III-21-(b). En effet, l'activité de l'uréase est donnée par la relation ci-dessous:

$$\text{Activité (Unités/mg)} = \Delta_{340/\text{min}} / 6,22 \cdot \text{quantité d'uréase (mg/mL)}$$

Avec:

Δ_{340} définie la pente de la partie linéaire de la courbe cinétique enregistrée à $\lambda_{\text{max}} = 340$ nm. La constante 6,22 définie la valeur d'extinction de NADH à 340 nm.

Dans le cas de l'enzyme immobilisée dans les différentes matrices organiques nous avons déterminé les paramètres de la cinétique en introduisant l'électrode fonctionnalisée dans la cuve du spectrophotomètre. La cinétique de l'uréase immobilisée dans les polymères acétate, lactobionate et hydroxy est donnée par la [figure III-22](#).

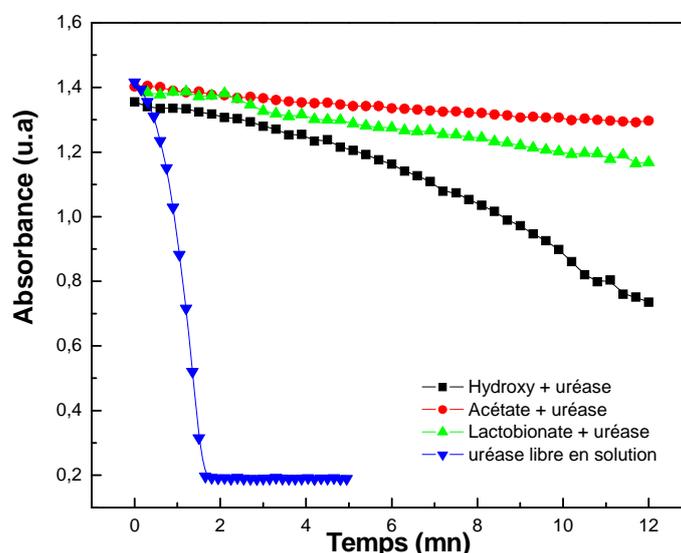


Figure III-22 : Courbes de cinétique ($\lambda_{\text{max}}=340$ nm) de l'uréase libre et immobilisée dans les différentes matrices organiques.

L'examen de l'activité de l'uréase immobilisée dans les différents polymères et déposée sur un substrat de carbone vitreux montre une bonne adhésion de la biomembrane dans le cas des matrices à base de polymères chargés. Dans le cas de la biomembrane à base de polymère hydroxy/uréase, la décroissance rapide de l'absorbance en fonction du temps s'explique par le re-largage de l'enzyme dans la solution suite à une faible adhésion de la biomembrane à la surface de l'électrode. Les valeurs d'activité de l'uréase immobilisée dans les différentes matrices polymères sont; 3,6, 2,4 et 1,2 mUcm⁻² respectivement pour le polymère hydroxy, lactobionate et acétate. Ces résultats confirment bien ce qui a été mentionné auparavant par les mesures capacitives : une

meilleure stabilité de la réponse analytique du biocapteur vis-à-vis de l'urée dans le cas des polymères cationiques.

II.8- Détermination du paramètre cinétique K_m

Pour évaluer l'activité catalytique de l'uréase immobilisée dans les différentes matrices nous avons utilisé l'approche cinétique classique décrite par Michaelis-Menten ([chapitre I](#)). La réaction enzymatique est donnée par la [figure III-23](#).

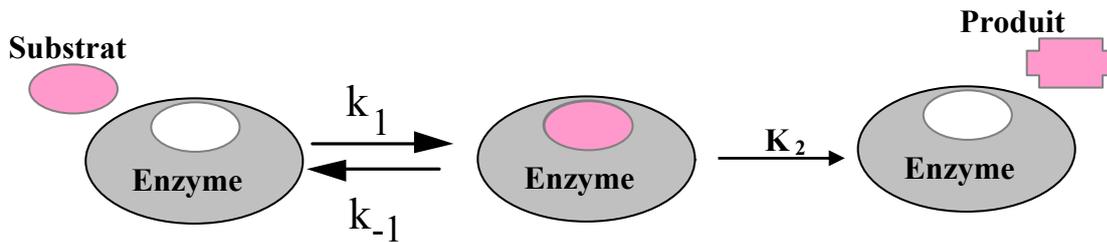


Figure III-23 : Schéma réactionnel de la cinétique enzymatique selon Michaelis-Menten..

La première étape (formation du complexe enzyme-substrat) est rapide et équilibrée. La seconde étape (séparation du complexe en produit et enzyme), plus lente, module la vitesse de l'ensemble. En outre, la constante de vitesse K_2 représente la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, c'est-à-dire l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Plus K_2 est petit, plus l'enzyme a de l'affinité pour le substrat. Cette constante est appelée constante catalytique ou constante de Michaelis-Menten K_m .

L'affinité de l'uréase vis-à-vis de l'urée et le potentiel électrostatique maximal de catalyse sont donnés par les valeurs des constantes K_m et V_m . A titre d'exemple, la [figure III-24](#) montre la cinétique de l'uréase immobilisée par la matrice de polymère acétate selon la représentation de Lineweaver-Burk et d'Eadie-Hofstee [53]. Les valeurs faibles de la constante K_m déterminées dans le cas des différentes biomembranes peuvent s'expliquer par la haute spécificité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat et confirment bien les propriétés non inhibitrices des matrices biocompatibles utilisées dans notre travail comme supports d'immobilisations.

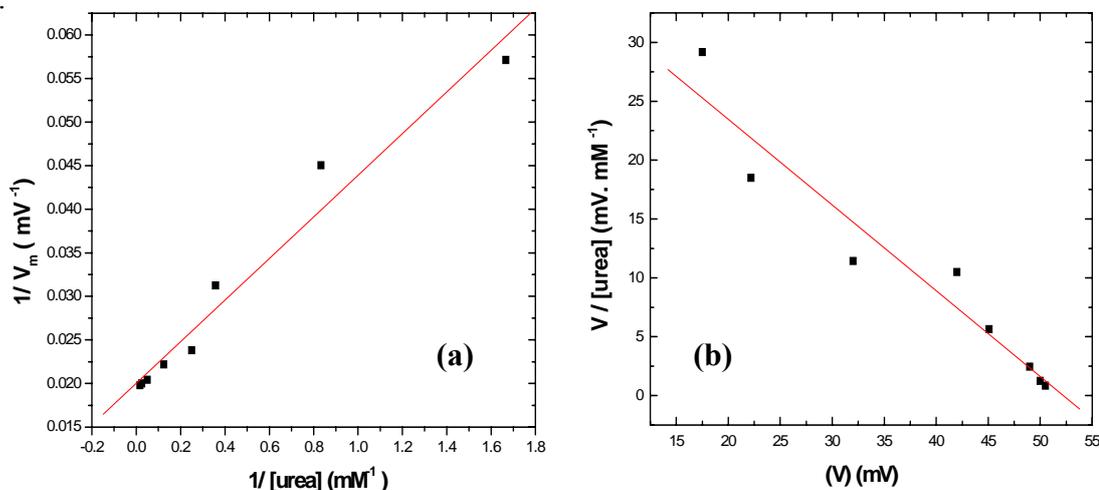


Figure III-24 : Représentation de Lineweaver-Burk (a) et d'Eadie-Hofstee(b) du biocapteur à base de composite uréase-polymère acétate en présence d'urée.

Les paramètres cinétiques de l'uréase immobilisée dans les différents polymères sont regroupés dans le [tableau III-5](#).

Tableau III-5 : Paramètres cinétiques de l'uréase immobilisée

Biomembrane	Potentiel maximal (mV)	K_m (mM) Lineweaver-Burk	K_m (mM) Eadie-Hofstee
uréase-polymère hydroxy	53.4	1.14	1.12
uréase-polymère lactobionate	49.72	1.12	1.19
uréase-polymère acétate	50	1.25	1.37

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons testé de nouveaux polymères pour l'encapsulation de l'uréase dans le but de développer un biocapteur pour l'analyse de l'urée. En outre,

ces matrices d'immobilisation constituées par un polymère neutre (hydroxy) et trois polymères chargés se différenciant par le contre ion associé (chlorure, acétate ou lactobionate) conduisent à immobiliser efficacement cette enzyme sur un support isolant-semiconducteur. La haute stabilité et la bonne reproductibilité de la réponse analytique du biocapteur vis-à-vis de l'urée sont observées dans le cas des électrodes fonctionnalisées par les matrices uréase-polymères chargées, surtout dans le cas du polymère acétate et lactobionate.

Dans le chapitre qui suit nous utiliserons d'autres matrices de nature inorganique pour l'encapsulation de l'uréase et comparer leurs performances avec celles des matrices polymériques.

Références bibliographiques du chapitre III

- [1] M. Kathryn, Koeller, Wong CH., *Nature* **409** (2001) 232.
- [2] R. Koncki, G. J. Mohr, O. S. Wolfbeis., *Biosensors and Bioelectronics* **10** (1995) 653.
- [3] S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana, C. Gessa. *Soil Biol. Biochem* **28** (199) 811.
- [4] M. Chellapandian, M. R. V. Krishnan., *Process Biochemistry* **33** (1998) 595.
- [5] T. Godjevargova, A. Dimov., *Journal of Membrane Science* **135** (1997) 93.
- [6] V. Volotovskiy, Y. J. Nam, N. Kim., *Sensors and Actuators. B* **42** (1997) 233.
- [7] S. Rejikumar, S. Devi., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **4** (1998) 61.
- [8] J. Laska, J. Włodarczyk, W. Zaborska., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (1999) 549.
- [9] E. Hearn, R. J. Neufeld., *Process Biochemistry* **35** (2000) 1253.
- [10] J. Chen, S. Chiu., *Enzyme and Microbial Technology* **26** (2000) 359.
- [11] H. El-Sherif, P.L. Martelli, R. Casadio, M. Portaccio, U. Bencivenga, D.G. Mita., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **14** (2001) 15.
- [12] M.C. Yang, C.C. Lin., *Biomaterials* **22** (2001) 891.
- [13] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **14** (2001) 101.
- [14] S. Akgol, Y. Yalcinkaya , G. Bayramoglu, A. Denizli, M. Y. Arica., *Process Biochemistry* **38** (2002) 675.
- [15] R. Singhal, A. Gambhir, M.K. Pandey, S. Annapoorni, B.D. Malhotra., *Biosensors and Bioelectronics* **17** (2002) 697.
- [16] F. Ayhan, H. Ayhan, E. Piskin, A. Tanyolac., *Bioresource Technology* **81** (2002) 131.
- [17] G. Bayramoglu, H. Altınok, A. Bulut, A. Denizli, M. Y. Arica., *Reactive. Functional Polymers* **56** (2003) 111.
- [18] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys., *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2004) 1641.
- [19] W. Koh, M. Pishko., *Sensors and Actuators B* **106** (2005) 334.
- [20] R. V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto., *Reactive and Functional Polymers* **62** (2005) 51.

-
- [21] K. Sawicka, P. Gouma, S. Simon., *Sensors and Actuators B* **108** (2005) 585.
- [22] S. K. Jha, S.F. D'Souza., *J. Biochem. Biophys. Methods* **62** (2005) 215.
- [23] H. Barhoumi, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, C. Mousty, S. Cosnier, E. Perez , I. Rico-Lattes., *Biosensors and Bioelectronics* **20** (2005) 2318.
- [24] J.V. de Melo, A.P. Soldatkin, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, S.Cosnier., *Biosensors and Bioelectronics* **18** (2003) 345.
- [25] E. Serres, P.Vicendo, E.Perez, T. Noel, I. Rico-Lattes., *Langmuir* **15** (1999) 6956.
- [26] T. Noel, S. Franceschi, E.Perez, P. Vicendo, I. Rico-Lattes ., *Langmuir* **16** (2000) 8980.
- [27] S. Franceschi, O. Bordeau, C. Millerieux, E. Perez, P. Vicendo, I. Rico-Lattes, A. Moisand., *Langmuir* **18** (2002) 1743.
- [28] S. Asgatay, S. Franceschi-Messant, E. Perez, P. Vicendo, I. Rico-Lattes, E. Phez, M. Pierre Rols., *International Journal of Pharmaceutics* **285** (2004) 121.
- [29] L. Puech, E. Perez, I. Rico-Lattes, M. Bon, A. Lattes., *New J. Chem.* **21** (1997) 1235.
- [30] L. Puech, Ph.D. Thesis of University Paul Sabatier, Toulouse, France, 1997.
- [31] S.M. Sze, M. Hill, N. Jersey, J. Willy., *Physics and Technology* (1985) 381.
- [32] S. J. Hawkins, N. M. Ractiffe., *J Mater Chem* **10** (2000) 2057.
- [33] M. E. Nicho, H. Hu., *Sol Energ Mat Sol C* **63** (2000) 423.
- [34] H. Barhoumi, A. Maaref, R. Mlika, C. Martelet, N. Jafferzic-Renault, L. Ponsoynet., *Materials Science and Engineering C* **25** (2005) 61.
- [35] D. Pijanowska, W. Torbicz., *Sensor Actuat B* **44** (1997) 370.
- [36] J.L. Diot, J. Joseph, J.R. Martin, P. Clechet., *J. Electroanal. Chem.* **75** (1985) 193.
- [37] H. Barhoumi., *DEA de physico-chimie de la matière condensée* (2002).
- [38] A. P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault., *Talanta* **58** (2002) 351.
- [39] F. Richards, J.R. Knowles., *J. Mo. Biol* **37**(1968)331
- [40] P. Mosan, G. Puzo, H. Mazarguil., *Biochimie* **57**(1975)160
- [41] S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, V.N. Arkhipova, M.Y. Alesina, C. Martelet, A.V. El'skaya, A.P. Soldatkin., *Biosensors and Bioelectronics.* **14** (1999) 283.
-

- [42] A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, A.A. Shulga, L.I. Netchiporouk, A.M. Nyamsi Hendji, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet., *Anal. Chim. Acta* **283** (1993) 695.
- [43] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Chudy., *Journal of Inorganic Biochemistry* **98** (2004) 1160.
- [44] Anh Tuan MAI., Thèse de l'Université Claude Bernard LYON 1 (2002).
- [45] S. Cosnier, S. Szumerits, S. R. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez , I. Rico-Lattes., *Talanta* **55** (2001) 889.
- [46] A. Sehitogullari, H. A. Uslan., *Talanta* **57** (2002) 1039.
- [47] R. Koncki, P. Leszczyński, A. Hulanicki, S. Glab., *Anal Chim Acta* **257** (1992) 67.
- [48] L. Dumaine., Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon (2004).
- [49] D.A. Gough, J.K. Leypoldt., *Anal. Chem.* **51** (1979) 439.
- [50] J.-M. Save'ant, *J. Electroanal., Chem.* **302** (1991) 91.
- [51] D.A. Gough, J.K. Leypoldt., *J. Electrochem. Soc.* **127** (1980) 1278.
- [52] H. Kaltwasser, H.G. Schlegel., *Anal. Biochem.* **16** (1966) 132.
- [53] H. Lineweaver, D Burk., *J. Am. Chem. Soc* **56** (1934) 658.

Chapitre IV

***Encapsulation de l'uréase
dans un matériau
synthétique Zn-Al hydroxyde
double lamellaire :
Application à un biocapteur
urée***

Chapitre IV

Encapsulation de l'uréase dans un matériau synthétique Zn-Al hydroxyde double lamellaire : Application à un biocapteur urée

Introduction

Les matériaux hybrides bioinorganiques constituent une nouvelle classe de matériaux à l'interface entre la biologie et la science des matériaux. En outre, ces matériaux occupent une position privilégiée pour la construction des biocapteurs [1,2]. Parmi ces matériaux les hydroxydes doubles lamellaires (notés, LDHs, acronyme de Layered Double Hydroxyde) qui ont fait l'objet d'un vif intérêt depuis quelques années en raison de leurs propriétés électrochimiques [3,4] ou d'échange anionique [5]. Ces composés lamellaires bidimensionnels présentent une grande anisotropie de leurs liaisons chimiques, fortes au sein des feuillets hydroxylés, faibles pour la cohésion entre les feuillets. Cette caractéristique permet d'intercaler une grande variété d'espèces chimiques, tant inorganiques qu'organiques ainsi que biologiques permettant de modifier la réactivité du matériau. En plus de leurs utilisations comme support en catalyse [6,7], adsorbants [8,9], échangeurs d'anions [10,11] et d'autres applications médicales [12], les hydroxydes doubles lamellaires ont connu

récemment un nouveau débouché pour l'encapsulation par intercalation des protéines [13]. Ainsi, plusieurs entités biologiques ont été intercalées tel que; l'adénosine monophosphate [14], l'ADN [15,16] et des biopolymères comme le poly(α , β -aspartate) [17], l'acide alginique [18], la cyclodextrine [19], les enzymes [20].... Dans ce contexte, notre étude porte sur l'immobilisation de l'uréase dans une matrice HDL de type $Zn_{1-x} Al_x(OH)_2 X_{x/q}.nH_2O$ en présence de vapeurs de glutaraldehyde en vue de la réalisation d'un biocapteur d'urée.

I- Structure du matériau hydroxyde double lamellaire (HDL)

La structure des HDL_s utilisée dans notre travail est constituée d'un empilement de feuillets de type brucite (Zn, Al) (OH)₂ formé d'octaèdres (Zn, Al) (OH)₆ à arrêtes communes (Figure IV-1). La densité de charge des feuillets est proportionnelle au rapport :

$$y = \frac{Zn^{2+}}{Zn^{2+} + Al^{3+}}$$

Afin d'assurer la neutralité électrique globale, des espèces anioniques X⁻ (Cl⁻) sont alors intercalées dans l'espace interfeuillets, conjointement à des molécules d'eau. La cohésion de la structure résulte, d'une part d'interactions électrostatiques entre les feuillets métalliques oxygénés et les anions, et d'autre part d'un réseau de liaisons hydrogène s'établissant entre les molécules d'eau, les anions interlamellaires et les groupements hydroxyles des feuillets.

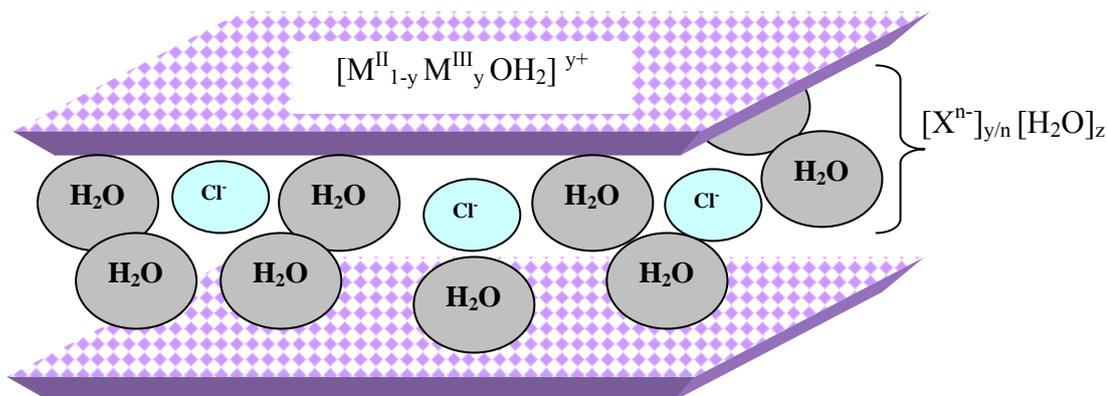


Figure IV-1: Représentation schématique de la structure d'une phase HDL.

I.1- Différentes méthodes de synthèse du matériau HDL

Les méthodes de synthèses usuelles conçus pour la synthèse du matériau hydroxyde double lamellaire sont au nombre de trois [21]. Les deux méthodes les plus utilisées sont la coprécipitation directe et l'échange anionique. La troisième méthode de synthèse dite de reconstruction est moins courante.

I.1.1- Coprécipitation directe

La coprécipitation consiste à provoquer la précipitation simultanée des cations métalliques par ajout d'une espèce basique à une solution de sels correspondants pris en proportions adéquates. Les meilleurs résultats s'obtiennent en ajoutant simultanément dans un réacteur contenant de l'eau, la solution acide des sels métalliques et la solution basique de façon à maintenir le pH à une valeur constante. La préparation se fait sous atmosphère exempte de CO₂, afin d'éviter la formation d'une phase ions carbonate intercalés. Parfois cette méthode est limitée et certains LDHs ne peuvent pas être obtenus par coprécipitation; cela est dû notamment à la complexation des métaux présents dans la solution [22]. La préparation se fait alors par d'autres voies telles que celle de l'échange anionique.

I.1.2- Echange anionique

Cette méthode utilise l'une des principales propriétés des LDHs. La réaction d'échange est une réaction topotactique, c'est-à-dire que la structure iono-covalente des feuillets est conservée, alors que les liaisons plus faibles anions/feuillets sont cassées. Il est à noter que les échanges s'effectuent plus facilement à partir de phases contenant des anions nitrates intercalés qu'à partir des phases contenant des anions carbonates ou chlorures intercalés, car l'affinité des ions NO₃⁻ pour la matrice est moindre que celle des ions Cl⁻ et CO₃⁻ [23].

I.1.3- Reconstruction

Après calcination et formation d'oxydes mixtes les LDHs ont la propriété de pouvoir se régénérer. Une fois l'anion détruit dans le domaine de température de calcination, il peut être remplacé par un autre anion. On parle alors, de "l'effet mémoire" des LDHs.

I.2- Préparation du matériau hôte $Zn_3Al(OH)_8DS.nH_2O$

Le matériau $Zn_3Al(OH)_8DS.nH_2O$ (noté ZnAl-DS) à base des molécules anioniques dodecyl sulfate (DS) est synthétisé selon la méthode de coprécipitation décrite par De Roy et al [24]. Celle-ci consiste à introduire une solution aqueuse contenant un mélange de $ZnCl_2$ et $AlCl_3$ définie par un rapport molaire Zn^{2+}/Al^{3+} égale à 2 dans un réacteur chimique contenant une solution de sodium dodecyl sulfate. ($DS^-/Al^{3+} = 2$). Le pH est maintenu constant à une valeur de 8 par addition simultanée d'une solution de NaOH (1 M). Après agitation de la suspension pendant 24 heures à température ambiante, le produit final est centrifugé, lavé plusieurs fois avec de l'eau bicarbonatée puis séché à la température ambiante. La réaction de synthèse est conduite sous atmosphère de N_2 pour éviter la contamination du matériau par le CO_2 . Une solution colloïdale de ZnAl-DS dans le butanol est obtenue après agitation de la suspension ZnAl-DS/butanol (1 g/L) sous reflux à 90 °C pendant 48 heures selon Adachi et al afin d'obtenir des valeurs élevées de surface spécifique [25].

I.3- Intercalation de l'uréase dans le matériau HDL

Comme nous avons déjà mentionné, plusieurs entités organiques, inorganiques et biologiques peuvent être intercalées dans le matériau HDL. Dans notre cas l'idée générale est d'intercaler l'uréase dans l'espace interfeuillet du matériau HDL.

Au cours de la phase d'intercalation, nous avons suivi deux chemins de synthèse pour aboutir au matériau nanohybride ZnAl-uréase; reconstruction (échange indirecte) et l'échange anionique (échange directe). D'après la littérature [26], les configurations possibles qui peuvent être atteintes au cours de l'interaction entre le matériau hôte HDL et la molécule invitée l'uréase sont fonction des sites disponibles au sein de la matrice inorganique HDL. La figure IV-2 illustre les différents sites qui peuvent être occupés par l'uréase.

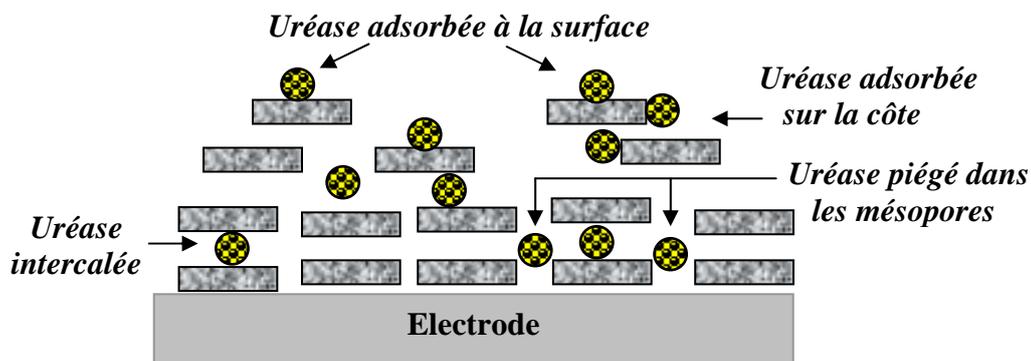


Figure IV-2 : Schéma représentatif de l'interaction HDL-uréase.

I.3.1- Etape de reconstruction: L'échange indirect ou dit par étape (reconstruction) entre l'uréase et la matrice hôte HDL est effectué à partir de la solution colloïdale de nanoparticules ZnAl-DS delaminés dans le butanol. En effet, la solution colloïdale (1g/L) est dispersée dans l'eau diionisée pour assurer le transfert des particules HDL de la phase organique vers la phase aqueuse. La séparation de phase eau/butanol est atteinte après agitation de la suspension colloïdale pendant une nuit sous atmosphère d'azote. A la phase aqueuse séparée, est ajoutée une solution d'uréase (1g/L) solubilisée dans un tampon phosphate (20 mM KH_2PO_4 à pH = 7.4).

I.3.2- Etape d'échange anionique : A la suspension colloïdale de ZnAl-DS (1 g/L) delaminé dans le butanol, on ajoute la solution d'uréase (1g/L) solubilisée dans le tampon phosphate. Ce mélange est agité pendant 4 heures sous atmosphère de N_2 . L'échange anionique entre les molécules d'uréase et les molécules dodecyl sulfate (DS) intercalées dans le matériau HDLs s'effectue par transfert de phase selon l'équation IV-1:



Au mélange ZnAl-uréase obtenu dans les deux étapes d'élaboration, 10 % de glycérol est ajouté pour assurer l'homogénéité et l'adhésion de la biomembrane au cours de l'élaboration du biocapteur d'urée.

I.4- Caractérisation structurale du matériau HDL par DRX et spectroscopie IR

Les phases HDLs et HDLs modifiées par les molécules d'uréase ont été caractérisées par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge (IR), afin de préciser la structure du matériau HDL avant et après l'intercalation des molécules d'uréase.

Dans cette étude, les diffractogrammes X des matériaux LDHs et nanohybrides uréase-LDHs ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre INEL équipé d'une anticathode de cobalt, d'un monochromateur avant et d'un détecteur courbe CPS 120.

Les diffractogrammes X des phases ZnAl-DS et ZnAl-uréase sont présentés sur la [figure IV-3](#). Le diffractogramme X de la phase ZnAl-Cl est également représenté sur la même [figure IV-3](#) pour faire des comparaisons. Cette dernière cristallise dans le système trigonal (groupe d'espace : R-3m). L'indexation du diagramme des rayons X peut être effectuée avec une maille hexagonale. La distance interréticulaire de la raie (003) correspond à l'espace

interfeuillet, alors que la distance interréticulaire (110) représente la moitié de la distance métal-métal dans le feuillet.

D'une manière générale, les diffractogrammes X des phases ZnAl-Cl (a) et ZnAl-DS (b) semblent mieux résolus que ceux de la phase ZnAl-uréase obtenus par la méthode d'échange directe (c) et la méthode d'échange indirecte ou dite de reconstruction (d). Ceci suggérant un meilleur état de cristallinité des phase LDHs en absence de molécules d'uréase.

On remarque que la présence d'uréase dans le matériau HDL affaiblie la cristallinité suite à la haute dispersion des feuillet HDL dans le matériau biologique. La présence des raies de diffraction (012) et (110) explique bien la stabilité structurale de la matrice inorganique au cours de chaque phase de synthèse. Dans le cas des phases ZnAl-Cl et ZnAl-DS, la différence observée sur la position de la première raie confirme bien l'intercalation des macromolécules dodecyl sulfate dans l'espace interfeuillet.

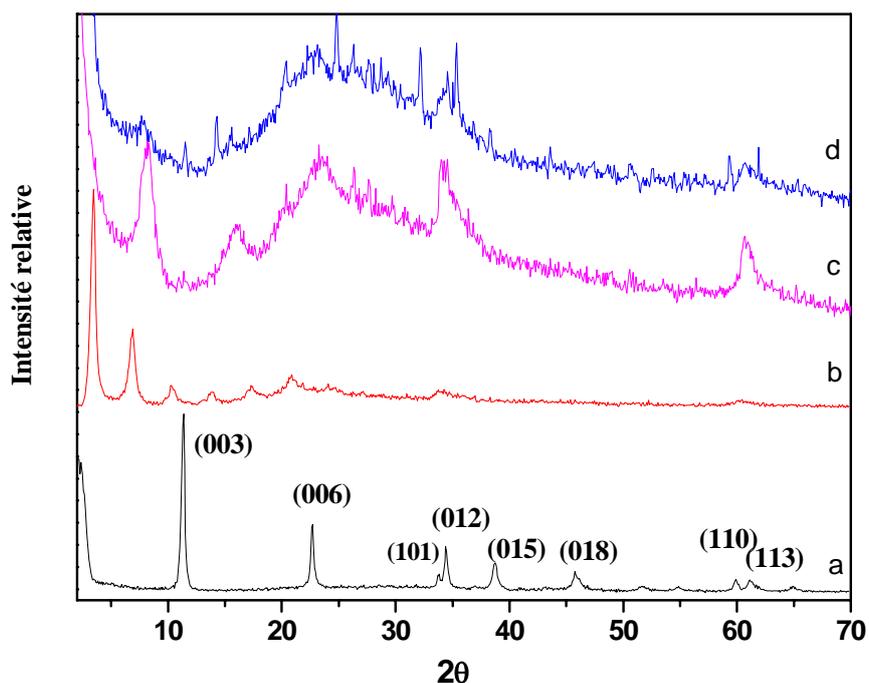


Figure IV-3 : Diagrammes de diffraction des rayons X des phases LDHs. (a) ZnAl-Cl, (b) ZnAl-DS, (c) et (d) ZnAl-uréase obtenues par reconstruction et échange anionique.

Une autre technique de caractérisation structurale telle que l'infrarouge (IR) permet de mettre en évidence la présence de l'entité anionique intercalée dans l'espace interfeuillet ainsi que les interactions qui peuvent exister avec la matrice HDL.

Dans cette étude, les spectres infrarouges ont été obtenus dans le domaine $4000-400\text{ cm}^{-1}$ sur un appareil PERKIN ELMER SPECTRUM ONE équipé d'une sphère de réflexion diffuse.

Les spectres infrarouges des phases ZnAl-DS (b), ZnAl-uréase obtenus respectivement par échange anionique (c) et ZnAl-uréase (d) par reconstruction sont présentés sur la [figure IV-4](#). Sur cette même figure, les spectres infrarouges de la phase ZnAl-Cl (a) et l'uréase (e) ont été présentés comme spectres de références. Les spectres IR du matériau ZnAl-uréase présentent des bandes de vibration qui sont caractéristiques de l'uréase et des ions phosphate HPO_4^{2-} intercalés au cours du processus de synthèse. La comparaison de ces bandes avec celles issues de l'uréase libre nous conduit à conclure que les ions phosphates intercalés n'affectent pas l'activité des molécules biologiques. De plus, la variation de l'intensité des bandes d'absorption observées entre 1000 et 1700 cm^{-1} montre que l'intercalation des ions phosphates apparaît plus importante dans le cas du matériau ZnAl-uréase obtenu par reconstruction que celle obtenue par échange direct.

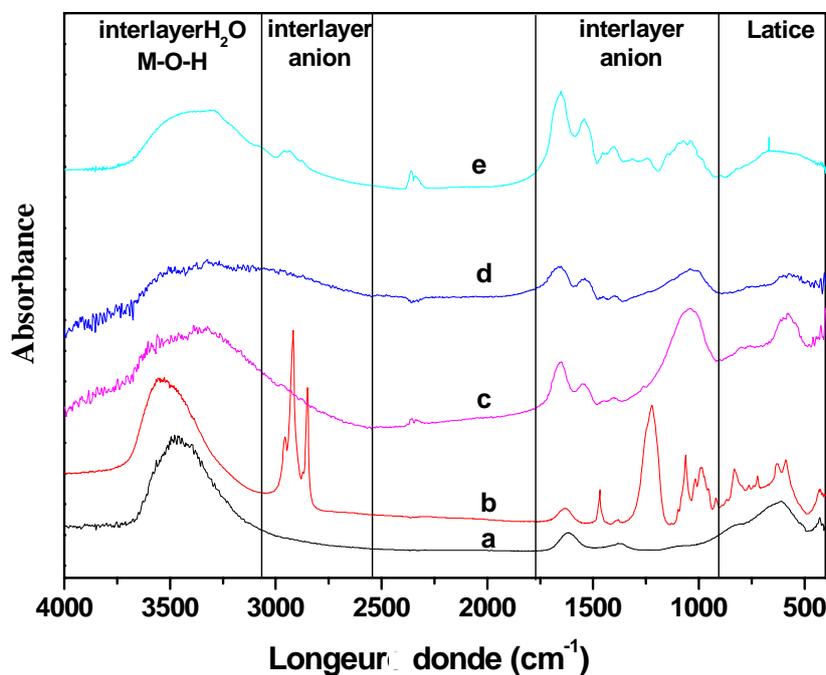


Figure IV-4 : Spectres infrarouge. (a) ZnAl-Cl, (b) ZnAl-DS, (c) et (d) ZnAl-uréase obtenus par reconstruction et échange anionique, (e) uréase libre.

Tous les modes d'élongation et de vibration de l'uréase [27] ont été observés dans les spectres infrarouges des matériaux hybrides ZnAl-uréase. La comparaison entre les deux spectres IR a et b montre l'apparition de nouvelles bandes vers 1250 et 2900 cm^{-1} indiquant l'échange des ions chlorure par les molécules DS (dodecyl sulfate) dans le matériau HDL. La disparition de ces bandes dans les spectres infrarouges c et d confirme l'échange des molécules DS par les molécules d'uréase au cours de la synthèse du matériau hybride ZnAl-uréase selon les deux méthodes d'échanges anioniques directe et indirecte (reconstruction).

L'étude texturale du matériau HDL-uréase a été réalisée par le microscope électronique à balayage (MEB). La figure IV-5 montre la texture du matériau hybride ZnAl-uréase obtenu par simple adsorption et reconstruction. Ces phases présentent une texture régulière et homogène. Le cliché MEB du matériau ZnAl-Cl est présenté sur la même figure IV-5 pour faire des comparaisons. Après l'intercalation de l'uréase, les particules ZnAl-Cl changent d'orientation. On remarque que la dispersion des plaquettes HDL au sein des molécules d'uréase est meilleure dans le cas du matériau ZnAl-uréase obtenu par reconstruction.

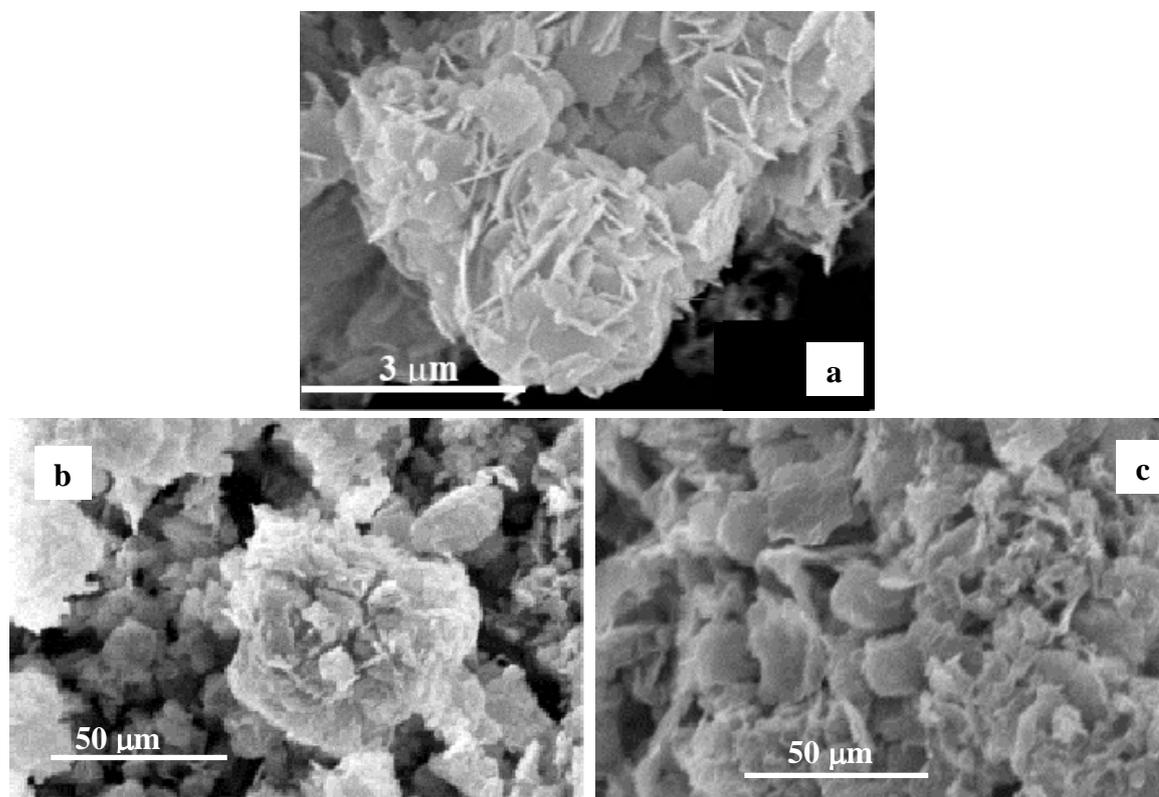


Figure IV-5 : Clichés de MEB de : (a) ZnAl-Cl, (b) ZnAl-uréase/adsorption, (c) ZnAl-uréase/reconstruction.

Ces différences de morphologie observées pour le matériau ZnAl-uréase, obtenu par adsorption et reconstruction, pourraient influencer l'arrangement et la densité de l'enzyme immobilisée autour des particules HDL.

II- Fonctionnalisation de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ avec le matériau nanohybride ZnAl-uréase

Dans un travail antérieur, un biocapteur d'urée avait été obtenu par dépôt du matériau ZnAl-uréase sur un transducteur ISFET (transistor à effet de champ) [27]. Au cours de notre travail, nous avons fonctionnalisé la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ par le matériau hybride ZnAl-uréase obtenu selon deux méthodes ; la reconstruction et l'échange direct des molécules uréase sur le matériau précurseur ZnAl-DS.

II.1- Dépôt du matériau nanohybride ZnAl-uréase sur la structure Si/SiO₂/Si₃N₄

La fonctionnalisation de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ par le matériau ZnAl-uréase s'effectue à la tournette (1000 tr/min). La couche formée par dépôt de 20 µL est exposée pendant une durée variant de 8 à 16 min sous atmosphère saturée en vapeur de glutaraldéhyde. Cette étape permet la réticulation des molécules d'uréase au sein du matériau inorganique.

II.2- Performances analytiques de la structure SiO₂/Si₃N₄/ZnAl-uréase

La réponse de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/ZnAl-uréase vis-à-vis de l'urée est évaluée par des mesures capacitatives, C (V). Les mesures sont réalisées à l'aide d'une cellule à trois électrodes (voir chapitre III) et un tampon phosphate 5 mM, pH = 7.4 dont la force ionique est fixée à 70 mM de NaCl. La figure IV-5 présente le spectre C(V) obtenu pour différentes concentrations en urée. Le changement local du pH au cours de la réaction de catalyse enzymatique provoque le déplacement de la caractéristique capacité-potential vers les potentiels négatifs.

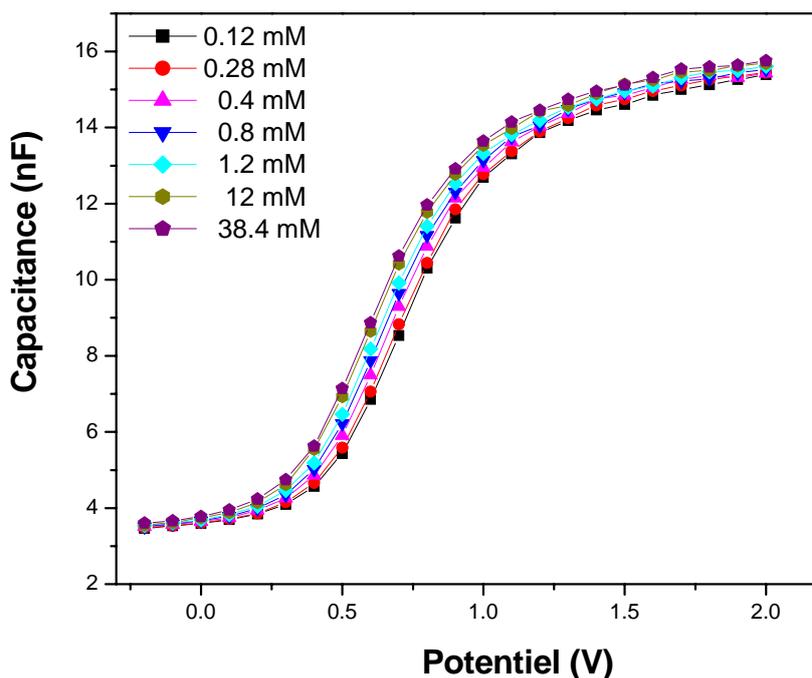


Figure IV-5 : Spectre $C(V)$ de la structure $Si/SiO_2/Si_3N_4/ZnAl$ -uréase pour différentes concentrations en urée.

Un travail antérieur, avait montré que la réticulation chimique de l'uréase par le glutaraldéhyde dans la matrice ZnAl-Cl constitue une étape indispensable pour la stabilité du biocapteur [27-29]. En effet, la réticulation aux vapeurs de glutaraldéhyde permet de réduire le re-largage de l'enzyme de la matrice vers la solution [26,30]. Pour cette raison et comme les performances d'un biocapteur sont intimement liés au mode d'immobilisation de l'enzyme, nous avons étudié quelques paramètres critiques impliqués dans l'élaboration d'un biocapteur tels que l'influence de la procédure de préparation du matériau hybride ZnAl-uréase et celle de la réticulation de l'enzyme par le glutaraldéhyde. Dans ce qui suit, les procédures d'immobilisation de l'enzyme seront désignées par **a** et **b**.

* **a** correspond à la phase de reconstruction basée sur le piégeage physique suivie d'une étape de réticulation de l'uréase à l'intérieur de la matrice inorganique HDL.

* **b** correspond à la phase d'échange anionique entre les molécules d'uréase et les molécules DS (dodecyl sulfate) occupant l'espace interfeuillet du matériau ZnAl-DS.

La réponse potentiométrique des biocapteurs préparés selon les deux procédures a et b est enregistrée dans les mêmes conditions expérimentales. Les courbes de sensibilité obtenues pour ces deux procédures d'immobilisation sont présentées sur la figure IV-6. Les courbes de

sensibilités présentées par la suite seront exprimées en fonction de pUrée. On définit pUrée = $-\log [\text{Urée}]$.

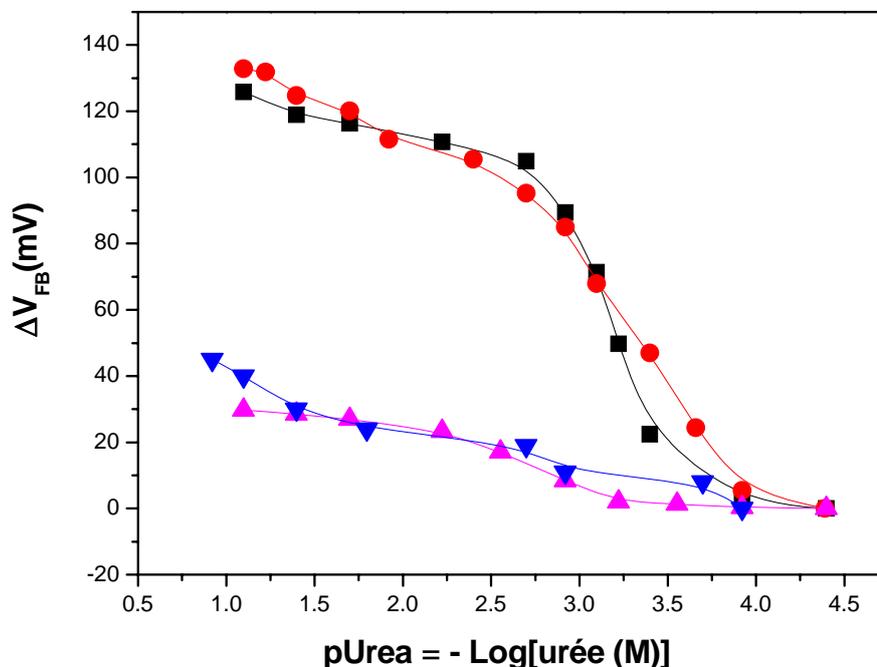


Figure IV-6 : Caractéristiques de sensibilité des biocapteur obtenus selon les deux procédures de préparation du matériau ZnAl-uréase.

Procédure a : (■) sans glutaraldéhyde, (●) 8 min au glutaraldéhyde, (▲) 16 min au glutaraldéhyde. Procédure b (▼) : sans glutaraldéhyde

D'après la [figure IV-6](#), on constate que l'utilisation du glutaraldéhyde comme agent de réticulation influe nettement sur la réponse des biocapteurs. Les meilleures performances analytiques sont obtenues dans les cas où le biocapteur est préparé selon la procédure **a**. En effet, la haute sensibilité vis-à-vis de l'urée (90 mV/purée) est observée dans le cas du biocapteur non réticulé aux vapeurs de glutaraldéhyde. Cette haute sensibilité observée dans la première mesure n'est pas reproductible et diminue fortement voire disparaît après quelques mesures successives. Ce résultat confirme bien que le biocapteur préparé en absence de glutaraldéhyde est instable et présente une très faible durée de vie suite au re-largage lent de l'enzyme du matériau HDL vers l'électrolyte. En outre, lorsque la durée de réticulation est assez importante (16 min) la sensibilité du biocapteur diminue de presque à 25 % par rapport

à la sensibilité obtenue dans le cas du biocapteur non réticulé. Ceci peut être attribué à l'inactivation de l'enzyme suite au haut degré de réticulation rendant plus difficile l'accès des sites actifs de l'enzyme par le substrat (urée). Il apparaît que les meilleures performances analytiques sont obtenues pour le biocapteur préparé selon la procédure **a** et avec un temps de réticulation de 8 min. Ces résultats sont en bon accord avec ceux trouvés dans le cas des matrices ZnAL-uréase déposées sur des ISFETs (transistor à effet de champs) [27]. Les performances analytiques des biocapteurs préparés selon la procédure **a** sont présentées dans le [tableau IV-1](#).

Tableau IV-1: Performances analytique des biocapteurs préparés selon la procédure **a**.

	Sans glutaraldéhyde	glutaraldéhyde (8 min)	glutaraldéhyde (16 min)
Potentiel maximal (mV)	132	126	30
Sensibilité (mV/pUrea)	90	70	21
Domaine de linéarité (mM)	0.1- 3.2	0.1 -5.6	0.56 -5.6

Les performances analytiques les moins satisfaisantes sont obtenues pour le biocapteur préparé selon la procédure **b**. En effet, la faible réponse de ce biocapteur vis-à-vis de l'urée (10 mV/purée) indique l'inefficacité du matériau inorganique HDL vis à vis des molécules d'uréase échangées. En plus, si la matrice inorganique contient une fraction d'enzyme échangée, elle sera partiellement dénaturée par la phase organique. Ceci est confirmé par la faible intensité des bandes d'absorption observées dans le cas du matériau hybride ZnAl-uréase ([Figure IV-4](#)). Dans un travail antérieur [31], ces auteurs avaient montré qu'on peut augmenter l'espace interfeuillet du matériau HDL à température ambiante au maximum jusqu'à 40 Å. A ce stade, on peut conclure que l'intercalation de l'uréase (dimensions $\sim 50 \times 90$ Å) est difficile voire impossible dans l'espace interfeuillet.

II.3- Stabilité des biocapteurs élaborés suivant les deux procédures d'immobilisation

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux de recherche ont été consacrés à l'immobilisation de l'uréase à la surface d'une électrode pour l'élaboration de biocapteurs à urée. Malgré ces efforts, la commercialisation de ce type de capteur n'a pas encore vu le jour. La dénaturation de l'enzyme et la faible durée de vie du biocapteur sont parmi les nombreuses raisons qui peuvent expliquer cet échec de commercialisation. La majorité de ces biocapteurs à urée présentent des durées de vie de quelques jours voire au mieux de quelques mois [32, 33]. Or il faut souligner que la conservation d'une activité intéressante sur une longue durée constitue un atout décisif pour un biocapteur, en vue d'une application industrielle. Nous allons étudier la stabilité des biocapteurs préparés suivant les deux procédures d'immobilisation. La [figure IV-7](#) montre l'évolution de la réponse des biocapteurs en fonction du temps de conservation dans un tampon phosphate (5mM, pH = 7.4) à 4 °C.

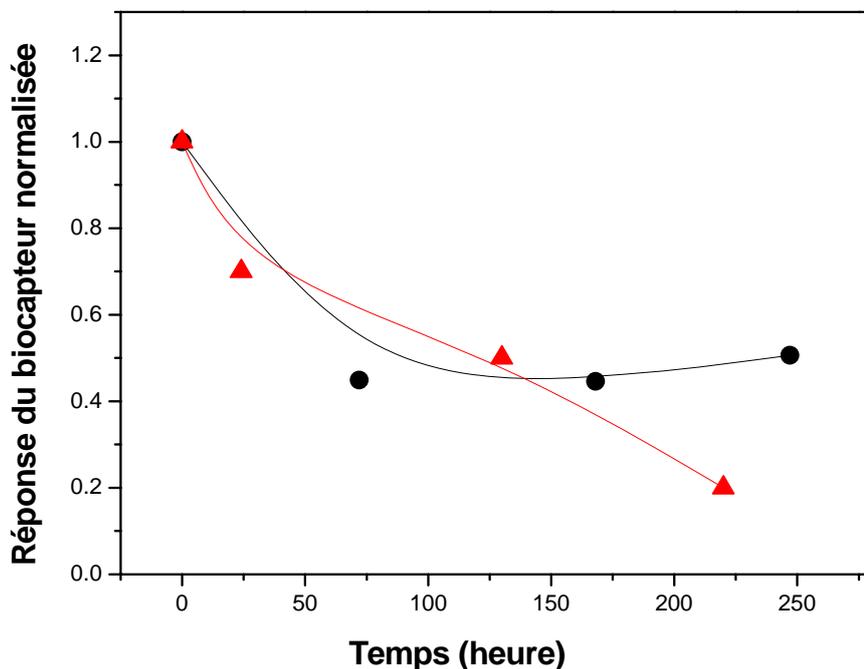


Figure IV-7 : Evolution de la sensibilité du biocapteur avec le temps. Entre chaque mesure, l'électrode est stockée dans un tampon phosphate pH 7.4 à 4 °C. (●) procédure (a) + 8 min d'exposition au glutaraldéhyde et (▲) procédure (b).

D'après la [figure IV-7](#) nous observons une diminution de la sensibilité du biocapteur préparé selon la procédure **a** après 3 jours de stockage dans le tampon phosphate 5 mM, puis elle devient stable pendant 10 jours. La diminution de la sensibilité peut s'expliquer par le fait que, lorsque l'électrode entre en contact avec l'électrolyte pour une durée prolongée, il s'établit un phénomène d'échange entre les nanoparticules ZnAl-uréase et les anions phosphate. Cet échange provoque le gonflement de la matrice d'argile et par conséquent modifie l'accessibilité des sites actifs de l'uréase pour l'urée. Ceci a été confirmé par le suivi de la cinétique de l'enzyme immobilisée soumise à une phase de conditionnement dans le tampon phosphate pour différentes concentrations. La cinétique de l'enzyme est régie par la détermination de la constante cinétique K_m et le potentiel maximal V_{max} à partir de la représentation de Lineweaver-Burk [34].

La [figure IV-8](#) montre les caractéristiques de Lineweaver-Burk obtenues avant et après conditionnement du biocapteur élaboré selon la procédure **a**.

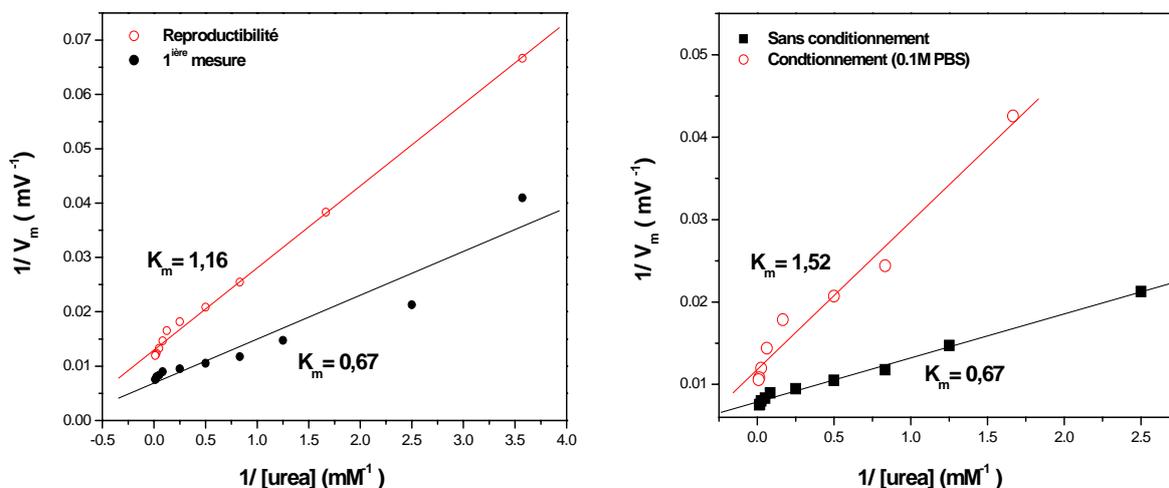


Figure IV-8 : Représentation de Lineweaver-Burk à différentes phases de conditionnement dans un tampon phosphate (5 mM, pH=7.4) à 4 °C.

Les performances cinétiques des capteurs préparés selon la procédures **a** suivit d'une étape de conditionnement sont présentées dans le [tableau IV-2](#).

Tableau IV-2: Performances cinétiques des biocapteurs préparés selon la procédure a et soumis à une phase de conditionnement.

	Conditionnement KH ₂ PO ₄ 5 mM (1h)	Conditionnement KH ₂ PO ₄ 5 mM (72h)	Conditionnement KH ₂ PO ₄ 100 mM (1h)
Sensibilité (pUrée/mV)	70	35	30
K_m (mM)	0.67	1.16	1.52

D'après les résultats du [tableau IV-2](#), on remarque que la concentration du milieu de conditionnement influence la cinétique du biocapteur. Dans un travail antérieur, le même comportement a été observé pour un biocapteur à base d'une biomembrane PVC (polychlorure de vinyle)/uréase. En effet, Robert Koncki et al ont observé la diminution de la sensibilité du biocapteur lorsque la concentration de la solution de conditionnement augmente [\[35\]](#).

II.4- Caractérisation de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/ZnAl-uréase par spectroscopie d'impédance Z(Ω).

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est fréquemment utilisée pour caractériser les propriétés électriques d'une couche de biomolécules liée à un support métallique [\[36\]](#), elle permet aussi de rendre compte du comportement de l'interface liquide/solide modifiée [\[37,38\]](#), qui joue un rôle prépondérant sur les performances du biocapteur. La théorie de la spectroscopie d'impédance est bien détaillée dans l'annexe.

Les mesures par spectroscopie d'impédance ont été effectuées avec le même dispositif que celui utilisé dans le cas des mesures capacitives. Ces mesures sont faites dans la gamme des fréquences allant de 100 mHz à 100 kHz et une valeur de tension de polarisation 1.5 V (cette valeur appartient au régime d'accumulation de l'interface Si₃N₄/électrolyte) appliquée par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl/KCl_{saturé}. Le milieu de test est un tampon phosphate KH₂PO₄ à pH=7.4. Ces mesures d'impédances sont représentées dans le formalisme de l'impédance complexe : représentation de la partie imaginaire de l'impédance

complexe en fonction de la partie réelle de l'impédance ($\text{Im}(Z) = f(\text{Re}(Z))$) appelée Nyquist Z. Dans notre cas, la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ est bloquante et dont la représentation ($\text{Im}(Z) = f(\text{Re}(Z))$) est une droite. Pour cette raison, la représentation admittance Nyquist Z donnée par $\text{Im}(Y) = f(\text{Re}(Y))$ est la plus exploitée [39,40]. Des études antérieures ont montré que les structures à base de semi-conducteur incluant une couche d'oxyde modifiée par une biomembrane réagissent en tant que conducteur lorsqu'ils sont polarisés dans le régime d'accumulation [41]. Si les couches associées au semi-conducteur sont électriquement neutres, elles peuvent être considérées comme une série de capacités. Cette approche purement capacitive a été justifiée par les études faites sur les structures Si/SiO₂/Ti/TiO₂ en technologie planaire [42]. La figure IV-9 montre les représentations Nyquist Z et Nyquist Y de la structure bloquante Si/SiO₂/Si₃N₄/électrolyte.

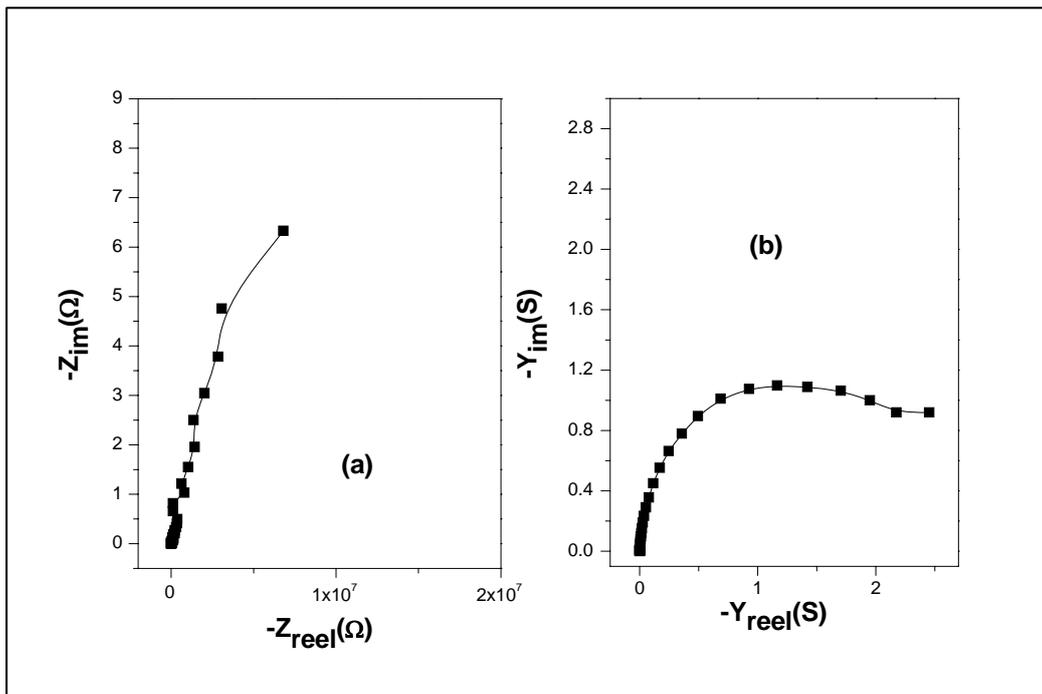


Figure IV-9 : Représentations dans le plan complexe: (a) $\text{Im}(Z) = f(\text{Re}(Z))$ et (b) $\text{Im}(Y) = f(\text{Re}(Y))$

La structure Si/SiO₂/Si₃N₄ a été modifiée par dépôt d'une couche du matériau nanohybride ZnAl-uréase. La figure IV-10 présente les courbes de Nyquist Y de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ avant et après fonctionnalisation.

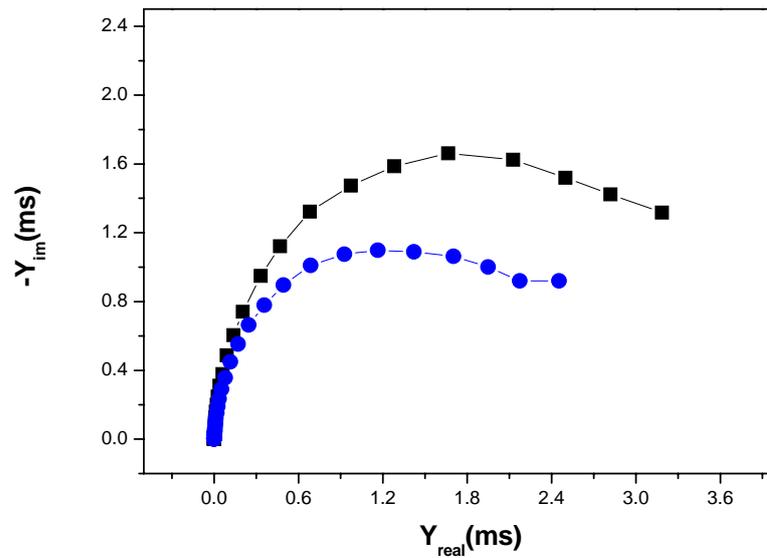


Figure IV-10 : Représentations dans le plan complexe $Im(Y) = f(Re(Y))$: structure avant (■) et après fonctionnalisation (●).

La structure Si/SiO₂/Si₃N₄/ZnAl-uréase obtenue selon la procédure de reconstruction a été testée vis-à-vis de l'urée. Les spectres d'admittances obtenus pour différentes concentrations en urée et pour différents pouvoirs tampons sont présentés sur la [figureIV-11](#). On remarque que l'augmentation de la concentration en urée provoque une diminution du diamètre des demi-cercles suite à la variation de la conductivité produite par la réaction de dégradation de l'urée au sein de la matrice biosensible.

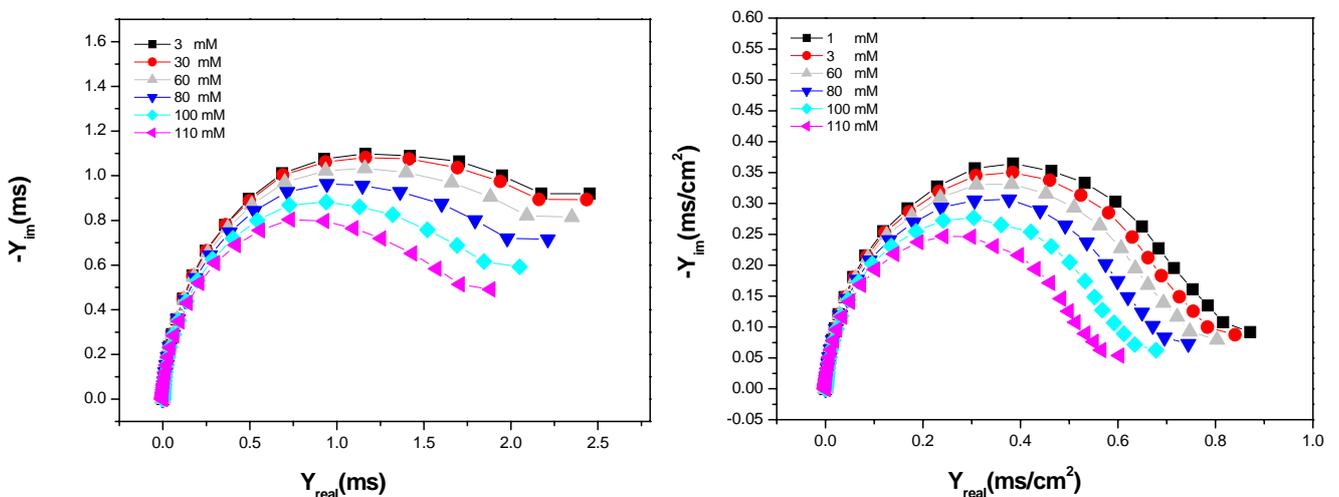


Figure IV-11 : Evolution du Nyquist Y en fonction de la concentration en urée de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/Zn-Al-uréase. Tampon phosphate (a) 1mM et (b) 5 mM à pH = 7.4.

La génération des ions NH_4^+ et HCO_3^- au cours de la réaction de catalyse diminue la résistance au sein de la couche biosensible ce qui provoque la diminution du rayon du demi cercle. Vu l'importance de l'influence du pouvoir tampon sur la réponse du biocapteur, nous avons effectué les mesures dans un tampon phosphate de concentrations 1 mM et 5 mM. En effet, Adeloju et al ont montré qu'une concentration de tampon supérieure à 5 mM peut masquer le processus catalytique du biocapteur ainsi qu'une concentration inférieure à 1mM entraînant un pouvoir tampon trop faible [43]. La Figure IV-12 présente la réponse impédancémétrique donnée par la variation de $\text{Log } |Z|$ en fonction de la concentration de l'urée. La réponse obtenue par mesure d'impédance est caractérisée par une bonne linéarité étendue vers les hautes concentrations (>100mM) par rapport à celle issue des mesures capacitives (Figure I-12).

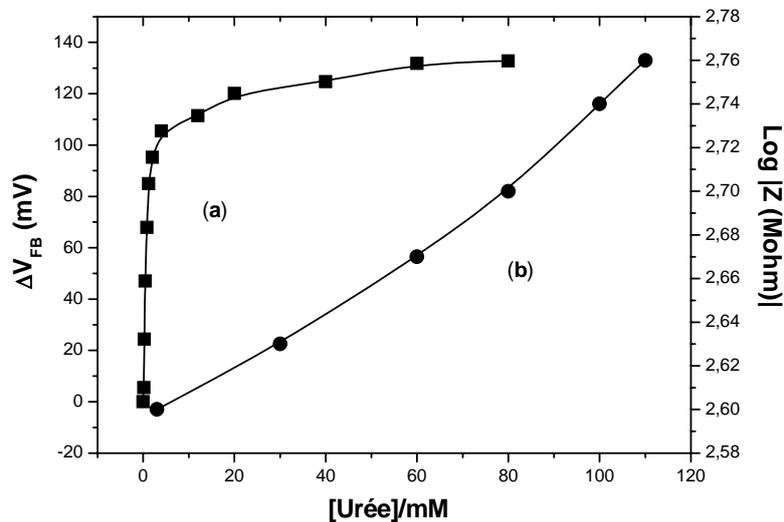


Figure IV-12 : Courbes de calibrations du biocapteur. (a) réponse capacitive et (b) réponse impédancémétrique. Tampon phosphate 5mM à pH = 7.4.

II. 5- Modélisation des phénomènes d'interfaces

Lorsqu'on introduit un métal ou un oxyde en solution, on modifie les propriétés des phases. La surface du solide acquiert une certaine charge qui est équilibrée par une charge de signe opposé dans la solution près de la surface solide. La zone limitée par ces deux surfaces de charges opposées est appelée "double couche électrique". Cette dernière constitue un condensateur plan dont le diélectrique a une épaisseur voisine de quelques dixièmes de nanomètres. Comme nous avons mentionné dans le chapitre I, le modèle de Gouy-Chapmann-

Stern est le plus couramment utilisé pour l'étude de l'interface oxyde/solution [44,45]. La Figure IV-13 illustre la répartition de charge à l'interface liquide/solide.

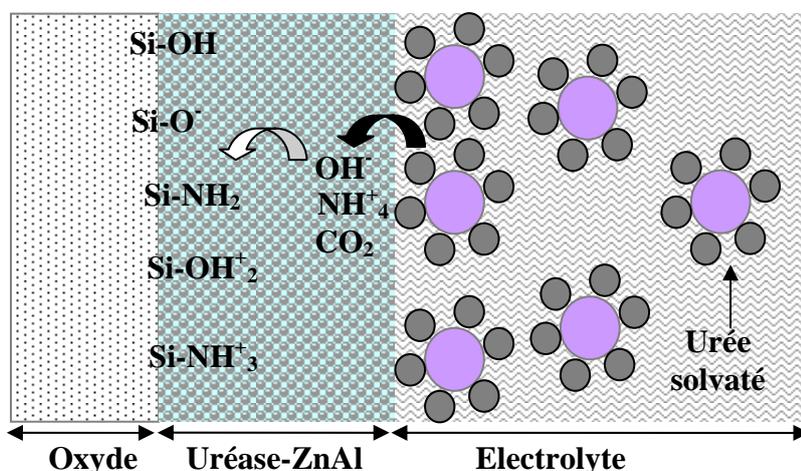


Figure I-13 : La distribution des espèces chimiques de l'électrolyte vers la surface de l'oxyde.

Pour bien comprendre les phénomènes électrochimiques à l'interface solide/liquide, la modélisation paraît un outil puissant pour représenter cette interface par un circuit équivalent et donc relier l'impédance complexe mesurée au comportement électrique du système formé par le semiconducteur, la matrice biosensible et l'électrolyte. Dans notre cas, les spectres Nyquist Y sont ajustés par le logiciel Zplot/Zview (Scribner Associates Inc.) [46]. La figure IV-14 montre le fit d'un spectre de Nyquist Y obtenu dans le cas de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ fonctionnalisée par le matériau ZnAl-uréase.

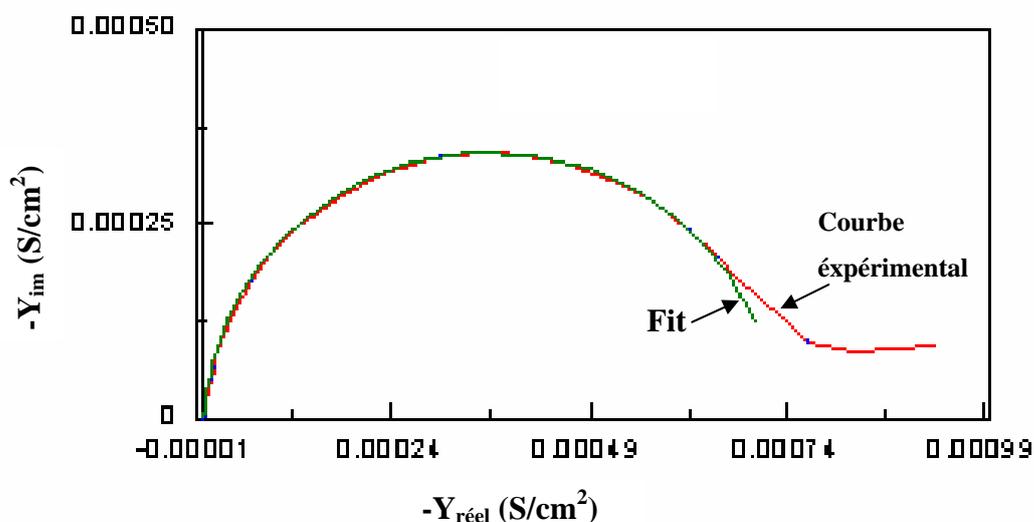


Figure IV-14 : Spectre de nyquist Y de l'interface Si₃N₄/ZnAl-uréase. Tampon phosphate 1mM, pH = 7.4.

Le modèle du circuit électrique équivalent proposé pour la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/ZnAl-uréase est donné par la figure IV-15. Ce circuit équivalent comporte une résistance R₁ qui regroupe les résistances de connexions électrique et celle de l'électrolyte. A cette résistance on associe le model de Randles [47], incluant la capacité de la double couche C_{dl} et la résistance de transfert de charge R₂.

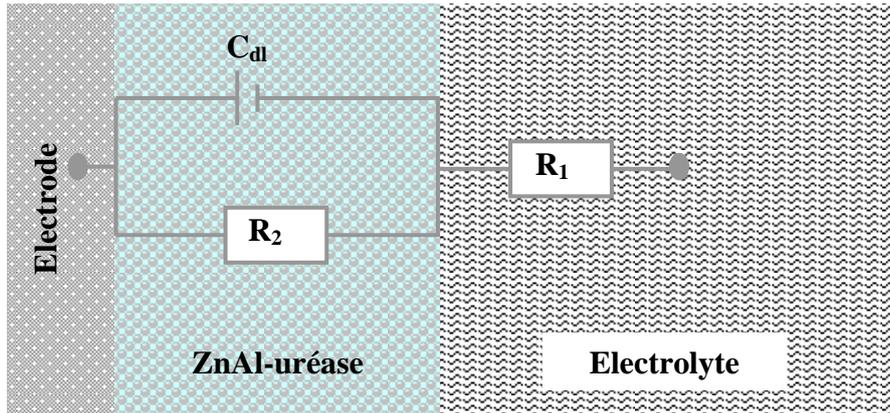


Figure IV-15 : Circuit équivalent de l'interface ZnAl-uréase/électrolyte.

La théorie de la spectroscopie d'impédance montre que la capacité de la double couche pour une cellule électrochimique réelle se comporte comme un élément de constante de phase CPE. Cette constante de phase prend en considération les irrégularités interfaciales (porosité, géométrie, rugosité, diffusion,.....). Elle est définie par une capacité C_{dl} et un nombre n qui peut prendre les valeurs -1, 0, 0.5 ou 1 et qui correspondent respectivement à une inductance, impédance pure, termes de Warburg ou capacitance. Les résultats de l'ajustement des spectres d'admittances de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄/ZnAl-uréase en présence d'urée et pour différents pouvoirs tampons sont donnés dans les tableaux IV-3 et IV-4. Les meilleurs résultats du fit sont obtenus avec une erreur moyenne de l'ordre de $\chi^2 = 10^{-4}$. Le dipôle R_c-C_{dl} caractérise la couche de ZnAl-uréase. En effet, CPE1-T (C_{dl}) qui caractérise la morphologie de la biomembrane reste quasiment constante. Par ailleurs, pour la valeur n, (CPE1-P) reste constante et proche de 1 ce qui indique que l'élément CPE est quasiment assimilable à une capacité pure.

Tableau IV-3 : Evolution des paramètres électriques de l'interface $Si_3N_4/ZnAl$ -uréase en fonction de la concentration en urée. Tampon phosphate 1mM.

Urée (M)	$R_1(\Omega) \pm \Delta R_1(\%)$	$R_c(k\Omega) \pm \Delta R_c(\%)$	$CPE1-T (10^{-8} F) \pm \Delta CPE1-T (\%)$	$CPE1-P \pm \Delta CPE1-P (\%)$
10^{-4}	1300 ± 0.36	661.43 ± 12.10	2.16 ± 1.60	0.967 ± 0.18
10^{-2}	1336 ± 0.40	695.43 ± 11.77	2.21 ± 1.62	0.965 ± 0.18
7.10^{-2}	1405 ± 0.41	779.75 ± 13.45	2.20 ± 1.67	0.965 ± 0.19
10^{-1}	1507 ± 0.38	793.70 ± 13.07	2.23 ± 1.61	0.963 ± 0.18

Tableau IV-4 : Evolution des paramètres électriques de l'interface $Si_3N_4/ZnAl$ -uréase en fonction de la concentration en urée. Tampon phosphate 5mM

Urée (M)	$R_1(\Omega) \pm \Delta R_1(\%)$	$R_c(k\Omega) \pm \Delta R_c(\%)$	$CPE1-T (10^{-8} F) \pm \Delta CPE1-T (\%)$	$CPE1-P \pm \Delta CPE1-P(\%)$
10^{-4}	431.6 ± 0.94	567.320 ± 13.39	1.96 ± 2.04	0.974 ± 0.21
10^{-2}	428.8 ± 0.89	581.97 ± 13.08	2.00 ± 1.92	0.973 ± 0.20
7.10^{-2}	448.7 ± 0.40	596.51 ± 13.55	2.02 ± 1.95	0.972 ± 0.20
10^{-1}	480.9 ± 0.85	734.59 ± 16.73	2.04 ± 1.61	0.971 ± 0.21

III- Etude des matrices ZnAl-uréase obtenues par coprécipitation

III.1-Préparation des matrices ZnAl-uréase

Les phases hybrides Zn-AlCl/uréase avec un rapport Q d'uréase/LDH de 1/3 à 3 sont préparées par la méthode de coprécipitation selon le procédé adopté par A. De Roy et al [24]. Dans un réacteur chimique contenant une solution d'uréase de 1M, on introduit, sous écoulement constant, un mélange de ZnCl₂ et de AlCl₃, avec un rapport molaire de Zn²⁺/Al³⁺ de 2, 3, 4, et une concentration totale des cations métalliques 1M. La valeur du pH est maintenue constante à une valeur de 7,0 pendant la phase de coprécipitation par l'addition simultanée d'une solution de NaOH (1M). La suspension est agitée pendant 24h à la température ambiante. Ensuite, le produit final est centrifugé et lavé plusieurs fois avec de l'eau décarbonatée, puis séché à la température ambiante. Toutes les expériences ont été effectuées sous un jet d'azote, pour éviter ou réduire la contamination du matériau synthétisé par le CO₂ atmosphérique.

III.2- Caractérisations du matériau ZnAl-uréase obtenu par coprécipitation

III.2.1- Caractérisation par spectroscopie UV-Visible

L'activité de l'enzyme libre, immobilisée par coprécipitation dans le matériau HDL, est déterminée on se basant sur le protocole décrit par Worthington et adapté par Kaltwasser et al [48], (voir chapitre III). On rappelle que l'activité de l'uréase est donnée par la relation si dessous :

$$\text{Activité (U/mg)} = \Delta_{360} / 6.22 \times \text{quantité d'uréase (mg)}$$

Dans le cas de l'uréase libre, la cellule de mesure contient 2.4 mL de KH₂PO₄ (0.1M, pH = 7.4), 0.1 ml d'adenosine-5'-diphosphate (0.03M), 0.1 ml de NADH (0.01M), 0.1 ml de α -ketoglutarate (0.03M), 0.1 ml urée (1M) et 0.1 ml GLDH (500 U/ml). Après l'incubation du mélange à 30 °C, une quantité bien déterminée d'uréase libre ou d'uréase coprécipitée (0.8mg) dans le matériau LDH est ajoutée dans la cellule de mesure. L'étude de l'activité de

l'uréase libre a montré que l'activité est indépendante de la quantité de l'uréase ajoutée. La droite d'étalonnage de l'uréase libre est représentée dans la [figure IV-16](#).

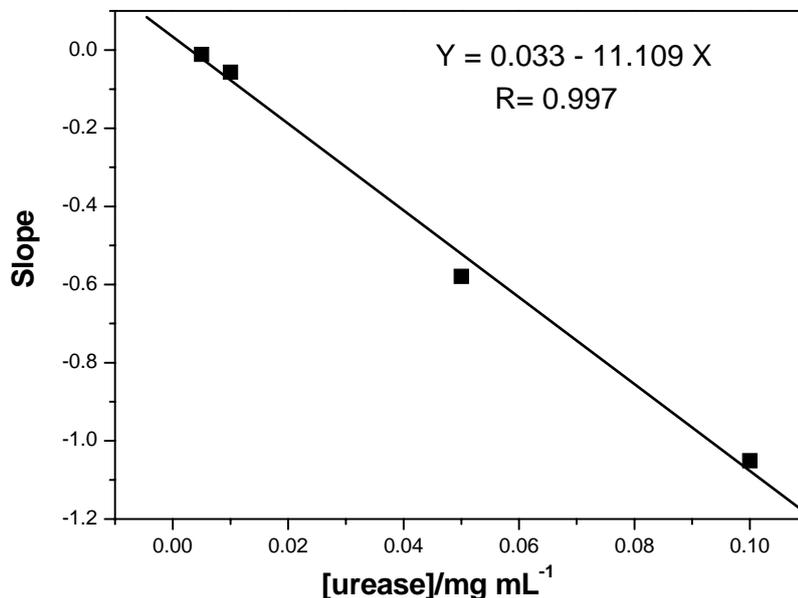


Figure VI-16 : Droite d'étalonnage de l'uréase libre : variation de Δ_{340} en fonction de la quantité d'uréase en mg/mL.

Les résultats d'activité de l'uréase libre et immobilisée dans le matériau HDL par coprécipitation sont regroupés dans le [tableau IV-4](#).

Tableau IV- 4: Résultats d'activité enzymatique des matrices Zn₃Al-uréase obtenus par coprécipitation

Urée (mg/mL)	0.1	0.05	0.01	0.005	1
Activité (U/mg)	50.69	50.80	52	53.60	50
Rapport urée/HDL	3/1	2/1	1/1	1/2	1/3
Activité (Ueq/mg)	0.96	0.29	0.47	0.34	0.23

De plus, nous avons mesuré l'activité de l'uréase libre en présence des ions Al³⁺ et Zn²⁺ et nous avons remarqué que ces ions ne présentent aucun effet inhibiteur sur l'uréase.

III.2.2- Etude texturale des phases obtenues par coprécipitation.

La morphologie des matrices Zn₃Al-uréase préparées par coprécipitation/chimie douce a été examinée par le microscope électronique à balayage (MEB). La [figure IV-17](#) montre les clichés de MEB de la phase LDH avant et après intercalation des molécules d'uréase pour différents rapports uréase/HDL (1/1 et 2/1). Cette observation microscopique montre bien que la dispersion des plaquettes HDL dans le matériau composite uréase/LDH dépend significativement de la quantité d'enzyme mise en jeu. Dans le cas d'un rapport uréase/HDL égal à 1, la composante majoritaire est la phase inorganique donnée par les plaquettes HDL qui sont nettement orientées dans la matrice uréase/LDH. Contrairement au rapport $Q=1$ concernant le rapport $Q=2/1$, la composante inorganique devient minoritaire et non plus identifiée. Ceci est dû à la dispersion totale des plaquettes HDL suivie d'une orientation forte entre les molécules d'uréase, ainsi que l'augmentation du rapport uréase/HDL conduit à des couches de plus en plus denses. Cette observation morphologique nous laisse penser à une forte association entre les molécules d'uréase et les plaquettes HDL. En outre, ces images MEB montrent que les phases HDL et uréase/HDL sont homogènes et bien structurées.

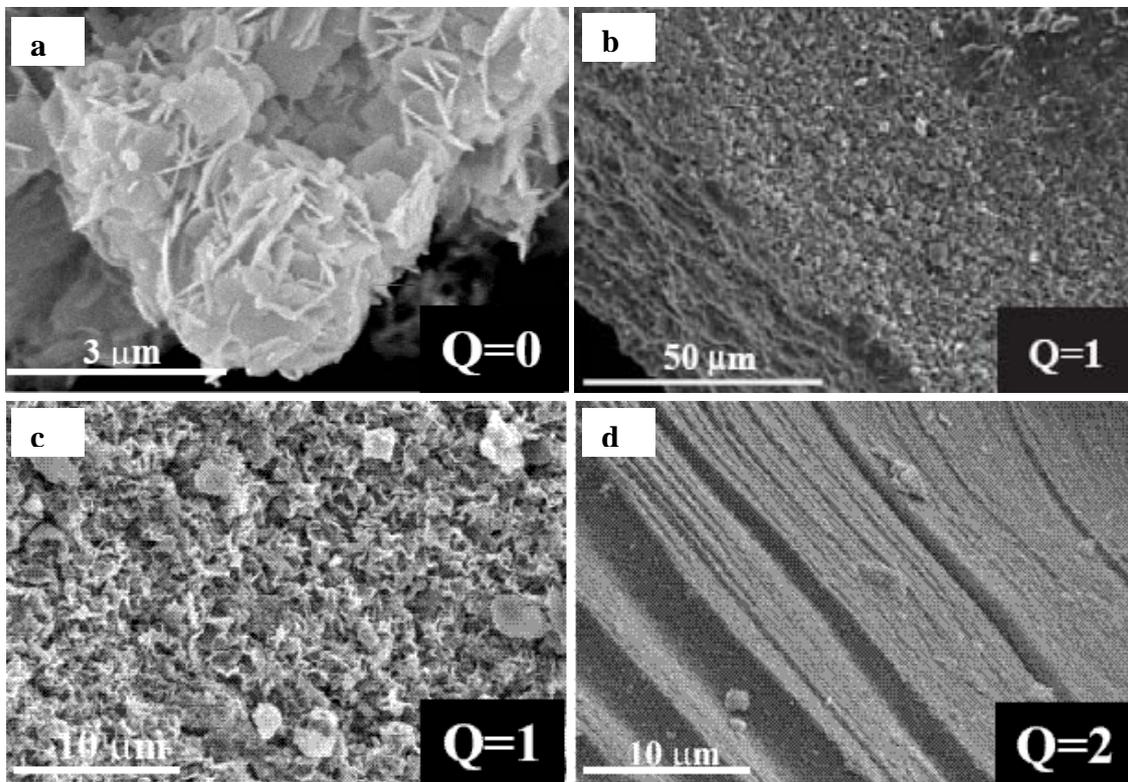


Figure IV-17 : Clichés de MEB: (a) ZnAl-Cl, (b) et (c) ZnAl-uréase rapport 1/1 et (d) rapport 1/2. Avec Q le rapport uréase/HDL

III. 3- Etude de la perméabilité des phases obtenues par coprécipitation

La perméabilité des matrices obtenues par coprécipitation a été évaluée par la technique de voltamétrie à balayage linéaire décrite dans le chapitre précédant. Les matériaux ZnAl-uréase avec différents rapports uréase/HDL (3/1, 2/1, 1/1, 1/2 et 1/3) sont déposés sous forme de couches minces sur des supports de carbone vitreux qui se fixent ensuite à une électrode tournante. Les voltamogrammes sont enregistrés en présence de l'hydroquinone comme élément électroactif. Le [tableau IV-5](#) regroupe les résultats de perméabilités obtenues pour les différentes matrices ZnAl-uréase élaborées par coprécipitation.

Tableau IV- 5: Résultats de perméabilité des matrices Zn₃Al-uréase obtenus par coprécipitation.

Biomembrane	P_m (cm.s ⁻¹)
Zn ₃ Al-uréase (reconstruction)	1.2 10 ⁻²
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation ; 1/3)	1.6 10 ⁻²
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation ; 1/2)	1.3 10 ⁻²
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation; 1/1)	1.6 10 ⁻²
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation; 2/1)	0.95 10 ⁻²
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation; 3/1)	0.7 10 ⁻²

III. 4- Etude des biocapteurs d'urée à base des phases ZnAl-uréase obtenues par coprécipitation

Les matériaux hybrides ZnAl-uréase obtenus par coprécipitation sont déposés par spin-coating à une vitesse de 1000 tours/min sur l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄. Cette structure fonctionnalisée par des couches ZnAl-uréase pour différents rapports HDL/uréase, 3/1, 2/1,

1/1, 1/2 et 1/3 est testée vis-à-vis de l'urée par mesures électrochimiques capacité-potentielle C(V). La figure IV-18 montre les réponses analytiques vis-à-vis de l'urée des structures à base des matériaux ZnAl-urée obtenus par coprécipitation. Nous observons une diminution de la réponse du biocapteur lorsque le rapport urée/HDL diminue. Ce résultat analytique est en accord avec les résultats de perméabilité et l'observation par le microscope électronique à balayage. Pour un rapport urée/HDL élevé, la membrane est très dense et les plaquettes HDL sont hautement dispersées à travers les molécules d'urée. Ceci rend la membrane plus homogène, plus perméable, riche en molécules d'urée et plus sensible à l'urée.

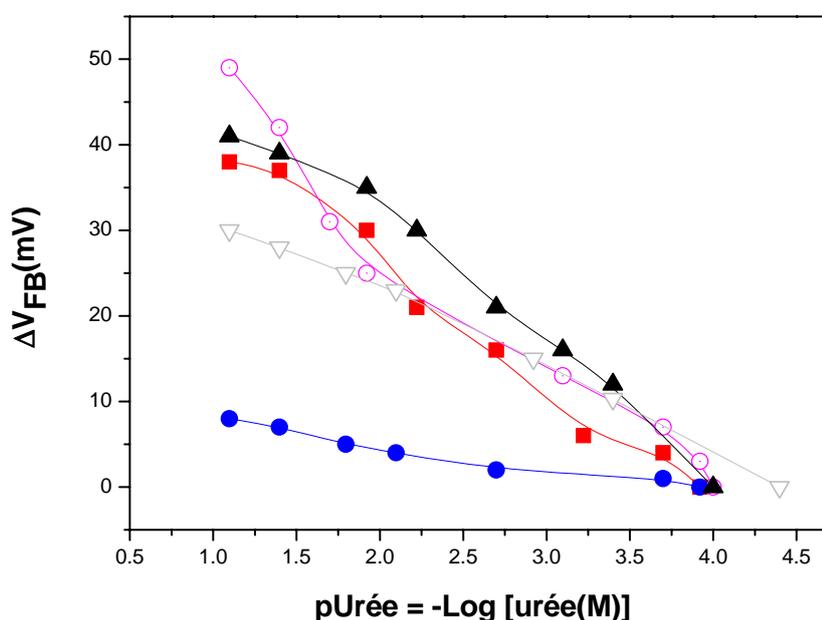


Figure IV-18 : Caractéristiques de sensibilité des biocapteurs à base du matériau ZnAl-urée obtenue par coprécipitation pour différents rapports urée/HDL: (○) 3/1, (□) 2/1, (▲) 1/1, (▽) 1/2 et (●) 1/3.

Les performances analytiques des structures fonctionnalisées par le matériau urée/HDL obtenu par: échange anionique, reconstruction et coprécipitation sont données par le tableau IV-6. Les meilleures performances sont obtenues dans le cas du biocapteur obtenu par la méthode de reconstruction. Ceci montre bien l'influence de la méthode d'immobilisation sur la densité d'enzyme immobilisée dans le matériau HDL. En plus, la haute sensibilité vis-à-vis de l'urée du biocapteur obtenu par la méthode de reconstruction est aussi observée dans un

travail antérieure réalisé par De Melon et al [27]. Dans certain cas, les valeurs élevées de K_m observées sont attribuées à la faible quantité d'uréase immobilisée dans la matrice HDL.

Tableau IV-6 : Performances analytiques des structures fonctionnalisées par le matériau uréase/HDL obtenu par: échange anionique, reconstruction et coprécipitation.

Biomembrane	Réponse (mV/pUrea)	Domaine de détection (pUrea)	V_{max} (mV)	K_m (mM)
Zn ₃ Al-uréase (reconstruction)	70	2.69-4	126	0.67±0.11
Zn ₃ Al-uréase (échange anionique)	10	1.5-4	45	16±1.4
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation ; 1/3)	17	1.92-3.92	42	1.18±0.15
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation ; 1/2)	14	1.9-3.69	26	1.42±0.12
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation; 1/1)	16	1.91-4	38	1.15±0.14
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation; 2/1)	9	1-4.5	28	1.06±0.04
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation; 3/1)	3	1-2.69	10	6±0.77

Pour étudier l'effet de la charge de la matrice HDL sur la quantité d'uréase immobilisée, nous avons testé des matrices de type Zn₂Al-Cl, Zn₃Al et Zn₄Al-Cl ayant un rapport uréase/HDL 1/3 et un rapport Zn²⁺/Al³⁺: 2, 3 et 4. Dans un travail antérieure [49], F. Leroux et al on étudié l'effet de la charge de quelques matrices HDLs sur leurs capacités d'échange anionique. Ils on montré que la capacité d'échange anionique dépend du rapport M^{II}/M^{III} comme le montre la figure IV-19.

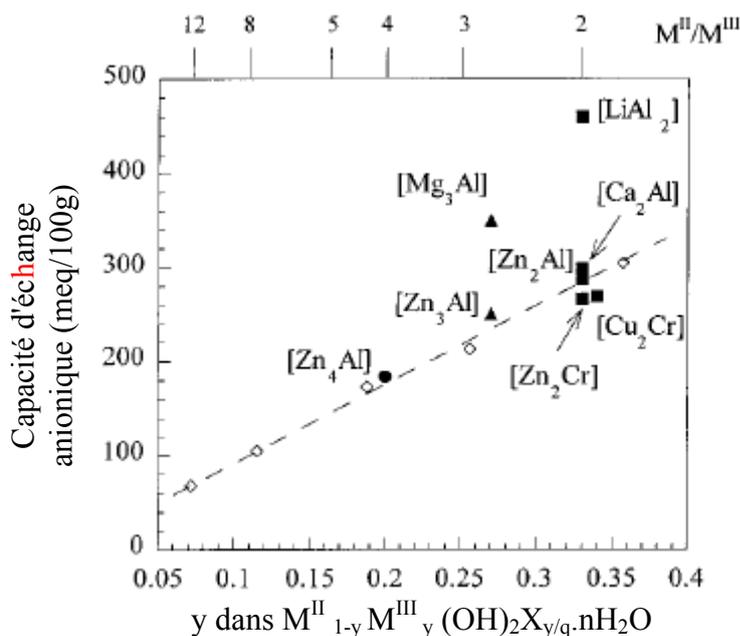


Figure IV-19 : Variation de la capacité d'échange anionique en fonction du rapport M^{II}/M^{III} [49].

Les matrices Zn₂Al-urée, Zn₃Al-urée et Zn₄Al-urée obtenues par coprécipitation ont été déposées sur un substrat Si/SiO₂/Si₃N₄ pour tester leur sensibilité vis-à-vis de l'urée. La figure IV-20 illustre les réponses analytiques des différentes matrices en présence d'urée.

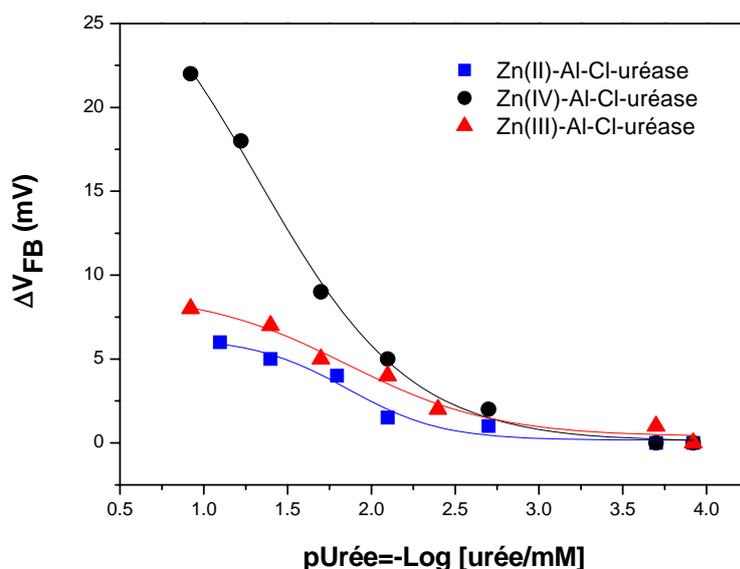


Figure IV-20 : Caractéristiques de sensibilités des biocapteurs à base du matériau ZnAl-urée pour différents rapports Zn^{2+}/Al^{3+} : 2 (■), 3 (▲) et 4 (●).

Nous observons que la réponse du biocapteur vis-à-vis de l'urée est meilleure pour un rapport Zn^{2+}/Al^{3+} égale à 4. Dans le [tableau IV-7](#), sont regroupées les performances des biocapteurs à base des matrice ZnAl-uréase pour différents rapports Zn^{2+}/Al^{3+} .

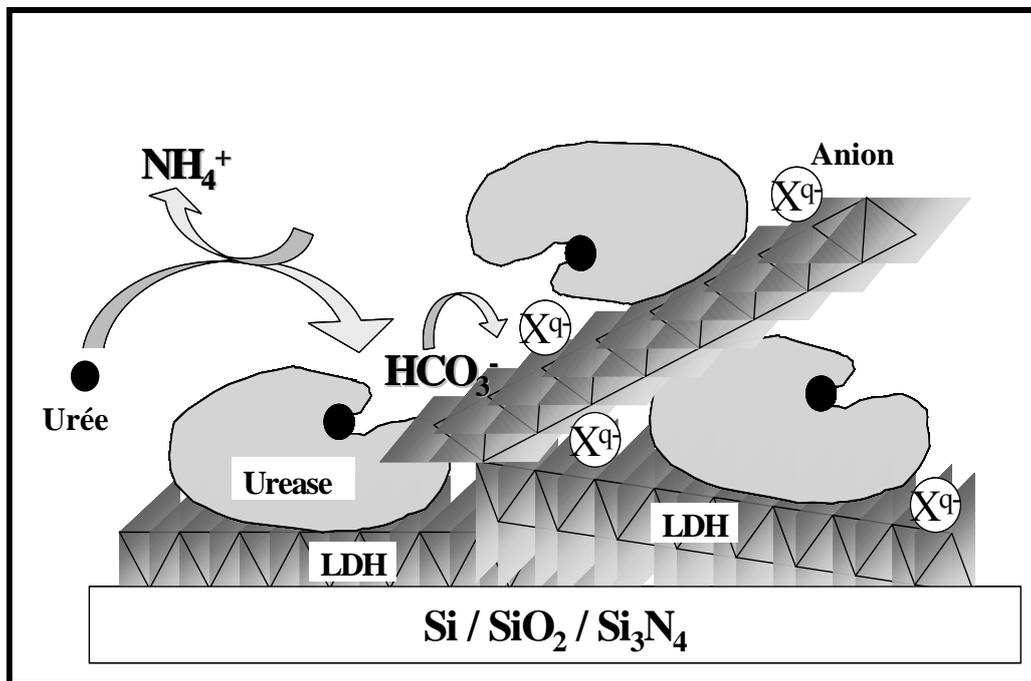
Tableau IV-7 : Performances analytiques des structures fonctionnalisées par le matériau ZnAl-uréase obtenu par coprécipitation pour différents rapports Zn^{2+}/Al^{3+} et un rapport uréase/HDL= 1/3.

biomembrane	Activité (U/mg)	P_m ($cm.s^{-1}$)	Réponse (mV/purea)	Vmax (mV)	Km (mM)
Zn ₂ Al-uréase ($Zn^{2+}/Al^{3+}=2$)	0.04	$0.78 \cdot 10^{-2}$	4	6	4 ± 0.56
Zn ₃ Al-uréase ($Zn^{2+}/Al^{3+}=3$)	0.23	$0.70 \cdot 10^{-2}$	3	10	6 ± 0.44
Zn ₄ Al-uréase ($Zn^{2+}/Al^{3+}=4$)	0.12	$1.70 \cdot 10^{-2}$	12	19	3 ± 0.11

Conclusion

La procédure d'immobilisation basée sur l'intercalation de l'uréase dans un film d'argile HDL (double hydroxyde lamellaire) nous a permis d'élaborer un biocapteur d'urée présentant des performances analytiques satisfaisantes. Ces dernières dépendent de la méthode d'intercalation de l'uréase dans le matériau inorganique HDL. Les meilleurs résultats du point de vue sensibilité et stabilité sont obtenus dans le cas du matériau hybride ZnAl-uréase élaboré par reconstruction. Des mesures électrochimiques C (V), de perméabilité et d'activité ont montré la possibilité de réaliser un système d'intercalation bio-inorganique sans que les propriétés catalytiques de l'enzyme en soient altérées. En outre, la cohérence entre les valeurs de la constante de Michaelis-Menten Km de l'enzyme libre et immobilisée suggère la biocompatibilité du matériau HDL vis-à-vis de l'uréase. Cependant, la difficulté d'intercaler

l'uréase dans l'espace interlamellaire nous laisse proposer un schéma conceptuel qui permet de décrire le réarrangement des plaquettes HDL autour des molécules d'uréase.



Dans ce chapitre et comme dans le chapitre précédent, nous avons étudié la possibilité d'immobiliser l'uréase par encapsulation dans des matrices organiques et inorganiques. Dans le chapitre prochain, nous utiliserons une nouvelle stratégie qui consiste à immobiliser l'uréase par la technique des couches auto-assemblées.

Références bibliographiques du chapitre IV

- [1] A. Senillou, N. Jaffrezic, C. Martelet, S. Cosnier., *Anal. Chim. Acta* **401** (1999) 117.
- [2] J.V. De Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault., *Anal. Chem.* **74** (2002) 4037.
- [3] C. Faure, C. Delmas, P. Willmann., *J. Power Sources* **36** (1991) 497.
- [4] L. Guerlou-Demourgues, C. Delmass., *J. Electrochem. Soc* **141** (1994) 713.
- [5] M. Lakraimi, A. Legrouri, A. Barroug, A. de Roy, JP. Besse., *J. Mater. Chem* **10** (2000) 1007.
- [6] H. Schaper, J.J. Berg-Slot, W.H.J. Stork, *Appl. Catal.* **54** (1989) 79.
- [7] L. Barloy, J.P. Lallier, P. Battioni, D. Mansuy, Y. Piffard, M. Tournoux, J.B. Valim, W. Jones, *New J. Chem.* **16** (1992) 71.
- [8] P.C. Pavan, G.D. Gomes, J.B. Valim, *Microporous Mesoporous Mater.* **21** (1998) 659.
- [9] P.C. Pavan, E.L. Crepaldi, G.D. Gomes, J.B. Valim, *Colloids Surf., A. Physicochem. Eng. Asp.* **154** (1999) 399.
- [10] S. Miyata, T. Kumura, *Chem. Lett.* (1973) 843.
- [11] M. Meyn, K. Beneke, G. Lagaly, *Inorg. Chem* **29** (1990) 5201.
- [12] A. Schmassmann, A. Tarnawski, B. Flogerzi, M. Sanner, L. Varga, F.Halter, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **5** (1993) 111.
- [13] A.I. Khan, D. O'Hare, *J. Mater. Chem* **12** (2002) 3191.
- [14] J.H. Choy, S.Y. Kwak, J.S. Park, Y.J. Jeong, *J. Mater. Chem* **11** (2001) 1671.
- [15] J.H. Choy, S.Y. Kwak, Y.J. Jeon, J.S. Park, *Angew., Chem., Int. Ed. Engl.* **39** (2000) 4042.
- [16] J.H. Choy, S.Y. Kwak, J.S. Park, Y.J. Jeon, J. Portier., *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 1399
- [17] N.T. Whilton, P.J. Vickers, S. Mann., *J. Mater. Chem.* **7** (1997) 1623.
- [18] F. Leroux, J. Gachon, Jean-Pierre Besse., *J. Solid State. Chem.* **177** (2004) 245.
- [19] J.-H. Choy, E.-Y. Jung, Y.-H. Son, M. Park., *J. Phys. Chem. Solids* **65** (2004) 509.
- [20] L. Ren, J. He, S. Zhang, D.G. Evans, X. Duan., *J. Mol. Catal., B Enzym.* **18** (2002) 3.

- [21] C. Carlino., Solid State Ionics **98** (1997) 73.
- [22] B. I. Intorre, A. E. Martell., J. Am. Chem. Soc., **82** (1960) 358.
- [23] A. Mendeboure, R. Schollhorn., Rev. Chim. Miner **23** (1986) 819.
- [24] A. De Roy, C. Forano, k. El Molki, J.P. Besse, M.L. Occelli, H.E. Eds: Van Nostrand Reinhold: New York, (1992) 108.
- [25] M. Adachi-Pagano, C. Forano, J.-P. Besse, Chem. Commun. (2000) 91.
- [26] C. Mousty., Applied Clay Science **27** (2004) 159.
- [27] J.V. De Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Anal. Chem. **74** (2002) 4037.
- [28] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, Anal. Chem. **75** (2003) 3872.
- [29] D. Shan, C. Mousty, S. Cosnier, Anal. Chem. **76** (2004) 178.
- [30] S. Poyard, N. Jaffrezic-Reanault, C. Marelet, S. Cosnier, P. Labbé, Anal. Chim. Acta **364** (1998) 165.
- [31] H. Zhao, K. L. Nagy., Journal of Colloid and Interface Science **274** (2004) 613.
- [32] F. Kuralay, H. Özyörök, A. Yildiz., Sensors and Actuators B **109** (2005) 194.
- [33] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys, Biosensors and Bioelectronics. **19** (2004) 1641.
- [34] Lineweaver, H., Burk, D., J. Am. Chem. Soc. **56** (1934) 658.
- [35] R. Koncki, G. J. Mohr, O. S. Wolfbeis., Biosensors and Bioelectronics 10 Issue **8** (1995) 653.
- [36] C. Pennetta, V. Akimov, E. Alfinito, L. Reggiani. Gomila. arXiv:q-bio.MN/0406018 v1 **8** Jun 2004.
- [37] X. Ren, P. G.Pichup, J. Electroanal. Chem. **420** (1997) 251.
- [38] F. Patoslky, B. Filanovsky, E. Katz, I. Willner, J. Phys. Chem. B **102** (1998) 10359.
- [39] S. Zairi, K. Reybier, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, B. Fahys. Materials Science and Engineering C **21** (2002) 35.
- [40] H. Barhoumi, A. Maaref, R. Mlika, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, L. Ponsonnet., Materials Science and Engineering C **25** (2005) 61.
- [41] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet. Synthetic Metals **90** (1997) 205.
- [42] A.R. Varlan, J. Suls, W. Sansen, D. Veelaert and A. De Loot, Capacitive sensor for the allatostatin direct irmnunoassay, Prec. Eurosensors X, 10th Eur. Conf. Solid-State Transducers, Leuven. Belgium, 8-tl Sept. Vol. **5** (1996) 1309.
- [43] S.B. Adeloju, S.J. Shaw, G.G. Wallace, Anal. Chim. Acta **281** (1993) 621.

- [44] J. O'M. Bocris, B. E. Conway, E. Yeager "Comprehensive Treatise of Electrochemistry"
Plenum Press, New York and London, Volume **1**, 1980.
- [45] J. A. Davis, R. O. James, J. O. Leckie., Journal of Colloid and Interface Science **63**
(1978) 480.
- [46] Xiaojuan Wu, Houyi, Shenhao Chen, Zhiyuan Xu, Aifen Sui, Electrochem. Soc. **146**
(1999) 1847.
- [47] [10] J.R.Mac Donald ,Impedance spectroscopy.Wiley, 1987.
- [48] H. Kaltwasser, H.G. Schlegel, Anal. Biochem. **16** (1966) 132.
- [49] F. Leroux, J. Besse., Chem. Mater **13** (2001) 3507

Chapitre V

***Immobilisation de l'uréase
dans le polypyrrole par
interaction avidine-biotine:
Application à un biocapteur
urée***

Chapitre V

Immobilisation de l'uréase dans le polypyrrole par interaction avidine-biotine: Application à un biocapteur urée

Introduction

Actuellement, la technique d'immobilisation en mode "sandwich" ou "bridge" est largement utilisée pour l'élaboration des biocapteurs [1-3]. Elle conduit à la formation de monocouches stables et bien contrôlées. L'approche la plus récente est basée sur l'électrogénération de polymères biotinylés par simple électropolymérisation sur la surface d'une électrode métallique [4,5]. En outre, grâce à sa grande stabilité et sa haute biocompatibilité non dénaturante, le polypyrrole biotinylé a été largement utilisé pour l'immobilisation de biomolécules comme les enzymes [1,6], l'ADN [7-9], Dans la technique des couches auto assemblées, le couplage entre deux couches successives se fait généralement par l'intermédiaire de molécules d'avidine (une protéine) ayant une haute affinité vis-à-vis de la biotine (une vitamine) ($K_m = 10^{-14}$ M).

Dans ce chapitre nous présentons l'utilisation du poly(pyrrole-biotine), obtenu par polymérisation chimique, pour l'immobilisation de l'uréase biotinylée. Le système de couches

auto assemblées "poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase" est construit à la surface de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄ pour conduire au développement d'un biocapteur d'urée. Les performances analytiques de ce biocapteur ont été évaluées par des mesures électrochimiques capacité-potentiel C (V). L'homogénéité de la couche du polymère polymérisée a été observée par microscopie à force atomique AFM.

I- Préparation du poly(pyrrole-biotine) par voie chimique

Le monomère de pyrrole-biotine est synthétisé dans le laboratoire "d'Electrochimie Organique et Photo chimie Redox" de l'Université Joseph Fourier de Grenoble selon la procédure décrite par Otten et al [10]. Généralement, la méthode la plus utilisée pour déposer le polypyrrole à la surface d'un métal est la méthode d'électropolymérisation. Dans notre travail, la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ utilisée comme transducteur est isolante et ne permet pas de déposer le polymère par voie électrochimique. Pour cette raison, la polymérisation par voie chimique était la meilleure solution pour polymériser le pyrrole-biotine sur la surface du transducteur isolant-semiconducteur. Les structures du pyrrole-biotine et du poly(pyrrole-biotine) sont données sur la [figureV-1](#).

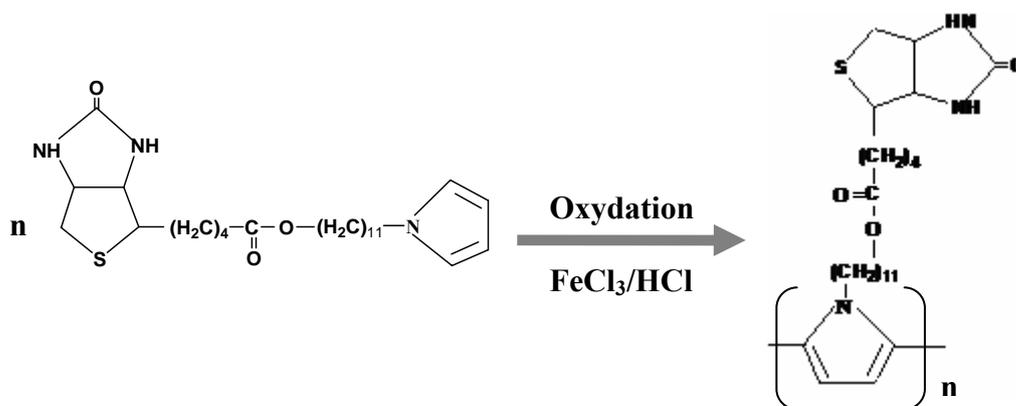


Figure V-1 : Oxydation du pyrrole-biotine en poly(pyrrole-biotine).

La polymérisation chimique du pyrrole-biotine est proposée pour la première fois par Marks et al [11]. Dans des travaux antérieurs [12-14], la polymérisation chimique par le fer (III) a été effectuée sur le pyrrole seul et ses dérivés. Parmi les agents oxydants, le fer (III) qui est le plus utilisé pour assurer la polymérisation chimique du polypyrrole [15]. Au cours du processus de polymérisation, le pyrrole interagit avec le FeCl₃ (acide de Lewis) et se transforme en un radical cation. Puis, plusieurs radicaux se couplent pour former des

oligomères qui, à leur tour, s'oxydent pour former des radicaux cations complémentaires [16]. Le processus d'oxydation chimique peut se résumer par l'équation stochiométrique ci-dessous [17,18]:



Où y représente le degré de polymérisation du polypyrrole. Cette valeur définit les propriétés d'échange ionique du polymère.

I.1- Mise en évidence de la réaction de polymérisation chimique

I.1.1- Etude par voltamétrie cyclique

Des couches minces de pyrrole-biotine (10^{-3} mol/L) sont déposées à la surface d'une électrode de platine (1cm^2) par étalement d'une goutte de $20\mu\text{L}$ à la tournette (spin-coating). Les mesures de voltamétrie cyclique sont effectuées dans une cellule électrochimique à trois électrodes; une électrode de référence Ag/AgCl/KCl_{saturé}, une contre électrode de platine et l'électrode de travail fonctionnalisée par le pyrrole-biotine. L'électrolyte support utilisé est un tampon phosphate KH_2PO_4 de concentration 5mM contenant 2mM d'hydroquinone. La [figure V-2](#) montre la superposition des voltamogrammes cycliques enregistrés pour une électrode de platine nue et fonctionnalisée par le pyrrole-biotine avant et après immersion dans une solution de FeCl_3 (0.1M) solubilisée dans l'acide chlorhydrique (0.1mol/L).

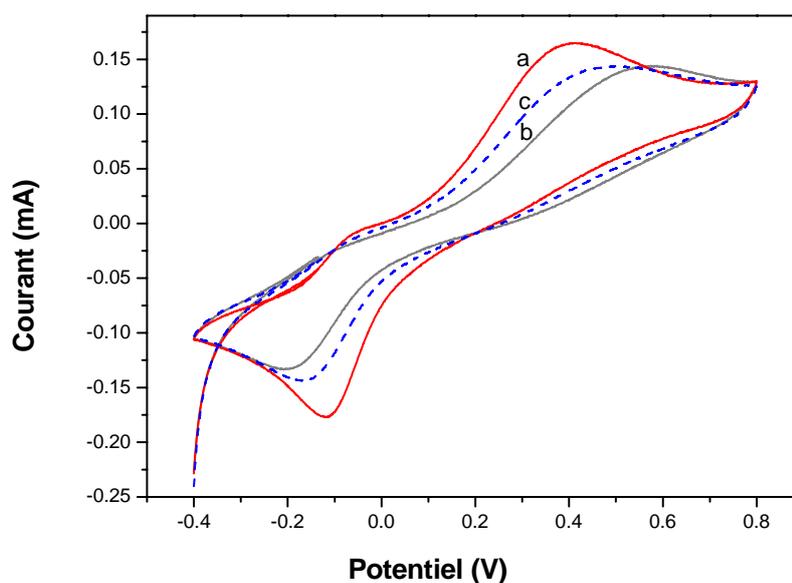


Figure V-2 : Voltamogrammes cycliques de l'électrode de platine; nue (a), fonctionnalisée par le pyrrole-biotine avant et après oxydation chimique (b) et (c).

La comparaison des voltammogrammes obtenus pour l'électrode nue et fonctionnalisée montre une diminution du courant des vagues d'oxydation et de réduction de l'hydroquinone après le dépôt de la couche de pyrrole biotinylé. Cette diminution de courant est suivie d'un déplacement du potentiel d'oxydation de l'hydroquinone avant et après immersion de l'électrode fonctionnalisée dans une solution de FeCl_3 . Ces changements peuvent être attribués à une modification des propriétés électrochimiques de la couche de pyrrole-biotine oxydé par les ions chlorure pour aboutir au poly(pyrrole-biotine).

I.1.2- Observation par microscopie à force atomique (AFM)

Nous avons étudié par imagerie AFM (microscopie à force atomique) la morphologie de la couche de poly(pyrrole-biotine) polymérisé à la surface de l'électrode $\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$. Le principe de la technique AFM est détaillé dans l'annexe. La [figure V-3](#) montre la structure bidimensionnelle et tridimensionnelle du polypyrrole biotinylé polymérisé par oxydation chimique.

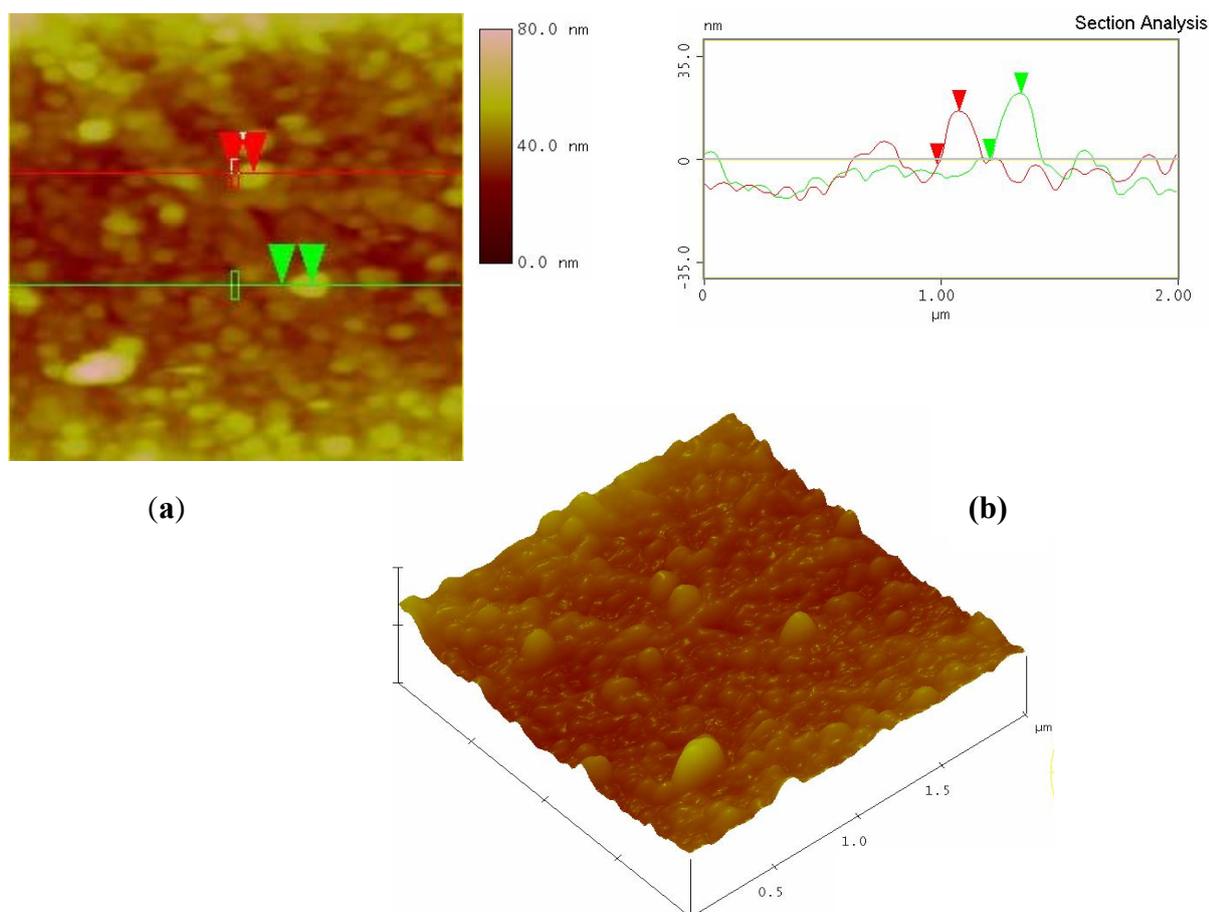


Figure V-3 : Images AFM en mode contact; 2D (a) et 3D (b) du poly(pyrrole-biotine) obtenu par polymérisation chimique.

Comme le montre la [figure V-3](#), à une échelle micrométrique la couche de polypyrrole biotinylé présente une surface uniforme avec une distribution sous forme de petits grains micrométriques. En outre, le rayon du grain est de l'ordre de 17.5 à 22 nm, ce qui conduit à un facteur de rugosité RMS égale à 6.807 nm. Ces données topographiques indiquent que la couche polymérisée est relativement lisse. Dans des travaux antérieurs, les mêmes observations microscopiques ont été observées dans le cas du polypyrrole non modifié obtenu par oxydation chimique en présence de FeCl_3 [15].

I. 2- Structure "sandwich " Si/SiO₂/Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase

I. 2. 1- Complexe "avidine-biotine"

Comme alternative aux systèmes d'immobilisation directe des protéines, on peut utiliser un système indirect à base d'avidine et de biotine. Ce système est basé sur le fait que la protéine avidine a une affinité extrêmement forte et stable pour la biotine (vitamine B1). La constante de dissociation pouvant atteindre 10^{-15} M [19]. Les fortes interactions affines entre l'avidine et la biotine conduisent à la formation spontanée et quasi-irréversible d'un complexe moléculaire "biotine-avidine" [20]. Cette propriété a été exploitée pour immobiliser simplement, rapidement et sans dénaturation des protéines via la formation de ponts avidine-biotines. L'avidine est tétravalente et elle peut donc fixer quatre molécules de biotine, ce qui permet d'augmenter la quantité de protéines fixées. ([Figure V-4](#)).

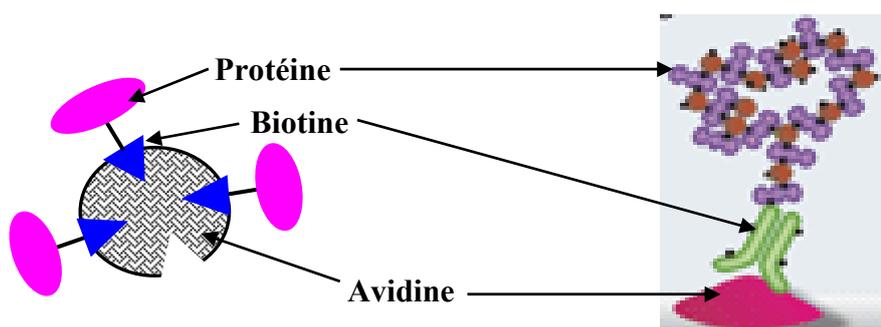


Figure V-4 : Complexe avidine-biotine.

En plus du mécanisme de reconnaissance chimique entre la biotine et l'avidine [21,22], plusieurs travaux ont mis en évidence l'interaction entre l'avidine et la biotine libre ou attachée à un support organique. Ainsi, Soledad et al ont montré par spectroscopie infrarouge l'effet de

la biotine sur la flexibilité conformationnelle et les propriétés dynamiques de l'avidine [23]. Par spectroscopie d'impédance, Ding et al ont étudié l'interaction entre l'avidine et la biotine [24]. D'autres manifestations par microscope à force atomique AFM ont permis de mesurer l'affinité de l'avidine vis-à-vis de la biotine [25].

Le choix récent d'une telle stratégie pour immobiliser les biomolécules provient; d'une part de la bonne biocompatibilité de la biotine avec les polymères organiques et d'autre part du fait qu'elle n'entraîne pas de phénomènes de dénaturation des molécules biologiques (enzyme, ADN, bactérie,...). Les avantages offerts par l'interaction "avidine-biotine" ont permis à divers auteurs de proposer des méthodes efficaces d'immobilisation des biomolécules par une stratégie d'assemblage couche par couche. Ainsi, Amounas et al ont immobilisé la glucose oxydase (GOD) et la peroxydase (POD) biotinylées à la surface d'un film de polypyrrole biotinylé via le développement d'un biocapteur à glucose [6]. Lassalle et al ont développé un système d'hybridation dédié à la détection de l'ADN. Ils ont utilisé le polypyrrole modifié par des brins d'ODN (oligonucléotide) biotinylés déposé par électropolymérisation à la surface d'un cristal de quartz [8]. La même procédure a été adoptée par Bidan et al pour développer un biocapteur d'ADN basé sur l'utilisation de polypyrrole biotinylé déposé par électropolymérisation à la surface d'une microélectrode d'or [7]. Un système "sandwich" biosensible à l'ADN a été développé par Filliard et al [9]. Ce système consiste à utiliser le polypyrrole biotinylé couplé à des brins d'ODN biotinylés via une couche d'avidine.

I. 2. 2- Immobilisation de l'uréase par interaction "avidine-biotine"

L'immobilisation de l'uréase par interaction "avidine-biotine" est adopté pour la première fois par Luo et Walt en 1984 [26]. Dans notre travail, La structure "sandwich" s'obtient à partir d'un film de polypyrrole fonctionnalisé en surface par des molécules biotine. L'uréase biotinylée peut être facilement immobilisée par interaction d'affinité via l'assemblage sandwich pour aboutir au système "polypyrrole-biotine/avidine/biotine-uréase". Cette stratégie de fonctionnalisation permet d'accéder à des biocapteurs régénérables, puisque le système biotine/avidine/biotine peut être 'désassemblé' par un surfactant, renouvelant ainsi le substrat polypyrrole-biotine [27]. Les quatre principales étapes de fonctionnalisation de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄ pour former L'assemblage "sandwich" Si/SiO₂/Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine/ biotine-uréase sont données sur la [figure V-5](#).

I. 2.3- Formation de la structure "sandwich"

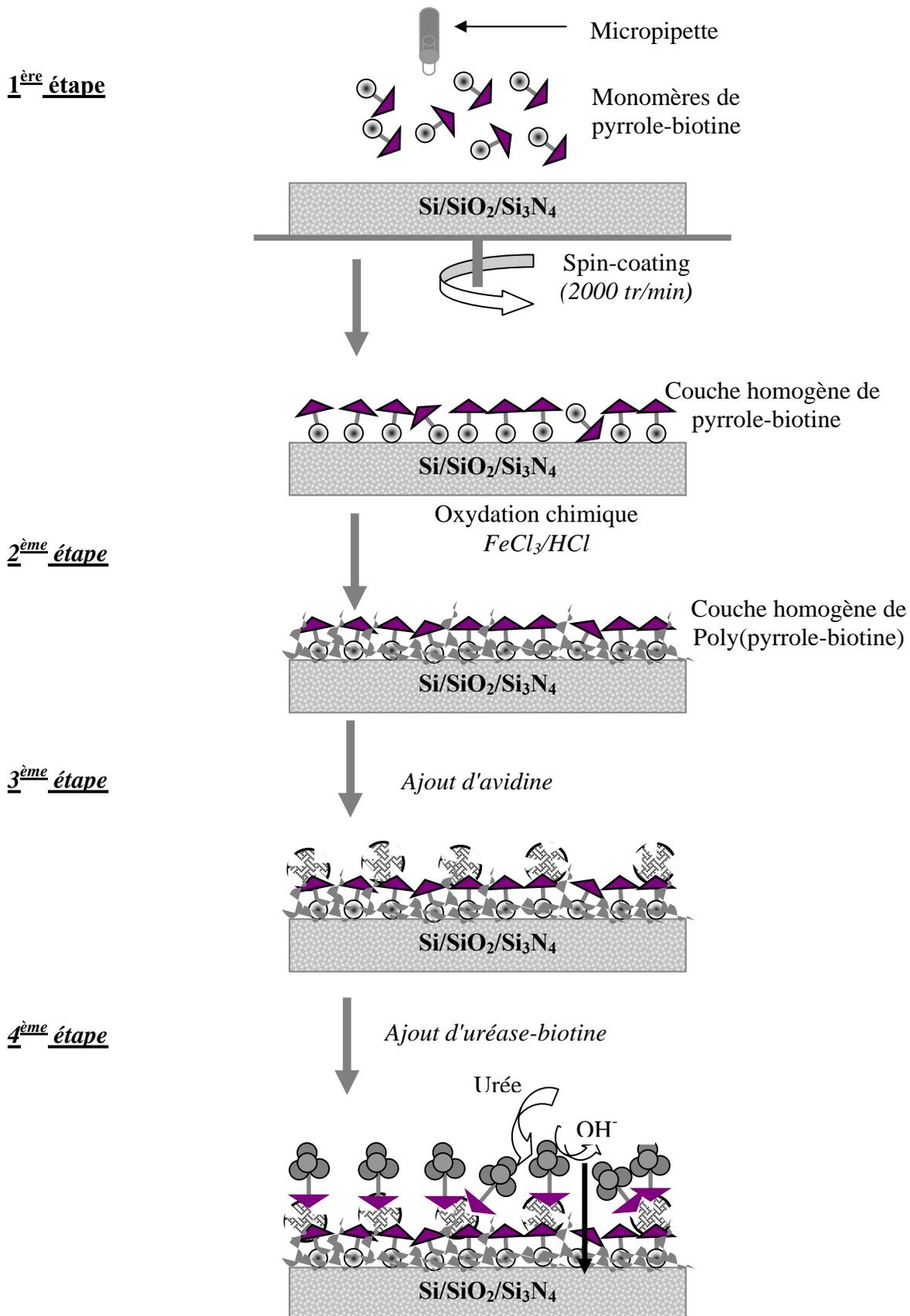


Figure V-5 : Différentes étapes de la constructions du système "sandwich".

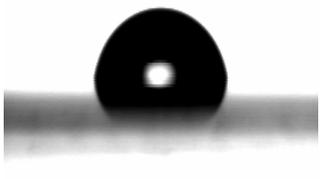
La fonctionnalisation de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ préalablement nettoyée se fait par étalement couche par couche, selon un protocole qui garanti la bonne interaction avidine-biotine. L'élaboration des couches se fait par étalement d'une goutte (20µL) de pyrrole-biotine (1mM) à l'aide d'une tournette à la vitesse 2000 tours/min. Après séchage à la température ambiante (30min), l'électrode fonctionnalisée est introduite dans une solution de FeCl₃ (0.1mol/L) pendant deux heures afin d'achever la polymérisation totale du polypyrrole biotinylé. Puis, la couche polymérisée est soigneusement rincée à l'eau ultra-pure pour éliminer les ions Cl⁻. Après séchage sous flux d'azote à la température ambiante pendant 15 min, une goutte de 20µL d'avidine (1mg/mL) solubilisée dans un tampon phosphate (20mM, pH = 7.4) est étalée par "spin-coating" à la surface du polypyrrole biotinylé. Après séchage à l'ambiante (15 min), une goutte de 10µL d'uréase-biotine (2.5mg/mL) est étalée par "spin-coating" sur la couche d'avidine. Enfin, l'électrode obtenue par assemblage des différentes biocouches est séchée à la température ambiante pendant deux heures, puis rincée à l'aide d'un tampon phosphate 5mM avant d'être stockée à 4°C en dehors des périodes d'utilisation

I. 2.4- Contrôle de la mouillabilité de l'électrode modifiée

Actuellement, la caractérisation des surfaces fonctionnalisées par le polypyrrole et ses dérivés a fait l'objet de plusieurs travaux de recherches. Parmi ces caractérisations, les mesures par angle de contact permettent de dégager un grand nombre d'informations relatives aux propriétés électrochimiques et morphologiques de la couche de polymère déposée [28]. Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode de la goutte posée (Chapitre I) pour suivre le changement de la mouillabilité de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄ au cours de la formation du système poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase. Nous utilisons l'eau comme liquide sonde pour caractériser le caractère hydrophile ou hydrophobe de l'électrode après chaque traitement. Dans le [tableau V-1](#) nous présentons la valeur moyenne θ_m de l'angle de contact et l'image correspondante d'une goutte d'eau déposée à la surface de l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄ avant et après fonctionnalisation. Dans le même [tableau V-1](#) nous présentons les résultats comparatifs de mouillabilité de l'électrode nue avant et après nettoyage. Comme il était mentionné dans le deuxième chapitre, les structures de types Si/SiO₂/Si₃N₄ possèdent un caractère hydrophobe marqué par un angle de contact égal à 80°. Un traitement chimique est aussi nécessaire pour rendre la surface active et hydrophile ($\theta = 23^\circ$). Après avoir déposer la couche de pyrrole-biotine, la mouillabilité change et la surface devient moins hydrophile ($\theta =$

34°). Cette hydrophilicité tend à diminuer ($\theta = 42^\circ$) après la phase d'oxydation chimique par le chlorure de fer (III) qui transforme la couche formée par les monomères de pyrrole-biotine en une couche plus dense formée par le poly(pyrrole-biotine). Généralement, le polypyrrole déposé en couche mince présente un caractère hydrophobe. Cette idée est confirmée par plusieurs travaux issus de mesures d'angle de contact sur des films minces de polypyrrole [15, 28,29]. Dans notre travail, la légère hydrophilicité du poly(pyrrole-biotine) observée peut être due à la présence des molécules de biotines. Par ailleurs, le dépôt d'une monocouche d'avidine sur le poly(pyrrole-biotine) conduit à une surface hyper hydrophile caractérisée par un angle de contact égal à 12°. Cependant, le dépôt d'une couche d'uréase-biotine reconduit à une surface assez hydrophobe ($\theta = 73^\circ$).

Tableau V-1: Valeurs d'angle de contact et image de la goutte d'eau déposée sur l'électrode au cours de diverses phases de traitement.

<p>$\theta = 80^\circ$</p>  <p><i>Si₃N₄ sans nettoyage</i></p>	<p>$\theta = 23^\circ$</p>  <p><i>Si₃N₄ nettoyé</i></p>
<p>$\theta = 34^\circ$</p>  <p><i>Si₃N₄/pyrrole-biotine</i></p>	<p>$\theta = 42^\circ$</p>  <p><i>Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)</i></p>
<p>$\theta = 12^\circ$</p>  <p><i>Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine</i></p>	<p>$\theta = 73^\circ$</p>  <p><i>Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase</i></p>

Pour quantifier les propriétés énergétiques de surface relatives à chaque couche déposée au cours de l'élaboration du "sandwich" Si/SiO₂/Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase, nous avons déterminé l'énergie de surface ainsi que ses composantes acides et basiques selon le modèle de Van OSS [30]. Les trois liquides sondes utilisés sont l'eau ultra-pure, le formamide et le diiodométhane. Les résultats d'énergie de surface et ses composantes acides et basiques sont donnés dans le [tableau V-1](#).

Tableau II-1 : Energie de surface et ses composantes selon le modèle de Van-Oss calculées dans le cas de l'électrode avant et après chaque étape de fonctionnalisation

Electrode	Θ_{Eau} (°)	Θ_{Form} (°)	Θ_{Diiod} (°)	Energie (mJ/m ²)	γ_{OH^-} (mJ/m ²)	γ_{H^+} (mJ/m ²)
<i>Si₃N₄ sans nettoyage</i>	80	62.1	65.4	32.1	6,4	1,1
<i>Si₃N₄ nettoyé</i>	23	17.6	21.2	58.3	44,6	5,5
<i>Si₃N₄/pyrrole-biotine</i>	34.3	25.3	38.2	52.4	40.3	0.9
<i>Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)</i>	41	29.6	35.9	51.1	34.6	0.6
<i>Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine</i>	12.2	28.5	33.7	47	63.1	0.1
<i>Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine) /avidine/biotine-uréase</i>	73.7	44.9	34	46.5	5.6	0.7

Les résultats d'énergie de surface mentionnés ci-dessus confirment la haute affinité entre les différentes couches du système "sandwich". Les couches étudiées ont une grande énergie libre de surface ($46.5 \text{ mJ/m}^2 < \text{Energie libre} < 58.3 \text{ mJ/m}^2$). Après fonctionnalisation, la composante basique reste élevée. Ceci peut s'expliquer par la présence de groupements carbonyles (dans la biotine) qui sont des bases de Lewis [31]. En outre, la composante basique élevée, obtenue après le dépôt de l'avidine, est due à son caractère basique à pH neutre. Cependant, la faible composante basique observée après le dépôt de la couche uréase-biotine est sans doute due à la présence des molécules d'uréase qui inhibent la réactivité des molécules biotines en surface. En effet, la molécule d'uréase oriente sa partie hydrophile vers la biotine et sa partie hydrophobe vers la surface. Ceci explique l'augmentation du caractère hydrophobe de la surface (angle de contact élevé) après l'adsorption des molécules uréase-biotine grâce aux acides aminés hydrophobes situés à la surface externe de l'enzyme [32]. Les

résultats obtenus par mesure d'angle de contact indiquent le changement de mouillabilité de la surface de l'électrode après chaque étape de traitement.

II- Caractérisation de la structure "sandwich" par mesures capacitives C (V)

Le fonctionnement du biocapteur formé par la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ fonctionnalisée en mode "sandwich" selon l'assemblage Si/SiO₂/Si₃N₄/polypyrrole-biotine/avidine/biotine-uréase a été évalué par les mesures C (V). La figure V-5 montre le spectre capacité-potential du biocapteur pour différentes concentrations d'urée, enregistré dans un tampon phosphate de concentration 5 mM, pH égal à 7,4 et 70 mM en NaCl. Nous observons un déplacement de la caractéristique C (V) vers les potentiels négatifs lorsque la concentration en urée augmente.

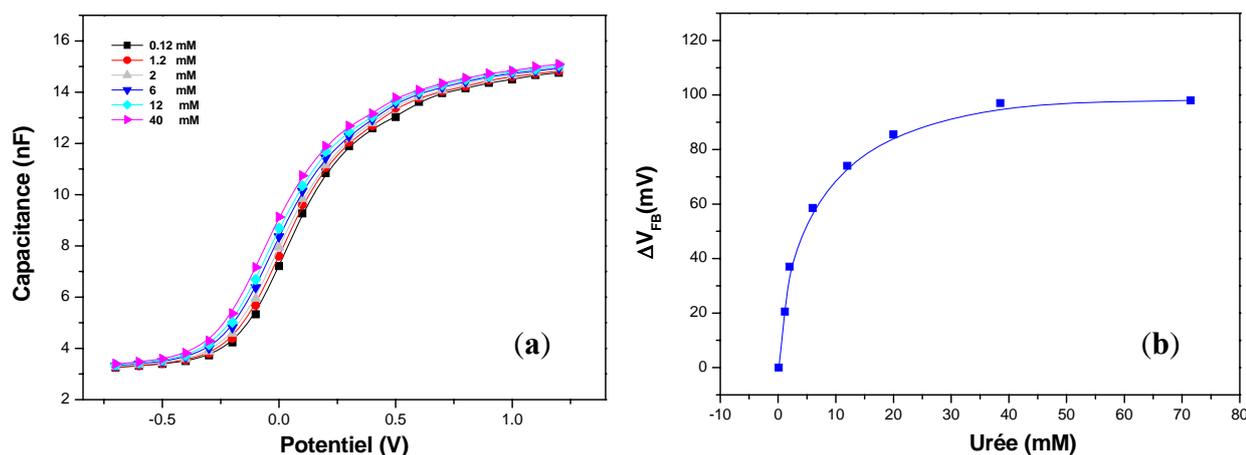


Figure V-5 : Spectre C (V) (a) et courbe de calibration (b) de la structure sandwich. Pour différentes concentrations en urée, PBS (5mM, pH = 7.4).

La courbe de calibration donnée par la représentation de ΔV_{FB} (potentiel de bande plate) en fonction de la concentration de l'urée (Figure V-6) présente un domaine linéaire compris entre 0.12 mM et 2.5 mM. Nous constatons que la saturation est obtenue pour une concentration en urée de 40 mM. Cette limitation est due à la saturation des sites actifs de l'enzyme en molécules d'urée. En revanche la constante de Michaelis-Menten K_m , calculée selon la méthode de Lineweaver-Burk est égale à 5 mM. Cette valeur obtenue pour l'uréase immobilisée dans le poly(pyrrole-biotine) est supérieure aux valeurs de K_m reportées précédemment pour les matrices organiques et inorganiques utilisées dans les chapitres III et

IV. En revanche, dans tous les cas ces valeurs restent toujours proches de la valeur K_m de l'uréase libre ($1\text{mM} < K_m < 5\text{mM}$) reportée dans la littérature [33].

L'épaisseur de la couche sensible peut influencer les caractéristiques du biocapteur. Pour cette raison, nous avons fait varier le nombre de couches de pyrrole-biotine déposées à la surface de l'électrode $\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$. Sur la figure V-6, nous présentons la réponse du biocapteur à base de deux, de trois et de quatre couches de pyrrole-biotine déposées par "spin-coating". Nous observons une diminution de la sensibilité du biocapteur vis-à-vis de l'urée lorsque le nombre de couches augmente. Ceci est sans doute dû à l'augmentation de l'épaisseur de la couche de polymère qui entraîne une réduction de la diffusion des ions OH^- (provenants de la réaction de catalyse enzymatique) vers l'interface $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{poly}(\text{pyrrole-biotine})$ [34].

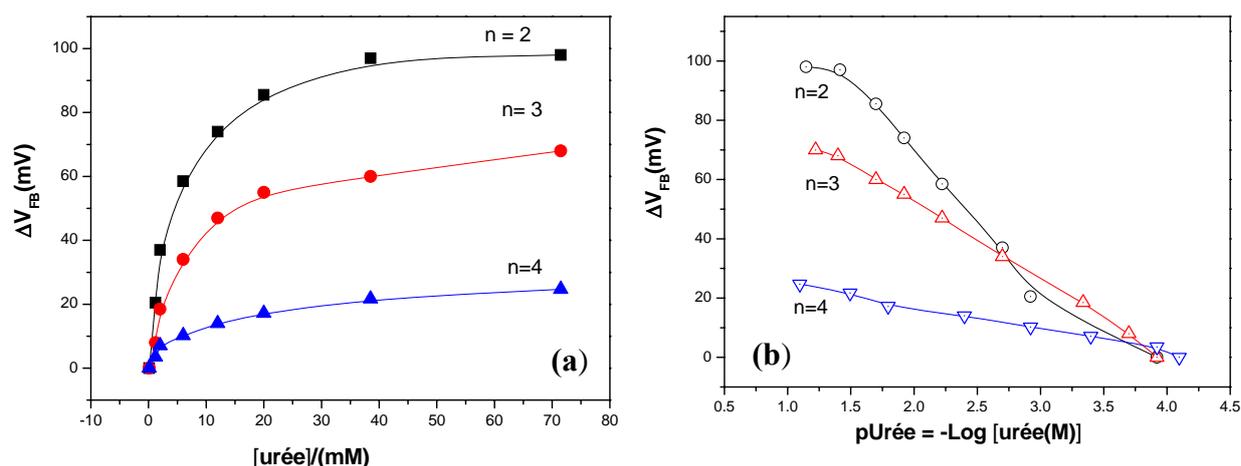


Figure V-6 : Courbes de calibration (a) et de sensibilité (b) de la structure $\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4/\text{poly}(\text{pyrrole-biotine})/\text{avidine}/\text{biotine-urée}$ vis-à-vis de l'urée, PBS (5mM , $\text{pH} = 7,4$) en fonction du nombre de couches de $\text{poly}(\text{pyrrole-biotine})$, $n = 2, 3$ et 4 .

II.1- Effet de l'EDTA sur l'activité de l'uréase

Le milieu de stockage du biocapteur joue un rôle primordial pour l'obtention d'une réponse reproductible et stable au cours du temps. Par exemple, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) compte parmi les agents stabilisateurs susceptibles de réactiver l'uréase inhibée par les ions métalliques [35]. Certains auteurs ont utilisé cette réaction d'inhibition de l'uréase pour doser certains ions de métaux lourds [36]. L'EDTA agit comme un agent stabilisant en complexant les ions de métaux lourds pouvant inhiber l'enzyme

(constante de stabilité du complexe EDTA-Hg égale à 21.8). Cette étude a été réalisée en enregistrant périodiquement la réponse à l'urée du biocapteur. Entre chaque test, le biocapteur est placé à 4°C dans un tampon phosphate 5 mM, pH=7,4 en présence de 1 mM d'EDTA. Les résultats présentant l'évolution des performances du biocapteur à base de l'assemblage Si/SiO₂/Si₃N₄/pyrrole-biotine/avidine/biotine-uréase stocké en absence puis en présence de l'EDTA sont donnés dans le [tableau V-2](#).

Tableau V-2: Evolution de la sensibilité du biocapteur vis-à-vis de l'urée en fonction du milieu de stockage.

	Sensibilité (mV/p[urée])	K _m (mM)
Première mesure	50	4.85
Deuxième mesure après stockage 12 h (KH ₂ PO ₄ 5 mM, pH=7,4)	35	7
Troisième mesure après stockage 12 h (KH ₂ PO ₄ 5 mM, pH=7,4 et 1 mM d'EDTA)	47	5

II.2- Effet de la température sur l'activité de l'uréase

Comme nous avons signalé précédemment ([Chapitre I](#)) il existe une zone pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. En effet, une augmentation de la température contribue à accroître la vitesse d'une réaction enzymatique jusqu'à une valeur limite au-delà de laquelle la vitesse de réaction chute rapidement en raison de la dénaturation irréversible de l'enzyme. L'effet de la température sur le fonctionnement de la structure Si/SiO₂/Si₃N₄ en contact de l'électrolyte est donné par la [figure V-7](#). L'évolution de l'allure de la caractéristique capacité-potentiel de la structure EIS (électrolyte-isolant-semiconducteur) en fonction de la température est pratiquement identique à celle observée pour la structure MIS (métal-isolant-semiconducteur) [37]. Nous observons un déplacement de la caractéristique C (V) vers les potentiels négatifs dans une gamme de température allant de 10°C à 50°C. Pour des températures supérieures à 50°C, un décalage du spectre C (V) vers les hautes capacités est observé. Contrairement aux structures EISs, l'effet de la température sur le fonctionnement

capacitif des structures MISs, a été bien étudié [37-39]. Divers auteurs ont attribué le déplacement de la caractéristique $C(V)$, sous l'effet de la température, à une accumulation de charges positives à l'interface isolant semiconducteur (Figure V-7).

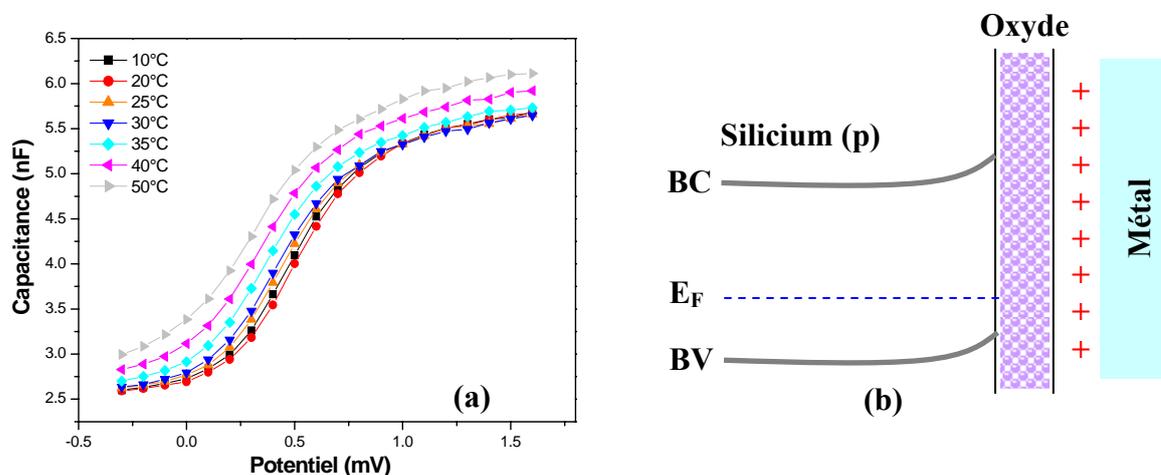


Figure V-7 : Evolution de la caractéristique $C(V)$ de la structure $Si/SiO_2/Si_3N_4$ en fonction de la température (a). Electrolyte PBS (5mM, pH = 7,4). Diagramme de bande d'une structure MIS (b): bande de conduction (BC), bande de valence (BV) et niveau de Fermi (E_F).

La réponse de la structure "sandwich" $Si/SiO_2/Si_3N_4$ /poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase en présence de 40 mM d'urée a été étudiée dans une gamme de température allant de 15 à 60 °C. La figure V-8 montre les courbes de calibration du biocapteur donnant le déplacement du potentiel de bande plate en fonction de la concentration en urée. Nous observons une augmentation de la réponse du biocapteur lorsque la température passe de 15 à 35°C puis une diminution pour des températures supérieures à 35°C en raison de la dénaturation thermique de l'uréase.

De nombreux travaux consacrés à l'immobilisation de l'uréase dans différentes matrices montrent une valeur de température optimale proche de 40 °C. Dans le cas des matrices purement inorganiques de type laponite et HDL (hydroxyde double lamellaires) [41], des températures optimales de 35 et 45 °C respectivement ont été trouvées. De même, lors de l'immobilisation de l'uréase dans des matrices organiques polymériques telles que le poly(vinylferrocène) [41] et le poly(éthylène glycol diméthylacrylate/2-hydroxyéthylène méthacrylate) [42], une température optimale de 35 °C a été trouvée. De même dans le cas du poly(hydroxyéthyl méthacrylate-co-glycidyl méthacrylate) [43], le polyamide [44] et le polyacrylonitrile [45], une température optimale de 40 °C a été trouvée.

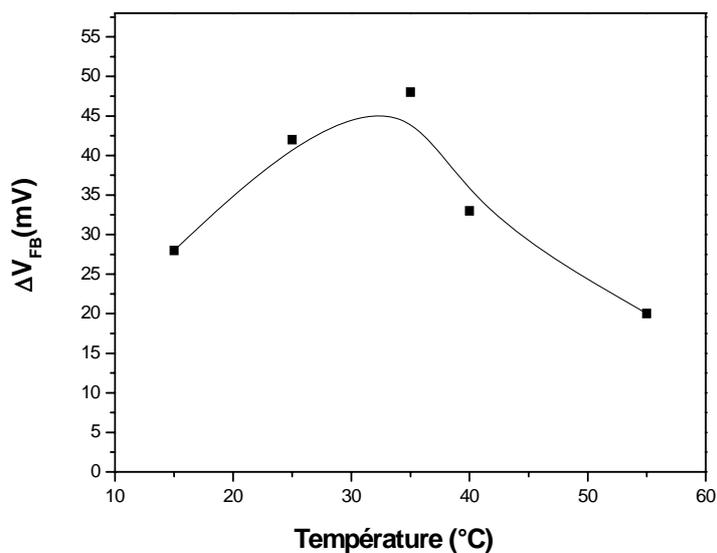


Figure V-8 : Influence de la température sur la réponse du biocapteur à une concentration en urée de 40 mM. Mesures effectuées dans un tampon phosphate 5mM et pH = 7,4.

En assimilant le potentiel (potentiel de bande plate) de la réponse du biocapteur à la vitesse de la réaction enzymatique, la représentation d'Arrhénius ([Chapitre I](#)) peut être utilisée pour déterminer l'énergie d'activation de la réaction. La [figure V-9](#) présente le logarithme du potentiel de bande plate ($\ln \Delta V_{FB}$) en fonction de l'inverse de la température absolue ($1/T$). Cette représentation est définie par une pente $-E_a/R$ dans la gamme de température où l'activité de l'uréase augmente.

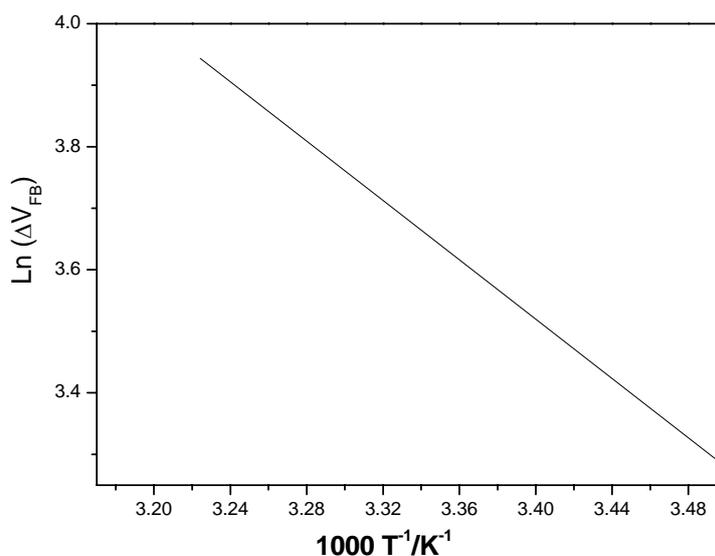


Figure V-9 : Courbe d'Arrhenius obtenue d'après les données de la figure V-8.

La pente de la [figure V-9](#) permet d'accéder à l'énergie d'activation qui est de $20,04 \text{ KJ.mol}^{-1}$ dans le cas d'un biocapteur Si/SiO₂/Si₃N₄/poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase. Cette valeur de l'énergie d'activation est en accord avec celles trouvées pour l'uréase immobilisée dans d'autres matrices. En effet, De Melo et al ont trouvé une énergie d'activation de 25 KJ.mol^{-1} pour l'uréase immobilisée dans des matrices inorganiques de type laponite et HDL [40]. Une énergie d'activation de 20 KJ.mol^{-1} a été trouvée par Eser et al pour l'uréase immobilisée dans des matrices organiques [46].

Toutefois, il faut noter que ces valeurs d'énergie d'activation sont supérieures à celles obtenues pour l'uréase libre en solution (12 KJ.mol^{-1}) [47]. L'augmentation de l'énergie d'activation est due à un changement physico-chimique lié à une modification de la structure de l'uréase au cours du processus d'immobilisation [48]. En revanche, la valeur de $20,04 \text{ KJ.mol}^{-1}$ caractérise le processus global mis en jeu dans le fonctionnement du biocapteur c'est-à-dire tient compte non seulement de la réaction enzymatique mais aussi des phénomènes de diffusion dans la biomembrane.

II.3- Suivi de l'interaction avidine-biotine par mesures capacitives

Le suivi de l'interaction avidine-biotine par diverses techniques a fait l'objet de plusieurs travaux de recherches [49]. Parmi ces techniques, l'AFM (microscopie à force atomique) qui constitue une technique prometteuse pour la quantification de l'interaction avidine-biotine [50]. De même, les mesures électrochimiques et en particulier les mesures d'impédances sont utilisées pour prévoir l'interaction avidine-biotine [51]. Dans ce travail, nous proposons la construction du système "sandwich" poly(pyrrole biotine)/avidine /biotine-uréase en formant les monocouches d'avidine et d'uréase-biotine à l'interface liquide/poly(pyrrole-biotine). Au cours du dépôt «in situ», nous avons suivi par mesures capacité-potentiel l'interaction entre l'avidine et la biotine. La [figure V-10](#) regroupe les étapes d'élaboration du système "sandwich".

Après l'étape d'oxydation chimique du pyrrole-biotine par le chlorure de fer (III), l'électrode Si/SiO₂/Si₃N₄/poly(pyrrole-biotne) est montée dans un système à trois électrode en présence d'une contre électrode de platine et d'une électrode de référence de type Ag/AgCl/KCl_{saturé}. Lorsque la stabilisation du système dans le tampon phosphate (5mM, pH=7,4) est atteinte, nous ajoutons l'avidine (2mg/mL) solubilisée dans le tampon phasphate

5 mM. L'addition de l'avidine provoque le déplacement de la caractéristique C(V) vers les potentiels négatifs. Ceci est dû à une complexation entre les molécules de biotine et les molécules d'avidine, celles-ci ayant un caractère basique à pH neutre.

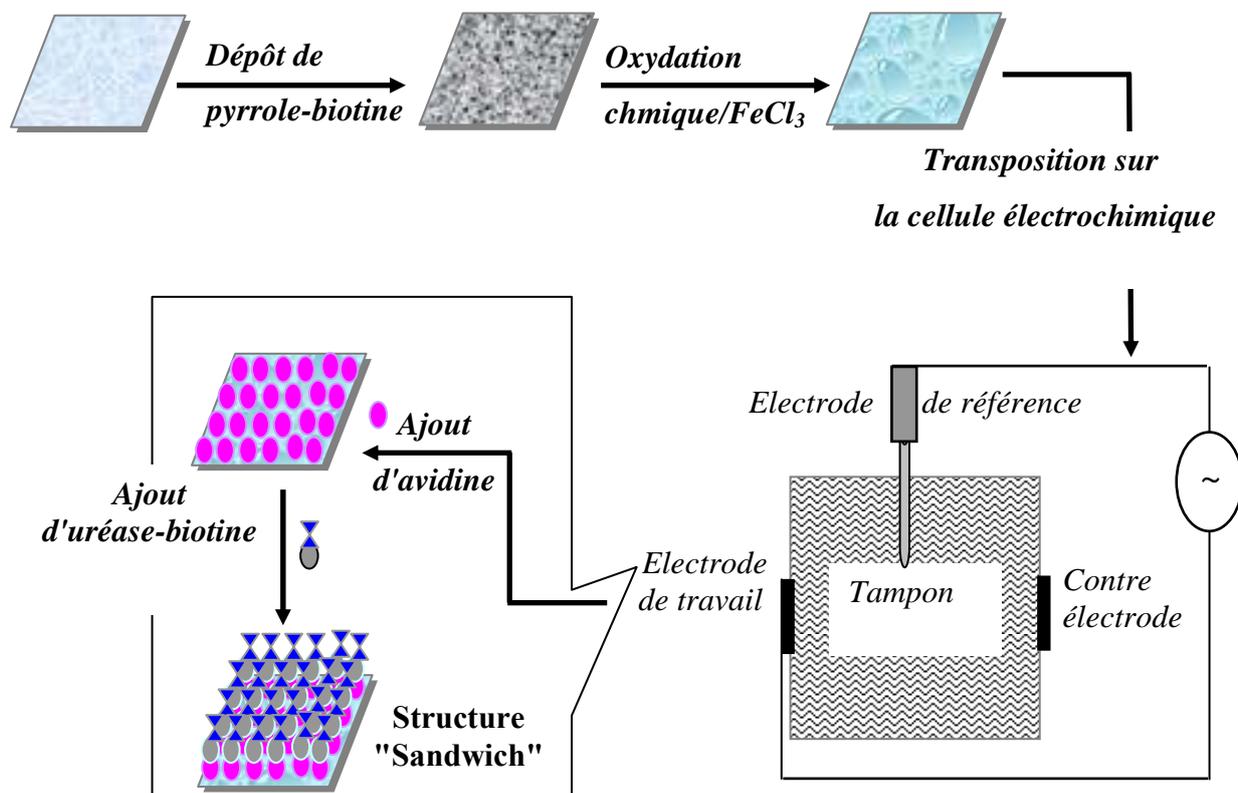


Figure V-10 : Différentes étapes d'élaboration du système "sandwich" par ajout d'avidine puis de l'uréase-biotine sous contrôle électrochimique.

Une fois la saturation est atteinte, nous renouvelons le tampon après un rinçage abondant sans toucher aux éléments de la cellule électrochimique. Nous procédons de la même manière pour l'uréase-biotine. L'addition de l'uréase-biotine se fait à partir d'une solution de concentration 2,5 mg/mL. La [figureV-11](#) montre la variation du potentiel de bande plate en fonction de la concentration de l'avidine puis de l'uréase-biotine ajoutée.

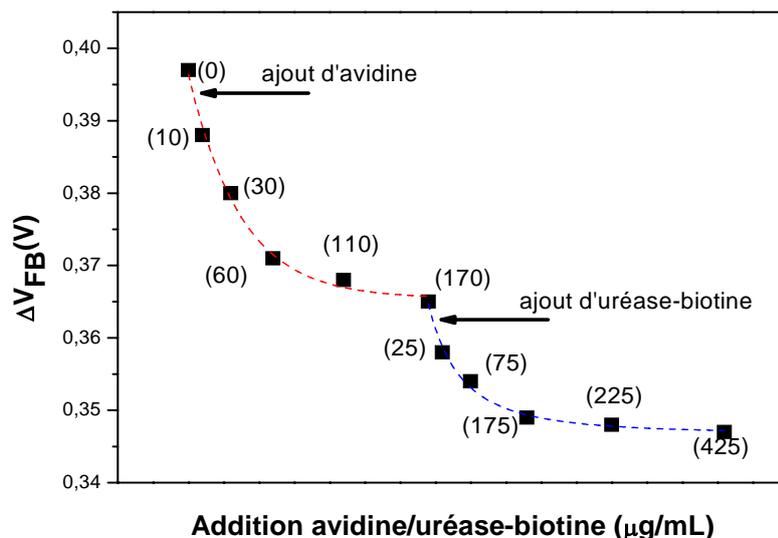


Figure V-11 : Variation de potentiel de bande plate de la structure $Si/SiO_2/Si_3N_4/poly(pyrrole-biotine)$ en fonction des quantités d'avidine et d'uréase-biotine ajoutées. Tampon phosphate 5 mM, $pH=7,4$

La réponse analytique vis-à-vis de l'urée de la structure $Si/SiO_2/Si_3N_4/poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase$, préalablement rincée par le tampon phosphate, est testée par des mesures C(V). L'électrolyte support est un tampon phosphate 5 mM, $pH=7,4$. La [figure V-12](#) montre le déplacement du potentiel de bande plate en fonction de la concentration en urée. La sensibilité du biocapteur vis-à-vis de l'urée confirme la présence d'une monocouche d'uréase-biotine attachée au poly(pyrrole-biotine) par l'intermédiaire des molécules d'avidine.

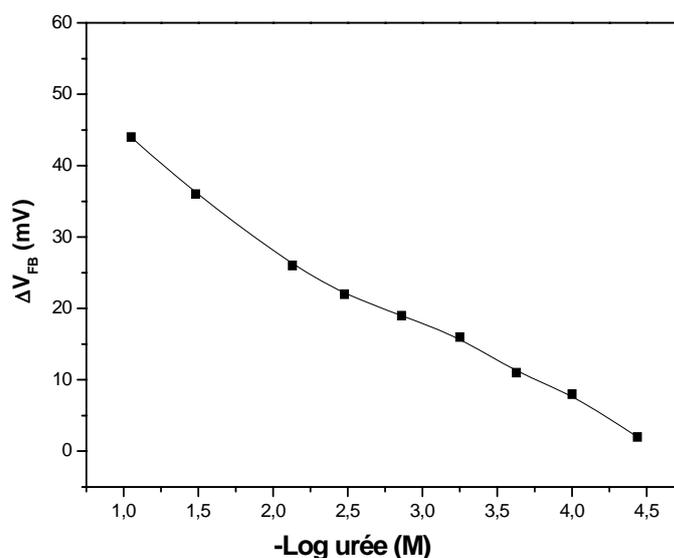


Figure V-12 : Sensibilité de la structure $Si/SiO_2/Si_3N_4/poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase$. Tampon phosphate 5 mM, $pH=7,4$.

Les performances analytiques du biocapteur élaboré selon la méthode d'empilement couche par couche ont été comparées à celles données par les capteurs obtenus suite à l'encapsulation de l'uréase dans les matrices organiques (chapitre I) et les matrices inorganiques (chapitre II). La [figure V-13](#) montre la dépendance de la réponse de quelques biocapteurs en fonction du temps.

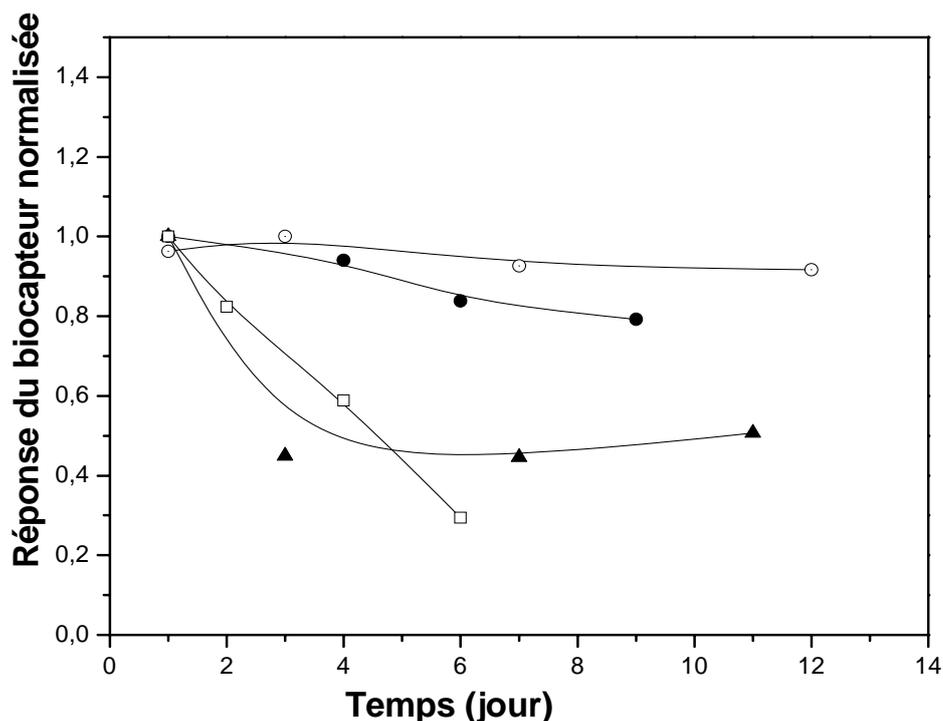


Figure V-13 : Evolution de la réponse des différents biocapteurs vis-à-vis de l'urée au cours du temps : biocapteur à base d'uréase/acétate (○), poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase (●), uréase/Zn-Al obtenue par reconstruction (▲) et par coprécipitation avec un rapport uréase/Zn-AL 1/1(□). Tampon phosphate 5 mM, pH=7,4.

La [figure V-13](#) montre que les capteurs à base des biomembranes uréase/acétate et poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase présentent des réponses quasi-reproductibles au cours du temps. Dans un tableau récapitulatif, nous regroupons les performances analytiques des différents biocapteurs élaborés au cours de ce travail. Leurs performances analytiques seront comparées à celles issues d'autres biocapteurs d'urée trouvés dans la littérature ([Tableau V-3](#)).

Tableau V-3 : Performances analytiques des biocapteurs élaborés dans ce travail comparées à ceux des biocapteurs d'urée trouvés dans la littérature.

Biomembrane	Sensibilité (mV/p[urea])	Gamme de linéarité (p[urea])	K_m (mM)	P_m ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	Ref.
Polymère hydroxy /uréase	22	2-3.92	1.14	$0.93 \cdot 10^{-2}$	ce travail
Polymère lactobinate/uréase	24	1.69-3.92	1.12	$0.83 \cdot 10^{-2}$	"
Polymère acétate/uréase	26	2-3.55	1.25	$1.06 \cdot 10^{-2}$	"
Polymère chlorure/uréase	17	2-3.39	1.4	-	"
Poly(pyrrole-biotine)/avidine/ biotine-uréase	50	1.41-2.92	5	-	"
Zn ₃ Al-uréase (reconstruction)	70	2.69-4	0.67	$1.2 \cdot 10^{-2}$	"
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation : 1/3)	17	1.92-3.92	1.18	$1.6 \cdot 10^{-2}$	"
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation : 1/2)	14	1.9-3.69	1.42	$1.3 \cdot 10^{-2}$	"
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation : 1/1)	16	1.91-4	1.15	$1.6 \cdot 10^{-2}$	"
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation : 2/1)	9	1-4.5	1.06	$0.95 \cdot 10^{-2}$	"
Zn ₃ Al-uréase (coprécipitation : 3/1)	3	1-2.69	6	$0.7 \cdot 10^{-2}$	"
Polyéthylènimine/uréase,	50.24	1.5-2.5	-	-	[52]
Polypyrrole/uréase	110	1.52-3.52	-	-	[53]
Poly(vinylferrocénium)/uréase	9	1-4.3	-	-	[54]
Laponite/uréase	53.22	3.25-5.3	2.8	$3.1 \cdot 10^{-3}$	[55]
PVAc-PE/uréase	52	2.67-5.14	-	-	[56]
PVC-NH ₂ /uréase	48	1.30 -3.30	-	-	[57]
Polyuréthane-acrylate/uréase	58	2.44-5.39	-	-	[58]

Enfin, on peut dire que chaque matrice traitée dans ce travail présente des avantages et des inconvénients à l'exception des biomembranes uréase/polymère acétate et Poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase. Ces dernières présentent des bonnes sensibilités et qui sont reproductibles au cours du temps. En plus, l'immobilisation de l'uréase dans ces deux matrices ne demande pas l'utilisation d'un agent de réticulation. Ce dernier, paraît indispensable dans l'élaboration des autres biomembranes à base d'uréase/polymère hydroxy, uréase/polymère chlorure, uréase/polymère lactobionate. La bonne sensibilité rencontrée dans le cas du biocapteur élaboré en présence de la matrice hydroxyde double lamellaire est limitée par le phénomène de gonflement. Le re-largage des molécules uréase immobilisées dans le polymère hydroxy vers l'électrolyte réduit aussi la sensibilité du biocapteur au cours du temps.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé une nouvelle stratégie qui consiste à immobiliser l'uréase en mettant à profit la forte interaction spécifique "avidine-biotine". Cette liaison non covalente entre l'avidine et la biotine conduit de manière efficace à immobiliser l'uréase biotinylée sur un film de poly(pyrrole-biotine) obtenu par oxydation chimique. En outre, cette technique d'assemblage en mode "sandwich" a permis le développement d'un biocapteur d'urée évalué par mesures C(V) et possédant de très bonnes caractéristiques. Il est important de souligner également que la sensibilité et la stabilité d'un tel biocapteur peuvent être améliorées de manière significative par l'ajout de l'EDTA dans la solution de stockage.

Références bibliographiques du chapitre V

- [1] Serge Cosnier, C. Gondran, A. Senillou., *Synthetic Metals* **102** (1999) 1366.
- [2] S. A.G. Evans, K. Brakha, M. Billon, P. Mailley, G. Denuault., *Electrochemistry Communications* **7** (2005) 135.
- [3] R. E. Ionescu, C. Gondran, Serge Cosnier, L. A. Gheber, R. S. Marks., *Talanta* **66** (2005) 15.
- [4] M. C. Shin, H. S. Kim., *Biosensors and bioelectronics* **11** (1996) 171.
- [5] M. Calvo-Munoz, B. Ehui-Avo Bile, M. Billon, G. Bidan., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **578** (2005) 301.
- [6] M. Amounas, C. Innocent, S. Cosnier, P. Seta., *Journal of Membrane Science* **176** (2000) 169.
- [7] G. Bidan, M. Billon, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L. M Torres-Rodriguez., *Synthetic Metals* **102** (1999) 1363.
- [8] N. Lassalle, A. Roget, T. Livache, P. Mailley, E. Vieil., *Talanta* **55** (2001) 993.
- [9] A. Dupont-Filliard, M. Billon., T. Livache, S. Guillerez., *Analytica Chimica Acta* **515** (2004) 271.
- [10] T. Ottena, T. Darbre, S. Cosnier, L. Abrantes, J. Correia, R. Keese., *Helvetica Chimica acta* **81** (1998) 1117.
- [11] R. Marks, A. Novoa, D. Thomassey, S. Cosnier., *Anal Bioanal Chem* **344** (2002) 1056.
- [12] S. P. Armes., *Synth Met* **20** (1987) 365.
- [13] P. Novak., *Electrochim Acta* **37** (1992) 1227.
- [14] D. Stanke. M. L. Hallensleben, L. Toppare., *Synth Met* **73** (1987) 267.
- [15] B. Bush, G. Xu, C. Carraro, R. Maboudian., *Sensors and Actuators A* **126** (2006) 194.
- [16] L.A. Samuelson, M.A. Druy, *Macromolecules* **19** (1986) 824.
- [17] S. Machida, S. Miata, A. Techagumpuch. *Synthetic Metals* **31** (1989) 145.
- [18] G. Tischenko, E. Rosova, GK. Elyashevich, M. Bleha. *Chem Eng J* **79** (2000) 211.
- [19] N.M. Green., *Methods Enzymol.*, **184** (1990) 51.
- [20] K.J. Airene, V.S. Marjomaki, M.S. Kulomaa., *Biomol Eng* **16** (1999) 87.
- [21] P.C. Weber, D.H. Olhendorf, J.J. Wendoloski, F.R. Salemme., *Science* **243** (1989) 85.

- [22] L. Pugliese, A. Coda, M. Malcovati, M. Bolognesi, *Journal Mol Biol* **231** (1993) 698.
- [23] M. Soledad Celej, Guillermo G. Montich, Gerardo D. Fidelio., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325** (2004) 922.
- [24] Shinn-Jyh Ding, Bin-Wha Chang, Ching-Chou, Hsien Chang, *Electrochimica Acta* **50** (2005) 3660.
- [25] A. Ebner, F. Kienberger, G. Kada, C. M. Stroh, M. G. ger, A. S. M. Kamruzzahan, L. Wildling, W. T. Johnson, B. Ashcroft, J. Nelson, S. M. Lindsay, H. J. Gruber, P. Hinterdorfer., *ChemPhysChem* **6** (2005) 897.
- [26] S. Luo, D. R. Walt., *anal Chem* **61** (1989) 1069.
- [27] J. Gau, E. H. Lan, B. Dunn, C. Ho, J.C. Woo., *Biosensors and Bioelectronics* **16** (2001) 745.
- [28] G.S. Gohil, V.V. Binsu, Vinod K. Shahi., *Journal of Membrane Science* **280** (2006) 210.
- [29] D. Cossement, F. Plumier, J. Delhalle, L. Hevesi, Z. Mekhalif., *Synthetic Metals* **138** (2003) 529.
- [30] C.J. van Oss., *Forces Interfaciales En Milieux Aqueux*, Masson, Paris, France, (1996) 177.
- [31] Y.T. Shieh, K.H. Liu., *Journal of Supercritical Fluids* **25** (2003) 261.
- [32] C.J. van Oss, *Acid/base interfacial interactions in aqueous media*, *Colloids Surf.*, **78** (1993) 1.
- [33] D. Liu, K. Ge, K. Chen, L. Nie, S. Yao, *Anal. Chim. Acta* **307** (1995) 61.
- [34] A. Sehitogullari, H. A. Uslan., *Talanta* **57** (2002) 1039.
- [35] F. Ayhan, H. Ayhan, E. Piskin, A. Tanyolac., *Bioresource Technology* **81** (2002) 131.
- [36] V. Volotovskiy, Y. J. Nam, N. Kim., *Sensors and Actuators B* **42** (1997) 233.
- [37] A. H. Jayatissa, Zhiyu Li., *Materials Science and Engineering B* **124–125** (2005) 331.
- [38] A. Tataroglu, S. Altindal, M.M. Bulbul., *Microelectronic Engineering* **81** (2005) 140.
- [39] V. G. Marathe, N. Chandani, N. DasGupta., *Thin Solid Films* **504** (2006) 126.
- [40] J.V. De Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault., *Anal. Chem.* **74** (2002) 4037
- [41] F. Kuralay, H. Özyörük, Attila Yýldýz., *Sensors and Actuators B* **109** (2005) 194.

- [42] F. Ayhan, H. Ayhan, E. Piskin, A. Tanyolac., *Bioresource technology* **81** (2002) 131.
- [43] G. Bayramoglu, H. Altınok, A. Bulut, A. Denizli, M. Y. Arica., *Reactive. Functional Polymers* **56** (2003) 111.
- [44] S. Akgol, Y. Yalcınkaya, G. L. Bayramoglu, A. Denizli, M. Y. Arica., *Process Biochemistry* **38** (2002) 675.
- [45] M.C. Yang, C.C. Lin. *Biomaterials* **22** (2001) 891.
- [46] A. E. Eser, E. Y. Murat., *biotechnol* **28** (2000) 95.
- [47] T. E. Barman., (1969). "Enzyme Handbook", Springer-Verlag, New York, USA.
- [48] A. S. Fahmy, V. B. Bagos, T. M. Mohammed., *Bioresource Technology* **64** (1998) 121.
- [49] N. Wang, J. P. Bulter, P. E. Ingber., *Science* **260** (1993) 1124.
- [50] V. T. Moy, E. L. Florin, H. G. Gaub., *Science* **266** (1994) 257.
- [51] X. Cui, R. Pei, Z. Wang, F. Yang, Y. Ma, S. Dong, X. Yang., *Biosensors and Bioelectronics* **18** (2003) 59.
- [52] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys. *Biosensors and Bioelectronics* **19** (2004) 1641.
- [53] T. Osaka, S. Komaba, M. Seyama, K. Tanabe. *Sensors and Actuators B* 35-36 (1996) 463.
- [54] F. Kuraly, H. Özyörük. A. Yildiz. *Sensors and Actuators B* 109 (2005) 194.
- [55] J.V. De Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Chem.* **74** (2002) 4037.
- [56] N. Tinkilic, O. Cubuk, I. Isildak. *Anal. Chim. Acta* **452** (2002) 29.
- [57] J. Gau, E. H. Lan, B. Dunn, C. Ho, J.C. Woo. *Biosensors and Bioelectronics* **16** (2001) 745.
- [58] C. Puig-Lleixà. C. Jiménez, J. Alonsa, J. Bartroli. *Anal. Chem. Acta* **389** (1999) 179.

Conclusion générale

Conclusion générale

Des centaines de millions de patients dans le monde souffrent d'une insuffisance rénale; il y a ceux qui ont une maladie chronique rénale, ceux qui ont besoin de dialyse ou ont eu recours à une transplantation. La mesure du taux d'urée dans l'urine sert d'indicateur de la fonction rénale. Par exemple, le rapport entre les niveaux d'urée dans l'urine et dans le sérum peut donner une indication sur la capacité du rein à filtrer et à supprimer l'urée du flux sanguin. Puisque l'urée est le résultat de la destruction des protéines, le niveau dans l'urine peut également être mesuré pour indiquer les besoins en protéines chez les patients sévèrement malades. La production d'un biocapteur d'urée sélectif, rapide, économique et durable constitue l'un des challenges de hémodialyse rénale.

Jusqu'à nos jours la recherche de nouvelles stratégies d'immobilisation de l'uréase constitue un impératif pour l'amélioration des performances des biocapteurs et l'espoir de pouvoir dans un avenir proche mettre un biocapteur à urée sur le marché. Notre travail de thèse, au cours duquel plusieurs types de nouvelles membranes enzymatiques ont été étudiées, s'inscrit dans ce contexte.

La première partie, concerne l'immobilisation de l'uréase dans des polymères latex biodégradables. Dans ce but, les performances d'un polymère neutre fonctionnalisé par un groupement hydroxy et celles de trois polymères cationiques ou dérivés de polynorbornènes qui diffèrent par l'entité anionique associée (chlorure, acétate et lactobionate) ont été explorées. Ces polymères présentent l'avantage d'être soluble en milieu aqueux facilitant ainsi la préparation de la biomembrane en présence de l'uréase généralement active dans des conditions judicieusement choisies. Ces composites uréase/polymères ont été déposés par la technique de "spin-coating" sous forme de couches minces sur la surface d'une électrode IS (isolant-semiconducteur) sensible aux variations de pH. Le fonctionnement du biocapteur formé en présence d'urée est défini par la variation locale du pH à l'interface électrode/couche biosensible suite à la réaction catalysée par l'uréase, celle-ci transformant l'urée en ions ammonium et hydrogénocarbonate. Par des mesures électrochimiques capacités-potentiels C(V) nous avons étudié la réponse du biocapteur vis-à-vis de l'urée. Ces mesures électrochimiques ont révélé une variabilité de la réponse du biocapteur en fonction de

Conclusion générale

la matrice et de l'étape d'immobilisation. La réticulation de l'uréase par le vapeur du glutaraldéhyde (GA) s'est avérée être un avantage pour certain matrices et par contre néfaste pour d'autres. Nous avons remarqué que la présence de groupements ammonium dans le cas des polymères cationiques peut renforcer l'interaction électrostatique entre l'uréase (anionique à pH neutre) et le polymère, ce qui rend inutile la réticulation aux vapeurs de GA, surtout dans le cas du polymère chlorure et acétate. Ces constatations ont été confirmées par l'étude de la mouillabilité des biomembranes réticulées et non réticulées aux vapeurs de GA. Ces études ont montré que l'exposition des biomembranes à base de polymères chlorure et acétate aux vapeurs de GA rend les biomembranes très hydrophobes ce qui minimise sans doute la diffusion du substrat (urée) dans la biomembrane. En outre, des mesures par voltamétrie à balayage linéaire ont permis d'évaluer la perméabilité des différentes biomembranes vis-à-vis du substrat. Dans des conditions optimales d'élaboration, les biocapteurs développés à l'aide des polymères latex présentent des réponses acceptables (comprises entre 17 et 26mV/décade) définies sur une domaine de linéarité entre 10^{-4} et 10^{-1} M d'urée. En outre, ces biocapteurs sont caractérisés par une durée de vie qui peut dépasser trois semaines.

En seconde partie, nous avons développé un biocapteur d'urée basé sur l'intercalation de l'uréase dans un matériau inorganique HDL (hydroxyde double lamellaire). Cette structure lamellaire alternée, et qui s'obtient par une technique de chimie douce, constitue un matériau hôte non dénaturant pour l'uréase. Cette dernière a été échangée sur le matériau HDL selon trois méthodes; l'adsorption où reconstruction, l'échange anionique et la coprécipitation. Parmi ces différentes voies de synthèse, le matériau nanohybride uréase-HDL obtenu selon la méthode de reconstruction conduit à un biocapteur très sensible à l'urée (70mV/pUrée). En outre, nous avons remarqué qu'une étape de réticulation aux vapeurs de GA paraît désormais nécessaire pour renforcer la stabilité du biocapteur. Ces bonnes performances sont limitées par le phénomène de gonflement du matériau HDL, ce qui limite la diffusion du substrat vers les sites actifs de l'enzyme. Dans le cas du biocapteur obtenu par la méthode d'échange anionique la réponse reste faible (10mV/décade). Nous avons attribué cette réponse médiocre à la faible quantité d'uréase échangée sur le matériau HDL. Par ailleurs, des mesures par spectroscopie d'impédance $Z(\Omega)$ ont montré la haute sensibilité du biocapteur à base du

Conclusion générale

matériau nanohybride uréase-HDL obtenue par reconstruction. Ce biocapteur impédancemétrique est caractérisé par une large dynamique, élargie vers les fortes concentrations en urée (>100mM). D'autres matrices hybrides uréase-HDL préparées par coprécipitation, ont été utilisées pour différents rapports uréase/HDL (3/1, 2/1, 1/1, 1/2 et 1/3). Nous avons remarqué que la sensibilité ($10 < \text{sensibilité (mV/purée)} < 24$) de ces matrices préparées par coprécipitation vis-à-vis de l'urée dépend du rapport uréase/HDL.

Dans la troisième partie, nous avons développé un biocapteur d'urée en immobilisant l'uréase dans du polypyrrole biotinylé grâce à l'interaction "avidine-biotine". Par cette forte interaction non covalente, un système d'empilement couche par couche "poly(pyrrole-biotine)/avidine/biotine-uréase" a été construit avec succès à la surface de l'électrode IS. Ce biocapteur a montré de bonnes performances du point de vue sensibilité (50mV/purée) et reproductibilité. En outre, cette méthode d'immobilisation par ponts avidine-biotine présente des avantages par rapport aux matériaux organiques et inorganiques utilisés dans notre travail. Le premier avantage est que cette stratégie de couplage permet d'accéder à des biocapteurs régénérables, puisque le système biotine/avidine/biotine peut être 'désassemblé' par un surfactant, renouvelant ainsi le substrat polypyrrole-biotine. Le deuxième avantage réside dans l'excellente reproductibilité de cette méthode d'immobilisation conduisant à des couches homogènes et uniformes. De plus, le couplage avidine-biotine robuste exclut tous agents de réticulation et évite l'adsorption non spécifique. Ces avantages potentiels ne doivent pas masquer les bonnes performances du matériau inorganique HDL et des polymères cationiques, testés pour la première fois dans une optique de réalisation de capteurs enzymatiques.

Enfin, parmi les perspectives ouvertes par ce travail nous comptons :

- Poursuivre la caractérisation des différents biocapteurs développés dans notre travail en améliorant leurs performances. Ceci peut être réalisé par l'utilisation des inhibiteurs compétitifs pour élargir la dynamique du biocapteur et des agents stabilisateurs pour augmenter la stabilité et la durée de vie du biocapteur.
- Tester d'autres matériaux support pour immobiliser de manière covalente l'uréase et explorer le développement de biocapteurs en vue de la détection des métaux lourds avec tout en

Conclusion générale

poursuivant leur caractérisation par mesures capacitives comparativement avec l'utilisation de la technique SPR (surface plasmon resonance).

Annexes

Techniques de mesures
électrochimiques et
caractérisations morphologiques

I/Mesures électrochimiques à l'interface solide/liquide : mesures impédancemétriques

I.1- : Principe de la spectroscopie d'impédance :

En principe, il y a deux méthodes différentes pour obtenir des spectres d'impédance: mesure en fonction de la fréquence ou bien en fonction du temps. La méthode la plus commune, principalement employée par les dispositifs disponibles dans le commerce, est la mesure en fonction de la fréquence ou l'analyse harmonique [1,2]. Un potentiel sinusoïdalement variable $V(\omega,t)$ avec une amplitude typiquement dans la gamme de $V_0 = 5-50$ mV est appliqué au système électrochimique et on mesure le courant résultant $I(\omega,t)$ qui résulte de l'excitation électrique (Figure 1-A). Des spectres d'impédance sont obtenus par des mesures séquentielles de $V(\omega,t)$ et $I(\omega,t)$ pour chaque fréquence. L'amplitude du signal appliqué est choisie faible afin de maintenir une réponse pseudo-linéaire du système (Figure 1-B). Dans un système linéaire (ou pseudo-linéaire), la réponse courante à un potentiel sinusoïdal sera également sinusoïdale avec la même fréquence, mais décalée dans la phase et différent dans l'amplitude.

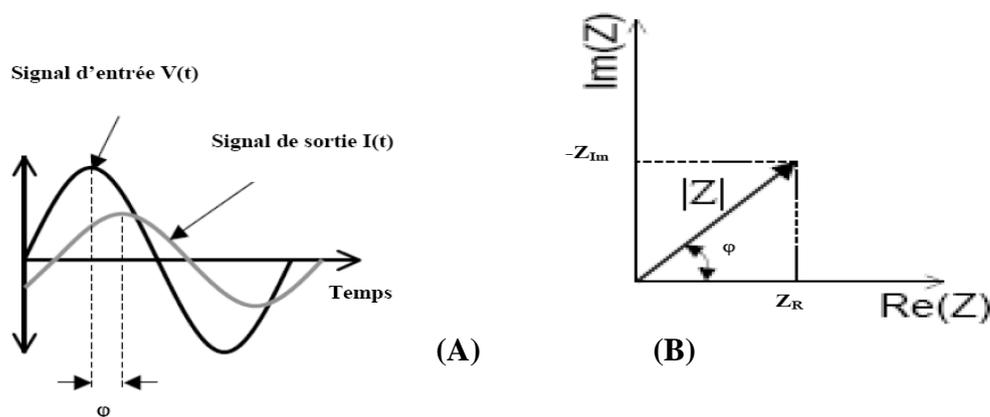


Figure 1 : A) Schéma de signal d'entrée $V(t,\omega)$ et de signal de sortie $I(t,\omega)$ et qui montre le déphasage ϕ , B) schéma représentatif des coordonnées cartésiennes et polaires.

Les données d'impédance sont typiquement représentées suivant deux types de représentations: le diagramme de Bode (Figure 2-A) et le diagramme de Nyquist. Dans le diagramme de Bode, le logarithme du module $|Z_0(\omega)|$ et le déphasage $\varphi(\omega)$ de l'impédance sont tracés en fonction du logarithme de la fréquence (Figure 2-B). Dans le diagramme de Bode, une résistance est représentée par un trait horizontal et avec un déphasage constant $\varphi(\omega) = 0^\circ$. Donc les valeurs de R_s et $R_s + R_{ct}$ peuvent se déduire du diagramme de Bode quand $\omega \rightarrow 0$ et $\omega \rightarrow \infty$ respectivement. Tandis qu'une pure capacité mène à une ligne droite de pente -1 et de déphasage constant $\varphi(\omega) = -90^\circ$, la valeur de la capacité est déterminée en extrapolant la ligne droite jusqu'à $\omega \rightarrow 1$, la valeur de Z trouvée est l'inverse de la capacité.

Le diagramme de Nyquist, est une représentation graphique dans un plan complexe; l'axe des abscisses représente la partie réelle alors que l'axe des ordonnées représente la partie imaginaire du nombre complexe.

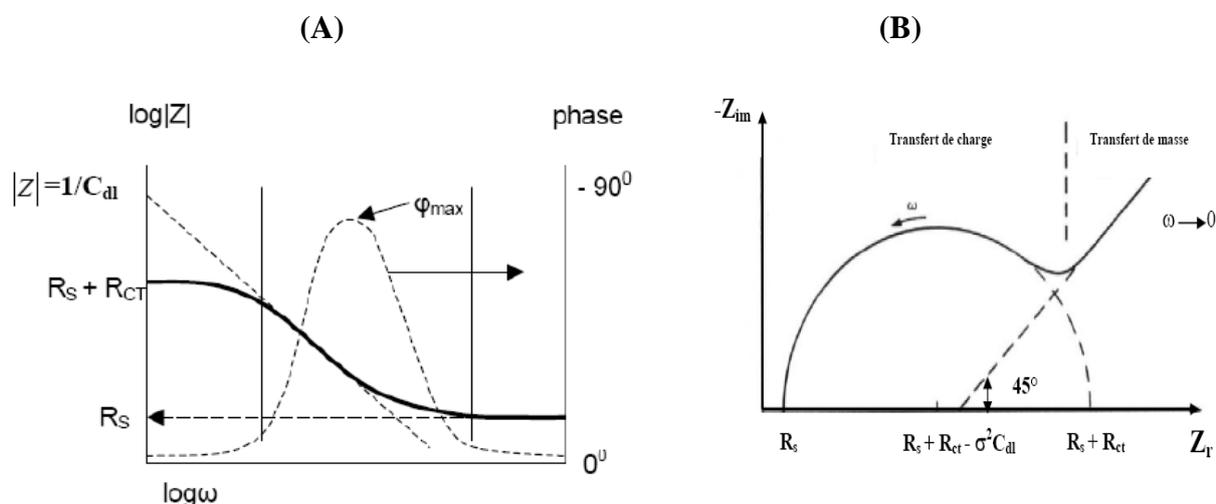


Figure 2 : (A) Diagramme de Bode et (B) Diagramme de Nyquist

1.2- Circuit électrique équivalent :

Les circuits équivalents sont traditionnellement utilisés pour modéliser les mesures d'impédance [3]. Un circuit équivalent est un circuit électrique qui a le même

spectre d'impédance que les résultats expérimentaux. Les valeurs et l'arrangement des éléments du circuit sont fréquemment de bonnes approximations de vrais systèmes et les données peuvent souvent être adaptées pour donner des résultats d'exactitude raisonnable. Les changements de ces valeurs peuvent nous aider dans la compréhension de l'évolution du système.

1.2.1- les éléments d'un circuit équivalent :

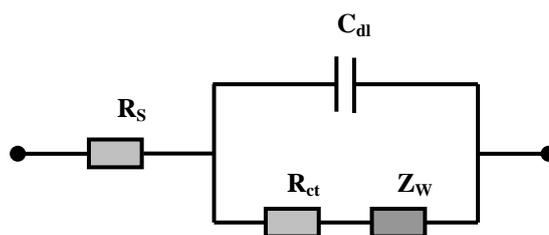


Figure 3 : Circuit équivalent de Randle

1.2.2- Résistance de l'électrolyte:

La résistance de l'électrolyte (R_s) dépend généralement de la concentration d'ions dans la solution, du type d'ions, de la température et de la forme de la cellule électrochimique. Elle est proportionnelle à la résistivité de l'électrolyte ρ . La résistance d'électrolyte est donnée par l'expression suivante :

$$R_s = \rho \frac{l}{A}$$

Avec l la distance entre l'électrode de travail et la contre électrode et A la surface active de l'électrode de travail.

1.-2.3- Résistance de transfert de charge :

La résistance de transfert de charge R_{ct} [4] est la résistance liée au mécanisme de transfert de charge pour des réactions redox à l'électrode. Elle est définie comme la dérivée partielle de la densité du courant faradique (J_F) par rapport au potentiel (E).

$$R_{CT} = \frac{RT}{nFI_0}$$

Avec R est la constante de 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 égal 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.

$$I_0 = nFAC_0k^0$$

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

1.2.4- Capacité de la double couche :

La capacité de la double couche (C_{dl}) résulte d'une double couche électrique qui se forme à l'interface entre l'électrode et l'électrolyte [4]. La valeur de cette capacité dépend de plusieurs variables comprenant la tension appliquée à l'électrode, la température, la concentration ionique, les types d'ions, les couches d'oxyde, la rugosité de l'électrode, l'adsorption d'impureté. L'expression de la capacité de la double couche est donnée par :

$$C_{dl} = \left(\frac{\partial Q}{\partial V} \right)_{T,P,\mu}$$

Avec, ∂Q la variation de charge stockée dans une couche, ∂V la variation de potentiel à travers la double couche, T la température, P la pression et μ le potentiel chimique de l'espèce ionique.

Selon le modèle d'Helmholtz, la double couche est équivalente à un condensateur plat. La capacité de la double couche est donc donnée par l'expression suivante :

$$C_{dl} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d}$$

II/Morphologie de la surface par Microscopie à Force Atomique : AFM

Le microscope à force atomique (ou AFM) est un dérivé du microscope à effet tunnel (ou STM), qui peut servir à visualiser la topologie de la surface d'un échantillon ne conduisant pas l'électricité. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie (scanne) la surface à représenter, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétro-action. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface. La différence entre l'AFM et le STM réside dans la mesure prise en compte pour la rétroaction utilisée : le STM utilise le courant tunnel, l'AFM utilise la déviation du levier, c'est-à-dire indirectement les forces d'interactions entre la pointe et la surface. Dans la technique AFM, l'interaction n'est plus alors décrite par un courant mais une force [6]. N'importe quelle surface peut donc être imagée.

II.1- Principe de fonctionnement:

Le principe de fonctionnement du microscope à force atomique est donné par la [figure 4](#).

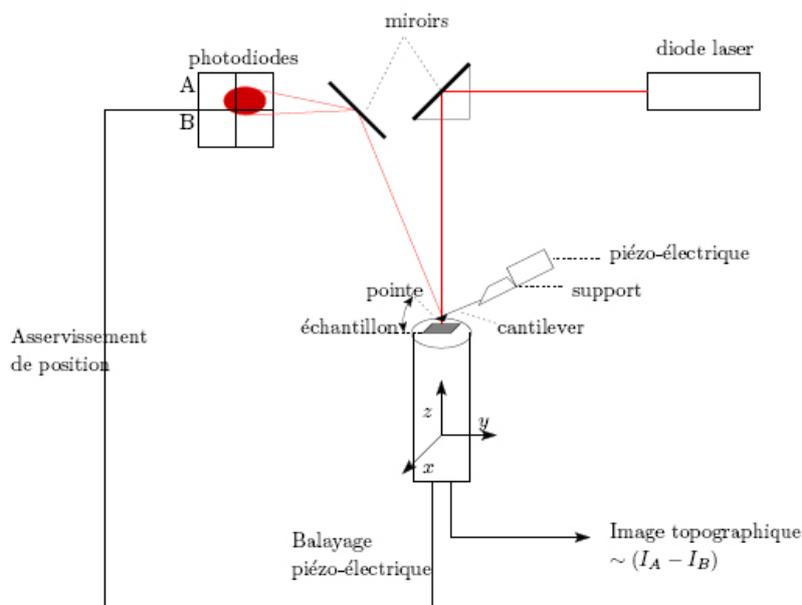


Figure 4: Schéma de principe de fonctionnement du microscope à force atomique

Une petite sonde est approchée de la surface. Le balayage de l'échantillon est réalisé par l'intermédiaire d'un dispositif permettant des déplacements précis en x,y,z sur différentes échelles (de l'Angstrom au micron). Deux géométries sont possibles: soit la surface est fixe et le piézo-électrique est solidaire de la sonde; soit la sonde est fixe et le piézo-électrique solidaire de la surface. La réalisation de la deuxième possibilité est plus simple et est généralement adoptée.

II.2- Interactions et modes d'utilisation

Les atomes ont souvent tendance à s'attirer ; lorsque l'affinité des atomes est grande, ils se lient pour former une molécule ou un cristal, mais dans la plupart des cas, cette attraction est très faible et n'est perceptible qu'à très faible distance (il s'agit de force de Van der Waals). À l'inverse, lorsqu'ils sont très proches, les atomes se repoussent du fait de la soumission des électrons du cortège électronique au principe d'exclusion de Pauli. Il y a donc une sorte de «distance d'équilibre» : si les atomes s'éloignent, une force les rappelle, et s'ils se rapprochent, une force les repousse.

On utilise donc cette attraction/répulsion entre les atomes surfaciques et la pointe sondeuse. La pointe est montée sur un levier très flexible ; la mesure de la flexion du levier (dans un sens ou dans l'autre) donne une mesure directe de la force d'interaction entre la surface sondée et la pointe.

Il existe en fait trois modes d'utilisation de l'AFM : le mode contact, le mode non-contact, et enfin le mode contact intermittent.

- Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée du fait du principe de Pauli, et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation.
- Le mode contact intermittent, de loin le plus utilisé, consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface (essentiellement de façon répulsive), l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.

- Le mode non-contact utilise, lui, les forces attractives. Difficile à gérer, il est très peu utilisé en pratique, parce que ces forces sont faibles, et nécessitent un environnement à faible bruit. Par ailleurs, la couche d'adsorbats (toute surface à l'air ambiant est recouverte d'une couche de l'ordre du nm d'épaisseur d'eau et de divers polluants) vient largement affecter les mesures - le vide est plus que conseillé pour obtenir une résolution suffisante en pratique. La rétroaction s'effectue soit sur la déviation, mais bien évidemment il s'agit d'une déviation du levier qui va dans l'autre sens que dans le cas du mode contact, soit sur l'amplitude des oscillations.

II.3- Mise en oeuvre expérimentale

La mise en oeuvre d'une expérience d'AFM à l'air est très rapide puisque elle consiste à approcher la pointe près de la surface. Une étape préalable est le réglage optique: le faisceau laser est amené au bout du cantilever (réponse des diodes A+B maximum) par l'intermédiaire de deux vis micrométriques permettant le déplacement du laser en x et y ; puis le faisceau laser est centré sur les diodes ($A-B = 0$) grâce à une microvis. Dans ces conditions ($A+B$ maximum et $A-B = 0$), la sensibilité et le champ de détection autorisé par les photodiodes sont maximum. Ce réglage étant effectué, il reste à rapprocher la pointe près de la surface. Expérimentalement, ce n'est pas la pointe qui est approchée mais la partie supérieure constituée du système de détection de la sonde. Cette partie supérieure s'adapte sur l'échantillon par l'intermédiaire d'un dispositif trait-piont-plan dont l'un des axes est relié à un moteur pas à pas commandé par l'intermédiaire de l'ordinateur. L'approche est effectuée manuellement à l'aide de deux autres axes puis terminée à l'aide du moteur. Pour cela, on impose une valeur de déflexion. Le moteur va approcher la pointe de la surface jusqu'à une certaine distance pour laquelle la déflexion atteindra la valeur fixée au départ. La pointe est alors engagée et la surface peut être imagée.

L'acquisition d'une image peut être extrêmement rapide (jusqu'à 30s). Elle dépend de la vitesse de balayage par ligne qui varie de 0.13 à 35 Hz. Cette valeur est fixée par rapport à la nature de l'échantillon. Le choix du piézo-électrique gouverne la taille du balayage puisque sa longueur fixe l'amplitude maximale des déplacements (130 μ m, 15 μ m, 1 μ m). Le piézo-électrique de taille moyenne (15 μ m) est généralement utilisé puisqu'il permet de travailler sur des champs assez importants tout en permettant d'obtenir la résolution atomique.

III/Morphologie de la surface par Microscopie Electronique à Balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface. Dans la pratique, au XXIème siècle, les MEB les plus conventionnels, c'est-à-dire, équipés de détecteurs d'électrons secondaires permettent d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 nm. Le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage est donné par la figure 5.

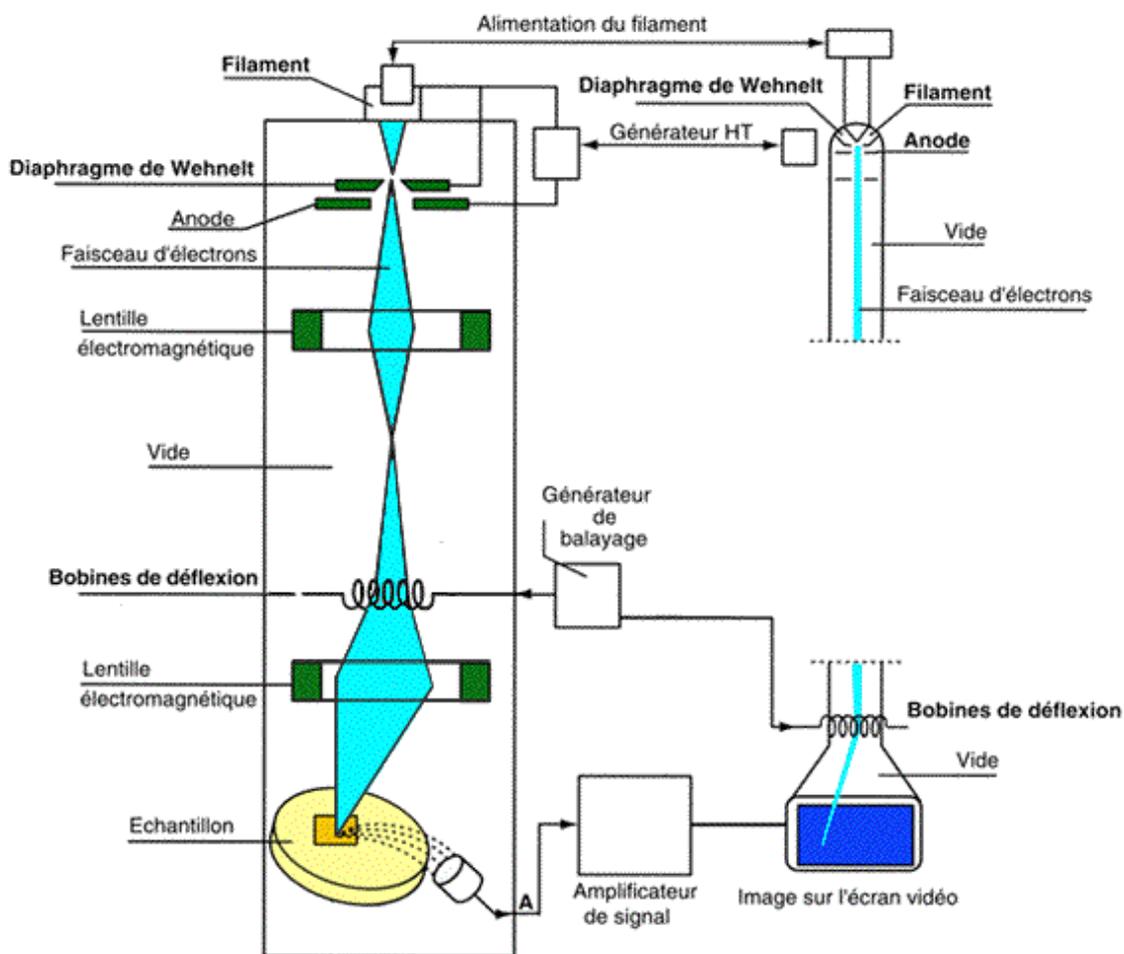


Figure 5 : Schéma de principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage (MEB).

Références Bibliographiques de l'annexe

- [1] J. Tauguy, N. Mermilliod and M. Hoclet, *Synthetic Metals*, 21 (1987) 7.
- [2] K. Jüttner. *Electrochimica Acta*, 35 (1990) 1501.
- [3] N. Bonanos, B. Ellis, K. S. Knight and M. N. Mahmood. *Solid State Ionics*, 35 (1989) 179.
- [4] J. R. Macdonald. *Impedance spectroscopy*, John Wiley and Son, 1987.
- [5] Z. Stoynov, B. Grafov, B. Savova-Stoynova, V. Elkin, *Electrochemical impedance*, Publishing House Science, Moscow, 1991.
- [6] Binning G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E., *Phys. Rev. Lett*, 50 (1983) 120.

***Liste de publications et
communications***

Publications

[1] A. Maaref, **H. Barhoumi**, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, C. Mousty, S. Cosnier. Comparative study between organic and inorganic matrices using for urease biosensor development. Sensors and actuators B Chemical (in press).

[2] S Vial, C Forano, D Shan, C Mousty, **H. Barhoumi**, C Martelet, N Jaffrezic. Uréase biosensors based on nanohybrid layered double hydroxide /urease materials. Materials Science and Engineering C 26 (2006) 377.

[3] **H. Barhoumi**, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. Vial, C. Forano Urea biosensor based on Zn₃Al–Urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures. Materials Science and Engineering C 26 (2006) 361

[4] **H. Barhoumi**, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, C. Mousty, S. Cosnier, E. Perezet I. Rico-Lattes. Insulator Semiconductor structures coated with a biodegradable latex as an encapsulation matrix for urease” Biosensors and bioelectronics 20 (2005) 2318.

[5] **H. Barhoumi**, A. Maaref, R. Mlika, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault and L. Ponsonnet. EIS Field effect structures functionalized by p-tert-butylcalix[6]arene for Ni²⁺ detection. Materials Science and Engineering C 25 (2005) 61.

Communications

[1] **H. Barhoumi**, A. Maaref, F. Ouni, R. Mlika et M. Rammah. Elaboration et caractérisation électrochimique d’hétérostructures ionosensibles à base de calixarenes F. Société Chimique de Tunisie (Douzièmes Journées Nationales de Chimie 2002).

[2] **H. Barhoumi**, A. Maaref, F. Ouni, M. B. Rammah, N. Jaffrezic Renault. Performance of capacitive fonctionnalized silicon nitride EIS structures with p-tert-butylcalix[6]arene for Ni²⁺ detection. African Journal of Physics (The 5th Edwad Bouchet Conference. Tunisia 2003).

[3] **H. Barhoumi**, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. Cosnier, E. Perez, I. Rico-Lattes “Characterisation of a new urea biosensor using different synthetic latex for urease immobilization”, The Eighth World Congress on Biosensors 24-26 May 2004, Granada, Spain.

[4] **H. Barhoumi**, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. Cosnier, E. Perez et I. Rico-Lattes. Immobilization de l'uréase dans différentes matrices biodégradables pour la détection d'urée. 7^{èmes} Journées Francophones des Jeunes Physico-Chimistes (Tunisie 2004).

[5] **H. Barhoumi**, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. Vial, C. Forano. Electrochemical impedance spectroscopy characterizations of urea biosensor using synthetic HDL matrix for urease encapsulation. MADICA Novembre 2004, Tunisie.

[6] **H. Barhoumi**, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. cosnier. Comparative study between organic inorganic matrices used for uréase immobilization. 8^{ième} Journées Francophones des Jeunes Physico-Chimistes, Tunisie 2004

[7] S. Vial, C. Forano, **H. Barhoumi**, A. Maaref, C. Martelet, N. Jaffrezic, S. Cosnier, C. Mousty. Matériaux Nanohybrides Uréase-HDL pour biocapteur à urée. MADICA Novembre 2004, Tunisie.

[8] S. Vial, C. Forano, B. Mailhot, **H. Barhoumi**, C. Martelet, N. Jaffrezic. Thin films of nanostructured Urease-Layered Double Hydroxides hybrid materials for application as Urea biosensors. European Materials Research Society (E-MRS), Strasbourg 31 Mai-3 Juin 2005, France.

[9] N. Zine, J. Bausells; **H. Barhoumi**, H. Jaffrezic, N. Jaffrezic-Renault, J. Samitier A. Errachid. Well engineered ion-implanted membrane for sodium microsensors. European Medical and Biological Engineering conference -EMBEC-Prague 20 à 25 November 2005, République Tchèque