



HAL
open science

Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : le PEDT. Application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et de composés phénoliques

Silvia Fabiano

► **To cite this version:**

Silvia Fabiano. Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : le PEDT. Application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et de composés phénoliques. Autre. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2002. Français. NNT : . tel-00127122

HAL Id: tel-00127122

<https://theses.hal.science/tel-00127122>

Submitted on 29 Jan 2007

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

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

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES MINES DE SAINT ETIENNE**

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD
LYON I**

N° d'ordre : 54-2002

Année 2002

THESE

Présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

Pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT EN CHIMIE-BIOCHIMIE

(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le 23 mai 2002

par

Silvia FABIANO

IMMOBILISATION D'ENZYMES DANS DES FILMS DE POLYMERES

CONDUCTEUR : LE PEDT

**APPLICATION A LA REALISATION DE BIOCAPTEURS AMPEROMETRIQUES
POUR LE DOSAGE DU GLUCOSE ET DES COMPOSES PHENOLIQUES**

JURY :	M. Comtat	Rapporteur
	M. Mascini	Rapporteur
	M.-C. Pham	
	C. Tran-Minh	
	O. Vittori	Président du jury

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au Centre Sciences des Processus Industriels et Naturels de L'Ecole des Mines de Saint-Etienne dirigé par Monsieur Michel Courmil.

Je voudrais remercier Monsieur Canh Tran Minh, directeur de cette thèse, pour l'accueil qu'il m'a accordé dans son laboratoire. Mes remerciements vont aussi à Monsieur Olivier Vittori, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon I en tant que codirecteur de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Minh-Chau Pham, Professeur à l'Institut de Topologie et de Dynamique des systèmes (ITODYS) de l'Université Paris VII-Denis Diderot, pour sa collaboration dans la mise au point de l'utilisation du PEDT et pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je suis également reconnaissante à Monsieur Marco Mascini, Professeur à l'Università degli Studi di Firenze de l'Italie et à Monsieur Maurice Comtat, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, pour avoir accepté d'être rapporteurs et membres de ce jury.

Je suis très reconnaissante envers Anne-Marie, non seulement pour son aide dans la conduite des premières expériences, mais aussi pour son support linguistique et son aide morale pendant toute la durée de ce travail.

J'adresse un remerciement particulier à Christophe pour ses suggestions utiles, ses conseils, ses critiques et son aide spontanée et amicale.

Je tiens à remercier mes camarades étudiants en thèse ou en DEA pour leur sympathie. Je leur souhaite une bonne continuation.

Je remercie également tout le personnel du Département Physico-chimie des Matériaux Multicomposants pour leur disponibilité.

Enfin, je tiens à témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance à Monsieur Victor Mantovani, Professeur de Chimie Analytique à la Faculté de Biochimie de Santa Fe, Argentine, pour son support tout au long de ces dernières années. Je remercie également tous mes collègues enseignants du Département de Chimie Analytique de la même Faculté.

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE.....	4
I.1 LES BIOCAPTEURS.....	5
I.1.1 Introduction.....	5
I.1.2 Définition et caractérisation.....	5
I.1.3 Les capteurs enzymatiques.....	6
I.1.4 Les biocapteurs électrochimiques.....	8
I.1.4.1 Les capteurs potentiométriques.....	8
I.1.4.2 Les capteurs conductimétriques.....	8
I.1.4.3 Les capteurs ampérométriques.....	9
I.1.4.4 Les capteurs enzymatiques ampérométriques.....	9
I.2 LES ENZYMES.....	11
I.2.1 Introduction.....	11
I.2.2 Définition des enzymes.....	11
I.2.3 Classification et nomenclature.....	11
I.2.4 Structure des enzymes.....	12
I.2.5 Catalyse enzymatique.....	13
I.2.6 Comparaison avec les catalyseurs chimiques.....	15
I.2.7 Unités d'activité.....	15
I.2.8 Fonctionnement et régulation des enzymes <i>in vivo</i>	16
I.2.9 Immobilisation des enzymes.....	17
I.2.9.1 Techniques d'immobilisation.....	18
I.2.9.2 Propriétés des enzymes immobilisées.....	20
I.2.10 Cinétique enzymatique.....	22
I.2.10.1 Equation de Michaelis-Menten.....	22
I.2.10.2 Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique.....	27
a Effet de la température.....	27
b Effet du pH.....	27
c Effet de la force ionique.....	28
I.3 UTILISATION DES FILMS DE POLYMERES POUR L'IMMOBILISATION D'ENZYMES.....	28
I.3.1 Introduction.....	28
I.3.2 Immobilisation des enzymes dans des films polymères électrogénérés.....	29
I.3.3 Polymères conducteurs.....	33
I.3.4 Polymères non conducteurs.....	40
I.4. CONCLUSIONS.....	42
CHAPITRE II : IMMOBILISATION DE LA GLUCOSE OXYDASE DANS UN FILM DE PEDT.....	43
II.1 LES BIOCAPTEURS A GLUCOSE.....	44

II.1.1 La glucose oxydase.....	44
II.1.2 Détection ampérométrique du glucose.....	47
II.2 MATERIELS ET METHODES	49
II.2.1 Réactifs pour l'élaboration du biocapteur.....	49
II.2.2 Appareillage.....	49
II.2.3 Méthodes.....	50
II.2.3.1 Elaboration des bioélectrodes	50
II.2.3.2 Détermination de l'activité de la GOD.....	50
II.2.3.3 Mesures ampérométriques.....	51
II.2.3.4 Influence de la concentration de GOD dans la solution d'électropolymérisation.....	51
II.2.3.5 Influence du pH de la solution d'électropolymérisation	52
II.2.3.6 Influence de la température	52
II.2.3.7 Influence du pH et de la concentration de la solution tampon d'analyse.....	52
II.2.3.8 Choix du potentiel.....	52
II.3 RESULTATS ET DISCUSSION	53
II.3.1 Optimisation des conditions d'élaboration du biocapteur.....	53
II.3.1.1 Caractérisation du biofilm et choix des conditions d'électropolymérisation.....	53
II.3.1.2 Evaluation de la concentration d'enzyme dans la solution d'électropolymérisation	59
II.3.1.3 Influence du pH de la solution d'électropolymérisation	60
II.3.1.4 Influence de la présence de biomolécules sur l'électroactivité du PEDT	61
II.3.1.5 Comportement des bioélectrodes en présence du substrat.....	62
II.3.1.6 Réponse du biocapteur à une solution de peroxyde d'hydrogène.....	63
II.3.2 Optimisation des conditions de mesure en cellule électrochimique	65
II.3.2.1 Influence de la température	65
II.3.2.2 Influence du pH.....	65
II.3.2.3 Influence de la concentration de la solution tampon.....	67
II.3.2.4 Influence de la concentration en oxygène du milieu d'analyse.....	68
II.3.2.5 Choix du potentiel de mesure.....	70
II.3.2.6 Réponse et courbe d'étalonnage d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD.....	71
II.3.2.7 Reproductibilité de la réalisation du biocapteur.....	74
II.3.2.8 Durée de vie et stabilité des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD.....	76
a Stabilité des bioélectrodes en utilisation fréquente.....	76
b Stabilité des bioélectrodes laissées en conservation.....	78
II.4 CONCLUSION.....	79
CHAPITRE III : REDUCTION DES INTERFERENCES LORS DE LA DETECTION DU GLUCOSE. APPLICATION DU SYSTEME BIOCAPTEUR-FIA POUR LE DOSAGE DU GLUCOSE EN MILIEU BIOLOGIQUE	80
III.1 Introduction.....	81
III.2 Etudes des espèces interférentes.....	82
III.2.1 Interférences des espèces électrochimiques.....	82

III.2.2	Optimisation de la détection électrochimique du peroxyde d'hydrogène	83
III.2.3	Médiateurs rédox pour la connexion électrique	84
III.2.4	Matériels et méthodes.....	87
III.2.4.1	Réactifs.....	87
III.2.4.2	Méthodes.....	87
a	Platinisation des électrodes.....	87
b	Préparation des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD/BQ	87
III.2.5	Résultats et discussion.....	88
III.2.5.1	Réponse des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD aux interférents électro-oxydables.....	88
III.2.5.2	Réponse des électrodes Pt/PEDT/GOD aux espèces interférentes	91
III.2.5.3	Platinisation des électrodes	93
III.2.5.4	Elaboration d'un biocapteur Pt/PEDT/GOD/BQ.....	97
III.3	Analyse par injection en flux continu (FIA).....	102
III.3.1	Principe	102
III.3.2	Caractéristiques d'un système FIA	102
III.3.3	Utilisation des enzymes immobilisées en FIA	105
III.3.4	Matériels et méthodes.....	106
III.3.4.1	Réactifs.....	106
III.3.4.2	Appareillage	106
III.3.4.3	Description de la cellule de détection électrochimique UniCell	106
III.3.4.4	Méthodes : conditions de mesure.....	107
III.3.5	Résultats et discussion.....	108
III.3.5.1	Mesures FIA avec détection directe par biocapteur	108
III.3.5.2	Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD en flux continu.....	110
III.3.5.3	Etude en milieu réel.....	113
III.4	Elaboration d'un biocapteur CV(Pt)/PEDT/GOD avec l'incorporation des différents médiateurs rédox et son utilisation dans des systèmes FIA.....	116
III.5	Conclusion.....	119

CHAPITRE IV : IMMOBILISATION DE LA POLYPHENOL OXYDASE DANS UN FILM DE PEDT **120**

IV.1	INTRODUCTION.....	121
IV.2	Principe du biocapteur à polyphénol oxydase.....	124
IV.2.1	La polyphénol oxydase.....	124
IV.2.2	Principe du biocapteur.....	126
IV.3	MATERIELS ET METHODES	129
IV.3.1	Réactifs pour la fabrication du biocapteur.....	129
IV.3.2	Appareillage.....	129
IV.3.3	Méthodes	130
IV.3.3.1	Elaboration des bioélectrodes	130

IV.3.3.2 Détermination de l'activité de la PPO	130
IV.3.3.3 Mesures ampérométriques en fonction des différents paramètres	131
IV.4 RESULTATS ET DISCUSSION.....	132
IV.4.1 Immobilisation de la PPO dans un film de PEDT.....	132
IV.4.2 Optimisation du temps d'électropolymérisation.....	134
IV.4.3 Choix du potentiel de travail	135
IV.4.4 Performances du biocapteur dans des conditions optimisées pour la détection de différents substrats	136
IV.4.5 Etude de la reproductibilité de l'électrode CV/PEDT/PPO.....	141
IV.4.6 Influence de la température sur la réponse du biocapteur.....	143
IV.4.7 Influence du pH sur la réponse du biocapteur.....	144
IV.4.8 Stabilité en stockage de l'électrode CV/PEDT/PPO	145
IV.4.9 Dosage direct du phénol.....	146
IV.5 CONCLUSION.....	148
CONCLUSION GENERALE.....	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
PUBLICATIONS	162

ABREVIATIONS

GOD	glucose oxydase
FIA	injection en flux continu (flow injection analysis)
PPO	polyphénol oxydase
EDT	3,4-éthylènedioxythiophène
PEDT	poly(éthylènedioxythiophène)
PPY	polypyrrole
PANI	polyaniline
PSS	poly(styrène sulfonate)
CoA	co-enzyme A
ATP	adénosine triphosphate
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
FAD	flavine adénine dinucléotide (forme oxydée)
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
PVP	polyvinylpyrrolidone
PEG	polyéthylène glycol
SDS	dodécylsulfate de sodium
ABTS	2,2-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)
BQ	benzoquinone
AA	acide ascorbique
AU	acide urique
PA	paracétamol
TCNQ	7,7,8,8-tétracyanoquinodiméthane
HcFK	hexacyanoferrate (III) de potassium
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
Pt/PEDT	électrode de platine recouverte d'un film de PEDT
Pt/PEDT/GOD	électrode de platine recouverte d'un film de PEDT contenant la GOD

Pt(Pt)/PEDT/GO	électrode de platine platinée recouverte d'un film de PEDT contenant la GOD
Pt/PEDT/GOD/BQ	électrode de platine recouverte d'un film de PEDT contenant la GOD et la benzoquinone
CV(Pt)/PEDT/GOD/BQ	électrode de carbone vitreux platinée recouverte d'un film de PEDT contenant la GOD et la benzoquinone
CV(Pt)/PEDT/GOD/HcFK	électrode de carbone vitreux platinée recouverte d'un film de PEDT contenant la GOD et l'hexacyanoferrate (III) de potassium
CV(Pt)/PEDT/GOD/TCNQ	électrode de carbone vitreux platinée recouverte d'un film de PEDT contenant la GOD et le 7,7,8,8 tétracyanoquinodiméthane
CV/PEDT/PPO	électrode de carbone vitreux recouverte d'un film de PEDT contenant la PPO

INTRODUCTION GENERALE

La détection et le dosage d'une espèce chimique ou biochimique sont réalisés à l'aide d'instruments d'analyse tels que les chromatographes et les spectromètres. Ces instruments sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. De plus, les phases de préparation des échantillons et d'exploitation des résultats augmentent souvent la durée totale de l'analyse.

Le développement, l'élaboration et les applications de nouveaux biocapteurs, particulièrement de type ampérométrique et enzymatique, ont fait l'objet d'une intense activité de recherche au cours de ces dernières années afin d'améliorer leurs performances notamment au niveau de leur spécificité. Les biocapteurs sont construits à partir du couplage d'un élément biologique sensible capable de reconnaissance moléculaire et d'un transducteur permettant la conversion du phénomène biologique subséquent à cette reconnaissance en un signal interprétable. Cette caractéristique leur confère une sélectivité de détection particulièrement attrayante.

Il s'agit donc de la mise au point d'outils analytiques simples, capables de donner une information en temps réel dans des domaines d'application variés.

- Dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique, ils offrent la perspective de dosages automatisés « en temps réel » pour le contrôle de production.

- Dans le domaine de l'environnement, leur emploi permet un suivi plus efficace de la qualité de l'atmosphère et des eaux.

- Dans le domaine médical, ils devraient permettre de diminuer le coût des analyses et d'envisager des mesures *in vivo*. Ainsi, les capteurs enzymatiques représentent les premiers biocapteurs étudiés, puis commercialisés, pour les besoins de l'analyse biomédicale : c'est le cas de l'électrode à glucose oxydase destinée au dosage du glucose dans le sang et dans l'urine chez les diabétiques.

Cependant les réalisations industrielles de tels outils analytiques restent limitées. Les travaux de recherche actuels visent à améliorer la stabilité des éléments biologiques immobilisés et à rendre économique leur mise en œuvre.

Dans cette optique, nous cherchons à améliorer les performances des biocapteurs ampérométriques par le choix d'un nouveau polymère conducteur : le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT) pour sa remarquable stabilité, sa grande conductivité et l'homogénéité des films obtenus. A différence d'autres dérivés du polythiophène, le PEDT peut être électropolymerisé à partir d'une solution aqueuse du monomère 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT). Ce monomère présente l'avantage d'une utilisation sans

traitement préalable à la différence du pyrrole qui doit être distillé avant d'être polymérisé. C'est dans ce contexte que ce travail a été effectué et présenté dans ce rapport.

Après une présentation générale des biocapteurs, suivie d'un rappel des lois fondamentales régissant les processus enzymatiques, l'étude bibliographique du chapitre I est axée sur les connaissances actuelles des films électrogénérés comme matrice d'immobilisation d'enzymes.

Le chapitre II est consacré à la description et à l'optimisation d'une méthode d'immobilisation électrochimique d'enzymes dans une matrice de polymère conducteur, le PEDT. La validation de cette méthode a été réalisée au moyen d'une enzyme modèle : la glucose oxydase (GOD). L'étude a permis de définir les conditions expérimentales du fonctionnement global du biocapteur en système batch.

Le chapitre III est consacré, dans sa première partie, à l'influence des interférents électro-oxydables sur la réponse des biocapteurs à glucose élaborés dans le chapitre II. La détection du glucose s'effectue par ampérométrie à un potentiel d'environ 0,65 V par rapport à l'électrode de calomel. A ce potentiel, des espèces interférentes endogènes (ascorbate, urate) ou exogènes (paracétamol) présentes dans des fluides biologiques peuvent donc perturber de façon non négligeable la réponse du biocapteur. La stratégie présentée pour limiter ces phénomènes d'interférences électrochimiques consiste, d'une part en la platinisation des électrodes pour augmenter la surface catalytique de décomposition de l'eau oxygénée (produit de la réaction enzymatique), et d'autre part la co-immobilisation de médiateurs rédox à la place de l'accepteur naturel d'électrons du système, l'oxygène, afin d'abaisser le potentiel de travail. La deuxième partie du chapitre décrit la mise au point d'un système d'analyse par injection en flux continu (FIA : flow injection analysis) adapté pour travailler avec de faibles volumes d'échantillon, ainsi que le dosage du glucose avec cette méthode *in vitro* en milieu réel (sérum humain).

Le chapitre IV concerne la mise au point d'un biocapteur en vue de son application dans le domaine de l'environnement qui constitue un axe de recherche du laboratoire (dosage de polluants). Nous avons étudié en particulier l'immobilisation de la polyphénol oxydase (PPO) dans un film de polymère électrogénéré de PEDT en vue de son application au dosage de composés phénoliques.

En conclusion, après avoir rappelé l'essentiel des résultats, nous tenterons de définir les développements à donner à cette étude, ainsi que les améliorations à apporter aux bioélectrodes en vue de leur application à la biodétection en milieu réel.

CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE

I.1 LES BIOCAPTEURS

I.1.1 Introduction

Le terme « biocapteurs » représente la fusion de deux des plus importantes technologies de ce siècle : l'électronique et les biotechnologies. Leur association permet des dosages rapides, sensibles et spécifiques.

Au cours des dernières décennies, les biocapteurs ont connu un développement considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles, que ce soit dans le domaine médical, agro-alimentaire ou celui du contrôle de l'environnement.

Actuellement, les études s'orientent vers la recherche de nouveaux matériaux permettant l'immobilisation des biomolécules sans altérer leur efficacité. Il n'existe pas de domaine privilégié puisque les travaux s'étendent de l'utilisation des membranes ou de polymères jusqu'à l'emploi de composés inorganiques divers.

Cependant, les contraintes de stabilité en conservation et en fonctionnement ne sont pas toujours compatibles avec l'utilisation des enzymes et limitent encore le développement des biocapteurs hors des laboratoires.

I.1.2 Définition et caractérisation

On peut considérer, en général, que le biocapteur est la combinaison d'un composant biologique appelé BIORECEPTEUR et d'un TRANSDUCTEUR qui représente en fait le mode de détection, afin d'assurer la transformation du phénomène biologique en signal électrique [1].

La figure I.1 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans un milieu échantillon, toute l'information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour une utilisation ultérieure.

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur : il sert à identifier l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une enzyme immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable

par le transducteur : c'est le cas des capteurs enzymatiques. Cependant parfois, pour des raisons de stabilité, l'enzyme doit être utilisée dans son environnement initial, et c'est alors la cellule ou le microorganisme tout entier qui sera immobilisée au niveau du biocapteur.

Le transducteur représente l'autre élément du biocapteur. Il sert à exploiter la modification biochimique du substrat par le biorécepteur pour la transformer en signal électrique. Dans le sens général, on peut dire que le transducteur assure la conversion d'un type d'énergie dans un autre. Suivant le type de modification biochimique, on choisira le type de transducteur approprié pour exploiter au mieux le travail assuré par le biorécepteur et obtenir un signal sensible, facilement exploitable et avec un minimum de bruit de fond. Un faible bruit de fond au niveau du transducteur assurera un seuil de détection plus bas et améliorera les performances du biocapteur [2].

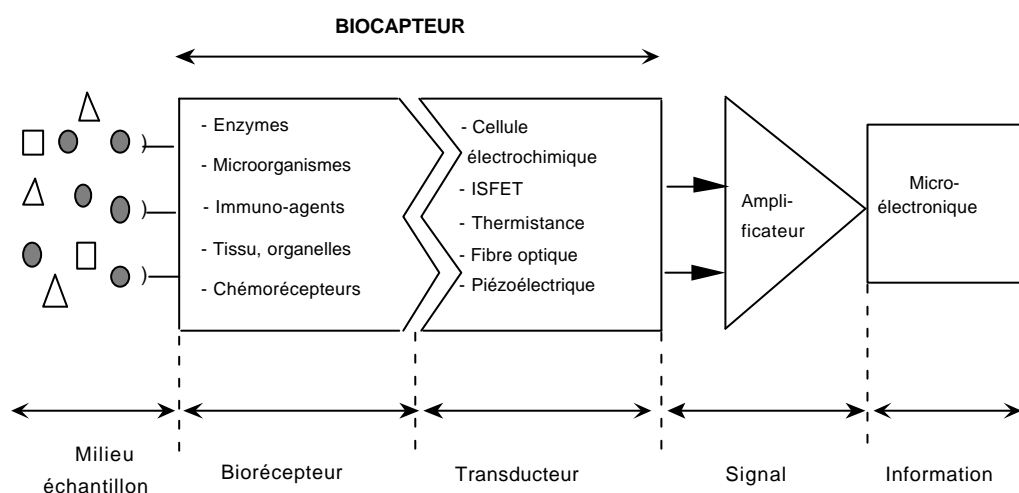


Figure I.1: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur [1].

I.1.3 Les capteurs enzymatiques

Un capteur enzymatique peut être considéré comme la combinaison de tout type de transducteur avec une fine couche enzymatique destinée, en général, à mesurer la concentration d'un substrat. La réaction enzymatique assure la transformation du substrat en produit de réaction détectable par le transducteur [3].

La représentation schématique d'un capteur enzymatique est donnée par la figure I.2. La surface sensible du transducteur est mise en contact avec la couche enzymatique. On suppose qu'il n'existe pas de transfert de masse à travers cette interface. La face externe de la couche enzymatique est trempée dans une solution contenant le substrat à doser. Ce substrat va migrer vers l'intérieur de cette couche et sera décomposé en produit de réaction dès qu'il entrera en contact avec l'enzyme immobilisée. Pour assurer une mise en équilibre rapide des concentrations, la membrane enzymatique doit être aussi fine que possible et la solution bien agitée pour assurer un apport constant en substrat. En résumé, les différentes étapes mises en jeu au cours du fonctionnement du capteur enzymatique sont :

- 1- transport du substrat de la masse de la solution vers la couche enzymatique
- 2- diffusion du substrat dans cette couche, accompagnée de la transformation enzymatique du substrat en produit de réaction
- 3- migration du produit vers le transducteur
- 4- conversion de la concentration du produit à cette interface, par le transducteur, en signal électrique.

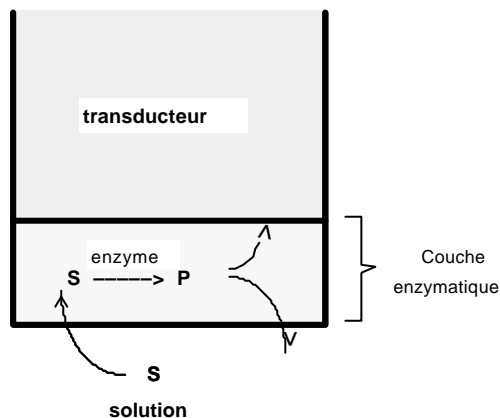


Figure I.2 : Représentation schématique de la diffusion du substrat *S* et du produit *P* dans une couche enzymatique fixée sur un transducteur [1].

I.1.4 Les biocapteurs électrochimiques

Depuis Faraday (1791-1867), ont été établies les relations qui régissent les réactions électrochimiques, c'est-à-dire les réactions dans lesquelles interviennent des particules chargées électriquement, généralement des ions et des électrons, dans un milieu dissociant comme l'eau. Un capteur électrochimique est donc, avant tout, un conducteur électrique que l'on implante au sein du milieu à étudier ; il s'établit alors un transfert de charges entre les espèces chargées présentes et le capteur ; la variation résultante d'énergie libre à l'interface est détectée par le capteur, et transmise à la chaîne de mesure sous la forme d'un signal électrique : courant ou tension [4].

Compte tenu de la diversité des types de capteurs électrochimiques actuellement utilisés, il est nécessaire d'en établir un classement sur la base de leur principe de fonctionnement. Ainsi, les capteurs électrochimiques peuvent être répartis en trois groupes principaux.

I.1.4.1 Les capteurs potentiométriques

L'utilisation de ces capteurs repose sur la détermination de la différence de potentiel qui s'établit entre une électrode de mesure associée à une électrode de référence (électrode dont le potentiel est constant et reproductible quel que soit le milieu dans lequel elle est plongée). Cette différence de potentiel est fonction de l'activité de l'ion (ou des ions) présent dans l'électrolyte où le capteur est plongé. Les conditions opératoires sont dites «potentiométrie à courant nul» si l'on n'impose pas de courant dans le circuit de mesure, ce qui est le cas le plus fréquent ; dans le cas contraire, il s'agit de « potentiométrie à courant imposé ».

I.1.4.2 Les capteurs conductimétriques

Pour la mise en œuvre de ces capteurs, on impose une tension ou un courant alternatif à deux électrodes plongeant dans la cellule de mesure ; l'emploi de courant alternatif permet de limiter les erreurs dues à la polarisation qui résulte des réactions aux électrodes. La mesure, soit de l'intensité du courant, la tension étant imposée, soit de la tension, lorsque l'intensité est imposée, permet de déterminer la résistance ou la conductance du milieu étudié.

I.1.4.3 Les capteurs ampérométriques

Le fonctionnement de ces capteurs fait appel au passage d'un courant dans le circuit de mesure ; pour cela, une différence de potentiel est appliquée entre deux électrodes, généralement une électrode métallique et une électrode de référence ; la concentration de l'espèce étudiée est proportionnelle à l'intensité du courant qui circule entre les deux électrodes. L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité du courant qui traverse une cellule électrochimique dans des conditions déterminées : l'intensité de ce courant est fonction notamment de la concentration des corps électroactifs et du potentiel imposé. Dans des conditions précises, il est possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents à partir de la mesure de l'intensité. Dans la plupart des cas, on effectue une oxydation ou une réduction d'une espèce à une électrode indicatrice, la seconde électrode étant en général une électrode de référence.

Si on applique à l'électrode indicatrice un potentiel E variable par rapport à l'électrode de référence, et que l'on trace la courbe de polarisation $i = f(E)$, la valeur i du palier limite de diffusion est proportionnelle à la concentration du corps oxydé ou réduit à l'électrode indicatrice [5].

Depuis que Faraday, Galvani et autres ont démontré l'existence de processus électrochimiques dans des systèmes biologiques, la recherche actuelle a pour objectif d'aider à mieux comprendre les réactions les plus importantes de la régulation biologique, étant donné que le transfert électronique se réalise de plusieurs manières dans le domaine biologique [6].

I.1.4.4 Les capteurs enzymatiques ampérométriques

Cette technique combine la spécificité de l'enzyme pour un substrat naturel avec les avantages de la détection sélective ampérométrique.

Dans le cas des capteurs enzymatiques ampérométriques, il est absolument nécessaire que l'enzyme immobilisée consomme ou produise une espèce électroactive au cours de la réaction enzymatique. L'intensité du courant enregistré est ainsi directement dépendante de la concentration d'un substrat cible qui est consommé dans l'épaisseur de la couche enzymatique. Une nécessité fondamentale pour le développement des électrodes

enzymatiques ampérométriques est un transfert électronique effectif entre le centre de réaction catalytique et l'électrode [7, 8].

Les biocapteurs ampérométriques peuvent être classés en trois catégories. La première correspond aux biocapteurs dont l'espèce enzymatiquement générée est directement oxydée ou réduite à l'électrode. Pour les biocapteurs de la seconde catégorie, la détection s'effectue à travers l'oxydation ou la réduction d'un médiateur rédox qui interagit avec l'espèce enzymatiquement générée ou qui régénère la forme active du groupe prosthétique de l'enzyme. Ce principe permet, par exemple, d'abaisser le potentiel de détection du substrat. Enfin, pour les biocapteurs appartenant à la troisième catégorie, l'enzyme est directement connectée à l'électrode au moyen de composés conducteurs afin de simplifier le transfert électronique (Figure I.3).

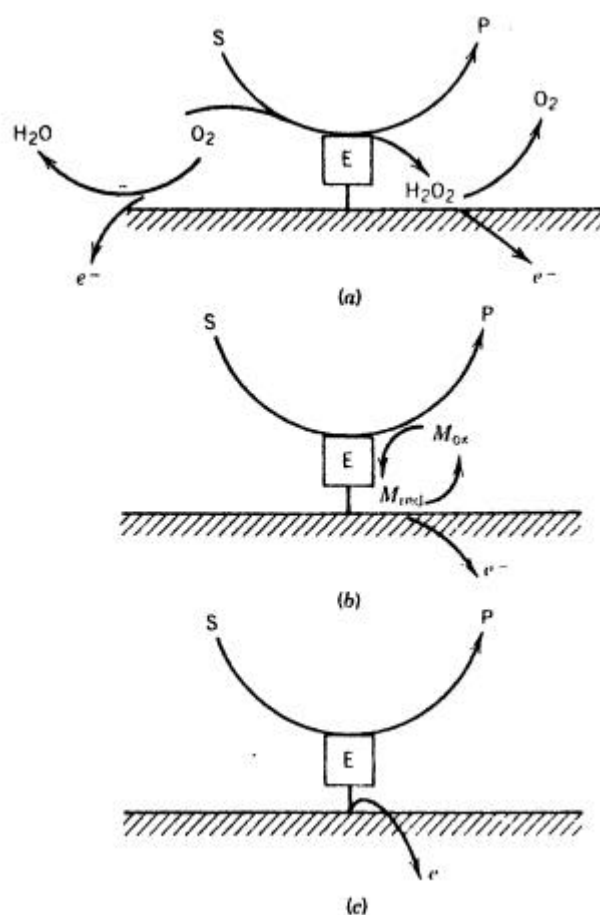


Figure I.3 : Schéma du principe de fonctionnement des trois types de biocapteurs ampérométriques : (a) première génération, (b) deuxième génération, (c) troisième génération. P représente le produit de la réaction électrochimique, S le substrat de la réaction électrochimique, E l'enzyme et Med le médiateur rédox sous sa forme oxydée (ox) ou réduite (red) [9].

I.2 LES ENZYMES

I.2.1 Introduction

La réalisation des capteurs enzymatiques ampérométriques met en jeu des enzymes immobilisées sur des électrodes. Malgré tous les travaux théoriques apparus, la modélisation des réponses est très délicate. En effet, l'activité des enzymes dépend fortement des conditions de température et pH. Dans le cas des enzymes immobilisées, viennent s'ajouter des phénomènes de diffusion des substrats ou des produits à travers le support considéré. L'étude bibliographique se limite donc au rappel des propriétés fondamentales des enzymes et de la cinétique enzymatique d'une enzyme en solution.

I.2.2 Définition des enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes. L'activité de ces enzymes est souvent régulée. D'autre part, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes.

Au cours de ces dernières années, le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et les applications sont multiples en chimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, dans l'industrie agro-alimentaire et dans le secteur biomédical [1].

I.2.3 Classification et nomenclature

On trouve encore, à l'heure actuelle, la dénomination ancienne de certaines enzymes telle que trypsine ou pepsine. Cependant, dans la mesure où l'on s'intéresse moins à la nature qu'à la fonction de l'enzyme, on utilise plutôt la nomenclature suivante :

L'Union Internationale de Biochimie recommande l'utilisation du suffixe « ase » couplé parfois avec le substrat (uréase, phosphatase...), mais généralement avec le type de réaction catalysée (hydrolase, oxydase, isomérase...).

Chaque enzyme porte ainsi un numéro dont le premier chiffre correspond à un certain type de réaction catalysée :

- 1 - Oxydoréductases (qui catalysent des réactions d'oxydoréduction)
- 2 - Transférases (qui catalysent le transfert de groupements fonctionnels)
- 3 - Hydrolases (qui catalysent des réactions d'hydrolyse)
- 4 - Lyases (qui catalysent des réactions d'addition sur une double liaison)
- 5 - Isoméras (qui catalysent des réactions d'isomérisation)
- 6 - Ligases ou synthétases (formation des liaisons avec clivage de l'ATP)

Ainsi la glucose oxydase portant le N° 1.1.3.4 correspond à une oxydoréductase. On l'appelle aussi β -D-glucose oxygène oxydoréductase.

Notre étude concerne les biocapteurs ampérométriques, et des oxydoréductases seront immobilisées au niveau des biocapteurs.

Le nom de l'enzyme ainsi que son numéro dans sa classification ne sont pas toujours suffisants pour caractériser sa spécificité et son pouvoir catalytique. Selon la source dont elle est extraite, l'enzyme possède une séquence d'acides aminés particulière et des propriétés différentes : la glucose oxydase utilisée dans cette étude provient de *Aspergillus niger*.

I.2.4 Structure des enzymes

On a réussi jusqu'à maintenant à identifier plusieurs milliards d'enzymes, un grand nombre d'entre elles ont été cristallisées. Ce sont toutes des protéines. Les unités structurales de base sont donc des acides aminés. Ces acides aminés sont unis par des liaisons peptidiques pour former des chaînes polypeptidiques.



Les groupements R possèdent souvent des fonctions NH_2 ou COOH permettant leur immobilisation par liaisons covalentes sur des supports insolubles.

La spécificité de l'enzyme est souvent attribuée à sa structure tridimensionnelle très élaborée permettant la formation du site actif responsable de la catalyse enzymatique.

I.2.5 Catalyse enzymatique

La catalyse, qu'elle soit chimique ou biologique, repose sur le même principe : elle fait appel à un composé appelé catalyseur pour augmenter la vitesse de réaction sans perturber les fonctions thermodynamiques. Ainsi la position d'équilibre d'une réaction n'est pas modifiée et peut être calculée à partir des données thermodynamiques liées au réactif (appelé substrat en terme biochimique) et au produit de réaction.

La cinétique de réaction, au contraire, dépend d'autres données liées à l'expérience même telles que la composition, la température, la pression du mélange réactionnel. Le catalyseur, d'autre part, ne doit pas être consommé au cours de la transformation : il peut, de ce fait, être séparé du produit de réaction et réutilisé plusieurs fois.

En réalité, le catalyseur a pour fonction d'abaisser l'énergie d'activation nécessaire à la réaction afin d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de donner lieu à la réaction [10] (Figure I.4).

Les enzymes sont des biomolécules très importantes parce que leur pouvoir catalytique et leur spécificité sont souvent très supérieurs à ceux des catalyseurs chimiques. L'activité des enzymes redox comme catalyseurs biologiques dépend, dans certains cas, de leur structure protéique. Une des caractéristiques particulières de l'enzyme est son besoin fréquent de cofacteur. Le cofacteur n'est pas une protéine : il peut être un ion métallique (Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} ...), ou une molécule organique complexe appelée aussi coenzyme tels que le NAD, FAD, CoA, ATP.... Le cofacteur métallique peut aussi se fixer sur une protéine appelée apoenzyme pour donner un complexe actif qui présente une interaction avec l'enzyme. La glucose oxydase possède le cofacteur FAD lié à l'enzyme sous la forme oxydée (FAD) ou réduite (FADH_2) [10].

Le fait que toutes les enzymes soient des protéines leur confère les propriétés physicochimiques de ces macromolécules (solubilité, propriétés osmotiques et de diffusion, échanges ioniques, dénaturation thermique et labilité avec les réactifs chimiques énergiques).

Parmi les protéines, on distingue habituellement les enzymes des protéines de structure dépourvues d'activité catalytique.

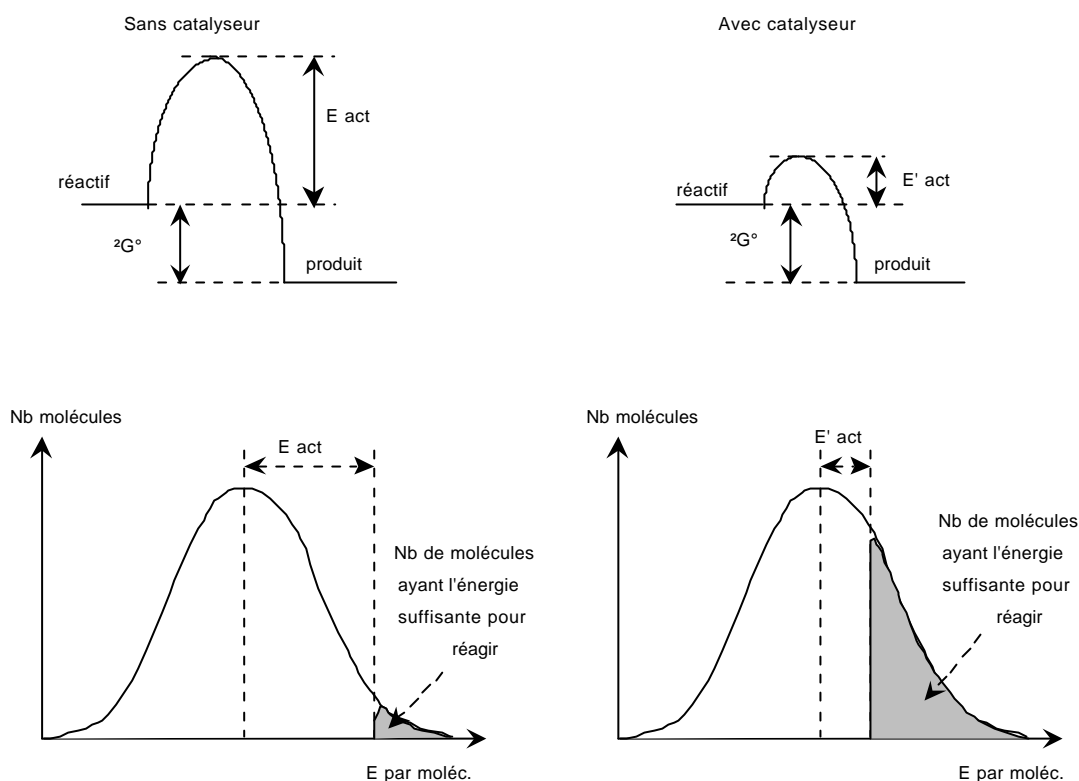


Figure 1.4 : La catalyse est basée sur la réduction de l'énergie d'activation de réaction E_{act} afin d'augmenter le nombre de molécules ayant l'énergie nécessaire ($\geq E_{act}$) pour réagir.

Les enzymes sont des catalyseurs puisqu'elles respectent strictement les lois de la catalyse :

a) l'enzyme ne figure pas quantitativement parmi les produits de la réaction, elle n'est donc pas consommée par celle-ci et chaque molécule d'enzyme peut théoriquement provoquer la transformation d'un nombre illimité de molécules de substrat.

b) elle ne modifie pas la nature de la réaction, ni son équilibre, ni son bilan thermodynamique. La réaction doit donc dans tous les cas être parfaitement possible sans la présence de l'enzyme et celle-ci ne soustrait en rien la matière vivante aux lois thermodynamiques observées dans le monde non vivant,

c) mais l'enzyme modifie la vitesse de la réaction en l'accélérant. Cette accélération est considérable et peut atteindre cent milliards (10^{11}) de fois la vitesse de la réaction spontanée.

Le facteur d'accélération varie d'une enzyme à l'autre et constitue à la fois une caractéristique et une mesure de l'efficacité de celle-ci.

d) La réaction catalysée est spécifique. L'étude du métabolisme montre que pratiquement toutes les réactions des cellules vivantes sont contrôlées par une enzyme particulière spécifique qui en est le siège.

I.2.6 Comparaison avec les catalyseurs chimiques

Points communs

- Les enzymes n'influencent pas l'énergie de réaction, elles ne catalysent donc que les réactions possibles thermodynamiquement.
- Elles ne déplacent pas le point d'équilibre : la nature des produits de la réaction n'est pas changée, seule la vitesse de réaction est augmentée.
- Elles sont récupérables à la fin de la réaction.

Différences

- Les enzymes sont plus actives que les catalyseurs chimiques vis-à-vis des substances naturelles. Elles augmentent généralement les vitesses de réactions au moins un million de fois.
- Elles sont plus sensibles à la dénaturation à cause de leur structure protéique macromoléculaire.
- Elles peuvent posséder une très grande spécificité.
- Elles peuvent donner lieu à des phénomènes de régulation.

I.2.7 Unités d'activité

L'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) et l'IUB (International Union of Biochemistry) recommandent l'adoption d'une unité internationale : U.I.

L'unité internationale U.I. est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole (1 μM) de substrat par minute. L'unité d'activité doit être donnée à partir de mesures de vitesse initiale afin de limiter les phénomènes de dénaturation, d'inhibition ou de

réversibilité, dus aux produits de la réaction. Les conditions de mesure (pH, température....) doivent être précisées bien que la température de 25°C soit généralement adoptée. Généralement, la détermination de l'activité se fait dans les conditions de saturation de l'enzyme par son substrat.

L'unité d'activité spécifique est celle relative à une unité de masse ou une mole d'enzyme. Elle peut être exprimée, par exemple, en micromoles de substrat transformé par minute par milligramme d'enzyme [11].

I.2.8 Fonctionnement et régulation des enzymes *in vivo*

Le fonctionnement des enzymes est intégré. Il tient compte des besoins des cellules et de l'organisme entier. Certaines enzymes fonctionnent indépendamment des autres, par exemple, la catalase détruit l'eau oxygénée dès sa formation. C'est une enzyme de défense, qui intervient pour éviter l'accumulation d'un produit toxique. Ce dernier n'est pas toujours présent et n'est pas transformable en d'autres substances utiles. Il n'y a donc pas de système de régulation du fonctionnement de la catalase [12].

La plupart des enzymes, par contre, font partie des séquences de réactions qu'on appelle voies métaboliques. Ce sont presque toutes des réactions réversibles. Certains stades sont catalysés dans un sens par une enzyme et dans le sens inverse par une autre. Ce sont des étapes de contrôle qui permettent à la cellule de diriger le sens de l'ensemble des réactions de la voie métabolique. Les molécules formées au cours de réactions métaboliques sont appelées métabolites. Le produit de chaque réaction enzymatique sert de substrat pour l'enzyme suivante. Certains métabolites peuvent être transformés en même temps par deux ou trois enzymes différentes : ils sont l'amorce de 2 ou 3 voies et constituent ce qu'on appelle un carrefour métabolique. Une voie métabolique, après un certain nombre d'étapes, peut retourner à son point de départ : il s'agit d'un cycle métabolique. Bien entendu un tel cycle ne peut être alimenté que par fourniture de nouvelles molécules par ses voies d'accès : ce n'est pas la même molécule qui parcourt tout le cycle, sans quoi, ce dernier n'aurait guère d'intérêt.

Bien souvent, les enzymes appartenant à une même voie métabolique sont fixées les unes aux autres, réalisant un complexe multi-enzymatique, de même type que le système de transport des électrons dans la membrane mitochondriale. Ces réactions fonctionnent de façon coordonnée, ce qui suppose l'existence des régulations. Il y a des régulations internes à chaque voie métabolique, des régulations entre voies métaboliques dans une même cellule et

des régulations dépendant de l'état physiologique de l'organisme entier. Cependant, toutes les enzymes d'une voie métabolique n'ont pas besoin d'être régulées, certaines suffisent. Les réactions de contrôle intéressent les enzymes clés de cette voie, celles qui catalysent les réactions non réversibles. La régulation la plus importante concerne l'étape la plus lente d'une voie métabolique, qui contrôle la vitesse de l'ensemble de cette voie [12].

I.2.9 Immobilisation des enzymes

Si l'on considère l'enzyme sous l'aspect théorique, on peut dire que les enzymes au niveau cellulaire se trouvent à l'état très organisé, souvent immobilisées dans des assemblages solides, membranes ou gels. Pour connaître vraiment le mécanisme d'action des enzymes *in vivo*, les expériences devraient être conduites en phase hétérogène [13].

Immobiliser les enzymes dans une matrice synthétique ne revient certes pas à les mettre dans leur environnement naturel mais représente une bonne approche par rapport à l'étude des enzymes en solution, loin de toute condition physiologique [13].

L'immobilisation des enzymes sur des supports synthétiques apporte aussi une stabilité mécanique et une maîtrise plus aisée des paramètres cinétiques (hydrophobicité, matrice chargée imitant la nature polyelectrolyte des membranes naturelles). D'autre part, elle facilite l'étude de la réversibilité vis-à-vis des inhibiteurs puisque l'on peut à tout moment changer de milieu, le support sur lequel l'enzyme est immobilisée [14, 15].

Depuis longtemps, les procédés industriels font appel aux microorganismes pour faire des biotransformations et élaborer des produits d'intérêt commercial. Cependant, la catalyse par les cellules microbiennes est peu efficace en raison de la perte du substrat due au besoin de croissance des microorganismes et de la présence des réactions secondaires gênantes. La possibilité d'extraire des enzymes et de les utiliser pour la conversion du substrat procure des avantages non négligeables quant au rendement et à l'uniformité du produit [16].

Pour compenser les problèmes liés à l'instabilité et au coût d'extraction des enzymes en solution, on cherche à les immobiliser sur des supports insolubles afin de pouvoir les réutiliser après l'opération, et de faciliter leur séparation du produit de réaction obtenu. Par ailleurs, les enzymes immobilisées se prêtent mieux à leur incorporation dans les réacteurs où l'entrée de substrat à un bout permet de récupérer le produit transformé à l'autre bout en flux continu.

Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme. La liaison covalente de l'enzyme à la matrice est généralement la technique d'immobilisation la plus stable. La capacité de la matrice ou la technique de liaison, ainsi que la stabilité mécanique et chimique de la matrice, son coût, la difficulté de l'activation du support sont aussi importants dans le développement d'un système d'enzyme immobilisée. Il faut remarquer qu'il n'existe pas la « meilleure » technique [17].

I.2.9.1 Techniques d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme.

La rétention physique exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme. Elle peut être un réseau, une capsule ou une membrane [18]. La liaison chimique entre l'enzyme et le support se réalise soit par simple interaction ionique (adsorption), soit par création d'une vraie liaison covalente (fixation covalente sur support activé et coréticulation). L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée [19].

Les principales méthodes d'immobilisation sont :

1- L'adsorption physique : elle se réalise sur des supports inertes (verres, cellulose, charbon actif). La fixation se fait par interaction des groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (liaison hydrogène, forces de Van der Waals, interaction ionique...). Cette adsorption exige des conditions de pH et de force ionique très précises. La moindre variation d'un de ces paramètres provoque une désorption, inconvénient majeur de cette technique.

2- La fixation sur échangeur d'ions : les enzymes sont porteuses de charges. Elles peuvent donc se lier avec des échangeurs d'ions par liaison électrostatique. Il existe différents types d'échangeurs :

- des échangeurs cationiques : Carboxyméthyl Cellulose
- des échangeurs anioniques : Diéthylaminoéthyl Cellulose

Cette fixation est réversible, les conditions opératoires, principalement pH et force ionique, ne doivent pas varier sous peine de désorption.

3- L'inclusion dans un gel: l'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat.

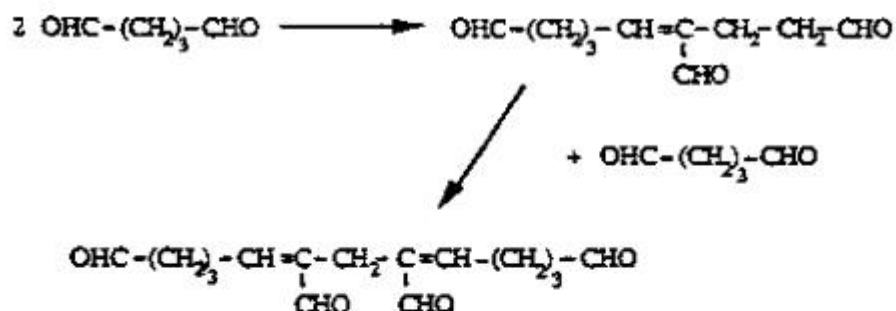
4- La liaison covalente avec le support: une liaison est établie entre un groupement fonctionnel de l'enzyme et un groupement fonctionnel du support préalablement activé. Il existe des membranes commercialisées déjà préactivées.

5- La réticulation et la co-réticulation: le procédé consiste à associer l'enzyme et une protéine de charge à l'aide d'un agent bi ou multifonctionnel. Le complexe formé possède une masse moléculaire élevée et est insoluble. Le plus souvent, la protéine de charge est l'albumine du sérum bovin (BSA) et l'agent réticulant le glutaraldéhyde ou sa forme polymérisée [20].

La forme polymérisée résulte d'une condensation aldolique avec perte d'eau. Cet agent bifonctionnel possède à ses extrémités deux groupements aldéhyde capables de réagir avec les fonctions amine des protéines. Le schéma réactionnel de la figure I.5 présente les deux types de réactions. On opère en immergeant la surface sensible de l'électrode ou un support (membrane nylon ou Pall, membrane hydrophobe) dans le mélange réactif. On peut réaliser aussi la pulvérisation de l'agent réticulant, ce qui permet d'obtenir des membranes très minces [21].

Toutes les techniques d'immobilisation d'enzymes sont représentées dans la figure I.6.

Aldolisation:



Réactions de réticulation:

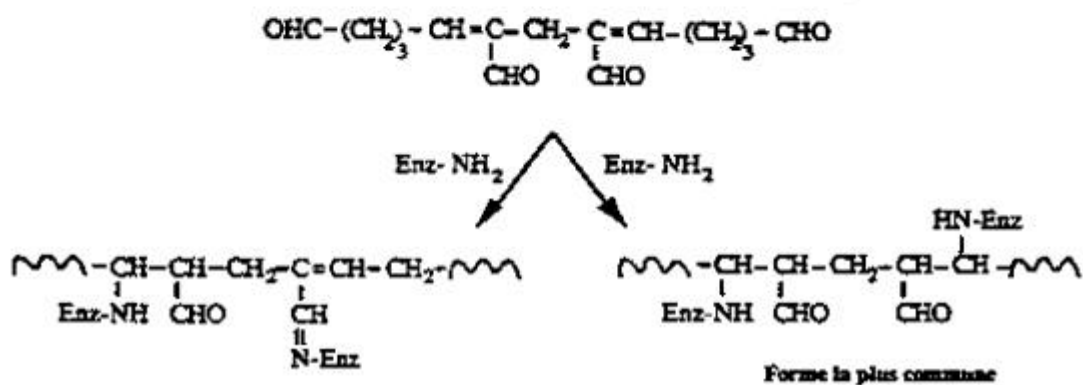


Figure I.5 : Réactions d'aldolisation et de réticulation avec le glutaraldéhyde. [20]

I.2.9.2 Propriétés des enzymes immobilisées

L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques et cinétiques.

Propriétés physico-chimiques : une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support. Ainsi, les enzymes fixées par liaison sulfonamide sont moins stables que celles fixées par liaison azo.

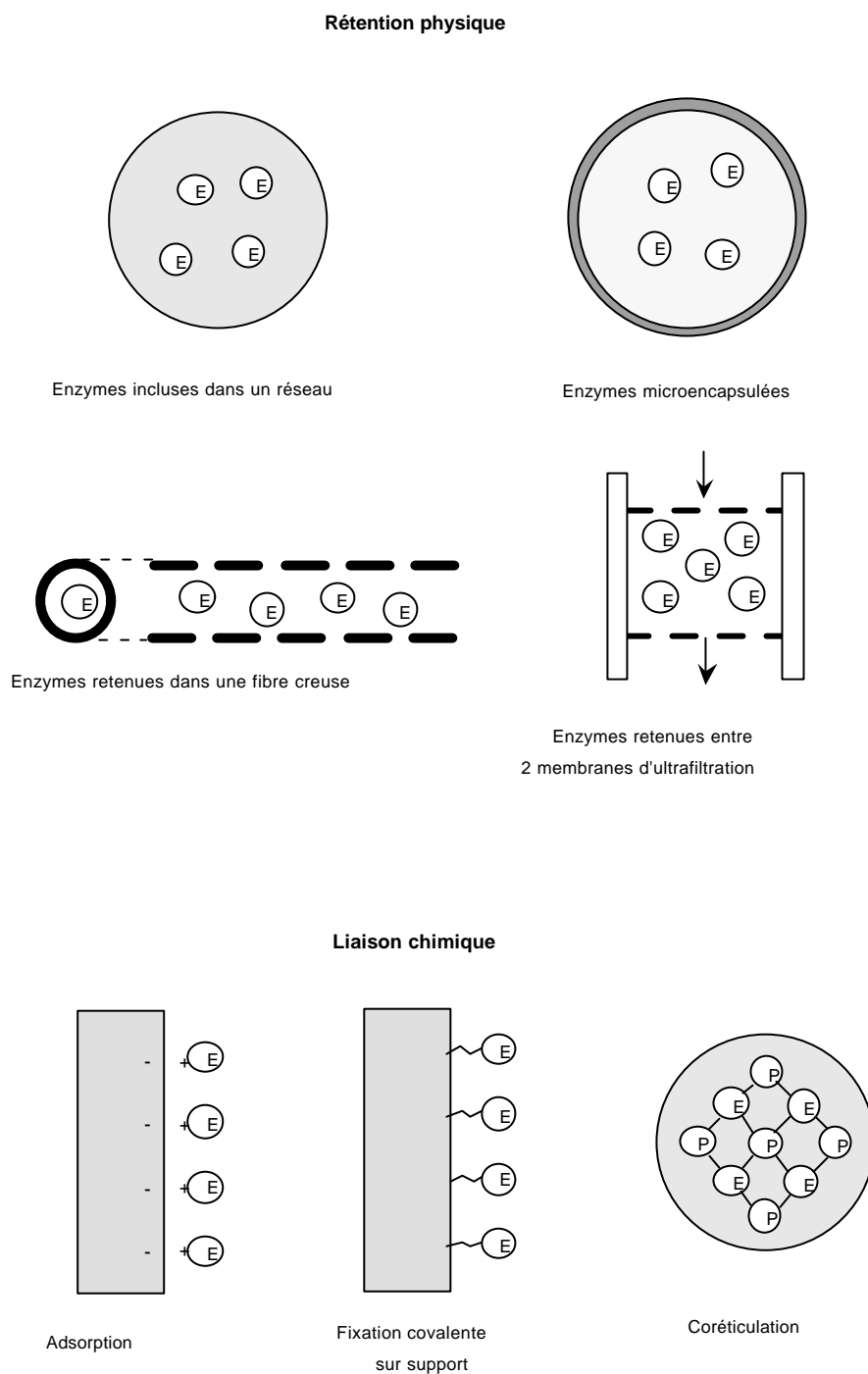


Figure I.6 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes.

Propriétés cinétiques : l'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut

ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale V_M et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.

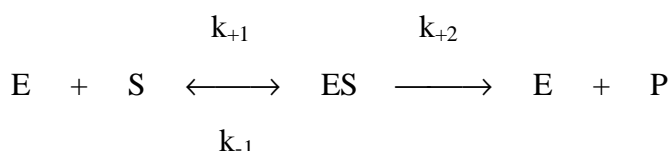
I.2.10 Cinétique enzymatique

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

La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme à la concentration habituelle de son substrat dans la cellule. Pour la plupart des enzymes, K_m est approximativement égale à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Quand elle est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme est faible. Quand elle est basse, cela veut dire que l'affinité du substrat pour l'enzyme est forte. Pour les concentrations en substrat inférieures ou égales à K_m , la vitesse de la réaction dépend de la vitesse d'association entre enzyme et substrat.

I.2.10.1 Equation de Michaelis-Menten

La réaction enzymatique peut être représentée sous la forme simplifiée suivante :



E : enzyme

S : substrat

P : produit

ES : complexe enzyme-substrat

La vitesse v de formation du produit est :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2} [ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1} [E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

Si $[E]_0$ représente la concentration initiale en enzyme, on a :

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1} \{ [E]_0 - [ES] \} [S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

D'autre part,

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES]$$

Avec les conditions initiales ($[S]_{t=0} = S_0$, $[ES]_{t=0} = 0$), la résolution par ordinateur de ces équations permet de connaître l'évolution de la concentration des différentes espèces participant à la réaction.

On peut voir sur la figure I.7 que la concentration de ES se stabilise au bout d'un temps très court, ce qui permet de supposer l'établissement rapide d'un état quasi stationnaire. Cette hypothèse est valable seulement si $[E_0] \ll [S_0]$.

Avec l'approximation de l'état quasi stationnaire de Briggs et Haldane, on a :

$$[ES] = \text{constante, soit } \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

On en déduit :

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2}}$$

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

$$v = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{A})$$

avec :

$$V_M = k_{+2}[E]_0$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

où

K_M est la constante de Michaelis de l'enzyme

V_M est la vitesse maximale de la réaction enzymatique

Deux cas limites se présentent :

$$\text{Si } [S] \ll K_M \Rightarrow v = \frac{k_{+2}[E]_0}{K_M} [S]$$

La cinétique de réaction est d'ordre 1 par rapport à S. Le rapport k_{+2}/K_M est fonction des autres constantes de vitesse :

$$k_{+2}/K_M = \frac{k_{+2}k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}}$$

$$\text{Si } [S] \gg K_M \Rightarrow v = k_{+2}[E]_0$$

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

La représentation graphique de l'équation (A) permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (figure I.8).

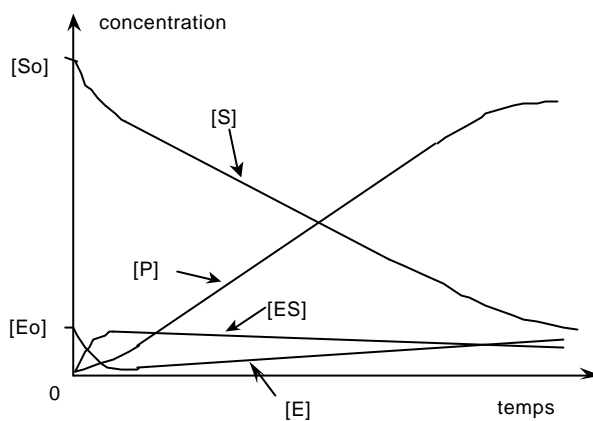


Figure I.7 : Evolution de la concentration des espèces réagissantes pour $k_{+1} \gg k_{-1} \gg k_{+2}$.

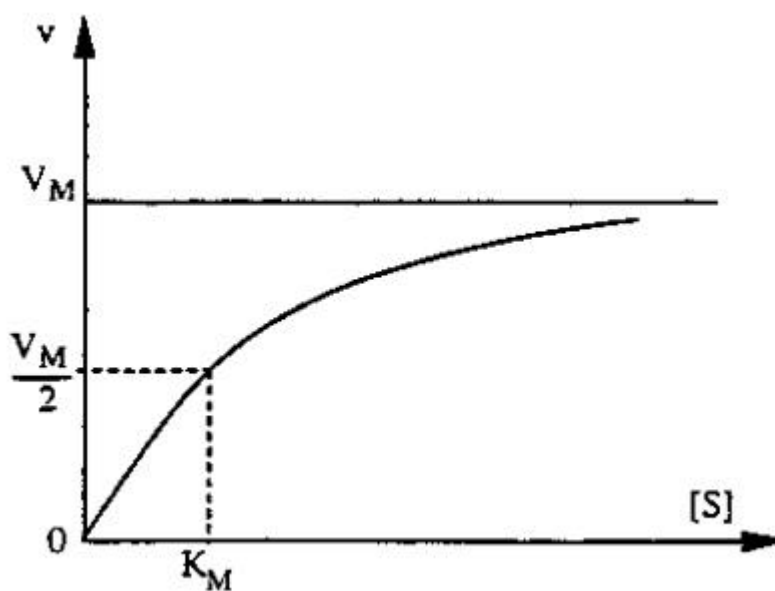


Figure I.8 : Représentation graphique d'une cinétique michaelienne. Evolution de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

La détermination graphique directe de V_M et K_M n'est pas toujours très précise, et d'autres méthodes ont été proposées. Elles reposent sur une linéarisation de l'équation (A) de Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient :

$$1/v = K_M/V_M \cdot 1/[S] + 1/V_M$$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. La représentation graphique $1/v = f(1/[S])$ est une droite de pente K_M/V_M (figure I.9). Cette méthode sera utilisée dans le Chapitre II pour le calcul de V_M et K_M .

Une autre représentation a été proposée par Eadie-Hosftee. En écrivant l'équation (A) sous la forme suivante :

$$v K_M + v [S] = V_M [S]$$

on obtient :

$$v/[S] = V_M/K_M - v/K_M$$

La représentation graphique $v/[S] = f(v)$ est une droite de pente $-1/K_M$ (figure I.9)

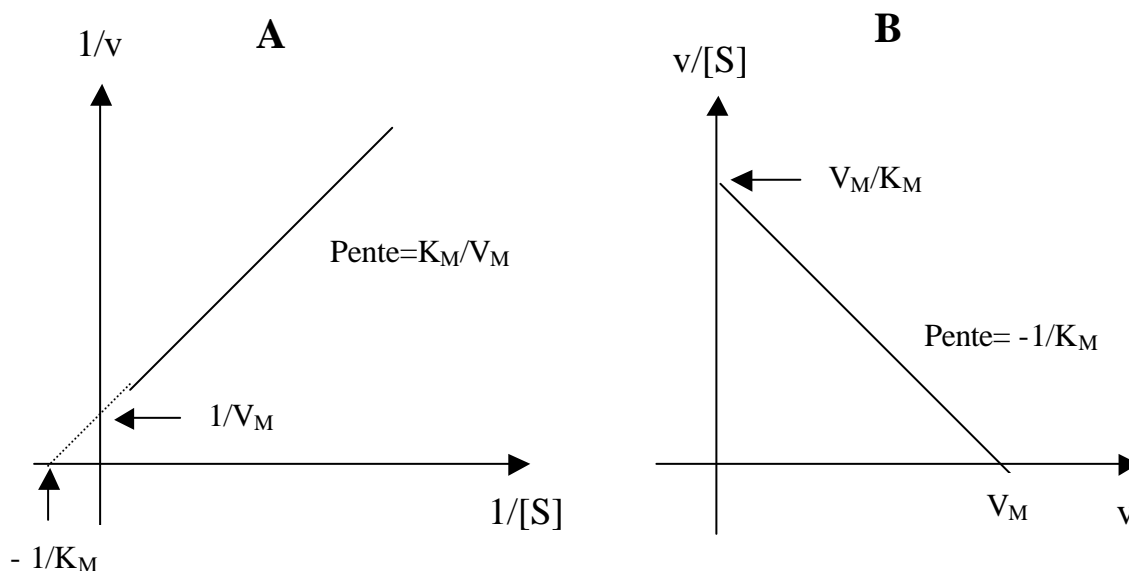


Figure I.9 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten

I.2.10.2 Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique

a Effet de la température

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

L'activation par la température d'une réaction enzymatique s'accompagne toujours du phénomène de dénaturation thermique irréversible. Il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Il en résulte l'existence d'une température critique T_c , au-delà de laquelle il se produit le phénomène de dénaturation.

D'autre part, la résistance de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique dépend d'autres paramètres tels que le pH ou la force ionique et de la présence de ligands. La fixation du substrat protège généralement l'enzyme. Les enzymes de faible masse moléculaire portant une seule chaîne polypeptidique et des liaisons disulfure sont plus sensibles à la dénaturation que les enzymes à grande masse moléculaire. En général, elles sont plus stables dans l'extrait brut en présence d'autres protéines ou immobilisées à l'état insoluble.

La dénaturation est souvent très sensible dès 50°C à 60°C. En général, il est conseillé de travailler environ 10°C en dessous du seuil de dénaturation.

b Effet du pH

La plupart des enzymes sont actives dans un domaine limité de pH. On peut attribuer ce fait à la stabilité de la protéine enzymatique dans une certaine zone de pH. Le pH optimal est fonction du site actif, de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'effet du pH sur l'activité enzymatique est lié souvent à l'état d'ionisation, soit du substrat (dont une forme seulement est catalysée), soit d'un certain nombre de groupements dissociables de l'enzyme nécessaires pour maintenir la conformation du site actif et participant à l'élaboration du complexe ES. Les différents groupements dissociables pouvant être présents au niveau du site actif sont : α -COOH carboxyle ou α -NH₂ amine en bout de chaîne, NH imidazole de

l'histidine, NH guanidine de l'arginine, SH sulfhydryl de la cystéine et OH phénolique de la tyrosine. La valeur des pK_a de ces groupements dépend beaucoup de leur environnement polaire ou non polaire.

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

c Effet de la force ionique

L'influence de la force ionique sur la vitesse d'une réaction enzymatique provient à la fois de la nature des sels choisis pour effectuer des solutions tampons et de la modification de la force ionique due à leur présence. Pour différencier ces deux effets, on utilise au moins deux tampons différents. Une même enzyme peut avoir une activité plus grande en milieu tampon citrate qu'en milieu tampon acétate au même pH. La différence vient du fait que le citrate chélate les ions métalliques présents qui pourraient inhiber l'enzyme.

La présence des sels peut aussi affecter la vitesse d'une réaction enzymatique, soit par déplacement de l'équilibre de formation du complexe activé, soit par leur combinaison avec les réactants. Pour obtenir des résultats reproductibles, la force ionique du système ne doit pas varier de façon appréciable.

I.3 UTILISATION DES FILMS DE POLYMERES POUR L'IMMOBILISATION D'ENZYMES

I.3.1 Introduction

L'utilisation des films électropolymérisés appliqués à l'immobilisation d'enzymes s'est énormément développée dans les dernières années et a fait l'objet de nombreuses revues [22-26]. La polymérisation électrochimique est un moyen simple et rapide pour l'immobilisation d'enzymes à la surface d'une électrode. L'électropolymérisation est conduite à partir d'une solution contenant les monomères et l'enzyme et permet le dépôt d'un film enzymatique mince à la surface de l'électrode. La solution est de préférence aqueuse et à pH neutre pour préserver le composant biologique incorporé dans le polymère au cours de son immobilisation.

L'électropolymérisation peut être contrôlée par le potentiel appliqué à l'électrode, ce qui permet de maîtriser l'épaisseur et la quantité d'enzyme greffée sur la surface active de l'électrode. Ces propriétés peuvent être utilisées aussi dans la construction de micro-électrodes enzymatiques.

Cette technique a été utilisée pour la fabrication de structures multicouches où l'on peut incorporer, soit plus d'une enzyme permettant le dosage simultané de plusieurs composés, soit une enzyme dans une multicouche de copolymère.

L'étude du poly(pyrrole) et ses composés dérivés utilisés pour immobiliser la glucose oxydase (GOD) a fait l'objet du plus grand nombre de travaux en raison de la facilité de mise en œuvre du polymère. La GOD est une enzyme très solide et par conséquent fournit un modèle d'étude très intéressant.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux films de poly(éthylènedioxythiophène) (PEDT) comme matrice polymère pour l'incorporation d'enzymes à la surface des électrodes. Il a été signalé en 1992 comme un nouveau polymère conducteur par Heywang et Jonas [27] qui ont comparé les potentialités du PEDT à celles du polypyrrole.

I.3.2 Immobilisation des enzymes dans des films polymères électrogénérés

Les principaux avantages de la polymérisation d'enzymes dans des films conducteurs sont la facilité de la procédure et le contrôle de la distribution spatiale de l'enzyme immobilisée [22]. Cette méthode a été utilisée pour la fabrication de dispositifs miniaturisés et microélectrodes [28, 8].

En général, l'électropolymérisation consiste en l'application d'un potentiel approprié à une électrode plongée dans une solution qui contient un monomère polymérisable et l'enzyme. Le pyrrole et ses dérivés sont souvent choisis à cause de la stabilité des films de polypyrrole à température ambiante et de leur préparation possible à partir de solutions aqueuses. La plupart de ces études ont été faites en utilisant l'enzyme rédox glucose oxydase (GOD) avec l'oxygène comme accepteur d'électrons. Le peroxyde d'hydrogène généré dans la réaction est déterminé de façon ampérométrique en mesurant le courant induit par l'oxydation électrochimique dans l'interface électrode-polymère.

Il est important de remarquer que la cinétique enzymatique dans le film polymère est probablement différente de celle des solutions homogènes. Pour comprendre ce processus, il

faut tenir compte des effets de la diffusion du substrat et du produit, ainsi que de la cinétique enzymatique. Cette différenciation entre cinétique des enzymes en solution et immobilisées permet de comprendre les résultats expérimentaux. En effet, il est probable que l'immobilisation de l'enzyme réduise l'activité molaire (turnover) de l'enzyme et augmente le K_M . Il est important aussi de considérer que la concentration de substrat dans le film peut être différente de sa concentration en solution. La figure I.10 décrit le processus physico-chimique de la conversion de substrat en produit à l'intérieur du film polymère. Le transport de masse du substrat et du produit dans les environs de l'interface polymère - solution, la partition des espèces dans l'interface polymère - solution, la diffusion des espèces dans le film et la réaction électrochimique produite à la surface de l'électrode sont pris en compte. Les effets de migration des espèces chargées sont habituellement négligés.

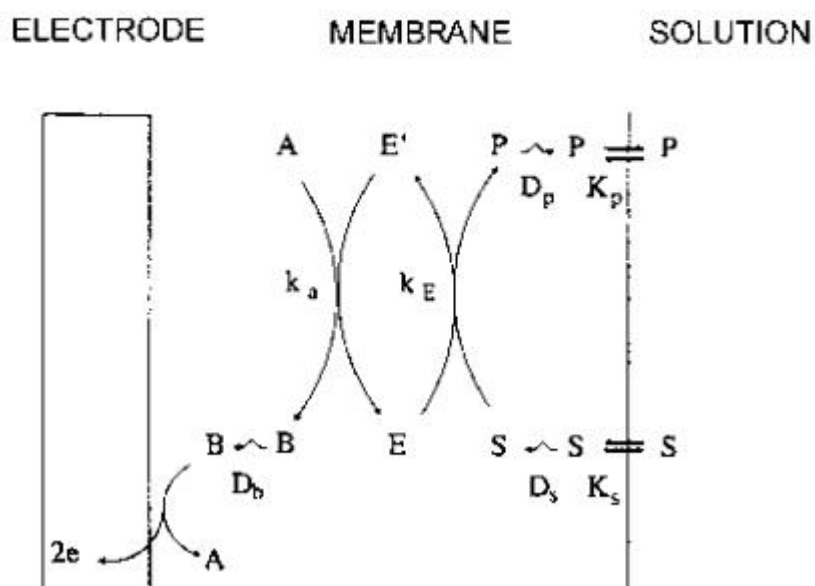


Figure I.10 : Schéma de la cinétique générale d'une enzyme immobilisée. S et P représentent le substrat et le produit de la réaction. A/B et E/E' représentent les couples redox du médiateur et de l'enzyme. k_E et k_a décrivent la cinétique enzymatique de la réaction enzyme/substrat et enzyme/médiateur. K_x et D_x représentent les coefficients de partition et de diffusion des espèces dans le film [23].

Néanmoins, l'intérêt principal de l'utilisation d'un polymère conducteur est de chercher, si possible, la connexion directe de l'enzyme à l'électrode.

S'il existe la possibilité d'un transfert électronique direct entre le polymère conducteur et l'enzyme, ce processus est généralement peu efficace. L'un des problèmes rencontrés au cours du test de l'oxydation électrochimique directe de l'enzyme par le polymère reste la fixation de très petites quantités de molécules de médiateurs, tel que l'oxygène, pouvant être fixées dans le polymère au cours de la polymérisation électrochimique. Ainsi, l'exclusion de l'oxygène du film polymère est essentielle pour assurer effectivement l'oxydation électrochimique directe de l'enzyme par l'intermédiaire du polymère [23]. Cependant, sous certaines conditions, la connexion électrique directe de la glucose oxydase avec l'électrode a pu être réalisée [29, 30]. La GOD est immobilisée par adsorption à l'intérieur des pores d'une membrane où le film s'était formé précédemment. Les auteurs ont mis en évidence des interactions électrostatiques entre l'enzyme et le polymère. Le biocapteur répond alors à des ajouts de glucose en présence et en absence d'oxygène. Les résultats ont été obtenus à un potentiel de travail de 0,35 V *vs* Ag/AgCl. Cette connexion permet alors la régénération de l'enzyme en absence d'oxygène. En d'autres termes, le film est capable de réoxyder à ce potentiel de travail la forme réduite de la GOD (FADH₂).

En outre, différents travaux [22, 31] ont démontré, dans le cas où la GOD est immobilisée dans un film de poly(pyrrole), que le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction enzymatique est oxydé à la surface de l'électrode de platine plutôt que sur le polymère conducteur. En effet, dans des conditions d'apport de substrat identiques, la variation de la réponse du capteur en fonction de l'épaisseur du film passe par un maximum. Dans un premier temps, l'augmentation de l'épaisseur entraîne une augmentation de la réponse ampérométrique en raison de la présence d'une quantité plus importante d'enzyme située près de la surface de platine de l'électrode. Puis, pour des films plus épais, le peroxyde d'hydrogène produit à la surface diffuse plus lentement à travers le film jusqu'à l'électrode. La réponse ampérométrique est en conséquence plus faible. Ces résultats expérimentaux montrent l'inefficacité du transfert direct d'électron entre l'enzyme et le polymère. En fait, la réaction du polypyrrole avec H₂O₂ entraîne la destruction de la conductivité du polymère [32].

La formation de H₂O₂ dans le mécanisme pour la détection de l'activité des enzymes oxydases dans les film polymères a d'importantes conséquences analytiques si on envisage une utilisation du biocapteur dans des situations analytiques réelles (par exemple les fluides biologiques). La détection du peroxyde d'hydrogène, à un potentiel de 0,65 V ou plus, réduit la sélectivité par la présence de composés pouvant modifier la réponse du capteur. La réduction de l'influence de ces interférents représente donc un problème majeur à résoudre [23].

En plus de la glucose oxydase, le polypyrrole a été employé pour l'immobilisation des déshydrogénases : alcool déshydrogénase, glucose déshydrogénase et lactate déshydrogénase. Ces enzymes ont besoin d'un cofacteur soluble pour fonctionner, la nicotinamide adénine dinucléotide, qui peut exister dans sa forme oxydé (NAD^+) ou dans sa forme réduite (NADH). La connexion électrique directe à l'électrode est difficile, la présence d'un médiateur piégé dans le film permet de faciliter la réoxydation du cofacteur. Comme exemples de médiateur nous pouvons citer : le ferricyanure, le naphtoquinonesulfonate et le chlorure de rhodium pentaméthylcyclopentadiényle.

En principe, il existe deux méthodes différentes pour l'incorporation d'une enzyme dans un film polymère. La première et la plus largement utilisée consiste à emprisonner l'enzyme à l'intérieur du réseau de polymère formé pendant l'électropolymérisation. La deuxième se réalise en deux étapes : la formation d'un polymère fonctionnalisé à la surface de l'électrode suivie d'une liaison covalente pour greffer l'enzyme au polymère [33] (Figure I.11).

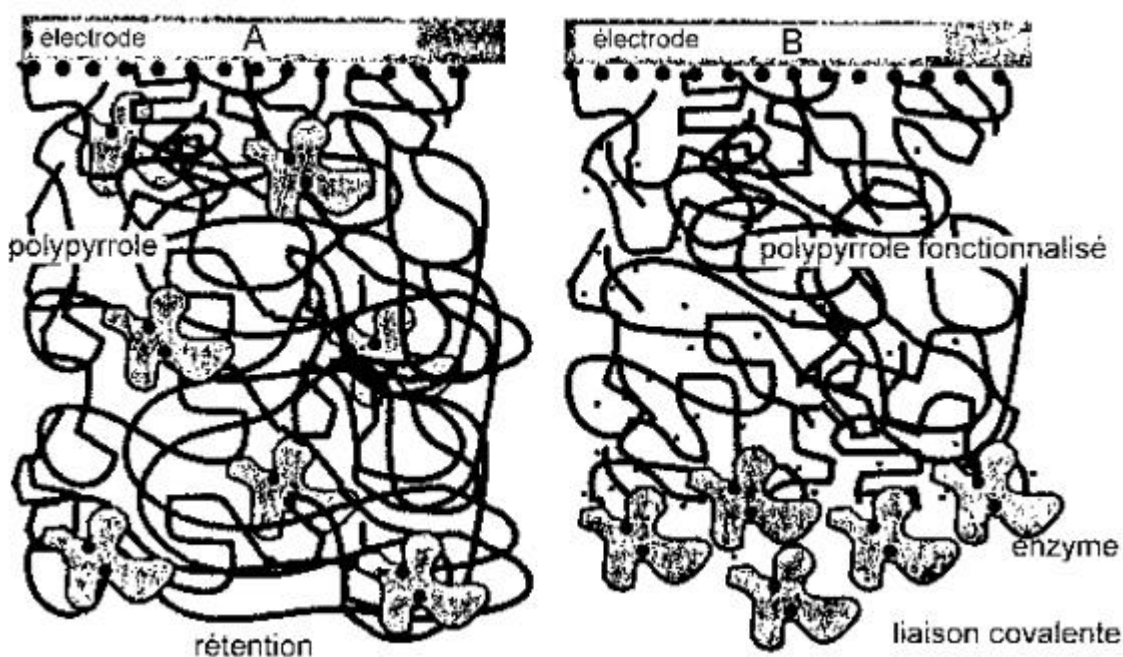


Figure I.11 : Schéma de représentation de la distribution d'une enzyme dans un film électrogénéré. (A) représente la rétention de l'enzyme pendant le processus de formation du polymère (séquence en une étape). (B) représente l'enzyme greffée par liaison covalente au polymère conducteur fonctionnalisé (séquence en deux étapes) [33].

I.3.3 Polymères conducteurs

Parmi les polymères conducteurs utilisés pour l'immobilisation des enzymes nous pouvons citer le poly(pyrrole) et ses dérivés [31, 34-43], la poly(aniline) [44-49] et le poly(thiophène) [50, 51]. Ils ont une structure qui leur permet de passer de l'état oxydé à l'état réduit suite à l'application d'un potentiel électrique [52]. Ils peuvent aussi servir à la rétention de l'enzyme. La figure I.12 montre la structure chimique des polymères conducteurs les plus utilisés.

L'interaction entre les protéines, principalement chargées de façon négative à pH neutre et les charges positives délocalisées tout au long de la chaîne de polymère induit des changements dans la capacitance du matériau. En conséquence, une bonne connaissance des mécanismes de fonctionnement des polymères conducteurs est nécessaire pour bien maîtriser

la cinétique des réactions des enzymes immobilisées sur ces supports et certains paramètres, tels que la sensibilité, la sélectivité et la limite de détection [52], ainsi que la nature précise du transfert électronique entre l'électrode et le site actif de l'enzyme [23].

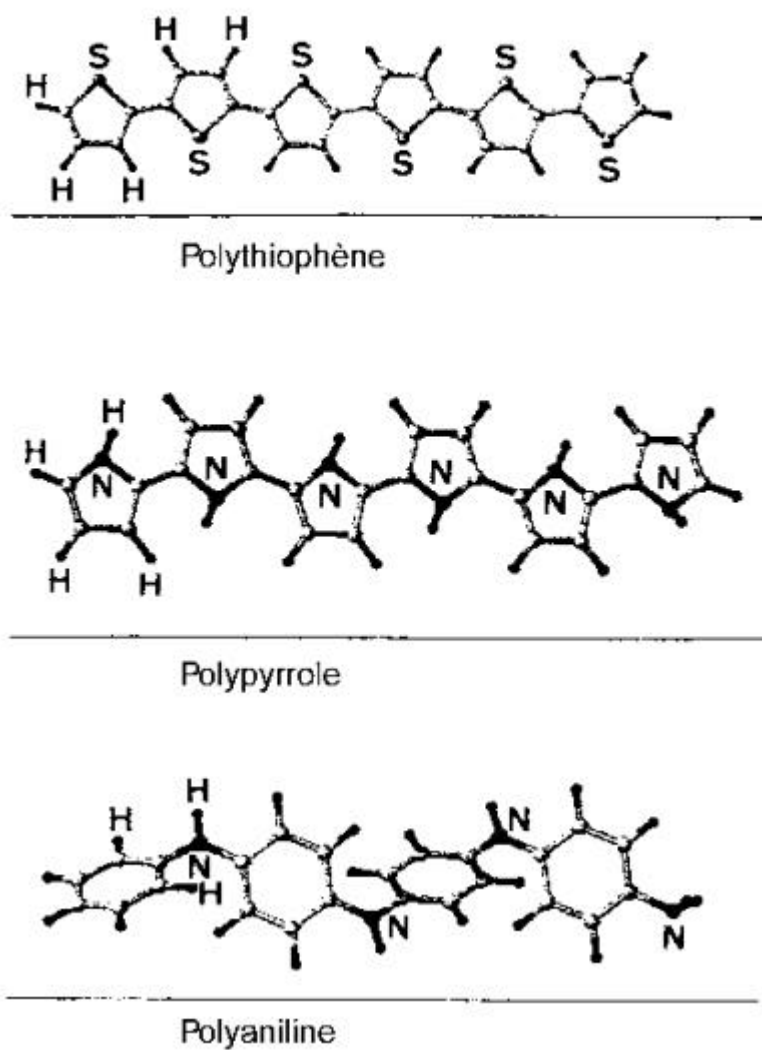


Figure I.12 : Structure chimique des polymères conducteurs [52].

Le polypyrrole et ses composés dérivés ont été très largement appliqués à l'immobilisation d'enzymes. Le polypyrrole est un polymère conducteur électronique obtenu par électro-oxydation à un potentiel supérieur à 0,6 V/ECS du monomère pyrrole. Le schéma du principe de cette électropolymérisation est donné sur la figure I.13. L'oxydation d'un motif pyrrole conduit à la formation d'un cation qui, par réaction avec un autre radical ou un monomère, donne le dimère correspondant après la perte de deux protons. Des réactions d'oxydation et de couplage du même type conduisent entre oligomères à la formation d'un polymère cationique insoluble à la surface de l'électrode correspondant à la forme oxydée du polypyrrole. Celui-ci peut être facilement réduit à un potentiel de $-0,2$ V/ECS pour donner la forme neutre isolante.

L'utilisation du polypyrrole a été rapporté pour la première fois en 1986 dans l'élaboration d'un biocapteur à glucose [53].

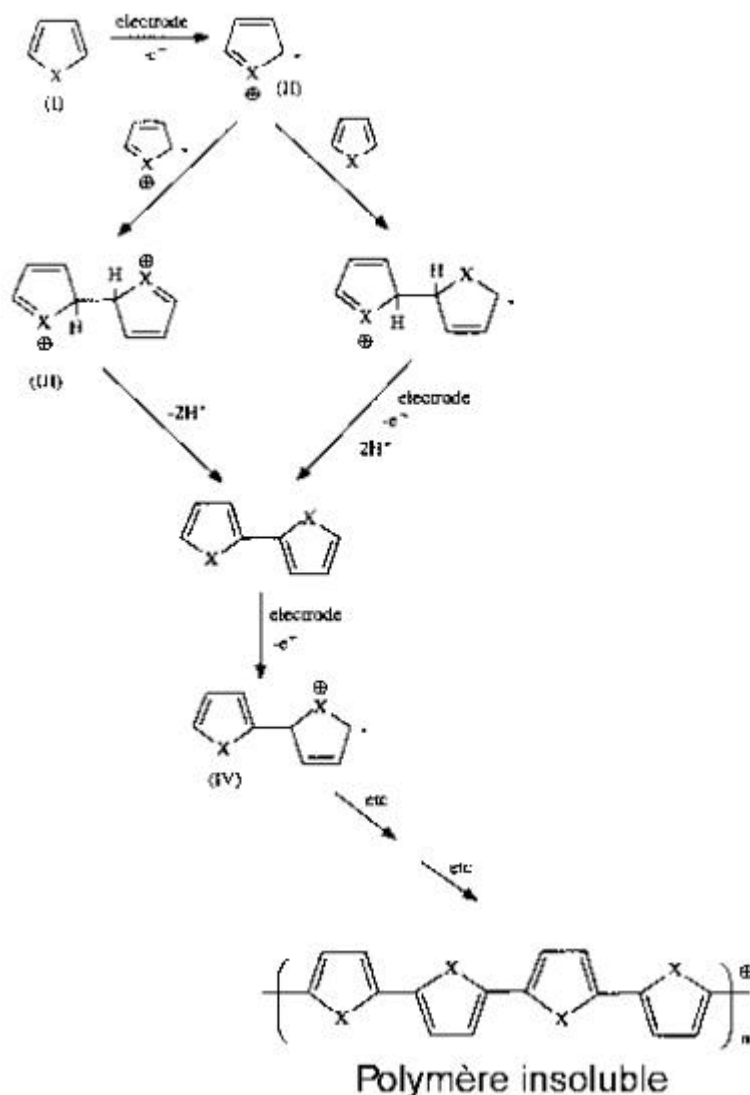


Figure I.13 : Mécanisme de l'électropolymérisation du pyrrole [23].

Le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT), composé de la famille des polythiophènes, est un polymère conducteur relativement nouveau présentant des propriétés très intéressantes. Des études réalisées [54] démontrent qu'il possède une lacune de conductivité faible, une mobilité de charge et une stabilité élevées et de très bonnes propriétés du film formé. Le monomère, le 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT) est un produit commercial, Baytron, qui a été récemment mis sur le marché par la Société Bayer AG. La figure I.14 et la figure I.15

montrent respectivement la formation du polymère et le mécanisme de modification de la structure du polymère.

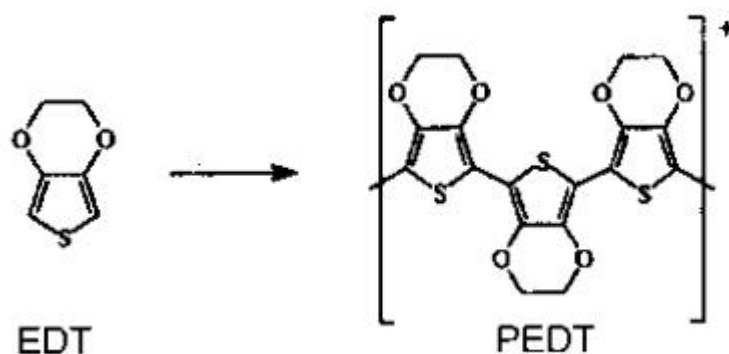


Figure I.14 : Schéma global de l'électropolymérisation du PEDT [55].

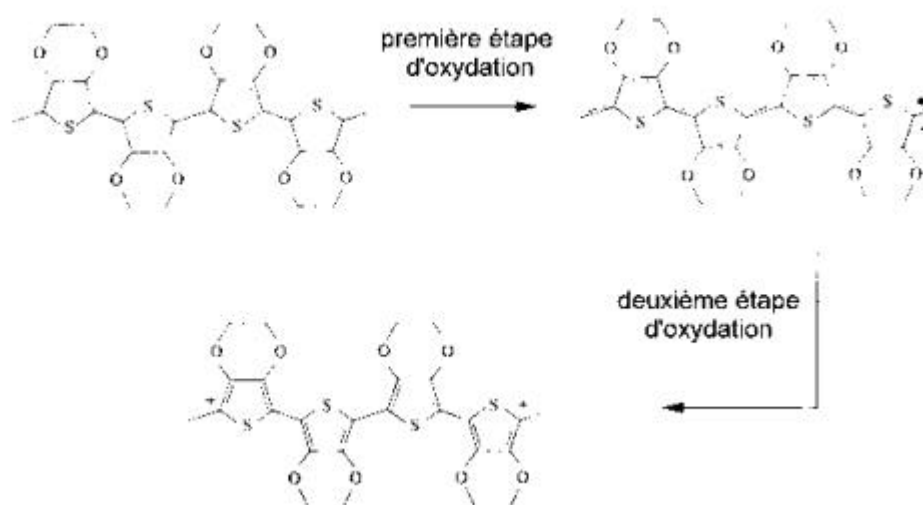


Figure I.15 : Mécanisme proposé de la modification de la structure du PEDT au cours de la polymérisation électrochimique [56].

Le film homogène de PEDT se fixe à la surface de l'électrode au travers de la polymérisation électrochimique du monomère 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT) à des conditions modérées de pH et de température. La formation du film se fait en milieu aqueux et éventuellement, on

peut rajouter un polymère hydrophile soluble du type polyvinylpyrrolidone (PVP) ou polyéthylène glycol (PEG) dans l'eau, à la solution d'électropolymérisation pour augmenter l'hydrophilie du polymère déposé. L'oxydation-réduction dépend du potentiel appliqué qui contrôle la formation des charges positives dans la structure du polymère. Pour le PEDT, il a été démontré que des polyanions comme les oligonucléotides peuvent être retenus efficacement dans le réseau du polymère en travaillant sous faible force ionique [57]. Les films obtenus sont bleus lorsqu'ils sont fins et noirs lorsqu'ils sont plus épais. Ils adhèrent aux supports sur lesquels ils sont électropolymérisés.

Si on compare le polyacétylène avec le polypyrrole ou le polythiophène, tous chargés positivement, on peut supposer que la grande stabilité des deux derniers polymères est due aux effets de stabilisation par les charges positives de l'azote ou du soufre [27]. Toutefois, le polyacétylène reste parmi l'un des meilleurs conducteurs électriques.

Les polymères conducteurs électroniques sont pour la plupart *instables dans le temps*. Leur instabilité thermiquement activée se traduit par une diminution importante de leur conductivité électrique au cours du temps. L'utilisation d'additifs ainsi que le choix judicieux des anions dopants d'une part, de matériaux barrières à l'oxygène d'autre part, permet de limiter en partie ces phénomènes. Le PEDT conserve 98 % de sa conductivité initiale, le polypyrrole (PPY) 75 %, et la polyaniline (PANI) 50 % après avoir suivi les mêmes tests de vieillissement à 70°C pendant 1300 heures [58].

Il existe des essais qui démontrent que PEDT est considérablement plus stable que le polypyrrole vis-à-vis de l'hydrolyse, la lumière et la température [59]. La voltampérométrie cyclique montre que les polyéthylènedioxythiophènes peuvent être étudiés dans un milieu aqueux plus longtemps que les polypyrroles sous des conditions comparables de préparation. L'eau détruit le polypyrrole par attaque nucléophile [27].

La stabilité dans le temps de la matrice active du polymère est un facteur clé pour aboutir à la fabrication des biocapteurs à grande échelle. Yamato et coll. [50] ont évalué la stabilité du polypyrrole et poly(3,4-éthylènedioxythiophène) en présence de poly(styrène sulfonate). Leurs travaux expérimentaux montrent que le PEDT - PSS constitue une excellente matrice dans la conception des biocapteurs.

En général, la *faible solubilité des monomères* rend difficile l'électropolymérisation des polythiophènes en milieu aqueux. Sakmeche et coll. [60] et Lima et coll. [61] ont utilisé la capacité de molécules tensioactives à augmenter la solubilité des monomères thiophène dans l'eau.

Plus récemment, Li et coll. [62] ont démontré, en utilisant 2-aminoéthylferrocénylméthyléther comme modèle, que les composés aminés peuvent être facilement fixés par liaison covalente à un polymère polyalkylthiophène préalablement modifié par un groupe 1,2 diol. Dans une première étape, le polymère modifié est électropolymérisé à la surface d'une électrode de platine, et après dans une deuxième étape, le composé aminé est greffé par activation avec le bromure de cyanogène (Figure I.16). La caractérisation électrochimique et les études par infra-rouge à transformée de Fourier (IR-TF) du polymère modifié confirment les potentialités de cette nouvelle approche quant à l'immobilisation de biomolécules et à l'élaboration de bioélectrodes.

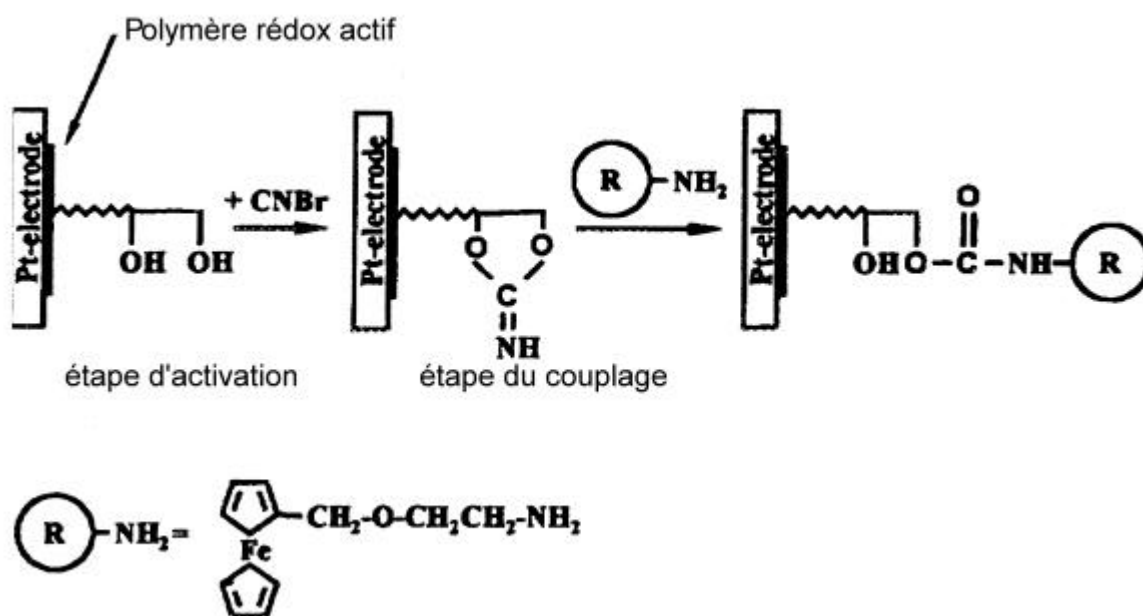


Figure I.16 : Fixation covalente d'un composé aminé à un dérivé polythiophène. ($R-NH_2$) représente le 2-aminoéthylferrocénylméthyléther [62].

I.3.4 Polymères non conducteurs

Du fait que la conductivité du polypyrrole est affectée par la présence du peroxyde d'hydrogène produit pendant la réaction enzymatique [32], les travaux de recherche s'orientent aussi vers l'utilisation de polymères électrogénérés non conducteurs [23]. Etant donné que ces polymères ne sont pas électroactifs, ils sont utilisés seulement comme support des biomolécules. Le caractère intéressant de ces composés est la perméabilité sélective qui pourrait être exploitée dans la réduction des interférences [63]. Par exemple, Malitesta et coll. [64] ont utilisé le poly(1,2-diaminobenzène) afin de réduire des interférences électrochimiques dans la détection spécifique du glucose.

Pourtant la bibliographie concernant l'utilisation de ces composés n'est pas très nombreuse. Parmi les polymères rencontrés, on peut citer les films de poly(phénol) [44, 65-70], de poly(o-phénylènediamine) [64, 39, 71-78], de poly(indole) [79], de poly(pyrrole-2-carboxylic acide) [80] et de poly(dyhydroxybenzophénone) [80]. Le mécanisme de polymérisation électrochimique du phénol est présenté sur la figure I.17.

L'épaisseur des films des polymères non conducteurs est autocontrôlée pendant l'électropolymérisation et les films isolants obtenus ont une épaisseur très fine (10 à 100 nm), ce qui permet de réduire les contraintes diffusionnelles des substrats et/ou des produits de la réaction catalytique à l'intérieur du biofilm. L'utilisation de ces composés donne lieu à des biocapteurs à réponse rapide et d'une sensibilité très élevée à cause d'une quantité relativement élevée d'enzyme immobilisée [81].

Comme le polypyrrole, les films du polyphénol peuvent se former à partir d'une solution aqueuse de pH neutre. Un exemple de cette approche est donné par Bartlett et coll. [82] avec l'utilisation de différents phénols pour l'immobilisation de la glucose oxydase.

Contrairement aux polymères conducteurs, ceux-ci forment une couche isolante d'épaisseur plus uniforme. Par rapport aux polymères conducteurs dans le processus d'électropolymérisation, il y a beaucoup moins de paramètres à maîtriser (épaisseur du film, reproductibilité).

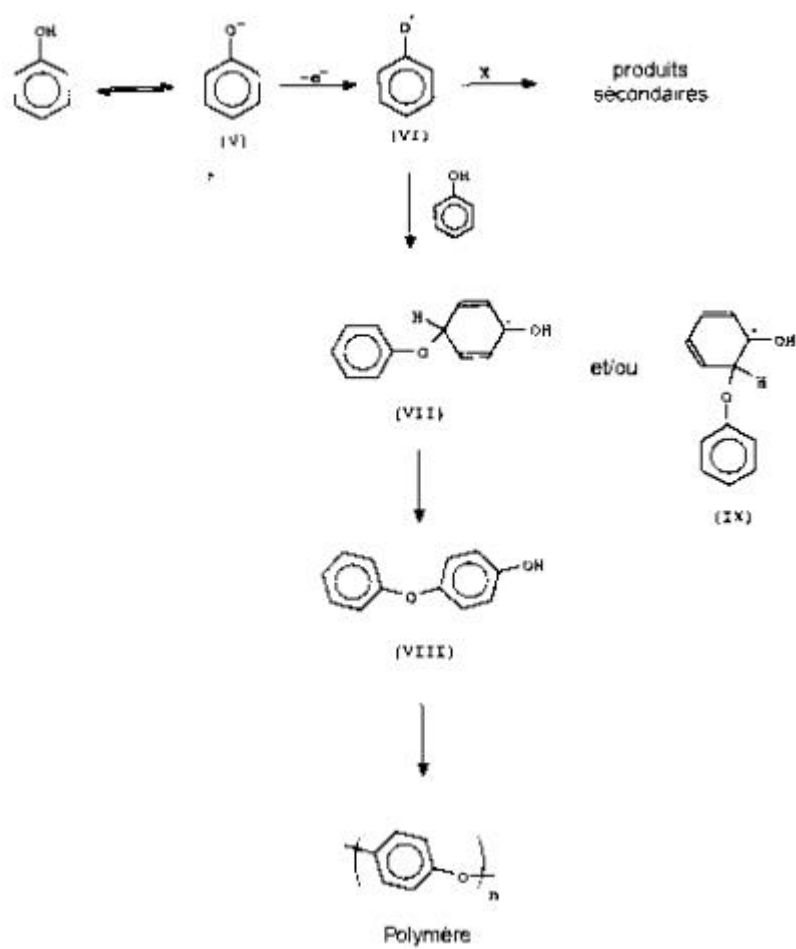


Figure I.17 : Mécanisme de polymérisation électrochimique du phénol [23].

I.4. CONCLUSIONS

L'exploitation des films polymères comme support enzymatique pour la fabrication de biocapteurs ampérométriques a atteint un développement considérable. Dans certains cas, l'incorporation d'un film polymère électropolymérisé permet au biocapteur de surmonter des problèmes liés aux interférences et de réduire la taille des biocapteurs.

La fabrication de microélectrodes enzymatiques [83-85] présente un intérêt pour de futures applications, notamment médicales. En effet, outre la simplicité de fabrication et la très grande sensibilité du mode de détection ampérométrique, les biocapteurs permettent de délivrer une information en temps réel. La capacité de détecter des changements rapides de concentration des composés dans les fluides biologiques permet l'élaboration de systèmes miniaturisés qui sont, soit utilisés dans les unités de soins intensifs, soit fixés dans le corps du patient, soit comme dispositifs implantables pour le suivi en continu de la concentration *in vivo* de certains métabolites. Il reste cependant à résoudre les problèmes de biocompatibilité, de réponse immunitaire, de dépôt de protéines sur l'électrode qui nécessite des étalonnages fréquents dans les cas des applications *in vivo* [86].

La tendance actuelle dans le développement des biocapteurs s'oriente vers la miniaturisation et l'intégration dans les dispositifs de mesure. Jusqu'à maintenant, des biocapteurs enzymatiques ont été commercialisés pour la détection de composés différents et des recherches sont en cours pour élargir les possibilités d'application.

CHAPITRE II : IMMOBILISATION DE LA GLUCOSE OXYDASE DANS UN FILM DE PEDT

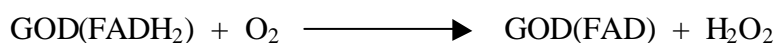
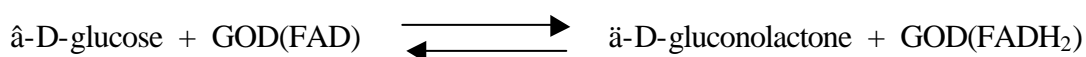
II.1 LES BIOCAPTEURS A GLUCOSE

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés principalement aux biocapteurs à glucose. Le glucose est le composé le plus fréquemment dosé dans le domaine médical, et plus particulièrement chez les patients diabétiques [87]. L'idée de maintenir les taux de glucose sanguin aux niveaux physiologiques normaux a conduit au développement d'une série de dispositifs pour le dosage du glucose *in vivo* ou *in vitro* dans les fluides biologiques [88]. Leur principe est basé sur la détection électrochimique et les biorécepteurs enzymatiques [89]. Récemment, d'autres méthodes ont été proposées pour la détermination du glucose, mais pour le contrôle *in vivo* à long terme, les biocapteurs électrochimiques suscitent toujours l'intérêt de la plupart des recherches.

II.1.1 La glucose oxydase

Les enzymes rédox sont des molécules avec un ou plusieurs centres rédox. Leur masse molaire varie environ entre 40000 Da (daltons) comme la galactose oxydase et 850000 Da comme la choline hydrogénase. Leur diamètre moyen fluctue entre 55 et 150 Å. La plupart d'entre elles ont leur centre rédox localisé en profondeur et recouvert d'une enveloppe de glycoprotéines qui rend le site actif inaccessible électriquement. Cette conformation de l'enzyme pourrait empêcher les réactions non spécifiques entre les diverses macromolécules rédox dans les systèmes biologiques [90]. Une autre fonction de l'enveloppe glycoprotéique serait de stabiliser la structure de l'enzyme.

L'élaboration du biocapteur à glucose est basée sur l'immobilisation de la glucose oxydase à la surface de l'électrode. La glucose oxydase (α -D-glucose : oxygène 1-oxydoréductase, EC 1.1.3.4) est une enzyme homodimérique (chaque subunité de cette protéine contient une molécule de coenzyme flavine adénine dinucléotide) [91] qui catalyse l'oxydation du α -D-glucose en α -D-gluconolactone (figure II.1) en présence d'oxygène moléculaire dissous dans le milieu réactionnel :



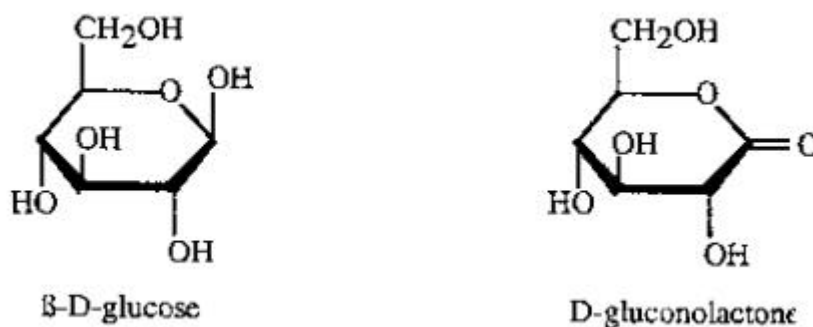


Figure II.1 : Formules chimiques du β -D-glucose et du α -D-gluconolactone.

La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* est une protéine volumineuse (diamètre environ 80 Å) et possède un poids moléculaire élevé (environ 160 kDa). L'enveloppe protéinique de cette biomolécule est constituée d'acides aminés lui conférant des propriétés de zwitterion. Le pH correspondant au point isoélectrique de la GOD est de 4,35. Au pH de l'eau distillée (pH 6-7) elle est anionique. Chaque monomère de GOD a deux domaines différents : l'un est lié fortement à un motif de FAD et l'autre est utilisé pour les liaisons avec le substrat de β -D-glucose [91].

Le site actif de la GOD est le cofacteur FAD ; celui-ci est localisé dans une cavité de la protéine profonde de 3 Å et ne peut pas être séparé de l'enzyme dans des conditions non dénaturantes. La partie électroactive du FAD est le cycle isoalloxazine qui, par oxydation du glucose, capte 2 électrons et 2 protons pour former FADH₂, forme réduite du cofacteur (figure II.2).

Etant donné sa localisation au sein de la molécule, le cofacteur FAD est isolé électriquement par l'enveloppe protéinique. Un relais pour le transfert d'électrons est donc nécessaire entre la GOD et l'électrode afin de permettre la détection ampérométrique. Dans ce contexte, l'accepteur d'électrons le plus couramment utilisé est l'oxygène moléculaire, médiateur physiologique de la GOD.

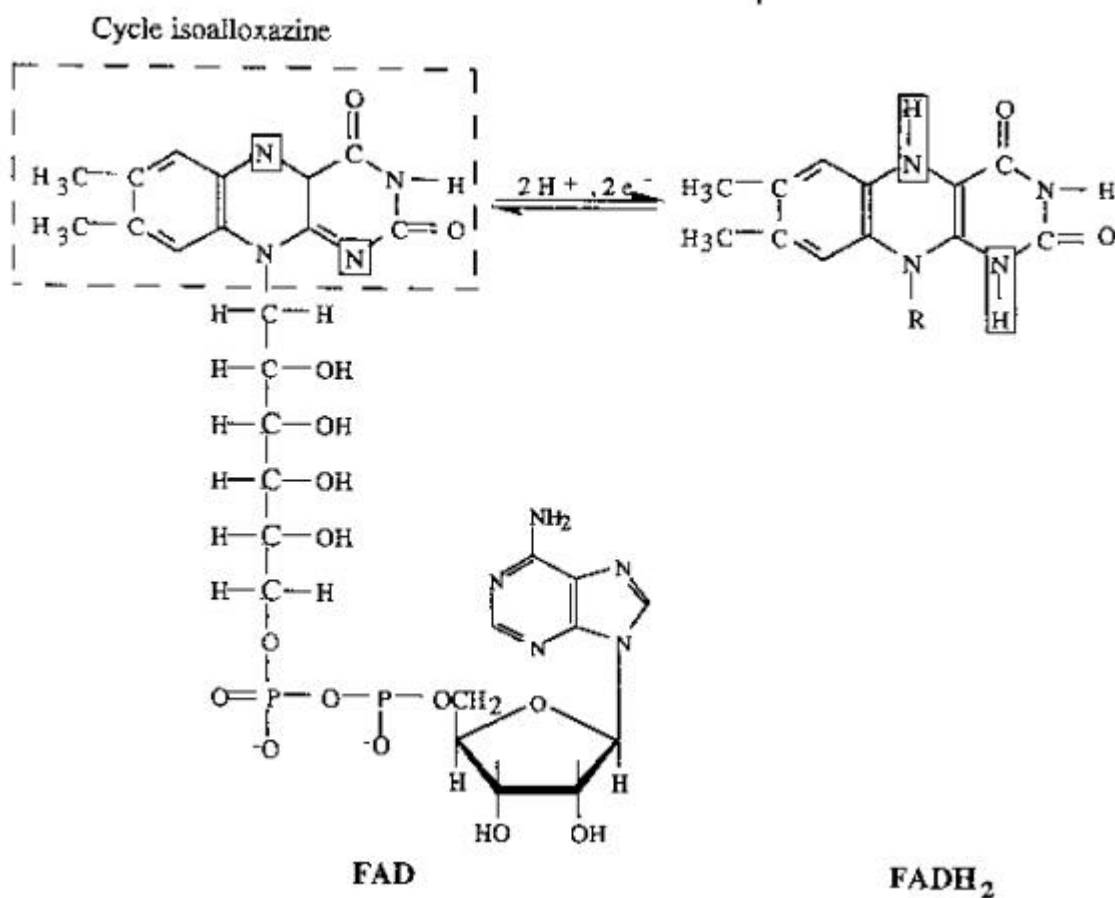


Figure II.2 : Formules chimiques du flavine adénine dinucléotide à l'état oxydé (FAD) et à l'état réduit (FADH₂).

Il existe des résultats controversés au sujet du transfert d'électrons des grandes enzymes rédox comme la GOD. Différentes études montrent que l'activité enzymatique de l'enzyme n'est pas directement corrélée au transfert électronique observé. Cela suggère, soit des changements importants de la structure de l'enzyme pendant la fixation à l'électrode, soit une destruction de l'activité enzymatique après le transfert d'électrons [92]. Cependant, la GOD est très fréquemment utilisée pour l'étude de l'immobilisation enzymatique en raison de sa grande stabilité et d'une bonne activité catalytique.

II.1.2 Détection ampérométrique du glucose

La réaction d'oxydation du glucose catalysée par la GOD entraîne les changements de plusieurs paramètres qui peuvent être éventuellement utilisés pour le dosage du glucose [93] (figure II.3). Ainsi, le transfert d'électrons du substrat à l'enzyme se traduit par :

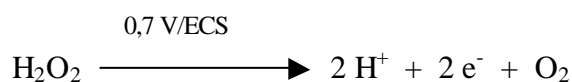
* la conversion du glucose en acide gluconique. Les changements locaux de pH peuvent être détectés par une électrode de pH.

* la réduction de l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène, ce qui occasionne une diminution de la tension partielle de O_2 et une augmentation de la concentration de H_2O_2 . La réduction électrochimique de l'oxygène peut être mesurée à $-0,65$ V/ECS sur une électrode d'oxygène. Son principe repose sur la diffusion de l'oxygène à travers une membrane hydrophobe. Updike et Hicks (1967) ont été les premiers à construire une électrode enzymatique pour la détection du glucose en utilisant cette méthode. L'oxydation électrochimique du peroxyde d'hydrogène peut aussi être mesurée à $+0,7$ V/ECS sur une électrode de platine [93].

Dans le cadre de l'élaboration de biocapteurs à glucose, nous avons choisi la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène en immobilisant la GOD à la surface d'une électrode de platine.

L'oxydation du glucose catalysée par la GOD génère la formation de peroxyde d'hydrogène qui peut être oxydé électrochimiquement à la surface d'une électrode de platine. L'intensité du courant induit par la réaction électrochimique est directement liée à la concentration du glucose dans la solution.

L'oxydation électrochimique de H_2O_2 est un processus global nécessitant le transfert de 2 électrons. La détection optimale de H_2O_2 est obtenue à un potentiel de $0,6$ à $0,7$ V/ECS [31].



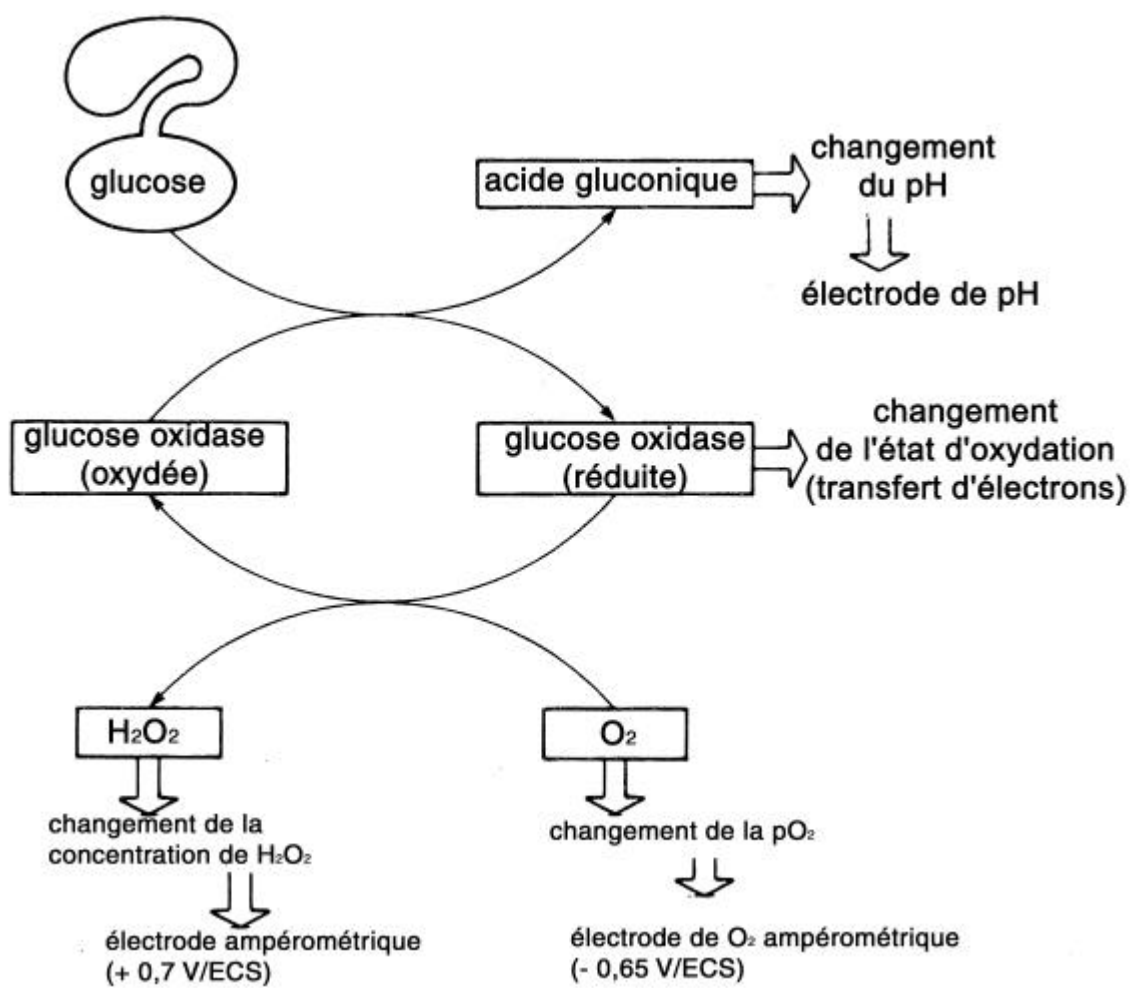


Figure II.3 : Oxydation du glucose catalysée par GOD. Identification des paramètres à tester dans le dosage du glucose [93].

II.2 MATERIELS ET METHODES

II.2.1 Réactifs pour l'élaboration du biocapteur

- La glucose oxydase (EC 1.1.3.4), type VII-S, d'*Aspergillus niger*, 229 U.mg⁻¹, 179 U.mg⁻¹ et 246 U.mg⁻¹ (1 unité oxyde 1 µmole de α -D-glucose en D-gluconolactone et en H₂O₂ par minute à pH 5,1 et 35 °C) est fournie par Sigma et est utilisée sans traitement préalable.

Le D-(+)-glucose anhydre de qualité analytique est fourni par SIGMA.

Le peroxyde d'hydrogène NORMAPUR pour la réalisation de solutions étalons est fourni par Prolabo.

Le monomère 3,4-éthylènedioxythiophène est fourni par Bayer AG.

Le poly(éthylène glycol) de MM = 15,000 est fourni par Aldrich.

Toutes les solutions de tampon phosphate sont préparées par mélange dans l'eau désionisée de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄, H₂O), d'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄, 2H₂O) et de chlorure de potassium RECTAPUR fournis par Prolabo.

Pour chaque expérience, toutes les solutions aqueuses ont été réalisées à partir d'une eau ultra-pure purifiée et désionisée par le système Milli Q[®].

Les expériences sur la réponse des biocapteurs en absence d'oxygène ont été menées avec des solutions tampon et de glucose désoxygénées avec de l'argon de qualité NERTAL fourni par Air Liquide.

II.2.2 Appareillage

L'appareillage pour les études électrochimiques consiste en un ensemble VoltaLabTM 21 (potentiostat/galvanostat PGP201 de Radiometer Copenhagen piloté par le logiciel VoltaMaster 1) et relié à un enregistreur thermique Sefram 8400. Toutes les expériences électrochimiques ont été effectuées dans une cellule thermostatée (volume 10 ou 20 mL) et avec un système à trois électrodes.

L'électrode de référence est l'électrode au calomel saturé (ECS) de chez Tacussel[®]. La contre-électrode est formée d'un fil de platine.

Les électrodes de travail sont des électrodes de platine de 1,6 mm de diamètre fournies par BAS[®].

La surface des électrodes de travail a subi un traitement préalable qui consiste en un polissage à l'aide d'une solution d'alumine avec des particules de 0,05 μm de diamètre et un feutre approprié (kit de nettoyage PK-4 fourni par BAS[®]), suivi d'un nettoyage électrochimique dans une solution de H_2SO_4 0,5 M entre $-1,5$ V et $+1,5$ V à une vitesse de balayage de 2 V/s pendant 50 cycles.

II.2.3 Méthodes

II.2.3.1 Elaboration des bioélectrodes

Les bioélectrodes Pt/PEDT/GOD sont obtenues à partir d'une solution tampon phosphate de potassium de pH 6,2 et de concentration $2 \cdot 10^{-2}$ M avec la composition suivante :

3,4-éthylènedioxythiophène (EDT) : 10^{-2} mol. L^{-1}

poly(éthylèneglycol) (PEG) : 10^{-3} mol. L^{-1}

glucose oxydase (GOD) : 1000 U. mL^{-1}

La polymérisation du EDT est effectuée par balayage de potentiel entre $+0,2$ V et $1,5$ V vs ECS à 0,1 V/s pendant 15 cycles.

II.2.3.2 Détermination de l'activité de la GOD

La activité de GOD contenue dans la couche active est déterminée par un procédé spectrophotométrique. La bioélectrode est immergée dans le mélange réactionnel et soumise à une vitesse de rotation déterminée. L'absorbance à 405 nm est mesurée toutes les deux minutes pendant 60 minutes. La partie linéaire de la courbe représentant l'évolution de l'absorbance au cours du temps permet alors de calculer l'activité des biofilms. Cette estimation est menée selon le protocole suivant :

Réactions GOD -HRP	$\text{D-Glucose} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{gluconate} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ABTS}_{\text{red}}^{\otimes} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{ABTS}_{\text{ox}}^{\otimes}$
Réactifs	A- Tampon phosphate 0,1 M pH 7. B- Solution de ABTS [®] 2 mM dans la solution A. C- Solution de D-Glucose 1,1 M dans l'eau désionisée. D- Solution de peroxydase (HRP) à 2500 U.mL ⁻¹ diluée 5 fois dans une solution de sulfate d'ammonium 3,2 M.
Mélange réactionnel	Placer dans l'ordre dans une cuve : 2,5 mL de solution B, 0,5 mL de solution C et 0,01 mL de solution D. Mélanger.
Mesure	Immerger la bioélectrode et mélanger par agitation mécanique. Enregistrer l'augmentation de l'absorbance consécutive à l'oxydation de ABTS durant X minutes à une longueur d'onde de 405 nm.

ABTS : 2,2-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)

II.2.3.3 Mesures ampérométriques

Avant chaque mesure électrochimique, les électrodes sont stabilisées dans un tampon phosphate 0,01 M (10 mL ou 20 mL) à un potentiel de 0,65 V/ECS jusqu'à l'obtention d'un courant résiduel stationnaire. Des petits volumes de solution de glucose (5 à 300 µL) sont ensuite injectés dans la cellule. Les solutions de glucose sont préparées dans de l'eau désionisée et conservées au réfrigérateur. Avant utilisation, elles sont stockées 24 heures à la température ambiante de manière à permettre l'équilibre de mutarotation du glucose.

II.2.3.4 Influence de la concentration de GOD dans la solution d'électropolymérisation.

La réponse de l'électrode à une concentration de glucose de 5 mM a été enregistrée pour différentes électrodes fabriquées avec diverses concentrations de glucose oxydase dans la solution d'électropolymérisation : 50 à 1000 UI. mL⁻¹.

II.2.3.5 Influence du pH de la solution d'électropolymérisation

La réponse des bioélectrodes a été mesurée à différents pH de la solution d'électropolymérisation avec les conditions suivantes : solution tampon phosphate 20 mM pH 5 à 8, concentration de la solution du glucose à tester : 5 mM.

II.2.3.6 Influence de la température

La réponse de l'électrode est enregistrée dans une solution d'analyse contenant du tampon phosphate 0,01 M pH 7 et du glucose 5 mM. La valeur du courant délivré par le biocapteur est alors relevée après stabilisation pour chaque température.

II.2.3.7 Influence du pH et de la concentration de la solution tampon d'analyse

La réponse de l'électrode est enregistrée dans chaque solution tamponnée à différents pH de 5 à 8 en milieu tampon phosphate 0,01 M. La concentration de substrat est fixée à 5 mM. Les électrodes ont été testées aussi en fonction de la force ionique (0,005 M; 0,01 M; 0,05 M ; 0,1 M) de la solution tampon phosphate.

II.2.3.8 Choix du potentiel

La réponse de l'électrode est enregistrée dans une solution contenant du tampon phosphate 0,01 M pH 7 et du glucose 5 mM. La valeur de la réponse en courant du biocapteur est alors relevée après stabilisation du courant pour chaque potentiel.

II.3 RESULTATS ET DISCUSSION

II.3.1 Optimisation des conditions d'élaboration du biocapteur

Comme les performances d'un biocapteur sont intimement liées au mode d'immobilisation de l'enzyme, nous avons étudié certains paramètres impliqués dans l'élaboration du biocapteur.

II.3.1.1 Caractérisation du biofilm et choix des conditions d'électropolymérisation

Lors de l'étape d'électropolymérisation, une quantité importante d'enzyme préadsorbée peut être relarguée en solution. Ce phénomène est lié au milieu électrolytique aqueux utilisé pour la rétention de l'enzyme. L'existence d'un coefficient de partage entre la phase adsorbée et le milieu aqueux est à l'origine du relargage plus ou moins rapide de l'enzyme en solution.

Le film de PEDT peut être formé par deux méthodes : soit par un balayage cyclique du potentiel, soit par le dépôt à potentiel constant. La mise au point de l'utilisation de ce polymère a été faite dans le cadre d'une collaboration entre notre Laboratoire et l'Institut de Topologie et de Dynamique des Systèmes (ITODYS) de l'Université Paris VII–Denis Diderot [94]. L'image de la figure II.4 montre la surface sensible d'une électrode de carbone vitreux obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB) où nous avons électropolymérisé un film de a) PEDT + PEG et b) PEDT + PEG-GOD. Nous avons utilisé un angle du microscope de 80 °. Nous pouvons observer clairement le changement de la morphologie de la surface en présence de l'enzyme.

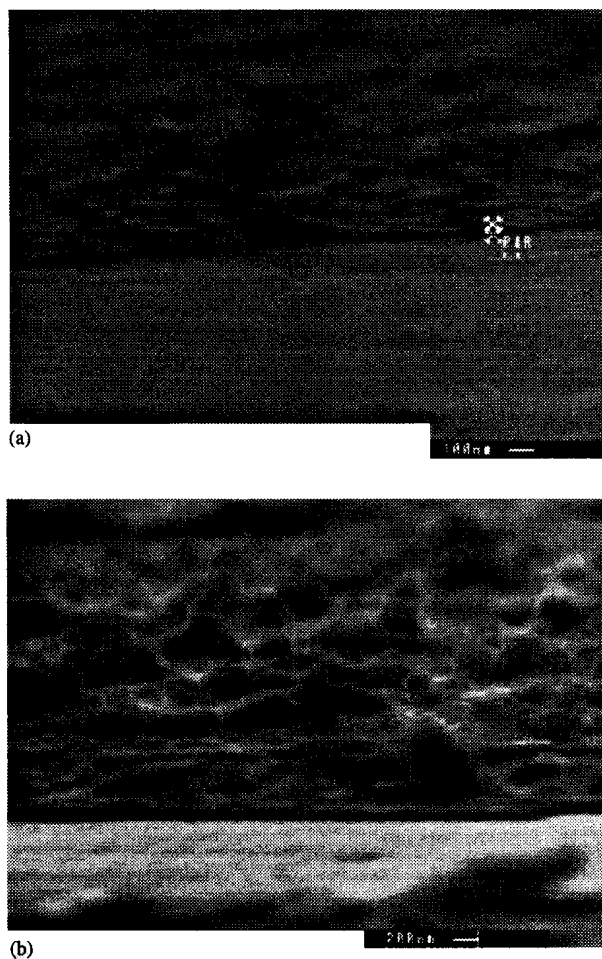


Figure II.4 : MEB des films obtenus par électropolymérisation sur une électrode de carbone vitreux à 1,1 V pendant 10 secondes de a) PEDT + PEG et b) PEDT + PEG-GOD avec un angle de microscope de 80° [94].

Garreau et coll. [56, 95] ont étudié et caractérisé le 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT) et le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT) par spectroscopie Raman. La figure II.5 montre les différentes bandes obtenues dans une gamme de fréquences de 600 à 1600 cm^{-1} .

Dans le EDT, on peut observer six bandes dominantes à 1487 cm^{-1} (C=C élongation asymétrique), 1424 cm^{-1} (C=C élongation symétrique), 1185 cm^{-1} (CH_2 balancement), 891 cm^{-1} , 834 cm^{-1} (déformation symétrique du cycle) et 766 cm^{-1} (déformation du cycle). Dans le PEDT, on observe un pic fort à 1423 cm^{-1} (C=C élongation symétrique).

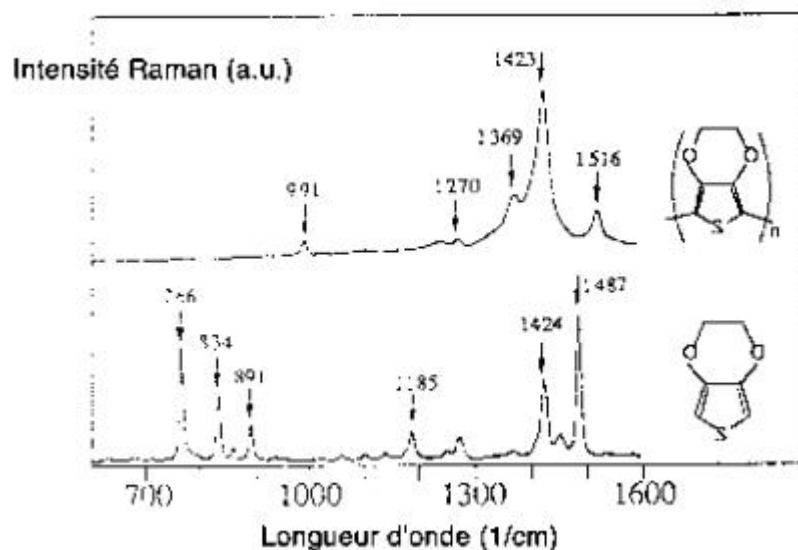


Figure II.5 : Caractérisation du monomère EDT et du polymère PEDT par spectroscopie Raman dans une gamme de fréquences de 600 à 1600 cm^{-1} [95].

Nous avons essayé la méthode du balayage cyclique du potentiel pour procéder à l'immobilisation de l'enzyme. Nous avons fait varier le potentiel de l'électrode entre 0,2 et 1,5 V/ECS à une vitesse de balayage de 0,1 V/s. Cette technique a déjà été utilisée par Yamato et coll. [50] pour l'électropolymérisation du PEDT en présence de poly(styrène sulfonate) (PSS). Le voltampérogramme cyclique (figure II.6) montre un pic anodique à 1,3 V dans le premier cycle dû à l'électropolymérisation du PEDT. Dans les cycles suivants, le courant anodique diminue probablement à cause d'une suroxydation du polymère déposé.

Le nombre de cycles de l'électropolymérisation détermine l'épaisseur de la couche de polymère. Après avoir mesuré la réponse ampérométrique des différents biocapteurs préparés avec 5, 10, 15, 20 et 30 cycles, nous avons obtenu une faible réponse pour les deux premiers et pas de réponse ou une très faible réponse pour les deux derniers. L'explication serait qu'une couche très épaisse de polymère gêne le passage du substrat à travers le film polymère pour entrer en contact avec l'enzyme piégée, ou bien que le produit de la réaction n'atteint pas l'électrode pour la même raison. Piro et coll. [57] ont utilisé la même technique pour le greffage d'un oligomère dans un film de PEDT. Ils ont vérifié qu'au-delà de 20 cycles le film

devient fragile et friable, ce qui pourrait libérer la protéine emprisonnée. Ils ont aussi montré, par microscopie électronique à balayage (MEB), que l'épaisseur du film augmente de manière quasi-linéaire avec le nombre de cycles appliqués. Pour 2 cycles, l'épaisseur du film est de 0,2 – 0,3 μm , et pour 20 cycles l'épaisseur de la couche est de 5,4 μm .

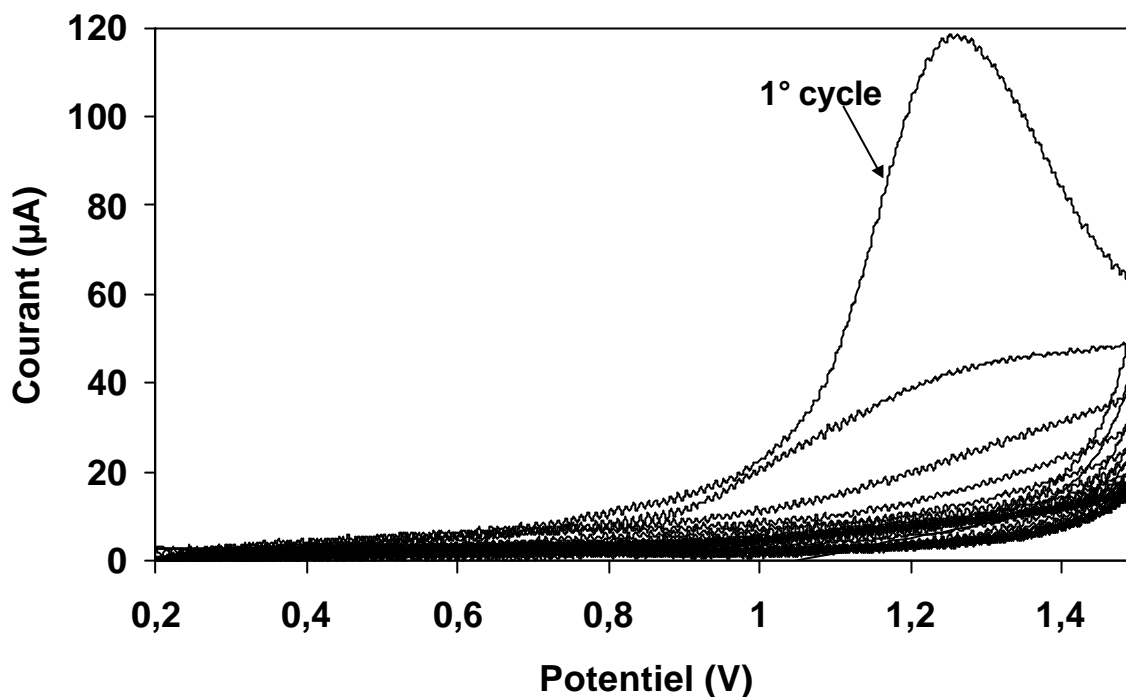
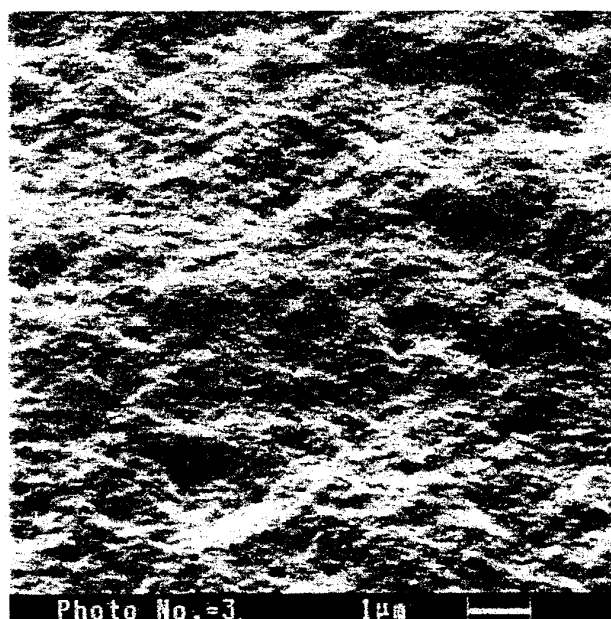


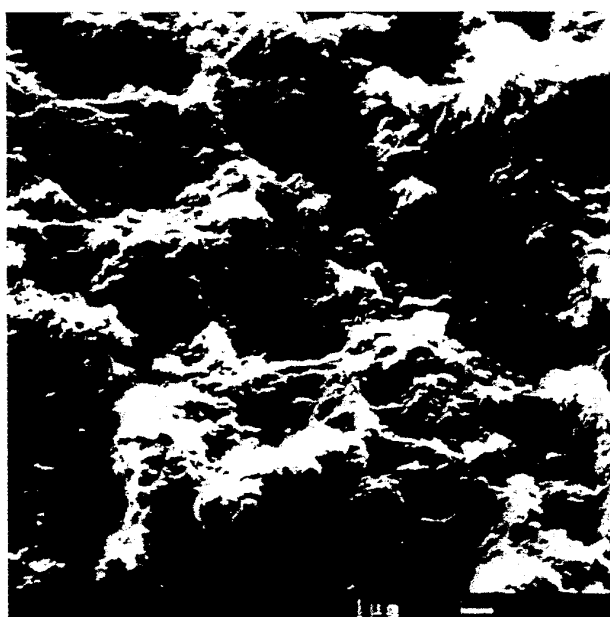
Figure II.6 : Electropolymérisation par balayage cyclique du EDT en présence de l'enzyme GOD et du poly(éthylèneglycol) (PEG) dans une solution tampon phosphate 0,02 M, pH 6,2. Electrode de travail : disque de platine de 1,6 mm de diamètre. Vitesse de balayage : 0,1 V/s.

La solubilité du monomère EDT dans un milieu aqueux est relativement faible. La solution d'électropolymérisation a été préparée à une concentration 10^{-2} M du EDT, ce qui représente la limite de solubilité du monomère. L'ajout dans le milieu d'électropolymérisation d'un polymère hydrophile de type poly(éthylène glycol) (PEG) ou polyvinylpyrrolidone (PVP) de masse moléculaire comprise entre 200 et 50000 g. mol⁻¹ à une concentration de l'ordre de 10^{-3} M permet une augmentation de l'hydrophilie du polymère déposé. Piro et coll. [57] ont démontré que l'addition d'un polymère soluble dans l'eau du type PEG ou PVP améliore l'incorporation des oligonucléotides dans un film de PEDT. La présence d'un polymère

hydrophile peut entraîner la formation de microdomaines hydrophiles dans la matrice de PEDT. La taille des microdomaines pourrait augmenter avec la masse molaire du polymère soluble ajouté. La formation de ces domaines pourrait être essentielle pour le déplacement de charges dans le polymère conducteur. Les films électropolymérisés en l'absence des polymères solubles dans l'eau montrent une perméabilité très faible aux solutions aqueuses. L'analyse de la surface du film par microscopie électronique à balayage montre les différences de la morphologie de la surface en l'absence et en présence de PVP dans le milieu d'électropolymérisation (figure II.7).



(a)



(b)

Figure II.7 : Images obtenues par MEB des films électropolymérisés en (a) absence ou (b) présence de PVP de masse molaire $40000 \text{ g. mol}^{-1}$ dans le milieu d'électropolymérisation. Nombre de cycles : 20 ; $[\text{EDT}] : 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{oligonucléotide}] : 1 \mu\text{M}$ [57].

II.3.1.2 Evaluation de la concentration d'enzyme dans la solution d'électropolymérisation

L'élaboration de bioélectrodes sensibles et reproductibles est un enjeu majeur dans la conception des biocapteurs. L'influence de la quantité d'enzyme déposée a été étudiée à travers la concentration de GOD dans la solution d'électropolymérisation. Les résultats sont montrés dans la figure II.8.

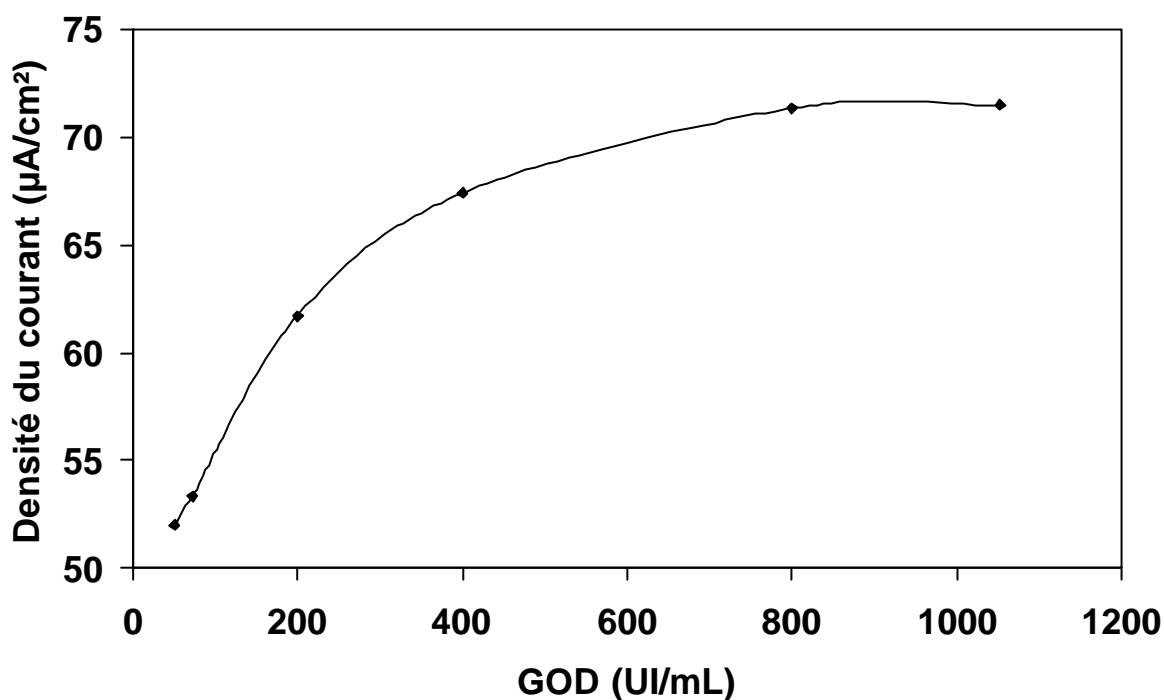


Figure II.8 : Réponse ampérométrique du biocapteur Pt/PEDT/GOD à différentes concentrations d'enzyme contenues dans la solution d'électropolymérisation. Mesures effectuées pour une concentration en glucose de 5 mM à 0,65 V/ECS et à 25°C dans une solution tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Le résultat optimal, du point de vue de la détection, est obtenu pour un biocapteur réalisé à partir d'une solution d'électropolymérisation contenant une concentration d'enzyme

entre 800 et 1000 U.I. mL⁻¹. Nous avons donc choisi de travailler avec une solution de concentration 1000 U.I. mL⁻¹ pour la suite des expériences.

Par l'utilisation du test spectrophotométrique utilisé pour la détermination de l'activité d'une solution de GOD, il est possible de mesurer l'activité de l'enzyme immobilisée. Pour cela, l'électrode est plongée dans le mélange réactionnel. Les résultats de cette étude montrent que l'activité de l'électrode est de 39 mUI. cm⁻². La fraction de molécules d'enzymes accessibles et jouant un rôle comme catalyseur est de moins de 1%. Cette faible valeur peut être le résultat d'une dénaturation au cours de l'électropolymérisation. Malgré la faible activité de l'électrode, nous verrons plus tard que la sensibilité électrochimique obtenue en présence de glucose est appréciable.

II.3.1.3 Influence du pH de la solution d'électropolymérisation

Nous avons procédé à l'évaluation de la réponse de l'électrode à différentes valeurs du pH de la solution tampon phosphate 0,02 M utilisée pour l'élaboration du biocapteur Pt/PEDT/GOD. La courbe de la figure II.9 montre que l'activité de la glucose oxydase pour une concentration du glucose de 5 mM est optimale pour un pH d'électropolymérisation de 6,0 environ. Par conséquent, pour avoir des résultats reproductibles, nous avons effectué toutes les polymérisations électrochimiques à partir d'une solution tampon de pH 6,2. Ce pH de la solution d'électropolymérisation a déjà été utilisé par Yamato et coll. dans une étude de comparaison de la stabilité entre le polypyrrole et le PEDT [50].

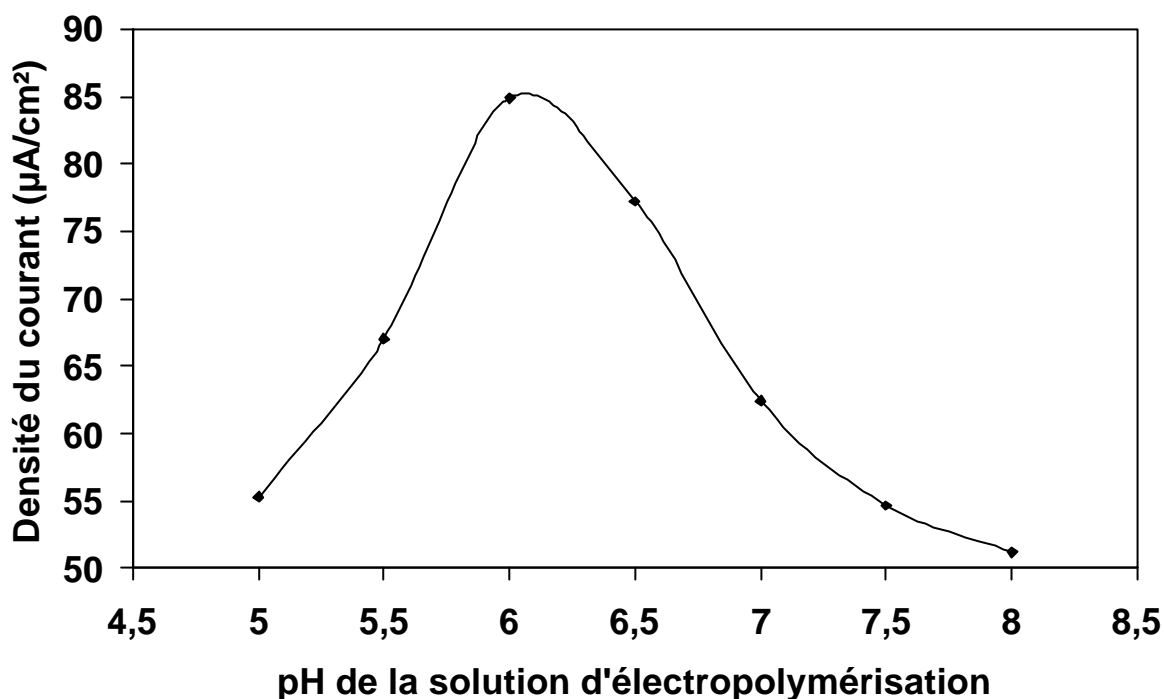


Figure II.9 : Effet du pH de la solution d'électropolymérisation sur la réponse de la bioélectrode Pt/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et à 25°C pour une concentration en glucose de 5 mM dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7.

II.3.1.4 Influence de la présence de biomolécules sur l'électroactivité du PEDT

Une fois la GOD retenue dans le film de PEDT, comme le montre la figure II.10, le voltampérogramme obtenu par balayage en potentiel diffère nettement de celui obtenu pour le PEDT seul. Le phénomène observé pourrait représenter une réduction de l'électroactivité du PEDT par la diffusion des porteurs de charges. L'oxydation du polymère s'accompagne de l'incorporation de contre-ions présents dans la solution, ce qui maintient l'électroneutralité du film. La présence d'enzyme peut perturber cette incorporation et provoquer une déformation des voltampérogrammes, comme nous observons dans la figure II.10.

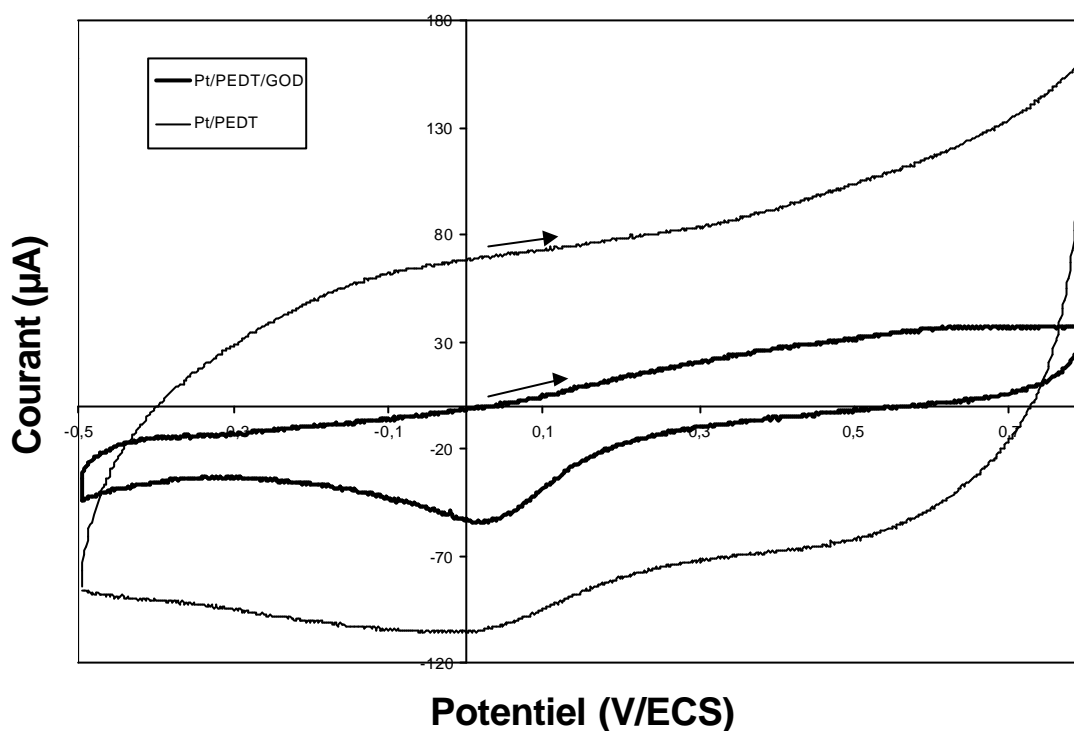


Figure II.10 : Voltampérométries cycliques d'une électrode Pt/PEDT et d'une électrode Pt/PEDT/GOD à 50 mV/s dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7. Matériaux d'électrodes élaborés par électropolymérisation à balayage cyclique sur une électrode de platine (diam. 1.6 mm).

II.3.1.5 Comportement des bioélectrodes en présence du substrat

Le comportement électrochimique du biocapteur Pt/PEDT/GOD a été mis en évidence par le tracé des courbes de voltampérométrie cyclique en l'absence et en présence du glucose (figure II.11). En présence du glucose, la courbe montre une augmentation du courant d'oxydation, phénomène lié à la détection de l'eau oxygénée par le système rédox du biocapteur. Le pic de réduction observé peut être attribué à la ré-oxydation de la forme réduite du cofacteur de l'enzyme (FADH_2) en présence d'oxygène (accepteur naturel d'électrons).

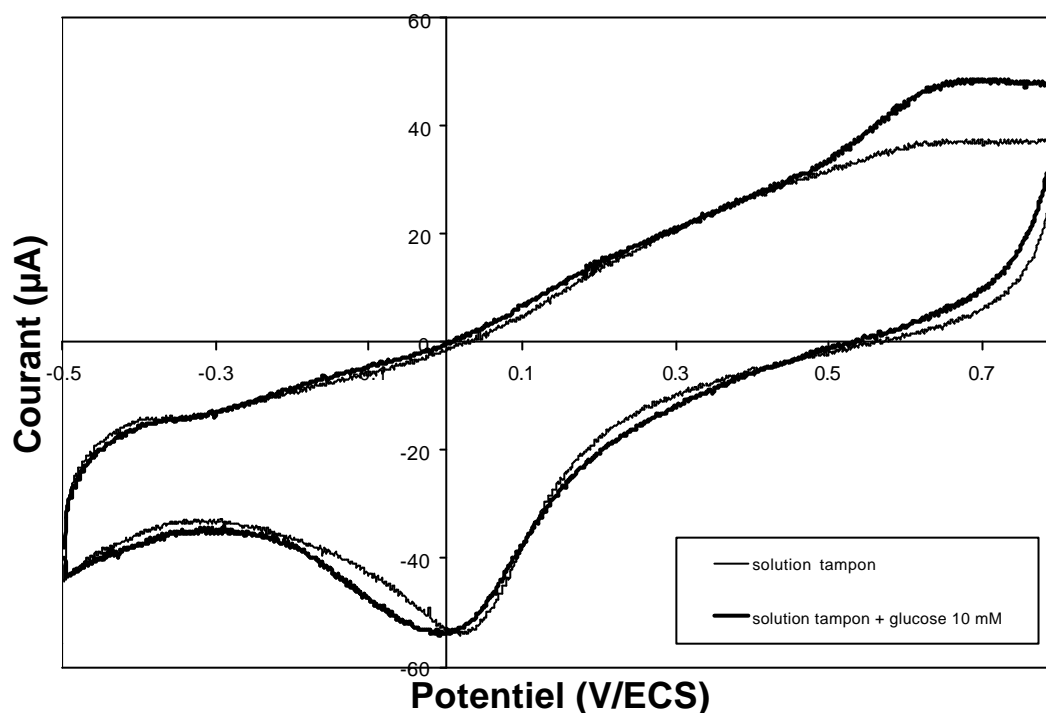
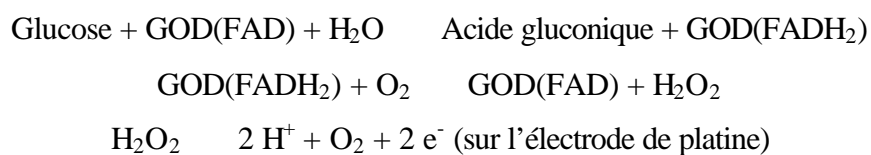


Figure II.11 : Voltampérométries cycliques d'une électrode Pt/PEDT/GOD en présence et en l'absence du glucose, à 50 mV/s dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7. Matériaux d'électrodes élaborés par électropolymérisation à balayage cyclique sur une électrode de platine (diam. 1.6 mm).

II.3.1.6 Réponse du biocapteur à une solution de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est le produit de décomposition de l'oxydation du glucose. Il doit être détectable par l'électrode de platine à un potentiel de 0,65 V/ECS. Afin de vérifier

si le film PEDT/GOD permet sa diffusion jusqu'à l'électrode, nous avons procédé à un essai de réponse du biocapteur en présence d'une solution de H_2O_2 .

La figure II.12 montre la réponse anodique de la bioélectrode Pt/PEDT/GOD à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène. La réponse du biocapteur est linéaire pour la détection des petites quantités de H_2O_2 (μM). L'électro-oxydation du peroxyde d'hydrogène à la surface d'une électrode de platine n'est possible que si les petites molécules de H_2O_2 traversent le biofilm qui recouvre l'électrode. En effet, la diffusion de H_2O_2 généré lors de la réaction enzymatique vers la surface du platine est un facteur important pour la sensibilité de l'électrode. Dans le cas d'une couche enzymatique épaisse, les molécules de H_2O_2 mettent plus de temps pour atteindre l'électrode de platine, ce qui augmente le temps de réponse du biocapteur. Quand l'épaisseur du film diminue, ce phénomène prend moins d'importance et la part de H_2O_2 oxydée à la surface de l'électrode devient plus élevée.

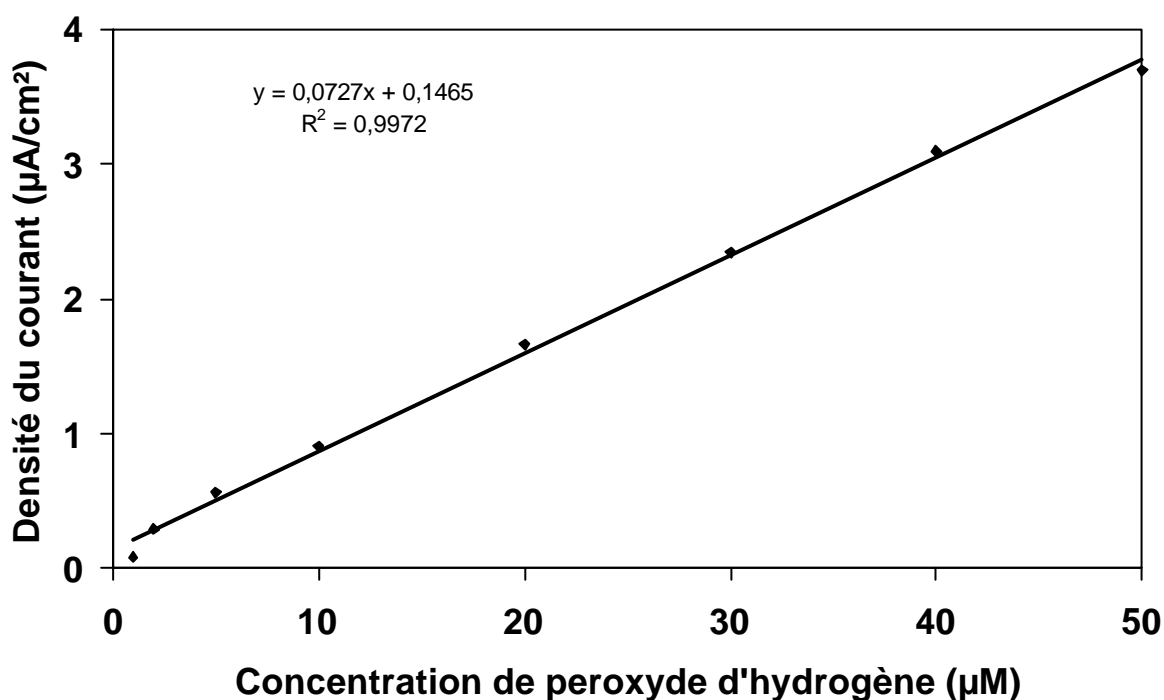


Figure II.12 : Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène avec une bioélectrode Pt/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

II.3.2 Optimisation des conditions de mesure en cellule électrochimique

La glucose oxydase immobilisée dans le PEDT a servi à la conception d'un capteur ampérométrique à glucose. Il est importante de définir des conditions optimales de mesure lors du fonctionnement du biocapteur de manière à obtenir une reproductibilité et une stabilité maximale des mesures.

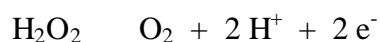
II.3.2.1 Influence de la température

La vitesse d'une réaction enzymatique est dépendante de la température. Nous avons fait varier la température de la cellule dans un domaine compris entre 15 et 50°C afin d'étudier l'influence de la température sur l'activité de l'enzyme. L'intensité du courant délivré par la bioélectrode a été étudiée en présence d'une solution de glucose 5 mM. L'influence de la température de la cellule sur la réponse du biocapteur est montrée à la figure II.13. L'intensité du courant augmente quand la température croît de 15 à 30°C. Nous voyons que la réponse ampérométrique du biocapteur présente un maximum d'intensité entre 25 et 30°C. Au-delà de 40°C, la dénaturation thermique se produit de manière irréversible. Il est encore possible d'utiliser l'électrode à 35 ou 37°C (température normale des fluides biologiques dans le corps) malgré une sensibilité plus faible. Cependant, nous avons travaillé dans un milieu thermostaté à 25°C afin de prolonger la durée de vie du biocapteur.

II.3.2.2 Influence du pH

L'activité enzymatique est aussi dépendante des conditions environnementales et spécialement du pH. Le pH du milieu peut modifier le degré d'ionisation des acides aminés latéraux de la protéine, qui peut alors être anionique, cationique ou zwitterionique. Les propriétés intrinsèques de l'enzyme au niveau de son pouvoir catalytique et de sa solubilité pourront être différentes selon le domaine de pH utilisé. L'activité catalytique de la GOD en solution est maximale pour un pH de 5,6 et sa solubilité minimale est observée autour de son point isoélectrique [96].

D'autre part, l'oxydation électrochimique de l'eau oxygénée présente un mécanisme faisant intervenir les protons :



Le potentiel standard, ainsi que la surtension d'oxydation du couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, sont donc dépendants du pH de la solution d'analyse.

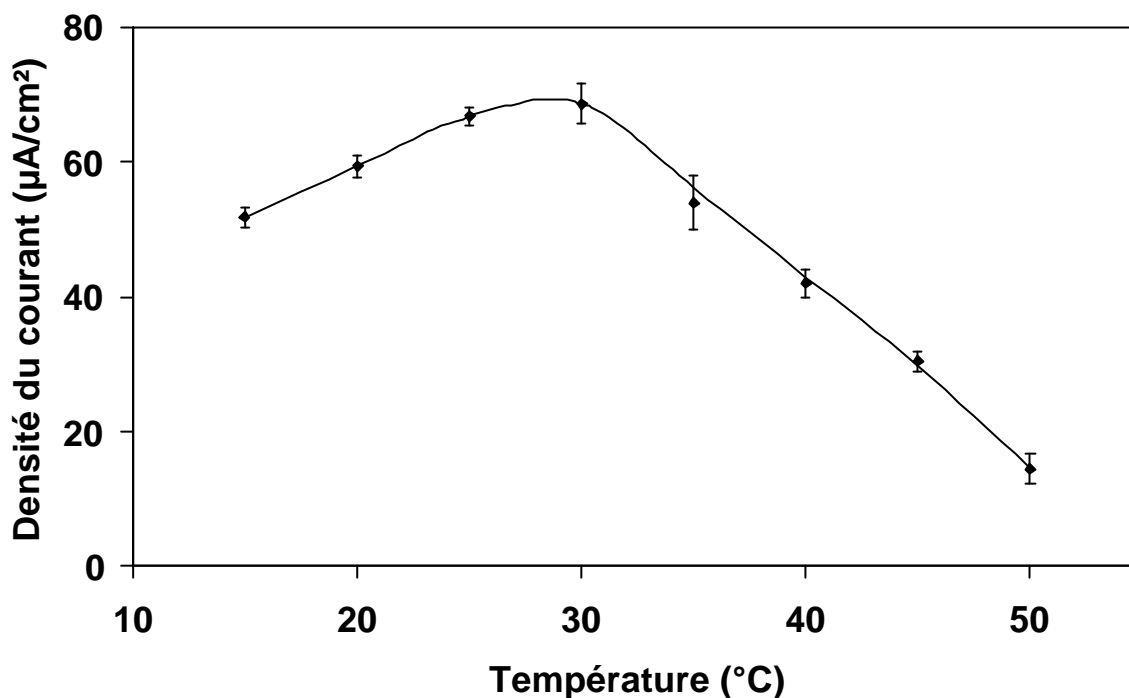


Figure II.13 : Influence de la température sur la réponse ampérométrique du biocapteur en présence de 5 mM de glucose à pH 7. Tampon phosphate 0,01 M. Potentiel de mesure 0,65 V/ECS.

Afin d'examiner l'influence de ce paramètre sur la réponse en courant du biocapteur, nous avons relevé les intensités obtenues avec une concentration de glucose de 5 mM pour des pH de la solution d'analyse compris entre 5 et 8 (figure II.14). Lors de cette expérience, le pH du milieu a été ajusté par l'utilisation du système $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$.

La réponse en courant du biocapteur à glucose est maximale pour un pH égal à 7. Nous observons un déplacement du pH optimum vers des valeurs plus alcalines par rapport à

la valeur optimale de 5,6 en solution. Dans la suite de ce travail, toutes les mesures seront réalisées en milieu tampon phosphate pH 7.

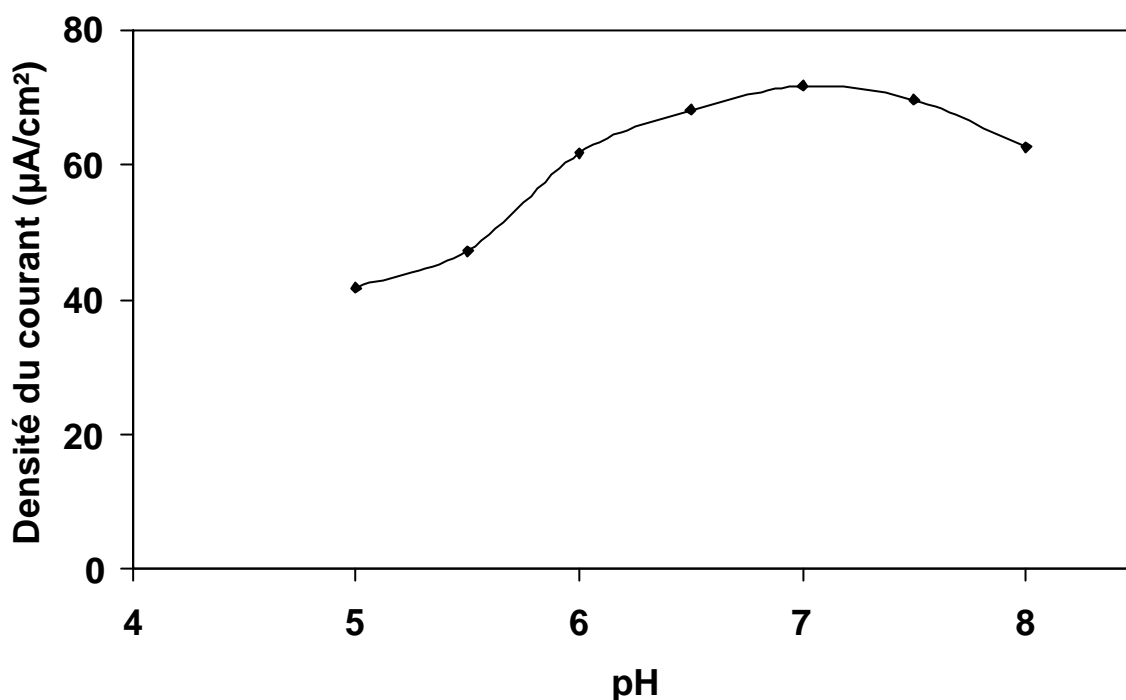


Figure II.14 : Influence du pH sur la réponse en courant d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD, à une concentration de glucose de 5 mM. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M.

II.3.2.3 Influence de la concentration de la solution tampon

Nous avons procédé à l'étude de l'électrode à différentes concentrations du milieu tampon phosphate. A la valeur du pH de mesure, la GOD est globalement anionique et une variation de la force ionique du milieu peut induire des modifications de charge sur la structure de la biomolécule immobilisée.

Les résultats exposés dans la figure II.15 montrent une meilleure réponse du biocapteur pour une concentration du sel de 0,01 M. La diminution de la sensibilité observée à la concentration de 0,005 M peut provenir d'une moins bonne conductivité de l'électrolyte. A

une concentration très élevée du sel support, l'existence d'interactions électrostatiques entre le polymère et l'enzyme peut réduire l'activité de l'enzyme. Ce phénomène a été décrit par d'autres auteurs [90]. Nous avons donc opté pour un tampon phosphate de concentration 0,01 M pH 7 pour la suite des travaux expérimentaux. Nous avons ajouté une concentration de 100 mM de KCl pour reproduire la concentration en électrolyte du milieu cellulaire interne dans le corps (tampon Dulbecco).

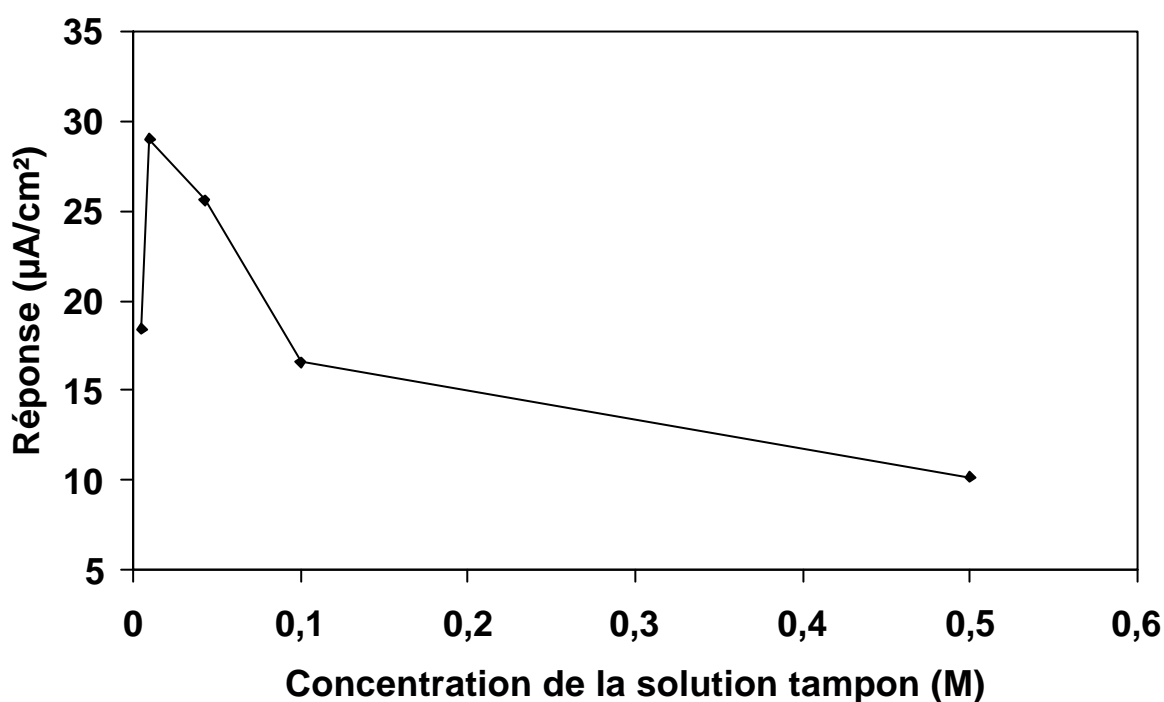


Figure II.15 : Influence de la concentration de la solution tampon du milieu d'analyse sur la réponse d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD. Conditions opératoires : concentration du glucose 2 mM, tampon phosphate pH 7, potentiel de mesure 0,65 V/ECS ; température 25°C.

II.3.2.4 Influence de la concentration en oxygène du milieu d'analyse

L'étape limitante de la réaction enzymatique de l'oxydation du glucose est la régénération de la glucose oxydase par l'oxygène. Ce phénomène a été observé dans le cas

d'une bioélectrode basée sur l'immobilisation de la glucose oxydase dans un film de poly(phénol) [65], ainsi qu'avec une bioélectrode basée sur l'immobilisation de la glucose oxydase dans un film de poly(pyrrole) dérivé [22].

Le PEDT est un bon conducteur électronique et nous l'avons choisi dans le but d'examiner la possibilité d'un transfert direct d'électrons entre le polymère et le site actif de l'enzyme. Pour vérifier la probable connexion électrique de la GOD à l'électrode à travers les groupes thiophène du PEDT, nous avons essayé la réponse du biocapteur dans un milieu sans oxygène (Figure II.16 A et B)

Avant de procéder à la réalisation des mesures, nous avons laissé le système sous une atmosphère d'argon pendant 20 minutes (figure II.16 A) et 60 minutes (figure II.16 B).

Les résultats montrent que la connexion électrique de la protéine via le PEDT est difficile, ce qui donne des réponses faibles et peu stables.

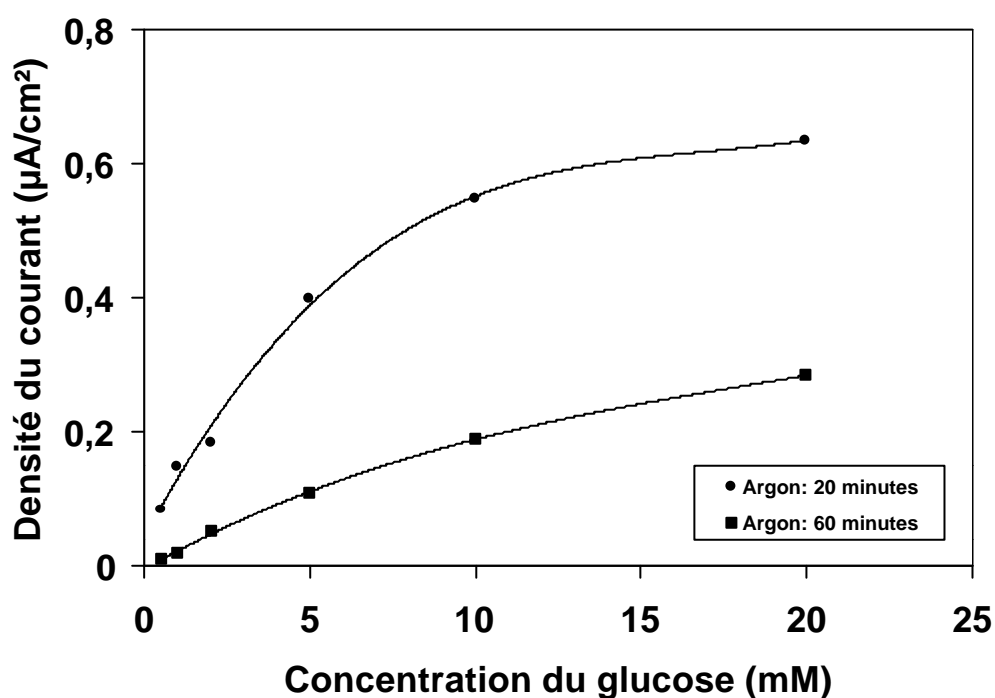


Figure II.16 : Courbe de réponse d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD sous atmosphère d'argon. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7 désoxygéné et agité mécaniquement. Le système est mis sous atmosphère d'argon pendant 20 min. (A) et 60 min. (B) avant de commencer les expériences.

II.3.2.5 Choix du potentiel de mesure

L'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène qui peut être oxydé électrochimiquement à la surface d'une électrode métallique. L'intensité du courant émis est directement proportionnelle à la concentration en glucose présente en solution.



C'est ce mode de détection ampérométrique que nous utiliserons dans la suite de ce travail. Le potentiel de mesure a été choisi de façon à être le moins anodique possible afin de diminuer la sensibilité du biocapteur aux autres espèces interférentes électro-oxydables. La réponse en courant du biocapteur pour une concentration en glucose de 5 mM a été mesurée pour des valeurs de potentiel comprises entre + 0,2 et + 0,9 V/ECS. Comme le montre la Figure II.17, le courant augmente avec le potentiel de 0,2 à 0,7 V/ECS, puis il diminue légèrement jusqu'à 0,9 V/ECS. Nous nous placerons à 0,65 V/ECS afin d'obtenir une réponse sensible et reproductible. Il n'est pas souhaitable de travailler à des potentiels trop élevés du fait d'une diminution probable de la sélectivité de la détection ampérométrique par électro-oxydation d'espèces interférentes présentes dans des fluides biologiques, tels que l'acide urique ou l'acide ascorbique.

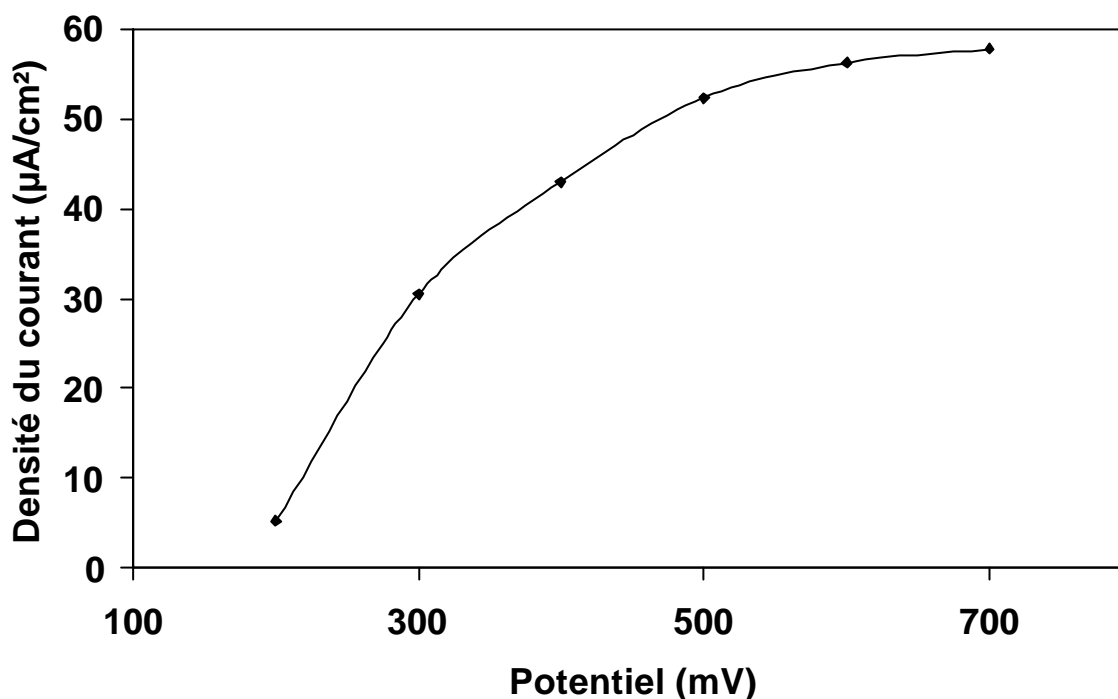


Figure II.17 : Influence du potentiel de mesure sur la réponse en courant d'un biocapteur Pt/PEDT/GOD pour 2 mM de glucose. Mesures à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

II.3.2.6 Réponse et courbe d'étalonnage d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD

Dans les conditions de mesures optimales précédemment établies, nous allons examiner plus en détail la réponse du biocapteur.

La figure II.18 présente la réponse ampérométrique caractéristique d'un biocapteur Pt/PEDT/GOD. Chaque saut correspond à des ajouts successifs de glucose jusqu'à obtenir des concentrations cumulées de substrat de 0,1 à 20 mM. Nous constatons que les réponses obtenues sont stables. Si nous examinons plus précisément le temps de réponse de ce biocapteur, nous constatons que pour obtenir 90 % de la réponse totale, celui-ci est de 5 secondes environ. En fait, un temps de 15 secondes est nécessaire pour obtenir une réponse stable à un ajout de glucose en solution.

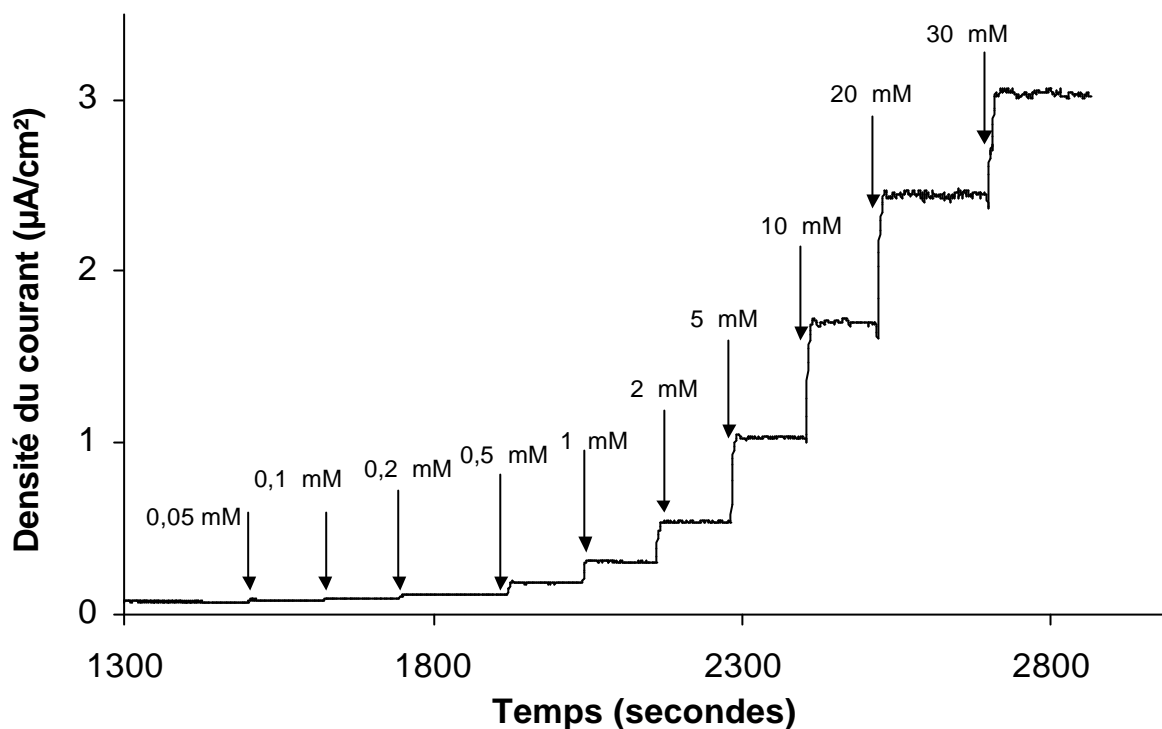


Figure II.18 : Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD à des incréments successifs en glucose de la solution d'analyse jusqu'à obtenir des concentrations finales de 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 mM. Surface active : 0,02 cm². Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

La figure II.19 représente la courbe d'étalonnage du biocapteur Pt/PEDT/GOD. Cette courbe présente une partie linéaire comprise entre 0,2 et 8 mM de glucose pour laquelle la réponse en courant est proportionnelle à la concentration du glucose. La sensibilité qui correspond à la pente de cette partie linéaire est de 15,2 mA.M⁻¹.cm⁻². La saturation est obtenue pour une concentration en glucose de 30 mM. La forme de la courbe de calibration est semblable à celle d'une courbe décrivant une catalyse enzymatique de type Michaelis-Menten. Bartlett et Wihitaker [22] ont montré que cette limitation de la réponse du biocapteur pour des fortes concentrations en glucose peut être attribuée, soit à la saturation des sites actifs de la protéine, soit à la réaction limitée de l'oxygène moléculaire avec l'enzyme.

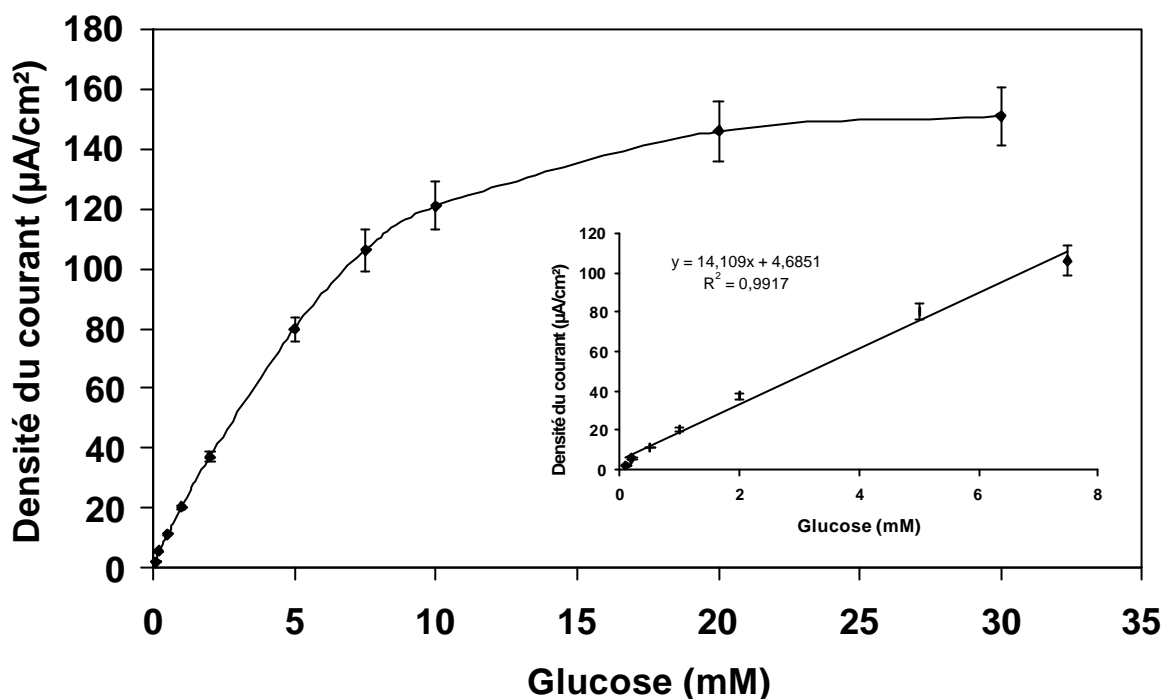


Figure II.19 : Courbe d'étalonnage d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25 °C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

La modélisation de la réponse du biocapteur a été réalisée à l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk (voir chapitre I). Elle permet d'accéder aux paramètres K_m^{app} et I_{max} qui ne sont pas spécifiques de l'enzyme immobilisée mais plutôt de l'ensemble de la biomembrane. La figure II.20 présente la linéarisation de la courbe d'étalonnage. La valeur de K_m^{app} déterminée à partir de la figure II.19 est de 7 mM. Cette valeur est inférieure à celle du K_m de l'enzyme en solution : 33 mM [96]. Cet abaissement du K_m sous l'effet de l'immobilisation a déjà été observé par d'autres auteurs pour d'autres systèmes enzymatiques [97].

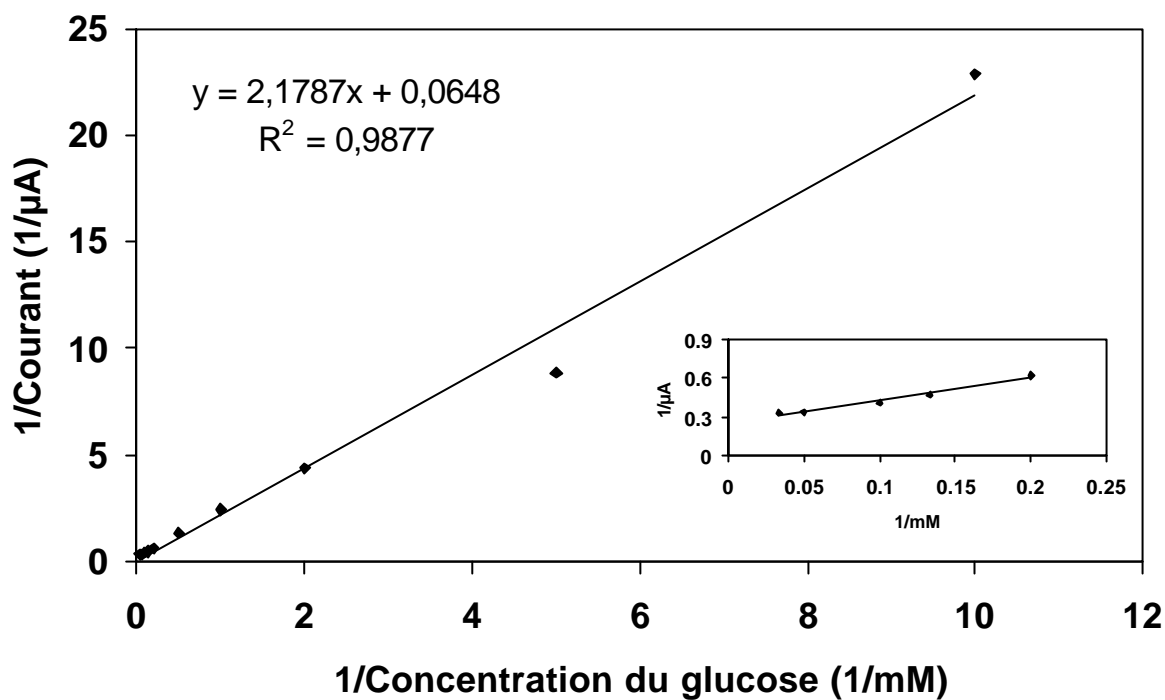


Figure II.20 : Représentation selon Lineweaver-Burk de la courbe de calibration de la figure II.19.

II.3.2.7 Reproductibilité de la réalisation du biocapteur

La reproductibilité du biocapteur pour les dosages de substrat a été étudiée pour douze électrodes de même type, mais préparées séparément. Les capteurs ont été réalisés en série, en respectant soigneusement les mêmes conditions d'immobilisation.

La figure II.21 présente l'intensité de la réponse ampérométrique de 9 électrodes Pt/PEDT/GOD à trois concentrations différentes de glucose : 0,05, 1 et 5 mM.

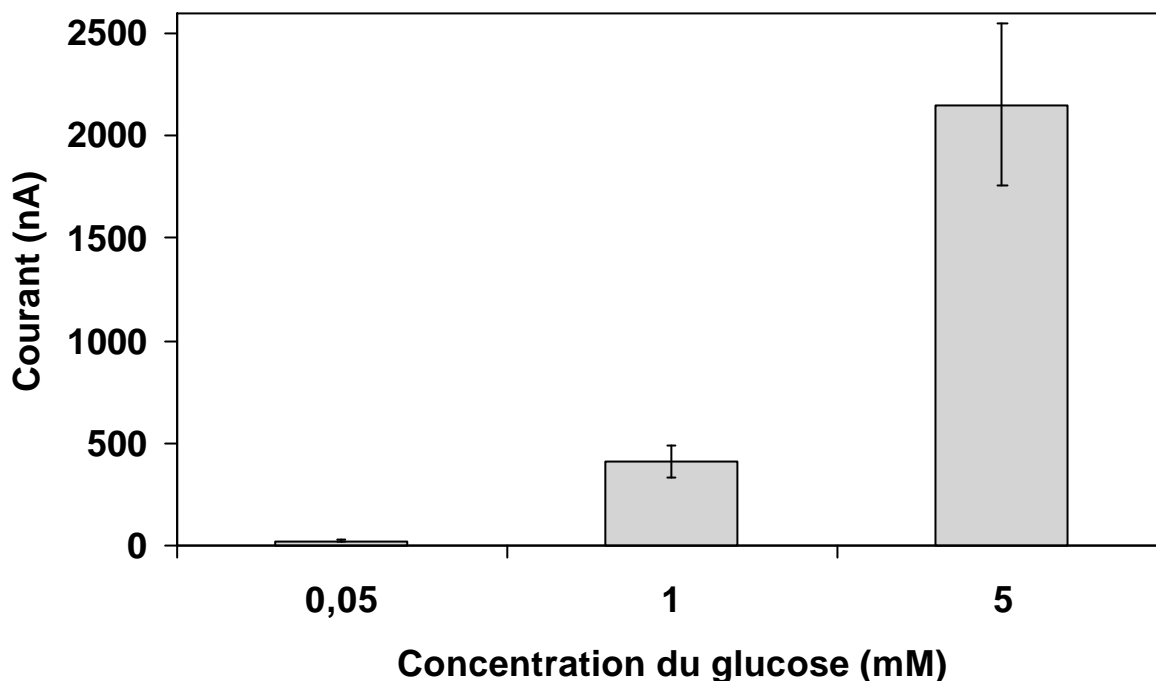


Figure II.21 : *Reproductibilité de la réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD obtenue avec 9 électrodes préparées séparément et pour trois concentrations différentes de glucose. Conditions opératoires : 0,65 V/ECS, 25°C, tampon phosphate 0,01 M pH 7.*

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.1. La méthode de préparation du biocapteur présente une reproductibilité assez intéressante si nous considérons que les électrodes ont été préparées à partir de différentes solutions d'électropolymérisation et sur une période de trois semaines. Les écarts entre les valeurs pourraient provenir d'une variation du dépôt de l'enzyme lors de l'électropolymérisation. La reproductibilité de la réponse d'une même électrode est caractérisée par une variation de 8,5 % obtenue sur 12 mesures consécutives pour 5 mM de glucose.

Tableau II.1 : Résultats statistiques obtenus de l'étude de la reproductibilité de la préparation de l'électrode Pt/PEDT/GOD. Pour l'intervalle de confiance, nous utilisons un niveau de confiance de 95 %, c'est-à-dire $\alpha = 0,05$.

	Concentration du glucose (mM)		
	0,05	1	5
INTERVALLE CONFIANCE [nA]	$24,1 \pm 5,3$	$408,1 \pm 98,7$	2151 ± 519
VARIATION [%]	22	24	24

II.3.2.8 Durée de vie et stabilité des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD

Les biocapteurs sont élaborés afin d'être utilisés comme outils analytiques dans divers domaines, tels que le biomédical, le contrôle de l'environnement, ou l'agroalimentaire. Donc, la fréquence des mesures, ou la manière dont sont utilisées ces sondes dépend de l'application envisagée. Ainsi, elles peuvent être utilisées, soit en continu, soit dans le cadre de tests nombreux et rapprochés, ou encore pour un usage unique. Donc, dans ce contexte la durée de vie et la stabilité des bioélectrodes apparaissent comme l'un des éléments clés de leur application à grande échelle. Dans cette optique, on compare le comportement des bioélectrodes sous deux conditions différentes :

- 1- En utilisation fréquente, on effectue une mesure de la réponse tous les jours.
- 2- En conservation longue durée, on effectue la mesure de réponse une fois par mois.

a Stabilité des bioélectrodes en utilisation fréquente

La stabilité de l'électrode en fonction du temps a été mesurée périodiquement. Nous avons appliqué un usage intermédiaire entre le stockage de l'électrode à basse température et son utilisation en continu. Après la préparation de l'électrode, nous l'avons utilisée pendant 4 heures par jour durant une période de 30 jours avec des concentrations différentes en glucose. Entre ces manipulations et après cette période, le capteur a été conservé dans le tampon

phosphate à 4°C. La figure II.22 présente l'évolution de la réponse du capteur en fonction du temps.

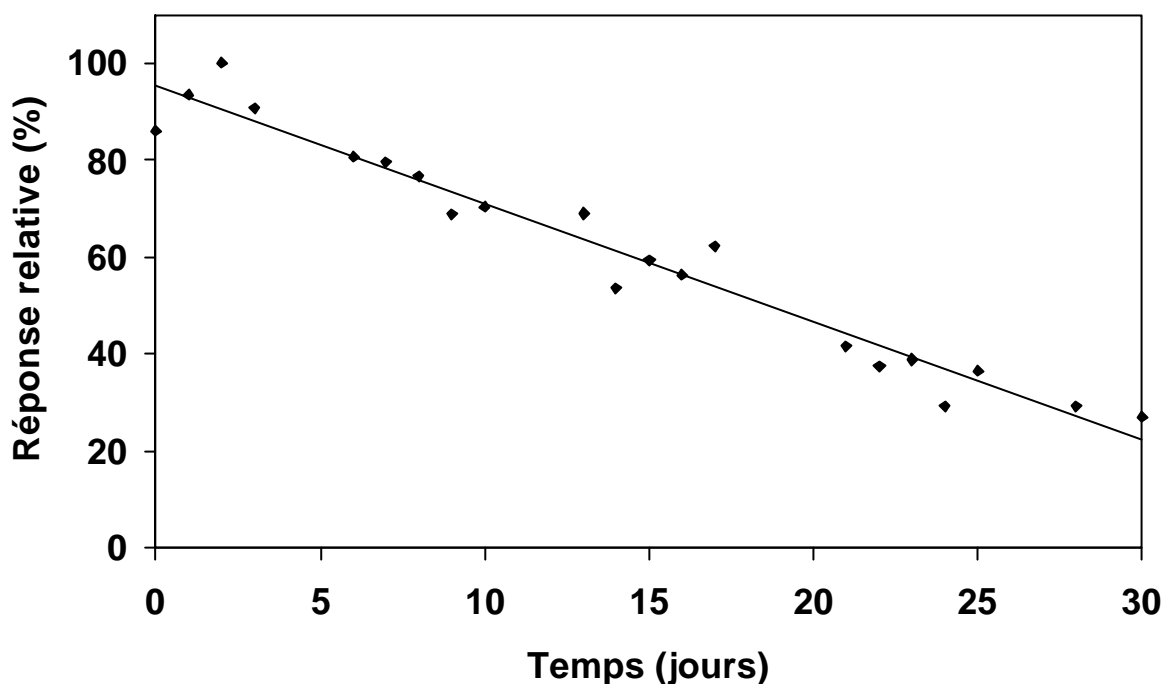


Figure II.22 : Evolution de la réponse ampérométrique du biocapteur (réponse relative rapportée à la réponse maximale) en fonction du temps d'utilisation du biocapteur. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7

Au bout de 30 jours, nous avons observé une diminution de la réponse ampérométrique et nous avons obtenu une réponse résiduelle de 40 % par rapport à la réponse maximale du biocapteur. La diminution de l'activité peut s'expliquer par la dénaturation de l'enzyme proprement dite, par une altération mécanique de la biomembrane ou par la dénaturation de l'enzyme comme conséquence du changement de milieu entre chaque expérience.

b Stabilité des bioélectrodes laissées en conservation

Dans cette étude, nous avons étudié la stabilité de l'électrode pendant le stockage à une température de 4°C dans une solution tampon phosphate pH 7. La figure II.23 présente l'évolution de la réponse en courant au cours du temps pour des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD.

Le biocapteur élaboré pour cette expérience a été testé vis-à-vis de sa réponse au glucose (5 mM) immédiatement après élaboration, puis toutes les quatre semaines. Le biocapteur présente une très bonne réponse après 4 mois de stockage. Nous avons obtenu une réponse résiduelle de 76 % de la réponse maximale.

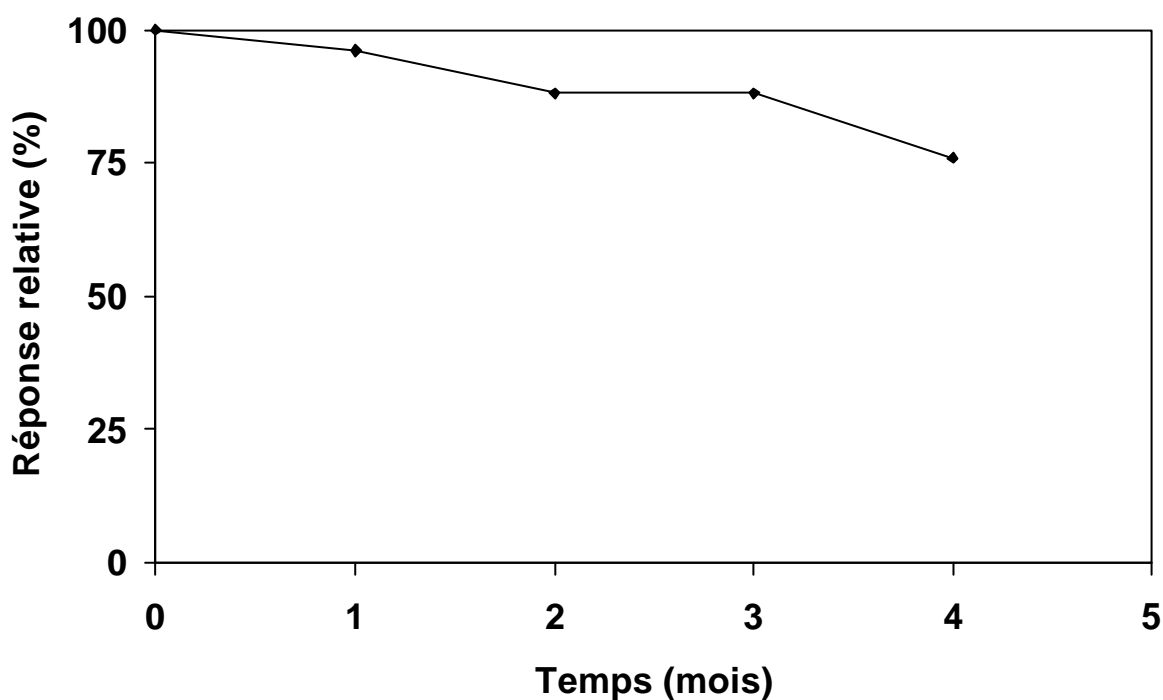


Figure II.23: Evolution de la réponse à 5 mM de glucose en fonction de la durée de stockage pour le biocapteur Pt/PEDT/GOD stocké à 4°C. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

II.4 CONCLUSION

Tout au long de ce chapitre, nous avons présenté l'optimisation d'une électrode enzymatique pour la détection du glucose.

L'élaboration du biocapteur est basée sur l'électropolymérisation de films d'enzyme et de 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT). Cette méthode présente une très grande facilité de mise en œuvre et permet de concevoir des biocapteurs avec des réponses sensibles et rapides. Nous avons analysé tous les paramètres pouvant agir, dans la pratique, sur le comportement de l'enzyme immobilisée : le pH, les concentrations du substrat, du tampon phosphate, la température. Cette analyse nous a permis de déterminer les conditions opératoires optimales d'utilisation de l'électrode, notamment pour son intégration dans un système de mesure en flux continu.

Ces travaux effectués sur les capteurs à glucose ont montré une très bonne faisabilité et aussi une bonne reproductibilité des bioélectrodes. Malgré une faible quantité de l'enzyme piégée la sensibilité est de $15,2 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, la limite de détection de $40 \text{ }\mu\text{M}$, tandis que le domaine de linéarité s'étend entre 0,2 et 8 mM.

Nous avons analysé la possibilité d'utiliser ce polymère conducteur pour effectuer la connexion électrique directe entre l'électrode et le site actif de la GOD de façon à régénérer l'enzyme en l'absence d'oxygène. Dans ce contexte, on n'a pas pu s'affranchir des problèmes de connexion électrique. Cependant ce polymère constitue un outil performant à utiliser comme support pour l'immobilisation d'enzymes.

**CHAPITRE III : REDUCTION DES INTERFERENCES LORS
DE LA DETECTION DU GLUCOSE. APPLICATION DU
SYSTEME BIOCAPTEUR-FIA POUR LE DOSAGE DU
GLUCOSE EN MILIEU BIOLOGIQUE**

III.1 INTRODUCTION

L'une des applications potentielles des biocapteurs à glucose est le suivi des concentrations en glucose dans le corps humain. Plus particulièrement, l'intérêt principal est lié à l'évolution du taux du glucose dans le sang pour le traitement des diabétiques. Cependant, les fluides biologiques sont constitués d'un mélange de molécules dont certaines peuvent induire un courant parasite lors de la détection ampérométrique du glucose. La détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène est très sensible mais peu sélective du fait du potentiel très élevé nécessaire à son électro-oxydation. On peut concevoir que certaines molécules présentes dans le sang puissent être oxydées directement à l'électrode.

L'intégration des biocapteurs dans les systèmes automatisés permet la conduite des différentes étapes de dosage, sans intervention manuelle. L'analyse par FIA présente l'avantage de travailler sur de faibles volumes d'échantillon, avec une vitesse limitée seulement par le temps de réponse du biocapteur. Le système offre la possibilité de faire successivement l'étalonnage, le dosage et le lavage du capteur. Ainsi, la technique FIA est couplée avec l'électrode à glucose oxydase pour le dosage du glucose dans le sang [1].

Dans la première partie de ce chapitre, nous allons utiliser deux stratégies visant à augmenter la sélectivité de la biodétection. La première utilise les propriétés électrocatalytiques de microparticules de platine déposées sur la surface de l'électrode de manière à détecter plus efficacement le peroxyde d'hydrogène. La deuxième exploite les propriétés des médiateurs rédox co-immobilisés avec l'enzyme pour assurer la connexion électrique des enzymes avec les électrodes.

L'intérêt des travaux présentés dans la deuxième partie du chapitre réside dans l'exploitation des propriétés de l'électrode à glucose oxydase mise au point, notamment de son temps de réponse très rapide, en vue de l'intégrer dans le système FIA d'une façon performante, simple et fiable.

III.2 ETUDES DES ESPECES INTERFERENTES

III.2.1 Interférences des espèces électrochimiques

Par leur spécificité, intrinsèque à l'enzyme immobilisée, et leur sensibilité, les biocapteurs Pt/PEDT/GOD constituent des outils analytiques intéressants pour le dosage du glucose.

La finalité d'un biocapteur à glucose est de mesurer de façon très sélective la concentration de ce substrat dans des fluides biologiques. L'utilisation de la glucose oxydase permet de catalyser sélectivement l'oxydation du glucose en gluconolactone et en eau oxygénée. Or, au potentiel d'oxydation de l'eau oxygénée ($\geq 0,5$ V/ECS sur électrode de platine et $\geq 0,8$ V/ECS sur électrode de carbone), certaines espèces présentes dans les fluides biologiques sont susceptibles d'être oxydées. Cette électroactivité se traduit par l'apparition d'un courant parasite perturbant la mesure.

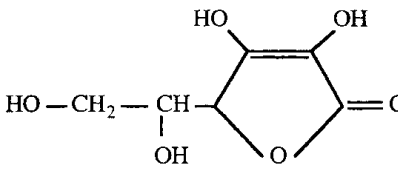
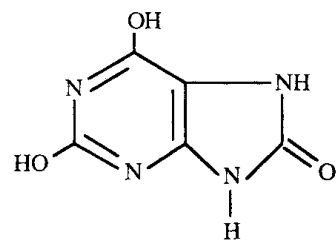
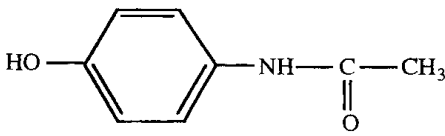
Les interférents électrochimiques de la détection du glucose pour des capteurs basés sur l'électro-oxydation de l'eau oxygénée peuvent être :

interférents endogènes : catécholamine, tyrosine, L-cystéine, glutathion, thymol, acide urique, NADH, acide ascorbique, héparine.

Interférents exogènes : paracétamol, acide acétylsalicylique, catéchol, acide ascorbique, héparine.

Lors des tests de sélectivité des biocapteurs à glucose, trois interférents modèles sont généralement considérés. Parmi eux, deux sont endogènes par nature, il s'agit de l'acide urique et de l'acide ascorbique (ce dernier pouvant cependant être absorbé lors d'un traitement médical) et le dernier est exogène : le 4-acétaminophène, plus connu sous le nom de paracétamol. Il faut noter que les acides ascorbique et urique sont détectés sous leur forme anionique : l'ascorbate et l'urate. La structure chimique de ces trois composés est représentée dans le tableau III.1

Tableau III.1 : Structure chimique des composés interférents électrochimiques dans la détection du glucose.

	Masse Molaire en g.mol ⁻¹	Formule
Acide Ascorbique	176	
Acide Urique	168	
Paracétamol	151	

III.2.2 Optimisation de la détection électrochimique du peroxyde d'hydrogène

La détection du peroxyde d'hydrogène, produit de la réaction enzymatique, intervient à un potentiel relativement élevé (>0,5 V) auquel l'acide ascorbique, l'acide urique et le paracétamol sont également oxydés (autant sur platine que sur carbone). De manière à diminuer le courant parasite dû aux interférents, une des solutions à envisager est la diminution de la surtension d'électro-oxydation de l'eau oxygénée, soit par l'utilisation d'un composé rédox chimiquement oxydable afin de servir de relais d'électrons entre l'eau oxygénée et la surface de l'électrode, soit par l'utilisation de microparticules de métaux nobles qui modifient la surface de l'électrode permettant une augmentation de l'activité catalytique vis-à-vis de l'oxydation de l'eau oxygénée.

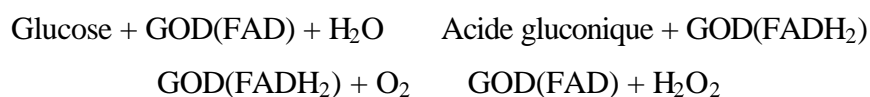
Wang et col. [98] montrent la détection sélective du peroxyde d'hydrogène à un potentiel faible (0-0,2 V/ECS) due à l'activité catalytique de particules de ruthénium utilisées

dans la fabrication d'électrodes imprimées destinées à la détection du glucose et éthanol. Li et col. [99] et Zhang et col. [81] ont proposé l'utilisation d'électrodes platinées pour l'élaboration d'un biocapteur sensible au glucose qui permet de diminuer l'influence des interférents électro-oxydables. Un travail récent de Daly et coll. [100] montre les avantages de la technique du dépôt simultané de microparticules de métaux nobles (ruthénium, rhodium et platine) dans l'élaboration des biocapteurs ampérométriques à glucose. La réponse à l'eau oxygénée, à + 0,1 V, a été 200 fois plus élevée que celle des interférents éventuels.

D'autres auteurs [99, 101-103;] ont aussi décrit une augmentation de la sensibilité à bas potentiel des biocapteurs exploitant cette technique.

III.2.3 Médiateurs rédox pour la connexion électrique

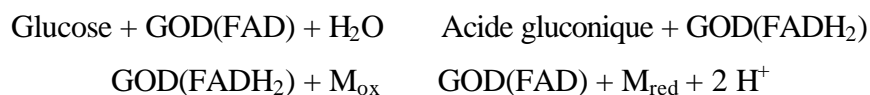
Les biocapteurs ampérométriques qui utilisent une enzyme oxydase pour décomposer un substrat à travers une réaction d'oxydation sont nombreux. Normalement, c'est l'oxygène, l'accepteur naturel d'électrons utilisé par les oxydases :



Finalement, le peroxyde d'hydrogène est oxydé sur l'électrode de platine :



Pour remplacer l'oxygène, de nombreux travaux ont été menés sur des accepteurs d'électrons non physiologiques, appelés médiateurs rédox. Ils ont utilisé, pour l'étude électrochimique, des systèmes rédox biologiques [104]. Ceux-ci peuvent être immobilisés, soit sur la surface de l'électrode, soit dans la couche enzymatique par des méthodes de greffage courantes : adsorption, liaison covalente, électropolymérisation, etc... Pour amener le complexe enzyme réduite-cofacteur vers une ré-oxydation, il est possible d'utiliser un accepteur d'électrons assurant le transport d'électrons entre le site catalytique et l'électrode :



Finalement, sur l'électrode :



L'utilisation des médiateurs rédox dans la préparation de biocapteurs ampérométriques permet de diminuer le potentiel de mesure. Cela peut réduire l'interférence des espèces trouvées généralement dans les milieux biologiques. Si la quantité de médiateur fixée dans la couche enzymatique est suffisante pour obtenir un biocapteur capable de régénérer le cofacteur et avec une sensibilité acceptable, on évite le problème des biocapteurs dépendant de l'oxygène dont les variations de concentration peuvent altérer les caractéristiques de la réponse.

Pour sélectionner le médiateur le plus approprié, on utilise des techniques électrochimiques comme la voltampérométrie cyclique qui fournit des informations électrochimiques importantes sur le médiateur étudié. En général, il est préférable d'utiliser un médiateur avec un potentiel d'oxydation bas et une constante de vitesse élevée pour s'assurer plus tard que la réponse du biocapteur ne sera pas limitée par la cinétique de l'électrode [105]. En résumé, pour arriver à un bon fonctionnement du médiateur, celui-ci doit respecter les contraintes suivantes :

- * Couple rédox réversible
- * Réaction rapide avec l'enzyme réduite
- * Stabilité des formes oxydée et réduite
- * Non réactif avec l'oxygène
- * Faible potentiel de régénération de la forme oxydée du médiateur
- * Non toxicité du composé pour des applications *in vivo*

De nombreux travaux ont été menés sur les médiateurs rédox. Les composés les plus couramment utilisés sont le ferrocène et ses dérivés. Nakabayashi et coll. [70] ont incorporé le ferrocène dans une pâte de carbone pour la fabrication d'un biocapteur à glucose et ont réussi à minimiser les courants parasites apportés par l'acide urique et l'acide ascorbique. Ce médiateur rédox a par ailleurs été fonctionnalisé de manière à être incorporé dans le Nafion [106]. Vidal et col. [107] ont utilisé un dérivé du ferrocène piégé dans un film de polypyrrrole sur une électrode de platine platiné pour améliorer la sélectivité et la sensibilité d'un

biocapteur à cholestérol. Les propriétés rédox des colorants comme le bleu de Prusse ont aussi été utilisées pour la fabrication des biocapteurs à glucose [108].

D'autres médiateurs comme le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) [109, 110], tétrathiafulvalène (TTF) [111], bleu de méthylène [112], 2,6-dichlorophénolindophénol [112], p-benzoquinone [113] ont été aussi incorporés dans une pâte de carbone pour améliorer la sélectivité des biocapteurs.

Les quinones sont aussi utilisées pour la connexion électrique de la GOD à l'électrode. Becerik [114] a utilisé une benzoquinone piégée dans un film de polypyrrole.

Serra et col. [115] ont décrit un matériel composite (téflon/graphite/ferrocène) pour la détermination du L-lactate. Milagres et col. [116] ont utilisé l'hexacyanoferrate dans l'élaboration d'un biocapteur pour la détection du salicylate.

III.2.4 Matériels et méthodes

III.2.4.1 Réactifs

La 1,4-benzoquinone, l'acide urique, l'acide L-ascorbique, le 4-acétamidophénol (paracétamol) et l'acide chloroplatiné (H_2PtCl_6 , $6\text{H}_2\text{O}$) sont fournis par SIGMA.

Le sérum synthétique ACCUTROLTM normal et ACCUTROLTM abnormal sont fournis par SIGMA DIAGNOSTICS.

Les autres réactifs utilisés ont déjà été décrits dans la partie expérimentale du chapitre II.

III.2.4.2 Méthodes

a Platinisation des électrodes

Pour cette méthode nous avons utilisé une solution de H_2PtCl_6 2 mM dans une solution de HCl 0,1 M. L'électrodéposition de microparticules de Pt sur les électrodes est effectuée à un potentiel de $-0,3$ V/ECS pendant 10 minutes. Les électrodes sont ensuite rincées dans l'eau désionisée.

b Préparation des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD/BQ

Les bioélectrodes Pt/PEDT/GOD/BQ sont obtenues de la même façon que celle présentée dans la section II.2.3.1. Nous avons ajouté à la solution d'électropolymérisation 5 mM de la benzoquinone (BQ). Les conditions d'électropolymérisation ont déjà été décrites dans le même paragraphe.

III.2.5 Résultats et discussion

III.2.5.1 Réponse des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD aux interférents électro-oxydables

Dans un premier temps, l'étude de la réponse de trois interférents (ascorbate, urate et paracétamol) sur une électrode de platine nue a été effectuée (figure III.1).

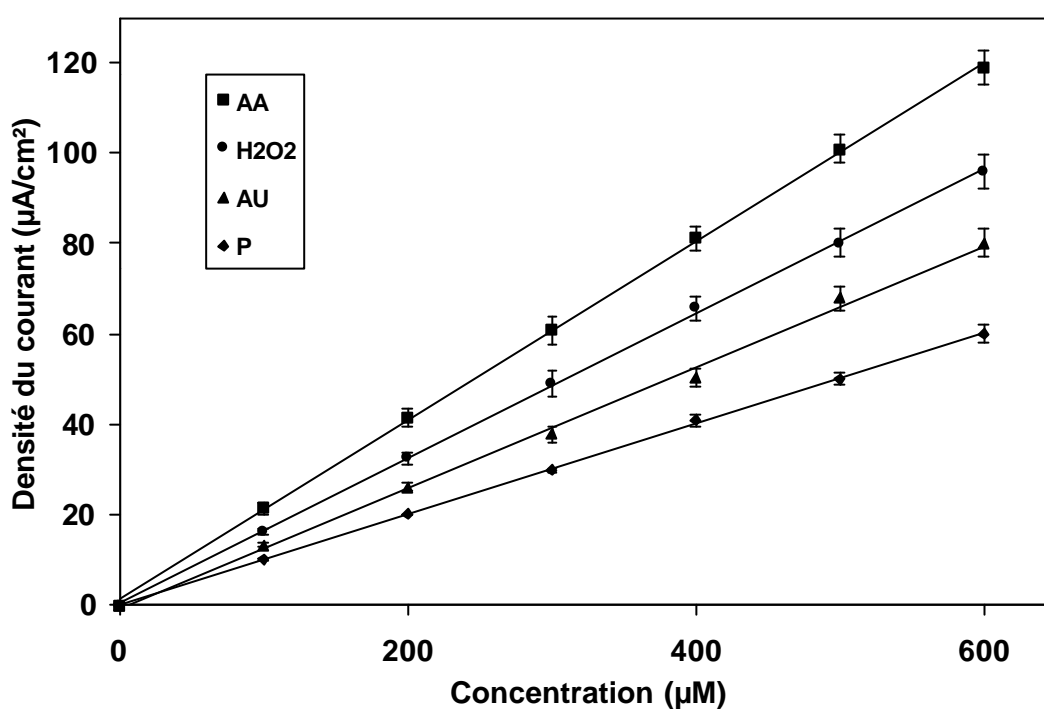


Figure III.1 : Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide ascorbique (AA), de l'acide urique (AU) et du paracétamol (P) sur une électrode Pt nue. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Les interférents considérés sont électroactifs au potentiel de détection du peroxyde d'hydrogène. Leur réponse est comparée à celle observée en présence de concentrations égales de peroxyde d'hydrogène.

L'étude de l'influence des interférents sur la réponse du biocapteur à glucose a été effectuée par le tracé de la courbe d'étalonnage d'une bioélectrode en présence (200 μ M d'urate et de paracétamol et 400 μ M d'ascorbate) et en l'absence d'interférents.

Les figures III.2, III.3 et III.4 montrent qu'en présence des composés électro-oxydables, les courants mesurés dans tout le domaine de concentration du glucose sont plus élevés qu'en leur absence. Le parallélisme des courbes indique que ce phénomène est indépendant de la concentration du glucose et que le mécanisme d'interférence mis en jeu serait électrochimique plutôt qu'enzymatique. Cependant, Lowry et coll. [73] ont observé une diminution de la réponse en présence d'ascorbate dans le cas d'un biocapteur élaboré par immobilisation de la glucose oxydase dans une matrice de poly(phénylènediamine). Ils ont attribué cette altération de la réponse du capteur à une consommation du peroxyde d'hydrogène engendrée par l'oxydation de l'ascorbate par H_2O_2 . Palmisano et Zambonin [117] suggèrent que la diminution et l'instabilité de la réponse du biocapteur au glucose en présence d'ascorbate sont dues à une passivation de l'électrode causée par les produits d'oxydation de l'ascorbate.

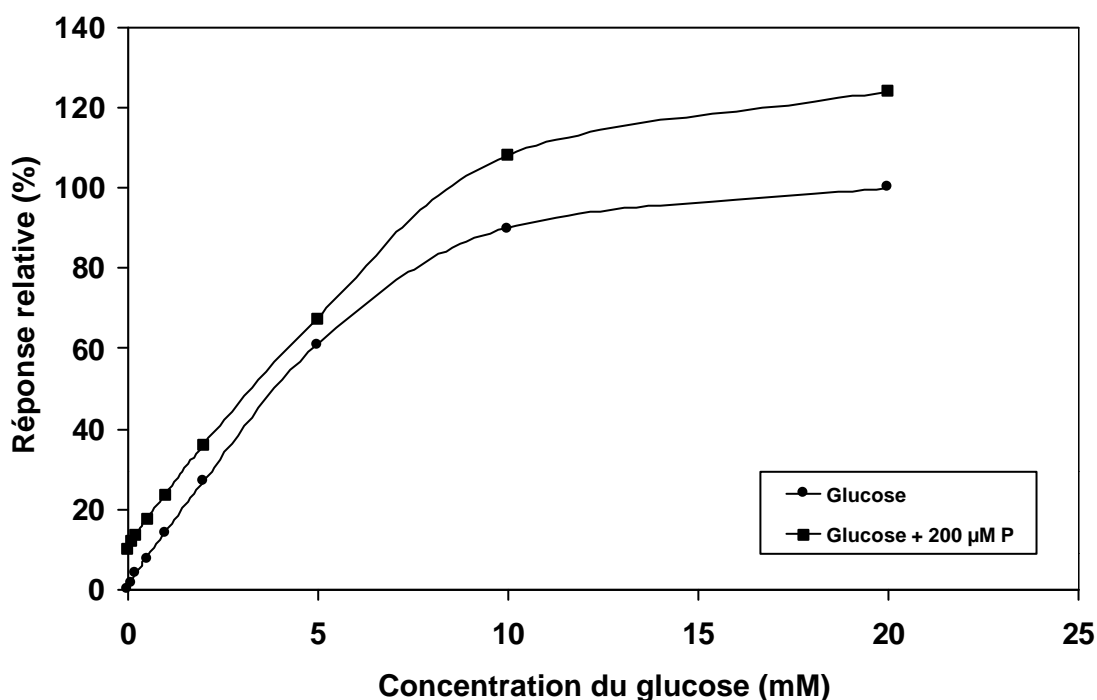


Figure III.2 : Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD au glucose en l'absence () et en présence () de 200 μ M de paracétamol. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7.

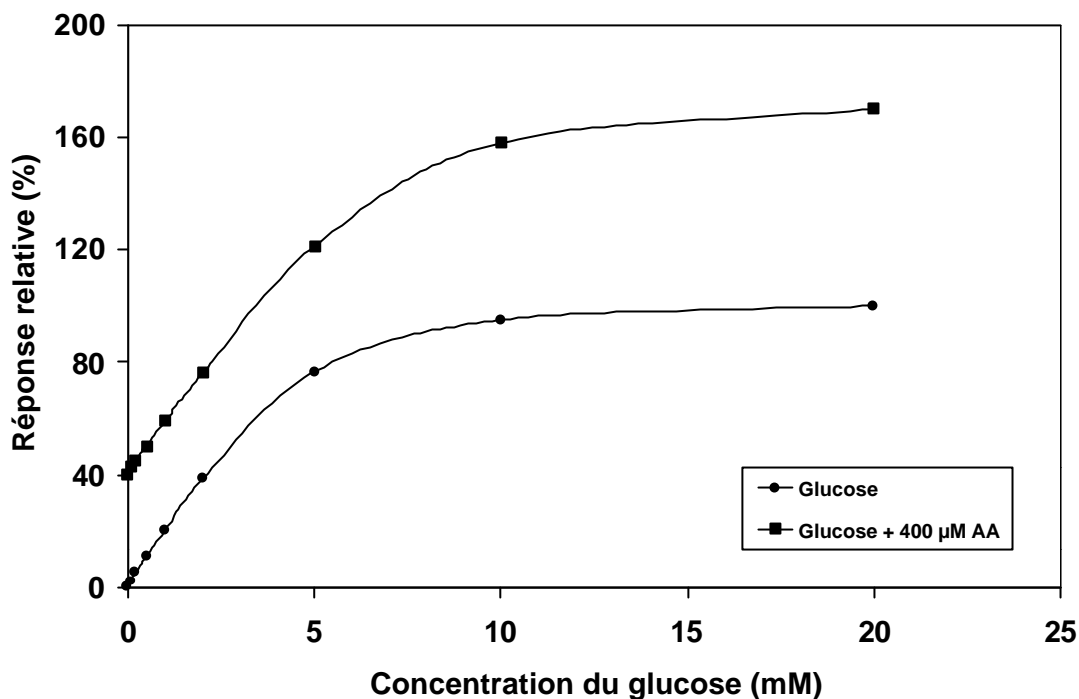


Figure III.3 : Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD au glucose en l'absence () et en présence () de 400 μ M d'acide ascorbique. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7.

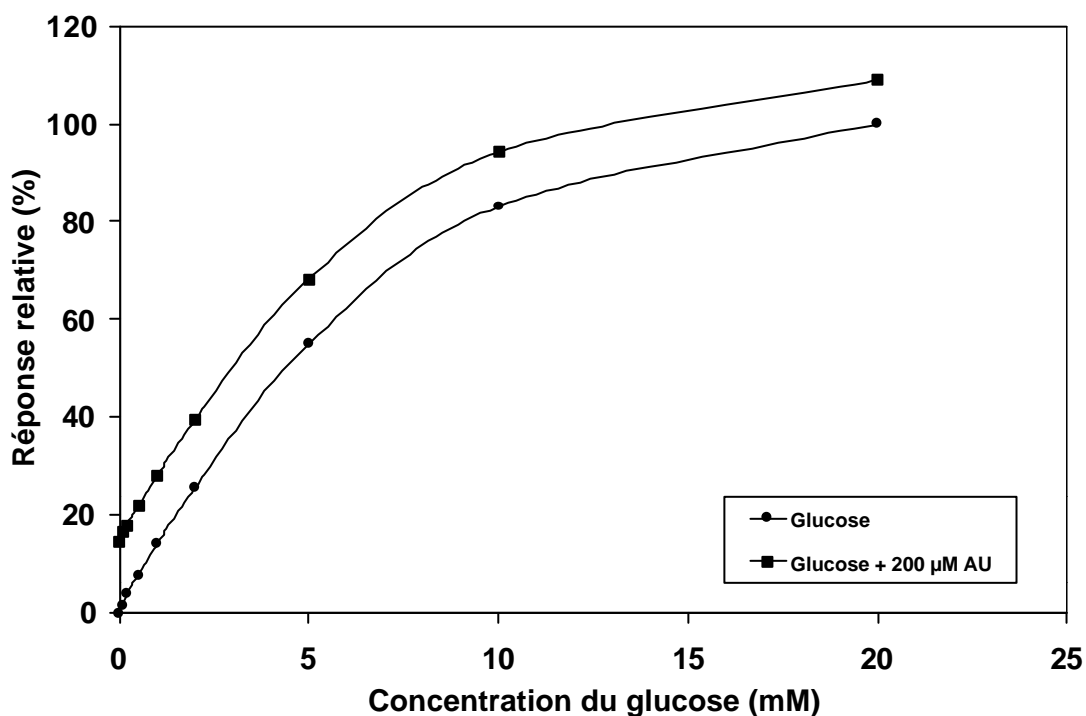


Figure III.4 : Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD au glucose en l'absence () et en présence () de 200 μ M d'acide urique. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7.

Enfin, nous avons pris comme modèle l'acide ascorbique pour tester la sélectivité du biofilm et nous avons comparé la réponse du biocapteur au peroxyde d'hydrogène et à l'acide ascorbique pour une même concentration finale (1 mM). Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux d'une électrode de platine nue (tableau III.2). Nous avons observé qu'en effet, la sélectivité des molécules d'enzyme n'est pas suffisante pour lever l'interférence de certaines molécules électro-actives qui sont détectées directement par le transducteur ampérométrique. Les courants recueillis sont, en comparaison, plus faibles en présence de la couche enzymatique car celle-ci freine l'accès de ces molécules vers l'électrode. Le phénomène est plus marqué pour l'acide ascorbique qui est de taille plus encombrante que H_2O_2 .

Tableau III.2 : Comparaison des courants obtenus avec une électrode de platine nue et une électrode de Pt modifiée. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7 qui contient 1 mM de peroxyde d'hydrogène ou d'acide ascorbique.

Electrode	$I_{H_2O_2}$ (μA)	I_{AA} (μA)	$I_{H_2O_2}/I_{AA}$
Pt	3,1	4,8	0,6
Pt/PEDT/GOD	2,6	1,4	1,8

III.2.5.2 Réponse des électrodes Pt/PEDT/GOD aux espèces interférentes

Afin d'évaluer l'influence des espèces interférentes sur la réponse au glucose de nos biocapteurs Pt/PEDT/GOD, l'étude de la réponse aux trois interférents modèles cités ci-dessus a été effectuée. Les concentrations utilisées pour les différentes espèces sont les suivantes : 5 mM de glucose, 400 μM d'ascorbate, 200 μM de paracétamol, 200 μM d'urate. Ces valeurs respectent les proportions interférent/glucose que l'on peut rencontrer dans des échantillons de sang. Les résultats sont présentés sur la figure III.5.

Nous observons que la réponse des trois interférents représente un pourcentage important de la réponse au glucose (80 % pour l'acide ascorbique, 50 % pour l'acide urique et 39 % pour le paracétamol), ce qui est considérable pour les dosages dans des milieux biologiques.

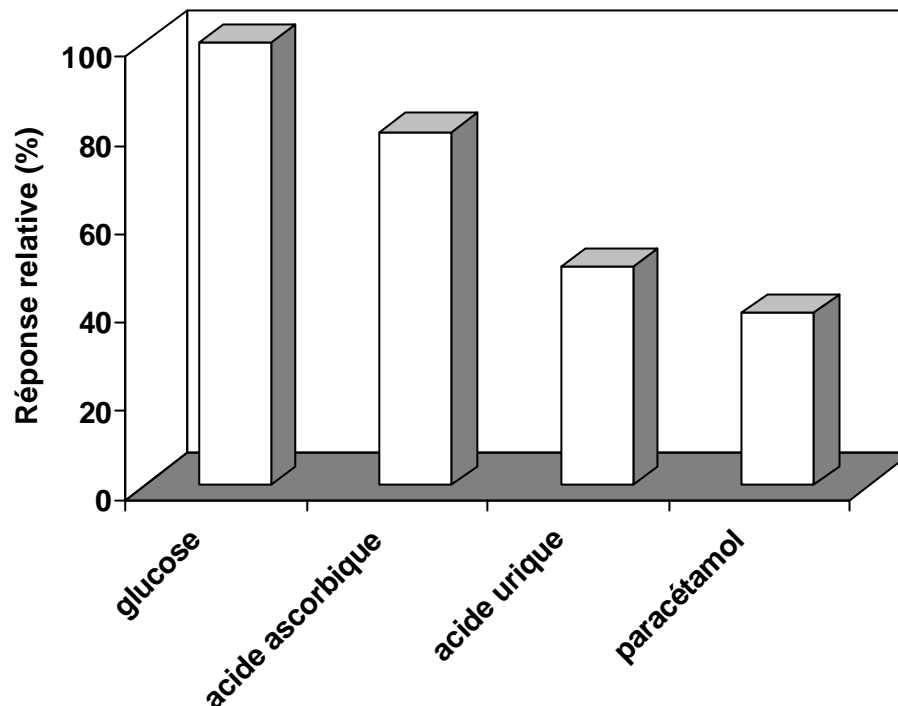


Figure III.5 : Réponses relatives dans les conditions d'utilisation possibles du biocapteur en milieu biologique du glucose (5 mM), de l'ascorbate (400 μ M), du paracétamol (200 μ M) et de l'urate (200 μ M) pour une électrode Pt/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Il est donc primordial de travailler à un potentiel conduisant à une réponse optimale des bioélectrodes au glucose tout en minimisant les courants interférents. Pour cette expérience, nous avons étudié la réponse en courant des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD au glucose et aux interférents à 0,4 V/ECS. La figure III.6 montre que la réponse des interférents diminue quand le potentiel passe de 0,65 à 0,4 V/ECS (75 % pour l'acide ascorbique, 45 % pour l'acide urique et 21 % pour le paracétamol). Cependant à 0,4 V/ECS, nous observons une perte de réponse en courant au glucose de 20 % par rapport à la réponse à 0,65 V/ECS.

Il s'avère donc que le biocapteur ainsi réalisé n'est pas bien adapté aux mesures des échantillons réels contenant les espèces interférentes essayées. Une amélioration du biocapteur est donc nécessaire afin d'augmenter la sélectivité du dosage.

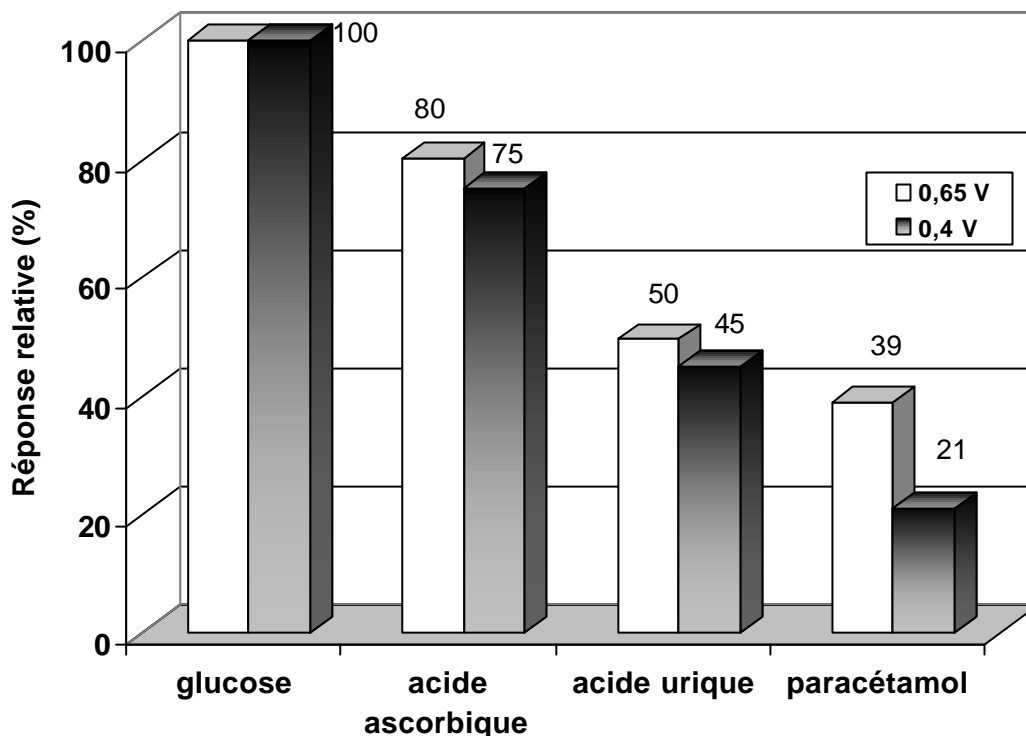


Figure III.6 : Réponses relatives au glucose à 0,65 V (5 mM), de l'ascorbate (400 μ M), du paracétamol (200 μ M) et de l'urate (200 μ M) pour une électrode Pt/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et à 0,4 V/ECS ; à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7.

III.2.5.3 Platinisation des électrodes

Dans cette optique, nous avons choisi de mettre à profit les propriétés électrocatalytiques de microparticules de métaux nobles. Dans une première étape, nous avons procédé à l'électrodéposition du platine sur une électrode de platine à partir d'une solution contenant un sel métallique précurseur. Dans une deuxième étape, nous avons immobilisé l'enzyme comme nous l'avons déjà décrit dans le chapitre 2. Les bioélectrodes ainsi élaborées ont montré de meilleures caractéristiques analytiques.

Après avoir préparé les électrodes, nous avons évalué les caractéristiques du biocapteur afin de les comparer avec les bioélectrodes non platinées (Pt/PEDT/GOD). La figure III.7 présente les courbes d'étalonnage des bioélectrodes platinées Pt(Pt)/PEDT/GOD à 0,65 et 0,3 V/ECS. Un résumé des caractéristiques analytiques est présenté dans le tableau III.3.

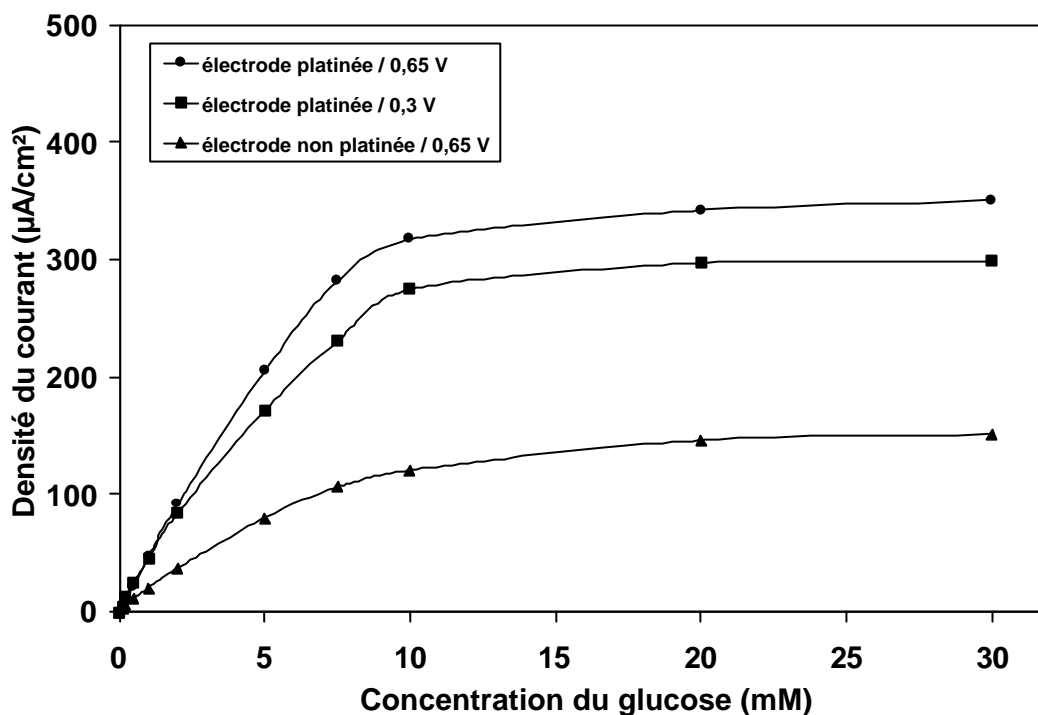


Figure III.7 : Courbe d'étalonnage des bioélectrodes platinées Pt(Pt)/PEDT/GOD à () 0,65V/ECS et à () 0,3 V/ECS et des bioélectrodes non platinées Pt/PEDT/GOD à () 0,65V/ECS. Mesures effectuées à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7.

Tableau III.3 : Caractéristiques des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD et Pt(Pt)/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7

Bioélectrode	Potentiel de mesure (V)	Sensibilité de la partie linéaire (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Domaine de linéarité (mM)
Pt/PEDT/GOD	0,65	15,2	0,2-8
Pt(Pt)/PEDT/GOD	0,65	44,2	0-8
Pt(Pt)/PEDT/GOD	0,30	42,3	0-8

Par rapport à une électrode non platinée, la sensibilité est plus élevée pour les biocapteurs élaborés sur une surface platinée. L'électrodéposition de platine a pour effet d'augmenter la sensibilité des bioélectrodes Pt/PEDT/GOD d'environ 100 %. Ce phénomène a déjà été observé par Bélanger et coll. [118]. Ils ont montré que l'inclusion de platine dans un biofilm polypyrrole/GOD permet d'augmenter la sensibilité des biocapteurs d'environ 40 %.

Le fait de pouvoir détecter le peroxyde d'hydrogène à un potentiel beaucoup moins élevé devrait permettre de diminuer les courants parasites dus aux interférents électro-oxydables.

Pour étudier ce phénomène, nous nous sommes attachés à évaluer la réponse des interférents électro-oxydables (ascorbate, urate et paracétamol) sur les bioélectrodes Pt(Pt)/PEDT/GOD. Les résultats sont exposés dans la figure III.8. Les taux d'interférence de chacun des composés électro-oxydables (ascorbate, urate, paracétamol) ont été calculés par rapport à la réponse au glucose. Les courants parasites générés par l'oxydation à 0,3 V des interférents sont inférieurs à ceux observés sur l'électrode non platinée (54 %, 42 % et 2 % pour l'ascorbate, l'urate et le paracétamol respectivement).

En conclusion, la platinisation de l'électrode met en évidence l'effet catalytique de particules métalliques, ce qui permet d'utiliser une surtension d'oxydation plus faible du peroxyde d'hydrogène sur électrode de platine. De cette façon, nous avons amélioré la sensibilité relative de la détection du glucose. La réponse cumulée aux trois interférents (aux concentrations indiquées) représente 98% de la réponse du glucose (contre 169% dans le cas d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD). Cependant, la sélectivité des biocapteurs ainsi élaborés

reste encore un problème à résoudre pour leur applicabilité à la détection du glucose dans les fluides biologiques.

Pour tester la réponse du biocapteur Pt(Pt)/PEDT/GOD dans un milieu réel, nous avons utilisé du sérum synthétique déjà dosé par la procédure N° 17-UV/18-UV (enzymatique, hexokinase) par Sigma Diagnostics®. Le produit Accutrol™ est une préparation lyophilisée, dosée contenant des enzymes d'origine humaine, des analytes dans une base de sérum humain. Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé une préparation avec des concentrations de glucose comprises dans la gamme des valeurs normales trouvées dans le sérum à jeun (Accutrol™ normal) et une autre préparation avec des concentrations de glucose élevées par rapport à la gamme des valeurs normales dans le sérum (Accutrol™ anormal). Les résultats sont présentés dans le tableau III.4.

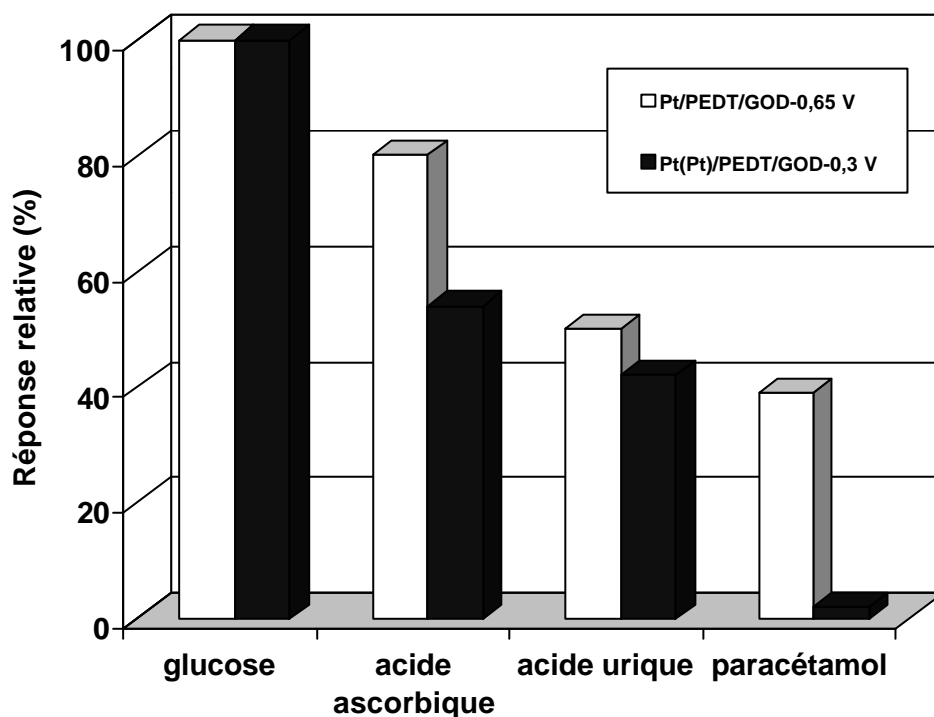


Figure III.8 : Réponses relatives au glucose (5 mM), de l'ascorbate (400 μ M), du paracétamol (200 μ M) et de l'urate (200 μ M) pour une électrode Pt/PEDT/GOD et Pt(Pt)/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et à 0,3 V/ECS ; à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7.

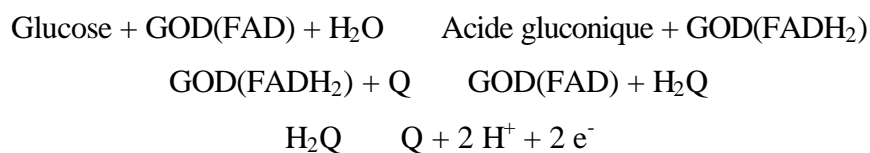
Tableau III.4 : Comparaison des résultats du dosage de glucose dans le sérum, obtenus avec le biocapteur Pt/PEDT/GOD, le biocapteur Pt(Pt)/PEDT/GOD et la procédure Sigma.

	Accutrol ^{1M} normal (mM)	Accutrol ^{1M} anormal (mM)
Pt/PEDT/GOD 0,65 V	7,3 ± 0,2	36,4 ± 0,9
Pt(Pt)/PEDT/GOD 0,65 V	5,6 ± 0,6	19,0 ± 1,2
Pt(Pt)/PEDT/GOD 0,3 V	4,4 ± 0,5	14,0 ± 0,4
Sigma (enzymatique, hexokinase)	5,3 ± 1,1	18,9 ± 2,2

Nous pouvons constater que la stratégie de la platinisation contribue à se rapprocher de la valeur obtenue avec une méthode couramment utilisée dans les laboratoires d'analyses. Les résultats plus élevés obtenus avec une électrode non platinée pourraient être dus aux espèces interférentes présentes dans l'échantillon (acide urique, paracétamol et salicylate).

III.2.5.4 Elaboration d'un biocapteur Pt/PEDT/GOD/BQ

Dans la continuité de l'étude des interférents, nous avons utilisé la benzoquinone comme médiateur rédox afin d'améliorer la sélectivité du biocapteur. Le mécanisme réactionnel proposé est le suivant :



Q et H₂Q sont les formes oxydée et réduite de la benzoquinone.

De manière à mettre en évidence la connexion électrique de l'enzyme à l'électrode via les molécules de benzoquinone, nous avons effectué une courbe d'étalonnage du glucose en présence du médiateur rédox en solution et en milieu anaérobie (Figure III.9). Cette expérience montre la régénération effective de l'enzyme par le médiateur rédox en l'absence d'oxygène.

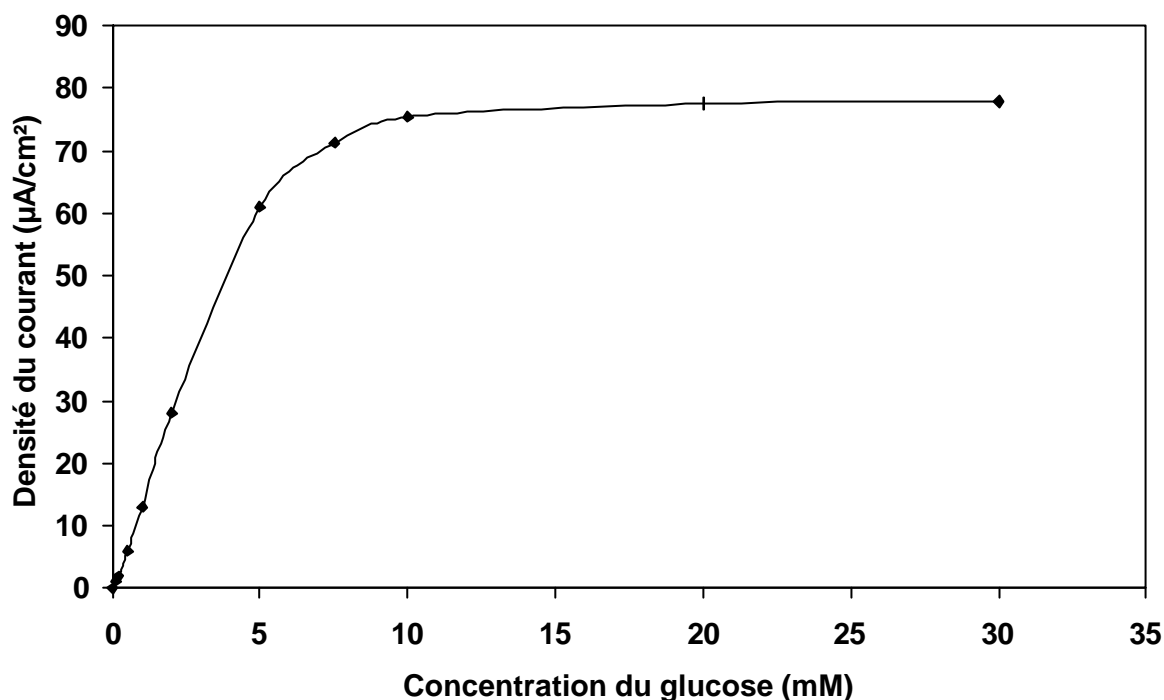


Figure III.9 : Courbe d'étalonnage établie en milieu anaérobie d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD. Concentration de la benzoquinone en solution = $5 \cdot 10^{-4}$ M. Mesures effectuées à 0,2 V/ECS ; à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M, pH 7, sous atmosphère d'argon.

La rétention du médiateur dans la matrice de polymère permettrait la ré-oxydation électrochimique du cofacteur de l'enzyme et la détection ampérométrique du glucose.

Le comportement de la bioélectrode est mis en évidence par le tracé de courbes de voltampérométrie cyclique en l'absence et en présence de glucose (figure III.10). En présence de glucose, la courbe montre une augmentation du courant du pic d'oxydation du groupement rédox associée à une diminution de l'intensité du pic de réduction. Ce phénomène est

caractéristique d'une oxydation catalytique et peut être relié à la réduction de la benzoquinone par la glucose oxydase à l'état réduit. Pourtant le pic d'oxydation retrouvé à environ 0,2 V est décalé par rapport au potentiel formel d'oxydation placé à 0,280 V [104].

Le potentiel d'oxydation du système permet la détection du glucose à un potentiel moins anodique et ainsi améliorer la sélectivité dans des conditions réelles d'analyse.

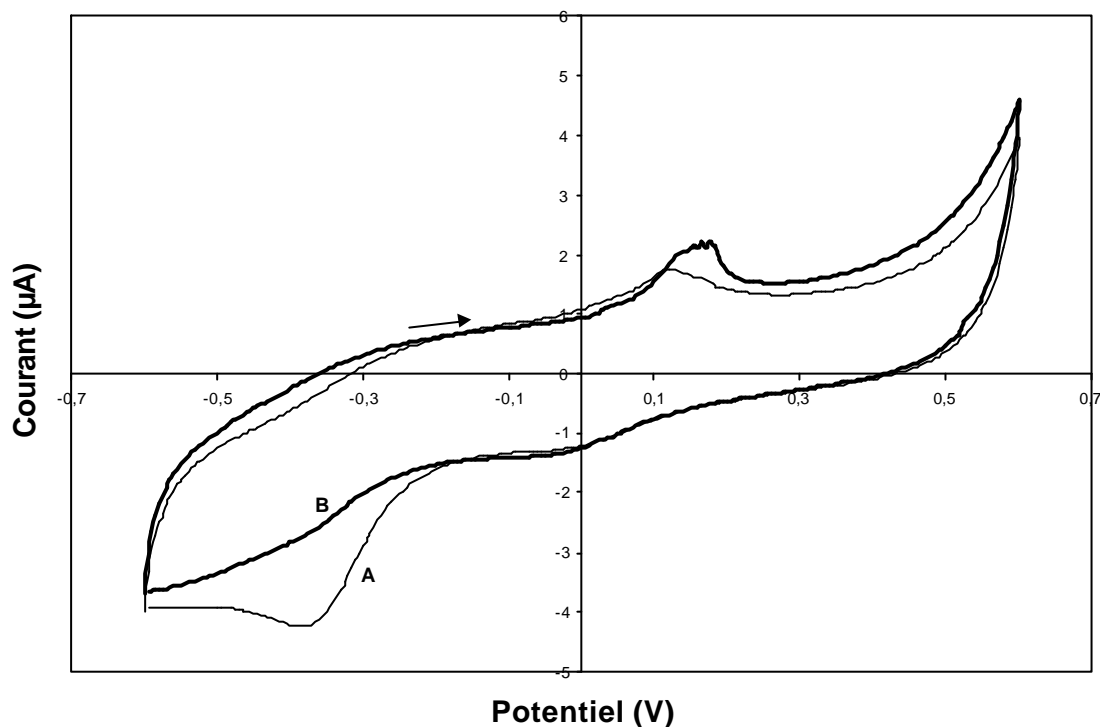


Figure III.10 : Voltampérogrammes en absence (A) et en présence (B) de glucose (5 mM) d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD/BQ. Mesures effectuées à 10 mV/s et 25 °C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

La figure III.11 présente la courbe d'étalonnage du biocapteur. La bioélectrode montre une augmentation rapide du signal de 0 à 5 mM et une sensibilité de $800 \mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ correspondant à ce domaine. Le temps de réponse est de 10 secondes. Nous avons utilisé ce biocapteur pour tester les interférents électro-oxydables. Les résultats sont présentés dans la figure III.12. L'élaboration des bioélectrodes en utilisant la benzoquinone comme médiateur rédox, présente une sensibilité faible mais permet de réduire assez considérablement

l'interférence du paracétamol. Cependant, le biocapteur n'offre aucun avantage en ce qui concerne l'ascorbate et l'urate. La faible sélectivité des bioélectrodes peut s'expliquer par une faible rétention de la benzoquinone dans la matrice polymère ou par une perte du médiateur dans l'étape d'électropolymérisation. Il serait donc nécessaire de mettre en œuvre un nouveau mode opératoire permettant de fixer de façon plus efficace le médiateur rédox à la matrice polymère afin de diminuer les interférents électro-oxydables.

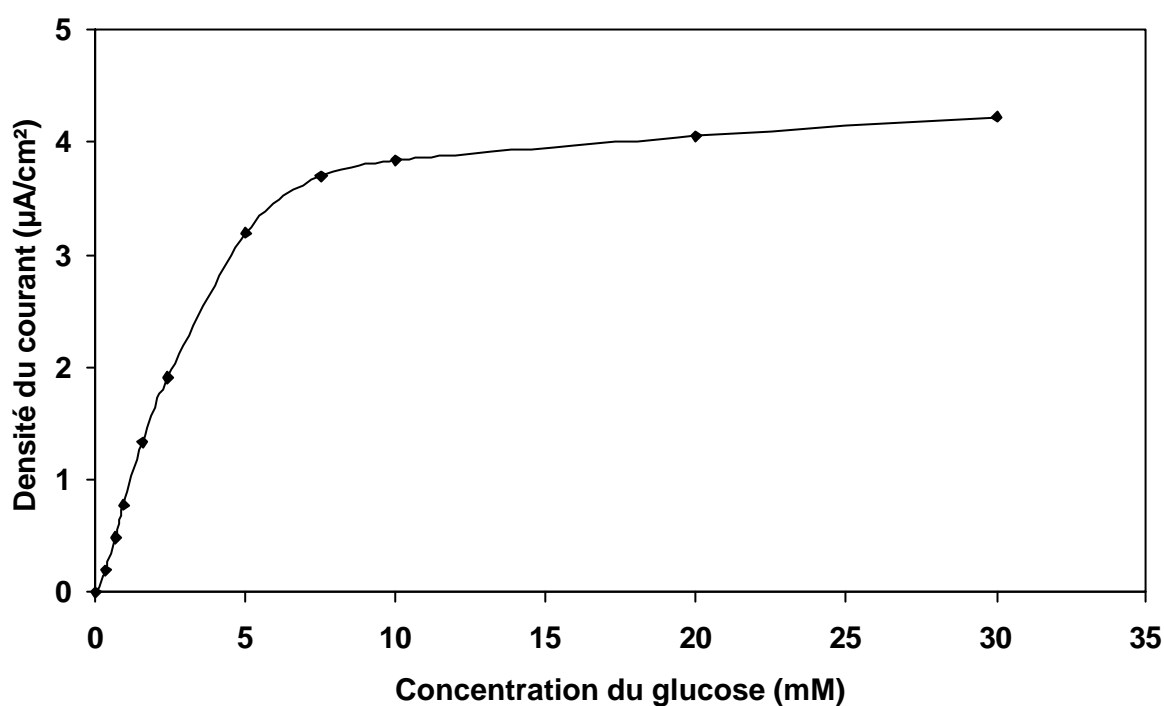


Figure III.11 : Courbe d'étalonnage d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD/BQ. Mesures effectuées à 0,2 V/ECS ; à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

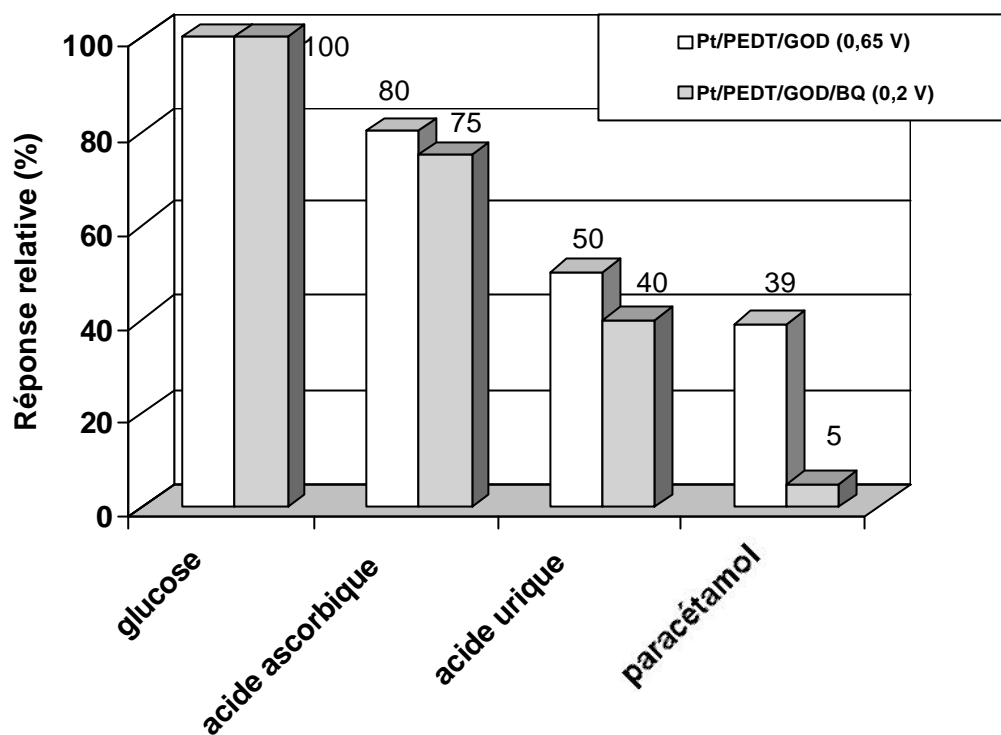


Figure III.12 : Réponses relatives au glucose (5 mM), de l'ascorbate (400 μ M), du paracétamol (200 μ M) et de l'urate (200 μ M) pour une électrode Pt/PEDT/GOD et Pt/PEDT/GOD/BQ. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et à 0,2 V/ECS respectivement; à 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

III.3 ANALYSE PAR INJECTION EN FLUX CONTINU (FIA)

III.3.1 Principe

L'analyse par injection en flux continu (technique d'analyse maintenant largement développée) est basée sur l'injection d'un échantillon liquide dans un flux porteur continu constitué d'un réactif convenablement choisi. L'échantillon injecté forme une zone qui, durant son transfert vers un détecteur, se disperse et réagit avec les composants du flux porteur. La forme et l'amplitude des pics détectés expriment la concentration de la substance injectée et fournissent des informations cinétiques sur les réactions chimiques se produisant dans le flux continu.

Le mode d'injection en flux continu le plus simple et le plus souvent adopté est présenté sur la Figure III.13.

La FIA a été appliquée au dosage de nombreux composés en phase liquide. Cependant, la rapidité de l'analyse peut être limitée par le détecteur, comme dans notre cas avec l'électrode enzymatique. Les courbes de réponse n'atteignent pas le plateau correspondant à l'état stationnaire (comme dans le cas de la mesure en batch), mais se présentent sous forme de pic de réponse correspondant à la concentration du substrat à détecter.

La Figure III.14 permet de comparer l'influence du temps de réponse de l'électrode enzymatique sur la hauteur et la forme du pic obtenu par le système FIA avec la réponse en système en batch. En travaillant avec un capteur à réponse rapide, il est possible de raccourcir le temps correspondant au cycle de mesure, tout en assurant un pic élevé, ce qui améliore le rapport signal/bruit.

III.3.2 Caractéristiques d'un système FIA

Sa caractéristique la plus intéressante est sa reproductibilité. Elle peut être attribuée aux propriétés suivantes du système :

- l'injection rapide et ponctuelle de l'échantillon
- le pilotage exact et reproductible des pompes et des vannes (analyse en temps fixe)
- le contrôle de la dispersion de l'échantillon entre l'injection et la détection.

Ces facteurs contribuent à réduire significativement le temps d'analyse et à supprimer l'attente des états stationnaires avant d'effectuer les mesures. De plus, l'automatisation du système FIA présente les avantages suivants :

- réduction des coûts de main-d'œuvre
- amélioration de l'exactitude et de la précision
- possibilité d'utilisation dans des analyses à risques pour l'homme
- réduction du temps d'analyse, donc augmentation du nombre d'échantillons dosés.

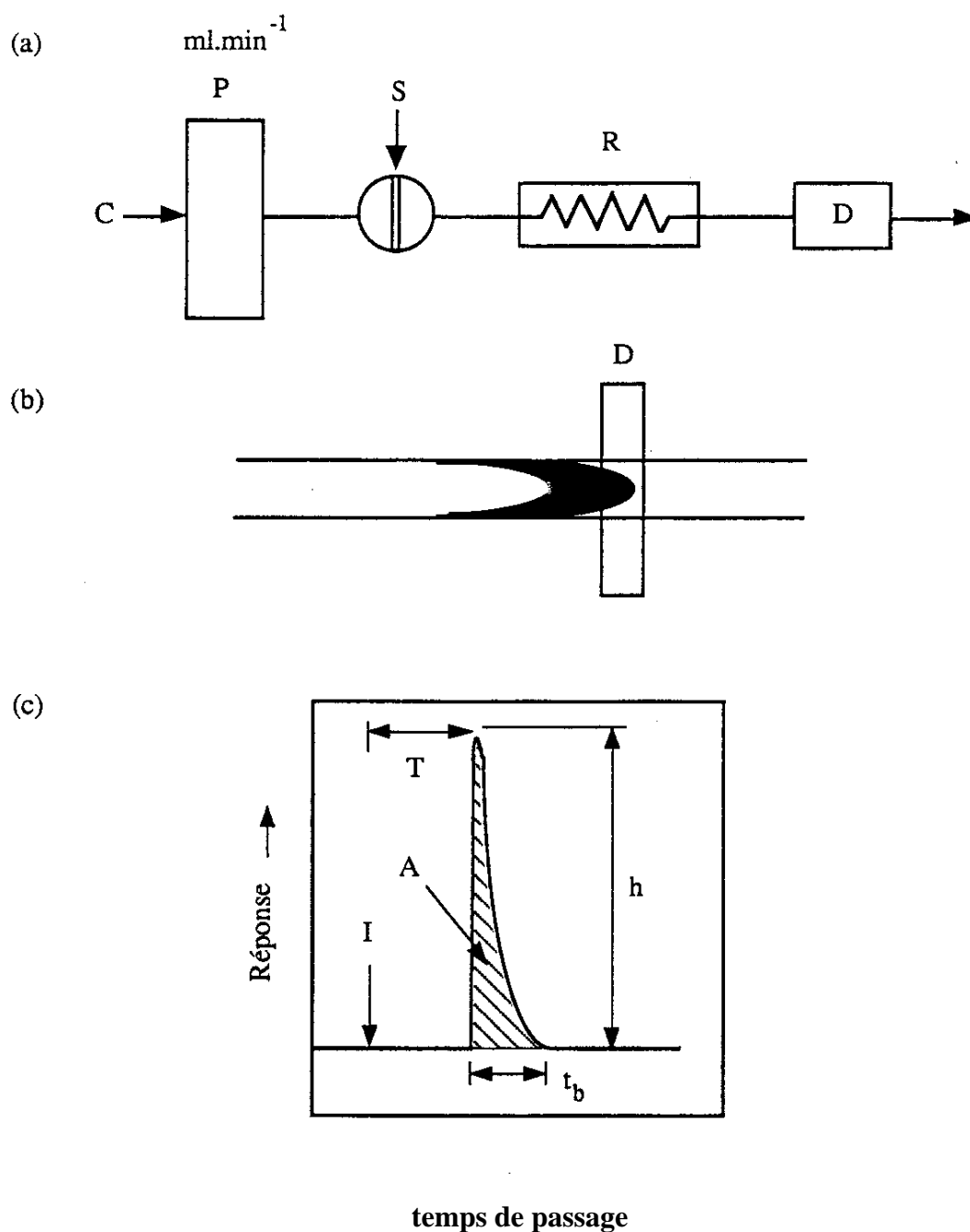


Figure III.13 : (a) Configuration la plus simple d'un système FIA à un seul passage : C : flux porteur ; P : pompe ; S : vanne d'injection ; R : réacteur ; D : détecteur. (b) Zone de dispersion de l'échantillon dans le flux porteur. (c) Pic caractéristique enregistré sous flux continu : I : point d'injection ; T : temps mort ; h : hauteur du pic ; t_b : largeur du pic à la base ; A : aire du pic.

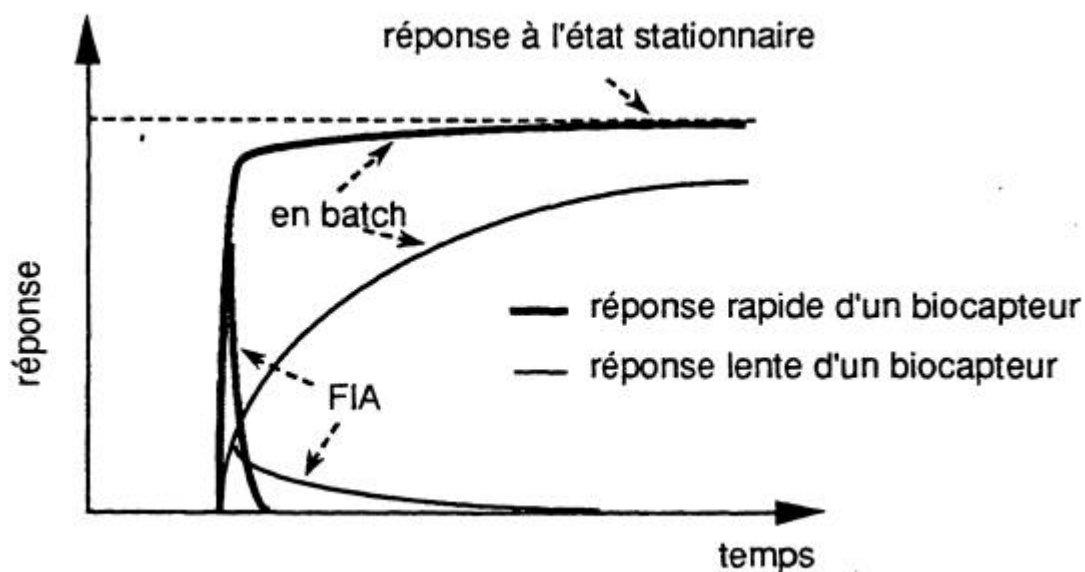


Figure III.14 : Réponses d'électrodes enzymatiques en batch et en système FIA

III.3.3 Utilisation des enzymes immobilisées en FIA

Par leur sélectivité et leur faible coût, les enzymes immobilisées représentent des compléments attrayants aux avantages propres du système FIA. Elles offrent ainsi des potentialités supérieures à celles des enzymes travaillant en mode batch, utilisées auparavant. Lorsque la technique enzymatique est combinée avec une méthode FIA, les détecteurs électrochimiques sont les plus fréquemment utilisés. La combinaison des enzymes immobilisées avec une méthode FIA a été décrite à partir de 1982. Grâce à ses avantages (sélectivité, simplicité, fiabilité et rapidité), la FIA en association avec les techniques enzymatiques est devenue un excellent système analytique et le nombre de ses applications a augmenté rapidement dans différents domaines : médecine [119, 120], alimentation [121], environnement [122, 123], analyse de la biomasse, pharmacie, contrôle de bioprocédés [124, 125].

Dans un système FIA, les électrodes solides (platine ou carbone vitreux) sont fréquemment utilisées pour la détection de substances électroactives (eau oxygénée ou NADH) générées par une réaction enzymatique dans un bioréacteur [126].

III.3.4 Matériels et méthodes

III.3.4.1 Réactifs

Le 7,7,8,8-tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) a été fourni par Sigma. L'hexacyanoferrate (III) de potassium NormapurTM a été fourni par Prolabo. Les autres réactifs utilisés ont déjà été décrits dans la partie expérimentale de la section III.2.

III.3.4.2 Appareillage

L'appareillage et l'équipement pour le dosage par système biocapteur-FIA comprennent :

- vanne d'injection basse pression Rhéodyne[®]
- boucles d'injection Rhéodyne[®] de 50 μL
- pompe péristaltique : Ismatec SA[®] REGLO digital – 4 canaux
- tuyaux Tygon[®] de 0,44 mm de diamètre
- cellule de détection UniCell - BAS[®] (voir paragraphe suivant)

III.3.4.3 Description de la cellule de détection électrochimique UniCell

UniCell[®] est une cellule ampérométrique miniaturisée destinée à être couplée à un système en flux continu. Elle a un volume ajustable à quelques microlitres (4,7 à 6,9 μl) selon le joint plat utilisée. Elle est conçue pour travailler à un débit jusqu'à 100 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$.

Dans cette cellule, l'électrode de travail modifiée avec des enzymes rédox peut servir au suivi en ligne de différents analytes, tels que le glucose, le glutamate ou le lactate, ou pour le suivi des composés électroactifs des échantillons.

La Figure III.15 montre un schéma de la cellule miniaturisée. Sur une face, se trouvent les cannules d'entrée et de sortie de l'échantillon, l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence. L'électrode de travail est fixée sur la face opposée. L'électrode de référence est un disque d'argent métallique recouvert d'une couche de chlorure d'argent. L'électrode auxiliaire est un disque de 2 mm d'acier inoxydable. L'électrode de travail est un disque de platine de 3 mm de diamètre ou un disque de carbone vitreux de 2 mm de diamètre. Le système utilise des joints plats de 51 μm d'épaisseur qui donnent un volume de cellule entre 4,7 et 6,9 μL .

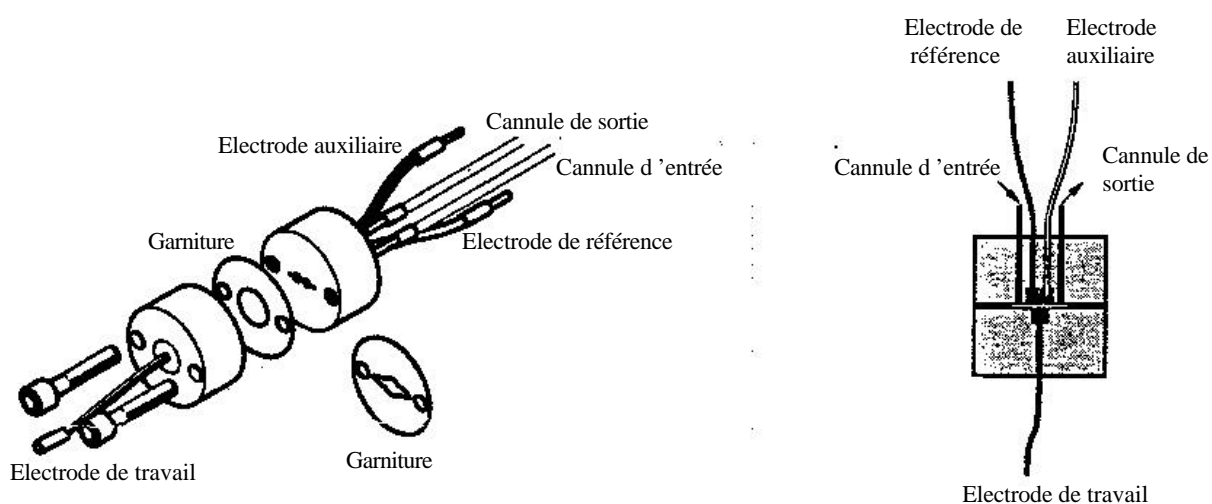


Figure III.15 : Schéma de la mini-cellule ampérométrique.

III.3.4.4 Méthodes : conditions de mesure

Pour les mesures électrochimiques en FIA, nous avons utilisé le même protocole que celui déjà exposé pour les mesures en batch (voir section II.2.3.3). Nous avons utilisé une boucle d'injection de 50 μL et le débit du flux porteur est de 75 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

III.3.5 Résultats et discussion

III.3.5.1 Mesures FIA avec détection directe par biocapteur

L'ensemble du système FIA utilisé est présenté sur la photographie de la figure III.16 et schématisé sur la figure III.17. La ligne de base est obtenue en pompant une solution tampon pH 7 à travers la microcellule électrochimique. Le débit d'échantillon est maintenu constant à $75 \mu\text{L. min.}^{-1}$. Les échantillons sont injectés dans le flux porteur à l'aide de la vanne d'injection. Afin de réduire le temps mort entre l'injection et la détection, la vanne est installée à proximité de la cellule. La mesure du signal s'effectue par enregistrement de la variation du courant. Cette variation correspond à la hauteur du pic par rapport à la ligne de base. Lorsque le flux porteur de la solution tampon pure arrive de nouveau vers la cellule, le courant retourne à la ligne de base.

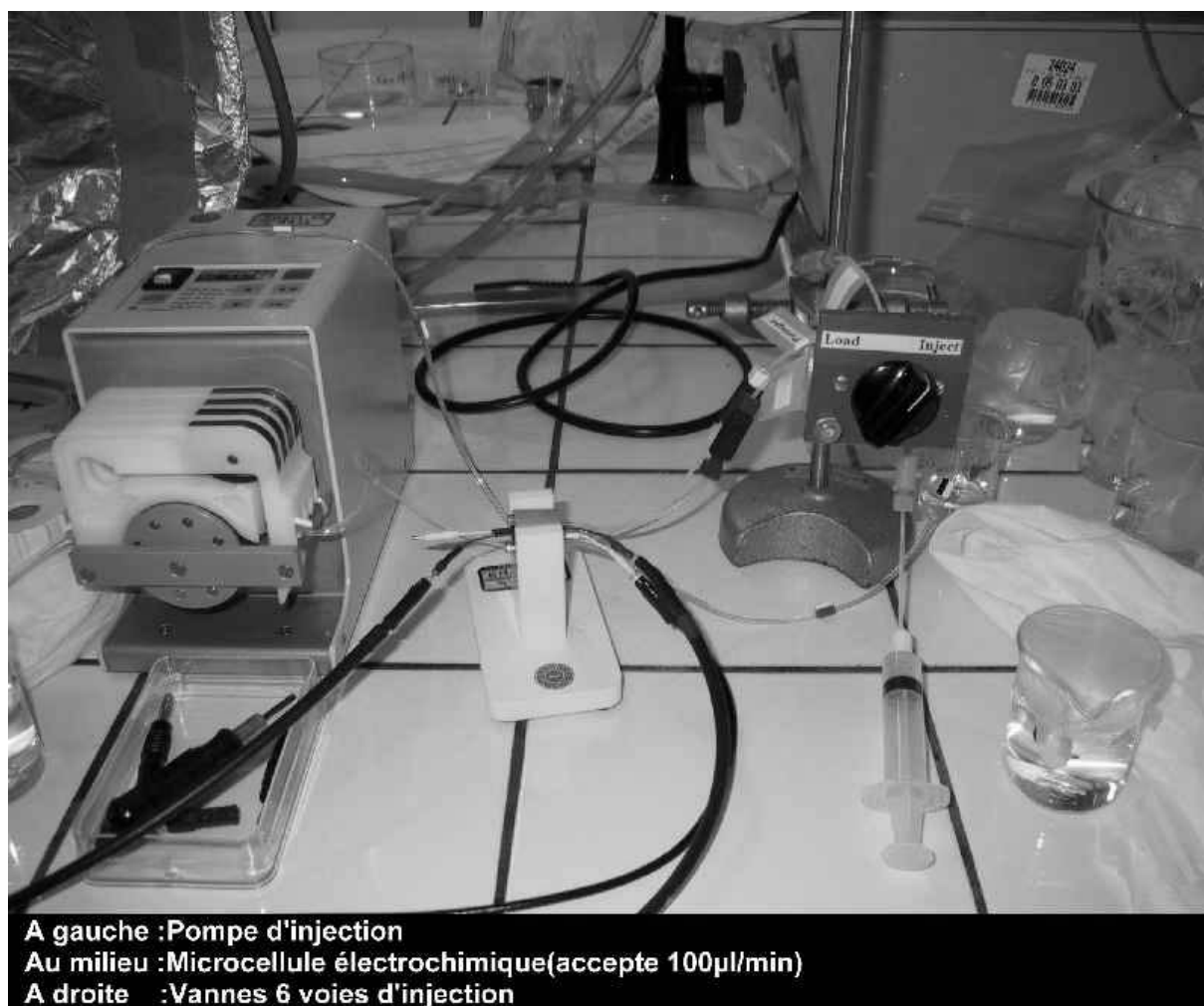


Figure III.16 : Installation du système FIA pour le dosage direct par électrode enzymatique incorporée à la cellule électrochimique.

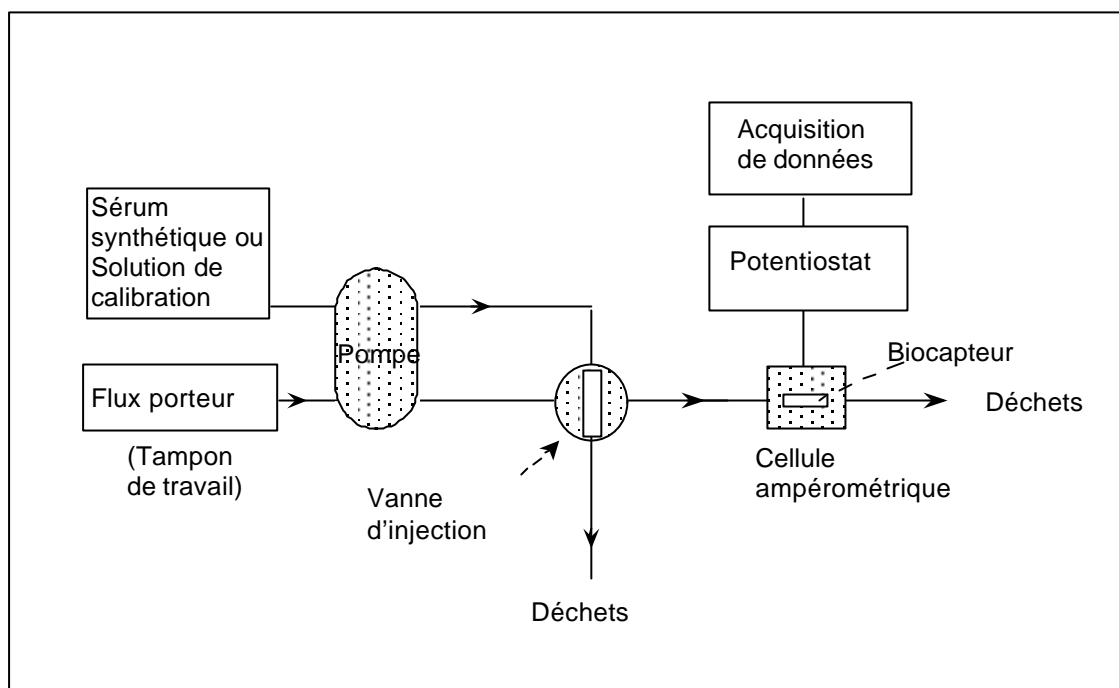


Figure III.17 : Schéma général du système FIA pour le dosage direct par électrode enzymatique incorporée dans la cellule électrochimique.

III.3.5.2 Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD en flux continu

Les pics et les courbes de calibration pour différentes concentrations du glucose sont présentés sur les figures III.18 et III.19.

La Figure III.18 présente la réponse ampérométrique du biocapteur Pt/PEDT/GOD incorporé au système FIA. On procède à deux injections successives de glucose pour une même concentration indiquée sur le graphique. On constate d'après cette figure que les réponses obtenues sont répétables. Si l'on examine le temps de réponse du biocapteur, on constate qu'il est d'environ 2 minutes pour atteindre la valeur maximale du pic. La Figure III.19 représente la courbe de calibration du biocapteur. Cette courbe présente une partie quasi-linéaire comprise entre 0,05 mM et 10 mM de glucose pour laquelle la réponse en courant est proportionnelle à la concentration en glucose. La limite de détection est de 5 μ M.

La sensibilité du biocapteur qui correspond à la partie linéaire est de $7,8 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.
L'écart-type relatif est de 3,7%.

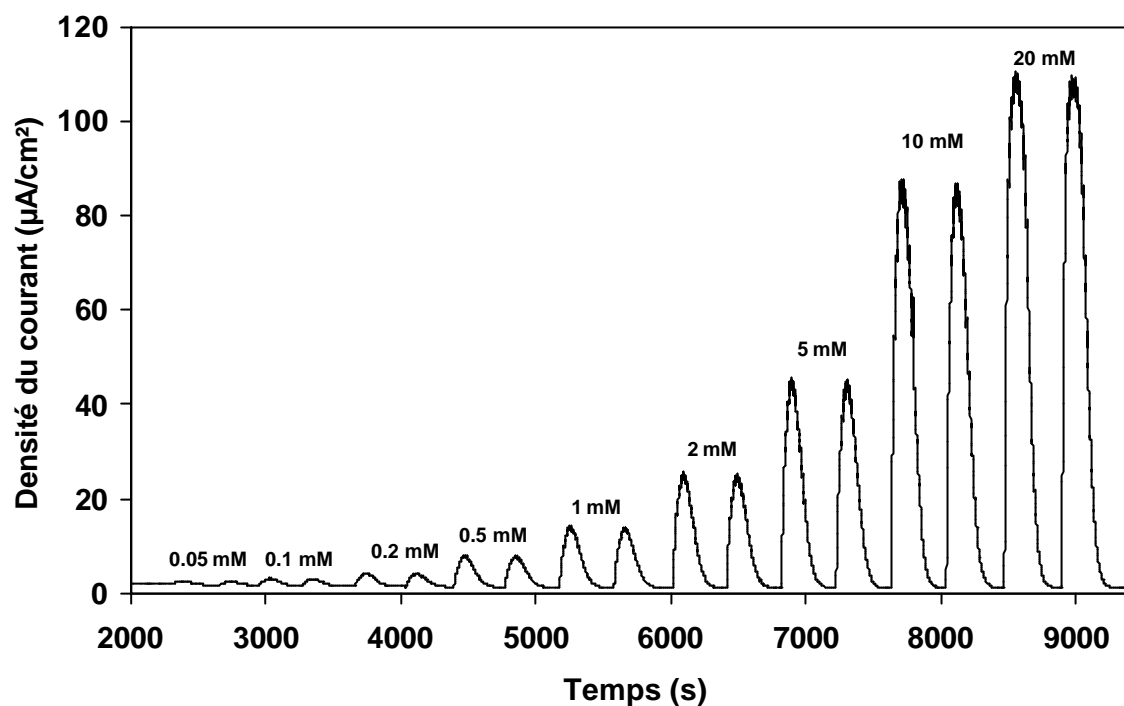


Figure III.18 : Réponse du biocapteur Pt/PEDT/GOD pour différentes concentrations en glucose de la solution d'analyse. Surface active : $0,071 \text{ cm}^2$. Mesures effectuées à $0,65 \text{ V/ECS}$ et 25°C en milieu tampon phosphate $0,01 \text{ M}$ pH 7. Paramètres FIA : volume d'injection : 50 µL , débit : 75 µL.min^{-1} .

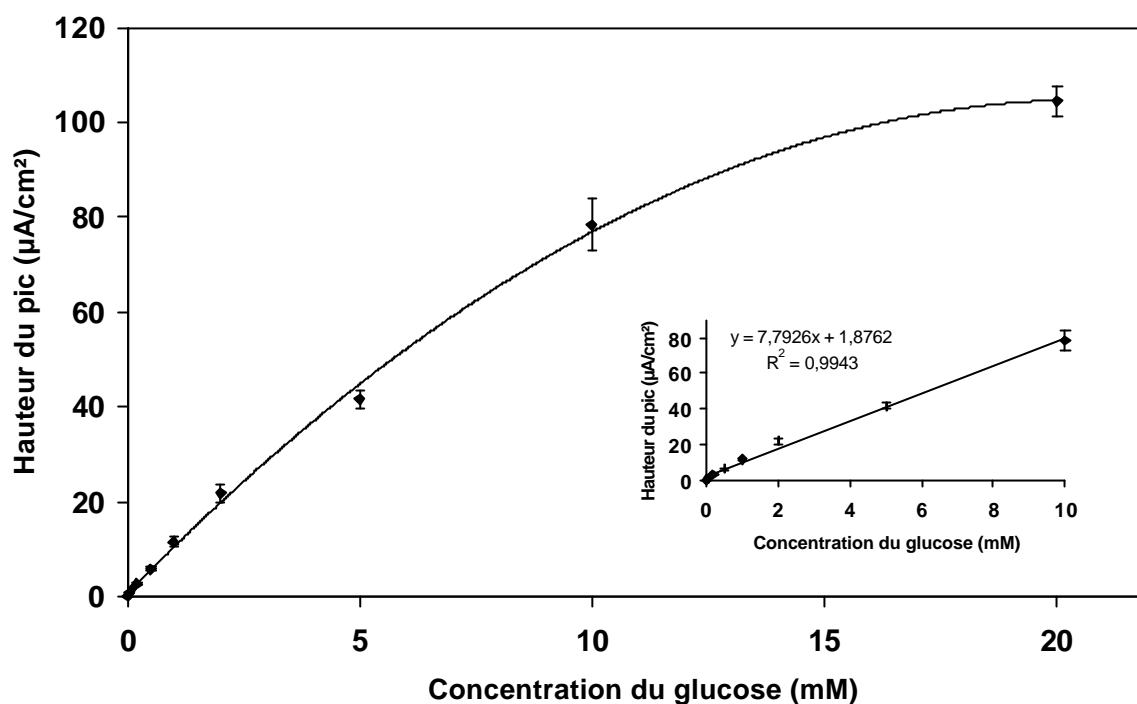


Figure III.19 : Courbe d'étalonnage d'une bioélectrode Pt/PEDT/GOD. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25 °C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Le tableau III.5 résume les caractéristiques de la détection en batch et en FIA du biocapteur Pt/PEDT/GOD.

Tableau III.5 : Comparaison des caractéristiques de détection du biocapteur Pt/PEDT/GOD.

	Biocapteur Pt/PEDT/GOD				
	Limite de détection (mM)	Domaine de linéarité (mM)	Sensibilité ($\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Ecart type relatif (%)	Temps de réponse (minutes)
Batch	0,040	0,2-8	15,2	8,5	0,2
FIA	0,005	0,05-10	7,8	3,7	2*

* Temps de réponse du système FIA (y compris le temps de transport de l'échantillon depuis la vanne d'injection jusqu'au biocapteur).

III.3.5.3 Etude en milieu réel

Comme pour la méthode en batch, nous avons validé le biocapteur Pt/PEDT/GOD en système FIA en faisant des tests en milieux complexes. Pour ce faire, nous avons utilisé aussi comme échantillon les deux sérums synthétiques commercialisés par Sigma® et déjà décrits dans la première partie du chapitre III. Ces deux échantillons réels contiennent aussi quelques espèces électro-oxydables susceptibles d'interférer dans le dosage du glucose dans les fluides biologiques. Ces interférences électrochimiques et leurs concentrations respectives sont résumées dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Liste des espèces interférentes présentes dans les échantillons réels.

Interfèrent Electro-oxydable	Méthode	Accutrol™ normal		Accutrol™ anormal	
		Moyenne (mmol/L)	Gamme de Concentrations (mmol/L)	Moyenne (mmol/L)	Gamme de Concentrations (mmol/L)
Acetaminophène	Abbott-AxSYM (FPIA)	0,113	0,086-0,139	1,019	0,814-1,225
Salicylate	Abbott-AxSYM (FPIA)	0,7	0,5-0,8	1,2	1,0-1,4
Acide urique	BioChem/ATAC (505 nm)	0,357	0,321-0,393	0,577	0,518-0,636

Les échantillons de sérum sont directement injectés dans le flux porteur du système biocapteur-FIA. La répétabilité des pics obtenus pour le sérum normal, sans dilution, est présentée dans la Figure III.20. Le tableau III.7 montre la comparaison des résultats obtenus par notre biocapteur/FIA avec ceux de différentes méthodes de dosages effectués chez Sigma Diagnostics et dans des laboratoires de référence utilisant les méthodes indiquées. Les valeurs obtenues dans la gamme normale sont légèrement inférieures à celles déterminées par les différentes méthodes signalées. Pour les dosages dans la gamme anormale, nous avons trouvé des valeurs qui ne sont pas en accord avec celles obtenues par les différentes méthodes d'analyse courantes. L'influence du volume d'échantillon injecté se traduit par une modification du signal du détecteur. En effet, la hauteur des pics augmente avec la quantité

injectée alors que le coefficient de dilution diminue dans le même temps ; la hauteur du pic tend vers une limite, appelée état stationnaire. A ce niveau, la hauteur correspond au signal que donne l'échantillon non dilué et donc à un coefficient de dilution égal à l'unité. Par conséquent, la dilution-dispersion de l'échantillon dans le liquide vecteur donne un signal plus faible si la concentration du constituant de l'échantillon au maximum du pic est inférieure à la concentration initiale injectée.

Un autre problème habituel associé à l'analyse des échantillons complexes est l'encrassement de l'électrode qui empêche son bon fonctionnement [73; 74]. Dans notre cas, le contenu total des protéines est d'environ 60 g/L pour le sérum synthétique normal et 80 g/L pour le sérum synthétique anormal. De substances tensioactives (lipides) sont aussi présents dans l'échantillon.

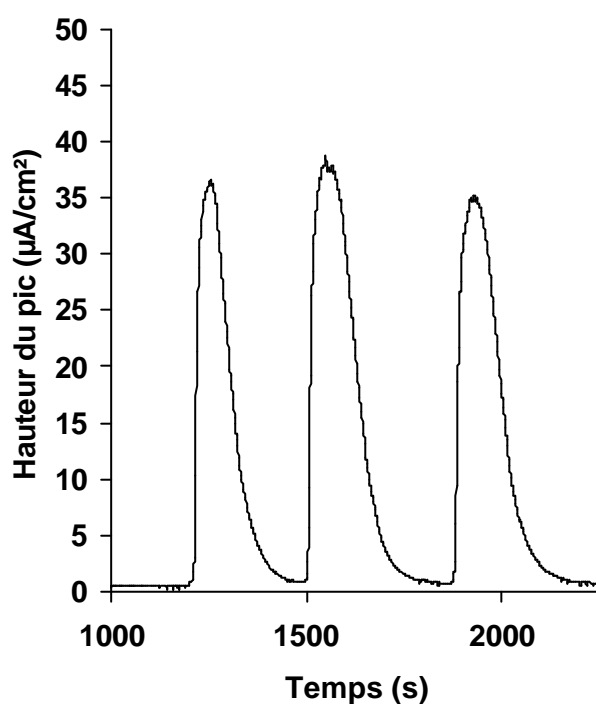


Figure III.20 : Répétabilité des mesures du glucose dans un échantillon de sérum Accutrol™ normal par système biocapteur-FIA. Mesures effectuées à 0,65 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7. Paramètres FIA : volume d'injection : 50 µL, débit : 75 µL.min⁻¹.

Tableau III.7 : Comparaison des résultats du dosage du glucose dans le sérum Accutrol™, obtenus avec le biocapteur Pt/PEDT/GOD couplé au système FIA et ceux obtenus par différentes méthodes.

METHODE	Accutrol™ normal		Accutrol™ anormal	
	MOYENNE (mmol/L)	DOMAINE DE CONCENTRATIONS (mmol/L)	MOYENNE (mmol/L)	DOMAINE DE CONCENTRATIONS (mmol/L)
Abbott Spectrum/VP series (hexokinase)	4,9	4,4-5,4	18,7	16,9-20,5
Bayer-Opera/RA series (hexokinase/340 nm)	5,0	4,5-5,5	18,6	16,8-20,4
Beckman-CX/LX/Synchron series (hexokinase)	4,8	4,3-5,3	18,1	16,3-19,9
BioChem-ATAC (hexokinase/340 nm)	5,3	4,7-5,9	18,8	16,9-20,7
Ortho- Vitros (oxydase)	4,8	4,3-5,3	18,5	16,7-20,3
Pointe Scientific (oxydase)	5,0	4,5-5,5	18,3	16,5-20,1
Roche-Cobas Mira series (hexokinase/340 nm)	4,6	4,2-5,0	18,8	16,9-20,7
Sigma (enzymatic, Trinder)	4,7	3,7-5,7	17,9	15,9-19,8
Pt/PEDT/GOD Biocapteur/FIA	4,1	3,9-4,3	8,4	7,9-8,9

III.4 ELABORATION D'UN BIOCAPTEUR CV(Pt)/PEDT/GOD AVEC L'INCORPORATION DES DIFFERENTS MEDIATEURS REDOX ET SON UTILISATION DANS DES SYSTEMES FIA.

Dans cette partie du chapitre, nous avons combiné les deux stratégies utilisées dans la première partie (platinisation des électrodes et utilisation des médiateurs rédox) afin d'évaluer la réponse au glucose des biocapteurs fonctionnant sous les conditions de l'analyse en flux continu.

Pour cela, nous avons platiné des électrodes de carbone vitreux (CV), et ensuite nous avons immobilisé l'enzyme et le médiateur rédox comme nous l'avons déjà décrit auparavant. Les biocapteurs ainsi élaborés ont été incorporés dans le système FIA.

Les figures III.21, III.22 et III.23 présentent respectivement les courbes d'étalonnage du glucose des bioélectrodes qui utilisent comme médiateur rédox, la benzoquinone (BQ), l'hexacyanoferrate (III) de potassium (HcFK) et le 7,7,8,8-tétracyanoquinodiméthane (TCNQ).

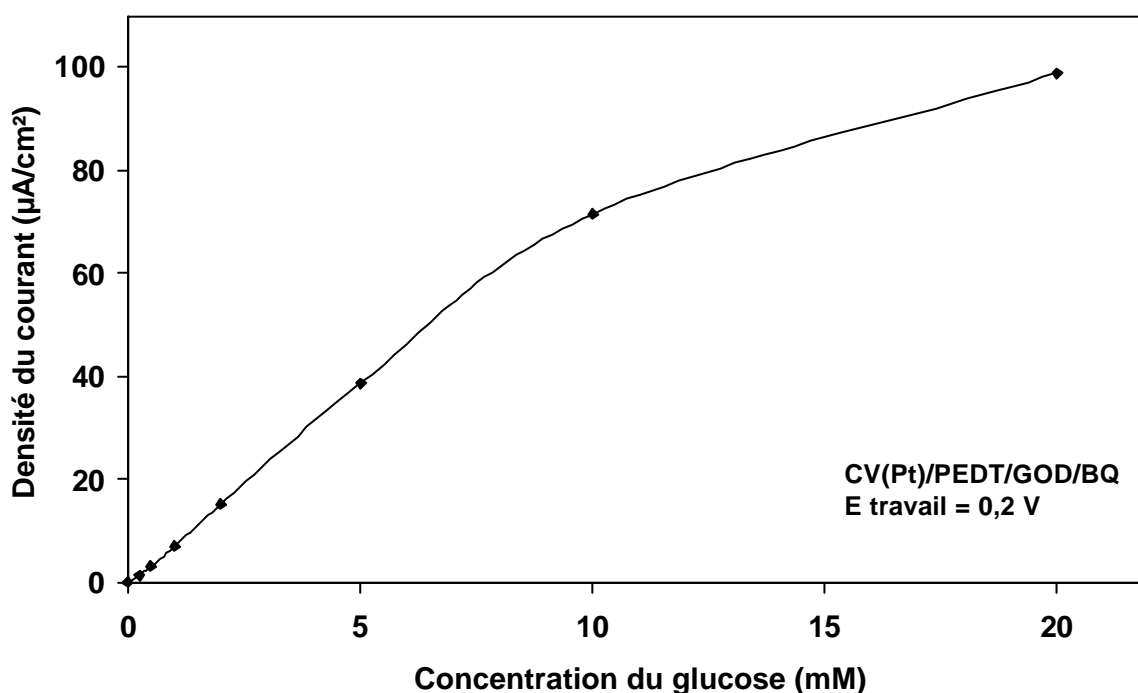


Figure III.21 : Courbe d'étalonnage d'une bioélectrode CV(Pt)/PEDT/GOD/BQ. Mesures effectuées à 0,2 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

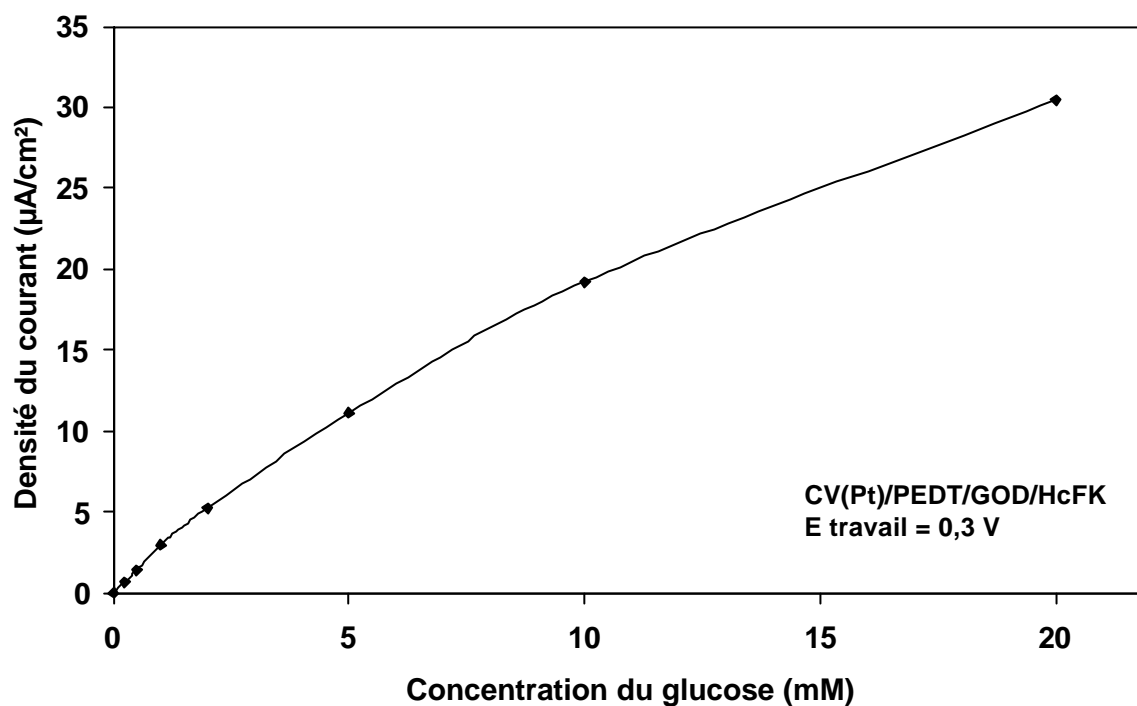


Figure III.22 : Courbe d'étalonnage d'une bioélectrode CV(Pt)/PEDT/GOD/HcFK. Mesures effectuées à 0,3 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

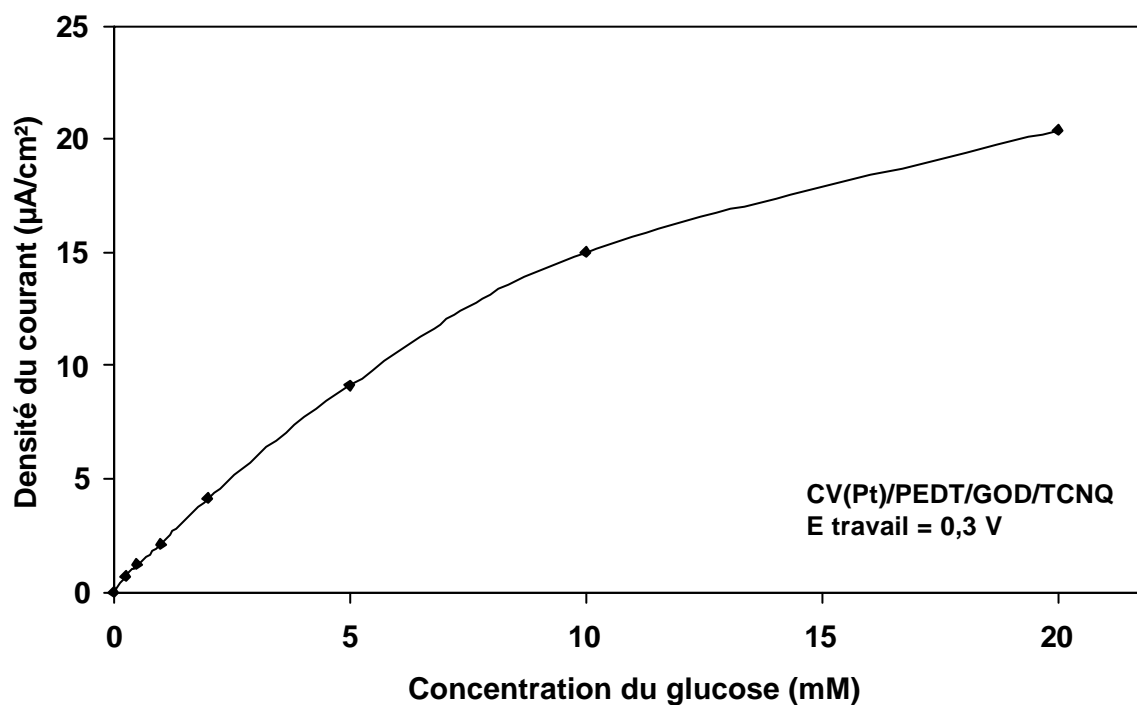


Figure III.23 : Courbe d'étalonnage d'une bioélectrode CV(Pt)/PEDT/GOD/TCNQ. Mesures effectuées à 0,3 V/ECS et 25°C en milieu tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Les trois bioélectrodes présentent une partie linéaire jusqu'à 5 mM. Le fait d'élaborer des biocapteurs qui dosent le glucose à un potentiel moins élevé permet d'envisager une amélioration de leur sélectivité par rapport aux espèces électro-oxydables présentes dans les échantillons réels. Cependant, nous observons une diminution de la sensibilité par rapport au biocapteur Pt/PEDT/GOD incorporé dans le système FIA.

Tableau III.8 : Comparaison des sensibilités des différents biocapteurs couplés au système FIA.

Biocapteur	Potentiel de mesure (V/ECS)	Sensibilité (mA.M⁻¹.cm⁻²)
Pt/PEDT/GOD	0,65	7,8
CV(Pt)/PEDT/GOD/BQ	0,2	6,9
CV(Pt)/PEDT/GOD/HcFK	0,3	2,4
CV(Pt)/PEDT/GOD/TCNQ	0,3	2,3

III.5 CONCLUSION

L'élimination de l'interférence des composés électro-oxydables, dans l'utilisation des biocapteurs *in vivo* est un défi crucial pour le développement futur de ces sondes. Cependant les réponses technologiques que l'on peut apporter à ce problème permettent d'améliorer la spécificité des biocapteurs sans jamais s'affranchir totalement de la variation des courants parasites causée par ces molécules. En général, l'efficacité dépend du choix des différentes techniques dont les principes de base ont été évoqués précédemment. Ceci s'accompagne souvent d'une diminution de la sensibilité des bioélectrodes.

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'utilisation d'une technique d'analyse associant l'électrode à glucose oxydase au système d'injection en flux continu (FIA). Afin de réaliser le système biocapteur enzymatique-FIA, nous avons utilisé une cellule de détection électrochimique commercialisée. L'un des buts essentiels de notre expérimentation était de déterminer les performances de l'ensemble du système biocapteur-FIA. Nous pouvons conclure, qu'avec la configuration biocapteur incorporé dans la cellule et associé au système FIA, nous avons réussi à améliorer la limite de détection grâce à l'augmentation du rapport signal/bruit, ainsi que le domaine de linéarité du dosage du glucose.

La reproductibilité de la réponse d'une même électrode est caractérisée par une variation de 3,7% contre 8,5% obtenue pour les mesures en batch. Cependant, nous avons constaté une perte de sensibilité dépendant du médiateur utilisé.

Ce système peut contribuer à l'amélioration du dosage automatisé du glucose car il peut parfaitement s'intégrer dans une chaîne automatique de mesures. Outre le secteur médical, d'autres secteurs d'activité industrielle peuvent aussi bénéficier de l'utilisation de ces types de capteurs enzymatiques associés à la technique FIA.

**CHAPITRE IV : IMMOBILISATION DE LA POLYPHENOL
OXYDASE DANS UN FILM DE PEDT**

IV.1 INTRODUCTION

L'utilisation intensive, notamment dans le secteur agricole, de pesticides et d'herbicides pour le traitement des sols, conduit à la contamination des eaux de surface, des lacs ou des nappes phréatiques. La plupart de ces produits demeurent actifs durant plusieurs années causant alors une pollution continue des eaux. Leur détection est donc très importante dans le contrôle de l'environnement.

Eau, air et sol sont des ressources naturelles vitales où nous puisons directement ou indirectement (via la chaîne alimentaire) nos nutriments. C'est pourquoi ces trois compartiments sont aujourd'hui très surveillés. A l'heure actuelle, des centaines de molécules chimiques sont contrôlées dans l'eau et dans l'air. Conformément à la réglementation, la détection et le dosage de ces molécules sont réalisés à l'aide d'instruments d'analyse conventionnels, tels que spectromètres et chromatographes. Ces appareils offrent des méthodes de mesure fiables, souvent normalisées. Cependant, ils sont coûteux, volumineux, exigeants sur le plan technique et nécessitent, en outre, une étape souvent longue de préparation de l'échantillon.

Par ailleurs, la demande en analyse dépasse largement le cadre réglementaire. La démarche sur le terrain vise la surveillance permanente sur site afin d'alerter le plus tôt possible en cas de danger. Cette prudence est de rigueur pour le risque sanitaire et pour la protection des installations industrielles ; elle nécessite des méthodes utilisables en continu, à réponse rapide et automatisables. En effet, toutes les sources de pollution n'étant pas répertoriées, *a fortiori* réglementées, il faut donc envisager la possibilité de découvrir de nouveaux dangers. C'est là que les méthodes biotechnologiques trouvent leur place et leur intérêt à côté des méthodes conventionnelles. Elles possèdent, en effet, les qualités requises pour révéler rapidement un danger pour le milieu naturel et l'homme.

Une grande variété de macromolécules biologiques ont été utilisées comme élément biologique dans l'élaboration de biocapteurs pour la détection de polluants, en raison de leur affinité élevée pour certains polluants [127]. Le tableau IV.1 montre quelques exemples des différentes classes de biorécepteurs utilisés dans l'élaboration de ces biocapteurs.

Tableau IV.1 : Exemples de différents biorécepteurs utilisés dans l'élaboration des biocapteurs pour le dosage des polluants [127].

BIORECEPTEURS	EXEMPLES	POLLUANTS DOSES
RECEPTEURS	Acide α -aminobutyrique (GABA)	Cyclodiènes Pyréthroides Bicyclophosphate
	Arylhydrocarbonés	Dioxines
ANTICORPS	IgG	Biphénylepolychlorés Dioxines Pentachlorophénol Benzo(a)pyrène Benzène, toluène, xylène
CELLULES ENTIÈRES	cyanobactéries	Herbicides
	<i>Pseudomonas</i>	Naphtalène
	Acétylcholinestérase	Organophosphorés
ENZYMES	Luciférase	Hg ²⁺
	Peroxydase	Cyanure Benzotriazole

La miniaturisation est un aspect attrayant pour le contrôle de l'environnement si l'on tient compte du coût très élevé de l'analyse au laboratoire. Le développement de biocapteurs portables pourrait aussi diminuer le temps de transport des échantillons vers le laboratoire et les précautions à prendre pendant ce transport.

Dans ce chapitre, nous décrirons un biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation d'une enzyme, la polyphénol oxydase (PPO), également appelée tyrosinase, à la surface d'une électrode de carbone vitreux (CV). L'immobilisation de la PPO est réalisée par piégeage dans des films de PEDT. Cette méthode permet la mise au point d'un capteur dont les performances en termes de sensibilité et de limite de détection sont intéressantes. Ce biocapteur assure la détection directe du phénol et d'autres substrats d'intérêt médical.

Dans cette partie, enfin, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des potentialités de fonctionnement de ce biocapteur et à la possibilité d'élargir, dans le futur, son champ d'application à la détection de polluants, tels que les cyanures, les herbicides et les pesticides, en utilisant la détection indirecte selon un processus d'inhibition de la bioélectrode.

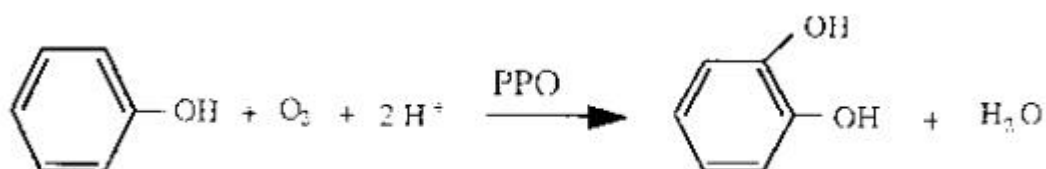
IV.2 PRINCIPE DU BIOCAPTEUR A POLYPHENOL OXYDASE

IV.2.1 La polyphénol oxydase

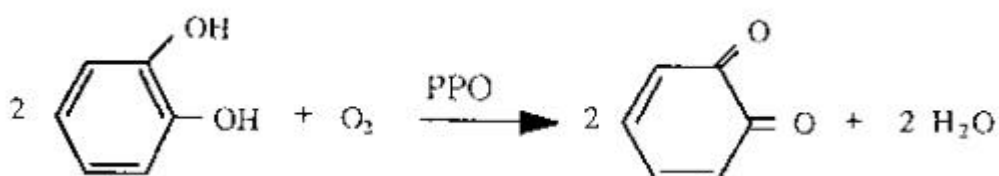
La polyphénol oxydase (PPO) (monophénol mono-oxygénase EC 1.14.18.1), également appelée tyrosinase, est une métallo-protéine formée de 4 sous-unités monomères, chacune de masse molaire avoisinant 32000 g.mol^{-1} . La séquence d'acides aminés de cette enzyme est connue. Issue de différentes souches (végétale, animale), la PPO assure, entre autres, la biosynthèse des pigments (mélanine) de la peau des vertébrés. En effet, elle permet l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA). La PPO participe aussi à la biosynthèse des composés polyphénoliques, dotés pour certains d'une activité antibiotique chez les plantes et les micro-organismes.

Cette enzyme catalyse en milieu aérobie deux types de réaction :

- l'ortho-hydroxylation (activité de crésolase) du monophénol en ortho-diphénol :



- L'oxydation (activité de catécholase) de l'ortho-diphénol en ortho-quinone :



L'oxygène moléculaire est réduit en eau par un mécanisme d'échange de quatre électrons [128].

Le groupe prosthétique de la PPO est un site composé de deux atomes de cuivre dont les variations de coordinance laissent apparaître trois formes limites sous lesquelles la PPO réagit différemment :

-forme "oxy" $[\text{Cu(II) O}_2^{2-} \text{ Cu(II)}]$

-forme "met" $[\text{Cu(II) OH Cu(II)}]$

-forme "déoxy" $[\text{Cu(I) Cu(I)}]$

Ces trois formes interviennent dans tous les mécanismes moléculaires relatifs aux activités de crésolase et de catécholase de la PPO. Toutes les interactions enzyme/substrat ont lieu sur ces sites actifs. Le mécanisme d'action de la PPO est, donc, relativement complexe à analyser [129]. Il est généralement admis que cette enzyme possède au moins deux sites distincts de fixation. L'un présente une affinité pour les composés aromatiques : c'est le site de l'enzyme sur lequel viennent se fixer par exemple le catéchol ou ses dérivés. L'autre site présente de l'affinité pour les composés complexant les centres métalliques : c'est le site sur lequel se fixe l'oxygène moléculaire. Cette complexité est néanmoins intéressante car l'activité de la PPO est susceptible d'être affectée par une large variété d'inhibiteurs.

Dans le mécanisme correspondant à l'activité de crésolase de la PPO, le monophénol est lié en position axiale à l'un des atomes de cuivre de la forme "oxy" de l'enzyme. Il doit alors subir un réarrangement stérique qui l'oriente en position ortho pour l'étape d'hydroxylation. Ce mécanisme génère un orthodiphénolate coordonné qui est ensuite oxydé en quinone laissant un site "déoxy" disponible pour l'oxygène moléculaire. Récemment, Rodríguez-López et col. [130] ont confirmé que la forme "oxy" de l'enzyme est la seule capable de catalyser la transformation de monophénol en diphénol.

Dans le mécanisme correspondant à l'activité de catécholase de la PPO, l'oxydation de deux molécules de catéchol en ortho-quinone est couplée à la réduction de deux molécules d'oxygène moléculaire en eau. Le cycle catalytique commence par la liaison d'une molécule de catéchol à la forme "met" de l'enzyme et la formation de une molécule de quinone. La deuxième molécule de catéchol est liée à la forme "oxy" de l'enzyme ce qui donne lieu à la formation de une autre molécule d'ortho-quinone et à la régénération de la forme "met" de l'enzyme qui recommence le cycle catalytique [131]. Contrairement au mécanisme antérieur, un réarrangement stérique du substrat ne s'avère pas nécessaire pour ce simple transfert électronique.

Le point isoélectrique de la PPO est de 4,7. A pH 6-7 elle est anionique. L'activité enzymatique d'une solution de PPO peut être mesurée par spectrophotométrie. En effet, en présence de l'enzyme, le catéchol en solution tamponnée (pH 6,5) est transformé en orthoquinone qui absorbe la lumière à 380 nm. Cette absorbance augmente tout d'abord linéairement en fonction du temps, puis tend à se stabiliser. La pente de la partie linéaire de la courbe obtenue à l'état stable est proportionnelle à l'activité enzymatique de cette solution.

IV.2.2 Principe du biocapteur

Les biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation de la PPO permettent la détection des dérivés monophénoliques et orthodiphénoliques (figure IV.1). Leur champ d'applications potentielles concerne essentiellement le domaine biomédical (dosage de neuromédiateurs, catécholamine) et celui de l'environnement (détection de polluants phénoliques et pesticides). Ces applications nécessitent des capteurs capables de détecter des concentrations nanomolaires de la molécule cible, ce qui constitue encore actuellement le premier objectif à atteindre.

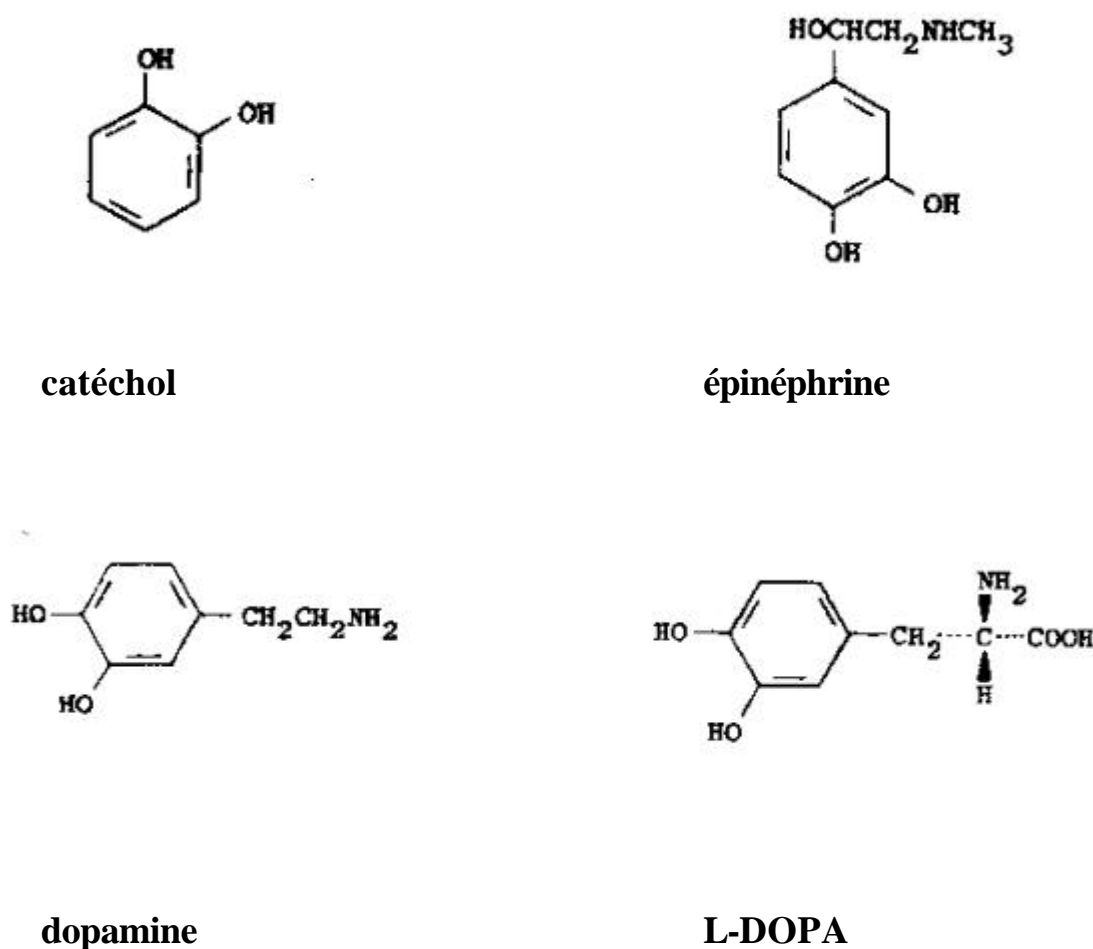


Figure IV.1: Formules chimiques de quelques substrats utilisés par la PPO.

Le principe de détection du biocapteur est montré à la figure IV.2. L'orthoquinone, produite par la réaction enzymatique, est un composé électroactif qui peut être réduit électrochimiquement en orthodiphénol. Le fonctionnement du biocapteur est basé sur la mesure du courant de réduction, au potentiel de $-0,2\text{V/ECS}$, de l'orthoquinone enzymatiquement générée. La réponse ampérométrique de l'électrode est directement liée à la concentration en substrat dans la solution.

Il est important de noter que ce mode de détection ampérométrique aboutit à la régénération de catéchol à la surface de l'électrode. Substrat de l'enzyme, ce composé peut soit diffuser vers la solution, soit entrer dans un nouveau cycle catalytique avec la PPO. Dans

ce dernier cas, le processus se traduit par une amplification de la réponse de la bioélectrode [132]. De même que la GOD, la PPO nécessite un milieu aérobie ; dans la suite de ce chapitre, les résultats ont été obtenus en utilisant comme électrolyte des solutions de tampon phosphate saturées en air.

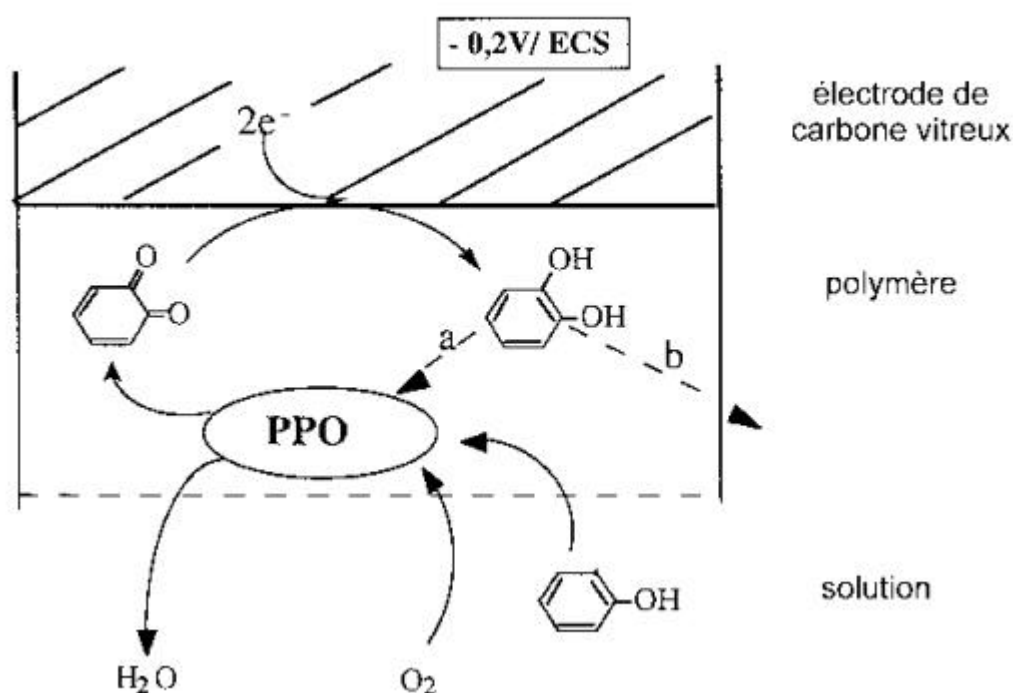


Figure IV.2 : Représentation schématique du fonctionnement du biocapteur à phénol.

Le chapitre précédent a montré les potentialités de nouvelles bioélectrodes enzymatiques basés sur l'utilisation de films de PEDT pour la réalisation de biocapteurs ampérométriques. Ce chapitre est axé sur l'immobilisation de la PPO dans des films de PEDT. L'étude décrit la caractérisation et l'optimisation du biocapteur pour la détection directe du phénol, du catéchol, de l'épinéphrine, de la L-DOPA et de la dopamine.

IV.3 MATERIELS ET METHODES

IV.3.1 Réactifs pour la fabrication du biocapteur

La polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1), de champignon, possède une activité de 6680 UI.mg⁻¹ (1 unité induit une augmentation de 0,001 d'absorbance à 280 nm de 3 mL de solution de L-tyrosine par minute à pH 6,5 et 25°C).

Le catéchol, l'épinéphrine, la dopamine et le L-DOPA utilisés sont des produits SIGMA.

Le phénol utilisé est un produit fourni par Carlo Erba.

Le monomère 3,4-éthylènedioxythiophène est fourni par Bayer AG.

Le poly(éthylène glycol) de MM = 15.000 est fourni par Aldrich.

Toutes les solutions de tampon phosphate sont préparées par mélange dans l'eau, de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄, 2H₂O), d'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄, 2H₂O) et de chlorure de potassium RECTAPUR fournis par Prolabo.

Pour chaque expérience, toutes les solutions aqueuses ont été réalisées à partir d'une eau ultrapure, purifiée par le système Milli Q[®].

IV.3.2 Appareillage

L'appareillage pour les études électrochimiques consiste en un ensemble VoltaLabTM 21 déjà décrit dans le chapitre II.

L'électrode de référence est l'électrode au calomel standard (ECS) de chez Tacussel[®]. La contre-électrode est formée d'un fil de platine.

Les électrodes de travail sont des électrodes de carbone vitreux de 3 mm de diamètre fournies par BAS[®].

La surface des électrodes de travail a subi un traitement préalable qui consiste en un polissage à l'aide de solutions de diamant de différents diamètres de particules (1, 3 et 15 µm) dans un feutre approprié (kit de nettoyage PK-4 fourni par BAS[®]).

Les tests enzymatiques ont été réalisés avec un spectrophotomètre UV/VIS Cary 50 (Varian) en utilisant des cuves à usage unique fournies par Polylabo pour éliminer toutes sources de contamination entre chaque mesure.

IV.3.3 Méthodes

IV.3.3.1 Elaboration des bioélectrodes

Les bioélectrodes CV/PEDT/PPO ont été élaborées selon le procédé suivant : 1 mg de PPO est dissous dans 200 μL d'une solution aqueuse contenant 10^{-2} M de 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT), correspondant à la limite de la solubilité du monomère. Cinq microlitres (5 μL) de ce mélange sont déposés sur la surface d'une électrode de carbone vitreux (diamètre 3 mm). L'électrode est séchée à l'air pour obtenir un film de monomère et d'enzyme adsorbés (Schéma figure IV.3). La polymérisation du EDT est effectuée à potentiel constant (+ 1,2 V/ECS) pendant 2 minutes, dans une solution tampon phosphate de potassium 0,02 M, pH 6,2 avec PEG 10^{-3} M.

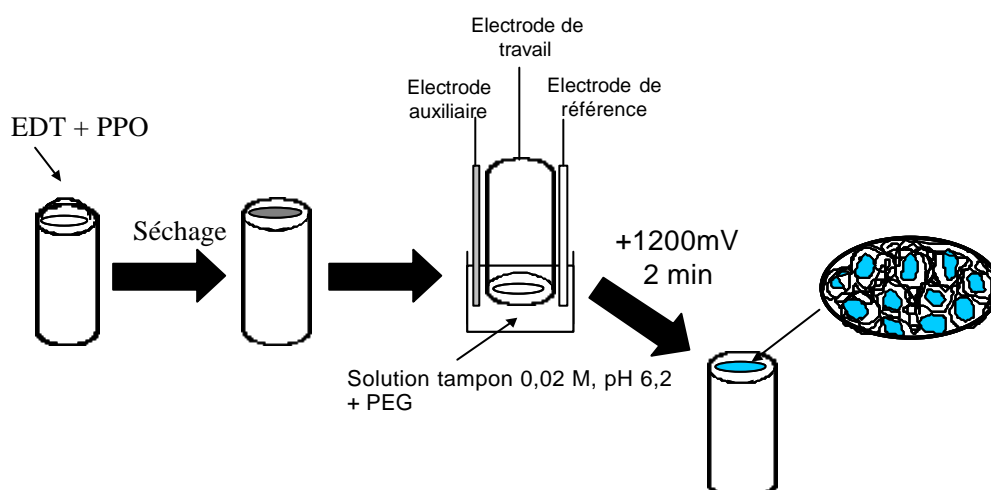


Figure IV.3 : Méthode de préparation du dépôt de monomère et de l'enzyme.

IV.3.3.2 Détermination de l'activité de la PPO

Cette technique de mesure d'activité a permis d'estimer la quantité d'enzyme relarguée par l'électrode dans la solution d'électropolymérisation lors de la polymérisation du PEDT. Vingt microlitres (20 μL) de solution d'électropolymérisation contenant l'enzyme sont

ajoutés à 1 mL de solution aqueuse de catéchol (0,1 M) et 1,980 mL de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5. Tout de suite après l'addition de la solution de PPO, la réaction d'oxydation du catéchol est suivie par l'enregistrement de l'augmentation de l'absorbance à 380 nm en fonction du temps. La courbe obtenue présente une partie linéaire au départ de la réaction. L'activité enzymatique est évaluée à partir de la pente mesurée.

L'activité du biofilm est mesurée par le même procédé spectrophotométrique. La bioélectrode est immergée dans la même solution de catéchol et tampon phosphate, et soumise à une vitesse de rotation déterminée. L'absorbance à 380 nm est mesurée toutes les deux minutes pendant 30 minutes. La partie linéaire de la courbe représentant l'évolution de l'absorbance au cours du temps permet alors de calculer l'activité du biofilm.

IV.3.3.3 Mesures ampérométriques en fonction des différents paramètres

Avant chaque mesure électrochimique, les électrodes sont stabilisées dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 (10 mL ou 20 mL) à un potentiel de - 0,2 V/ECS jusqu'à l'obtention d'un courant résiduel stationnaire. Des petits volumes de solution des substrats (5 à 300 μ L) sont ensuite injectés dans la cellule. Les solutions des substrats sont préparées dans de l'eau désionisée, et conservées au réfrigérateur.

La réponse de l'électrode en fonction de la température est enregistrée dans une solution d'analyse contenant du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 et du catéchol 5 μ M. La valeur de la réponse en densité du courant du biocapteur est alors relevée après stabilisation du courant pour chaque température.

La réponse de l'électrode en fonction du pH est enregistrée dans chaque solution tamponnée à différents pH (10 mL de tampon phosphate 0,1 M, pH 5 à 8). La concentration de substrat est de 5 μ M.

La réponse de l'électrode pour un potentiel donné est enregistrée dans une solution d'analyse contenant tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 et du catéchol 5 μ M. La valeur de la réponse en densité du courant du biocapteur est alors relevée après stabilisation du courant pour chaque potentiel.

IV.4 RESULTATS ET DISCUSSION

IV.4.1 Immobilisation de la PPO dans un film de PEDT

L'immobilisation de la PPO au sein de la matrice de PEDT a été réalisée sur une électrode de carbone vitreux : une quantité contrôlée de chacun des éléments constitutifs du biomatériau est déposée à la surface de l'électrode, puis laissée sécher à l'air afin d'obtenir un film adhérent à la surface de l'électrode (figure IV.3). Pour obtenir une réponse détectable, donc une production élevée d'orthoquinone, on a déterminé la quantité d'enzyme nécessaire dans une étude préalable. En conséquence, la solution de dépôt est composée de 1 mg de PPO dissous dans 200 μL d'une solution de EDT $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Le volume de dépôt a été choisi en fonction des valeurs optimales déterminées lors d'une étude préliminaire, soit 5 μL . La réponse du biocapteur n'est pas affectée par le pH de la solution d'électropolymérisation, donc la solution sera identique à celle définie précédemment dans le cas de la GOD, soit la solution tampon phosphate 0,02 M, pH 6,2.

Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de différences significatives dans la réponse du biocapteur quand un deuxième ajout de monomère est fait dans la solution d'électropolymérisation. Par conséquent, la solution d'électropolymérisation est composée de PEG 10^{-3} M en milieu tampon phosphate 0,02 M, pH 6,2. L'électropolymérisation à potentiel constant (+ 1,2 V/ECS) permet la synthèse d'un film polymère stable de PEDT.

La figure IV.4 illustre l'influence de la quantité d'enzyme initialement déposée, sur la sensibilité du biocapteur, la masse de EDT étant constante et égale à 75 nmoles.

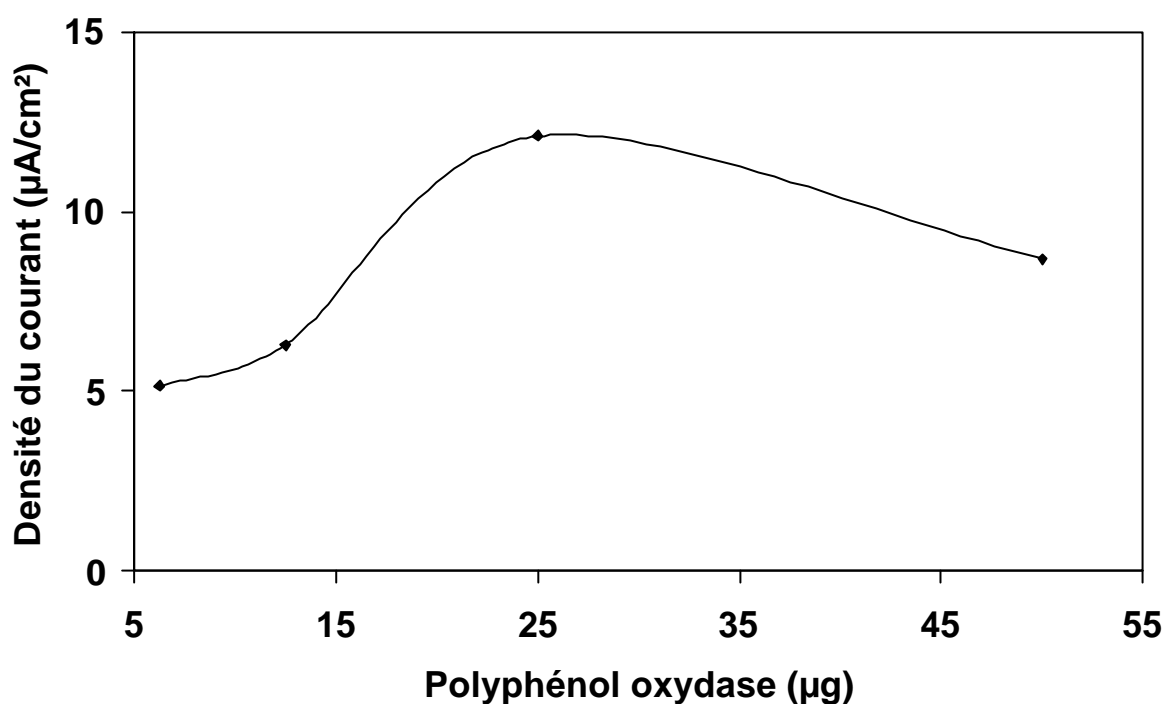


Figure IV.4 : Influence de la quantité initiale d'enzyme mélangée à 75 nmoles de EDT et déposée à la surface de l'électrode de carbone vitreux (diamètre 3 mm) sur la réponse du biocapteur à polyphénol oxydase (substrat : 5 µM catéchol, pH 6,5, 25°C, activité spécifique de la PPO : 6680 UI.mg⁻¹, dosée par Sigma).

L'électrode préparée avec 25 µg d'enzyme présente la meilleure réponse. Pour des faibles quantités de PPO déposées, la sensibilité du biocapteur décroît de moitié. La diminution de la sensibilité de l'électrode préparée avec 50 µg pourrait être due à une perte de biomatériau en raison d'une concentration trop élevée d'enzyme qui réduit son adhérence à la surface de l'électrode. Cependant, le pourcentage d'enzyme active piégée dans la matrice de PEDT reste très bas (moins de 1 % des unités déposés).

IV.4.2 Optimisation du temps d'électropolymérisation

Pour optimiser le temps d'électropolymérisation, nous l'avons fait varier dans un domaine compris entre 5 secondes et 8 minutes afin d'étudier son influence sur la réponse du biocapteur en présence d'une solution de catéchol 5 μM . Les résultats sont montrés à la figure IV.5.

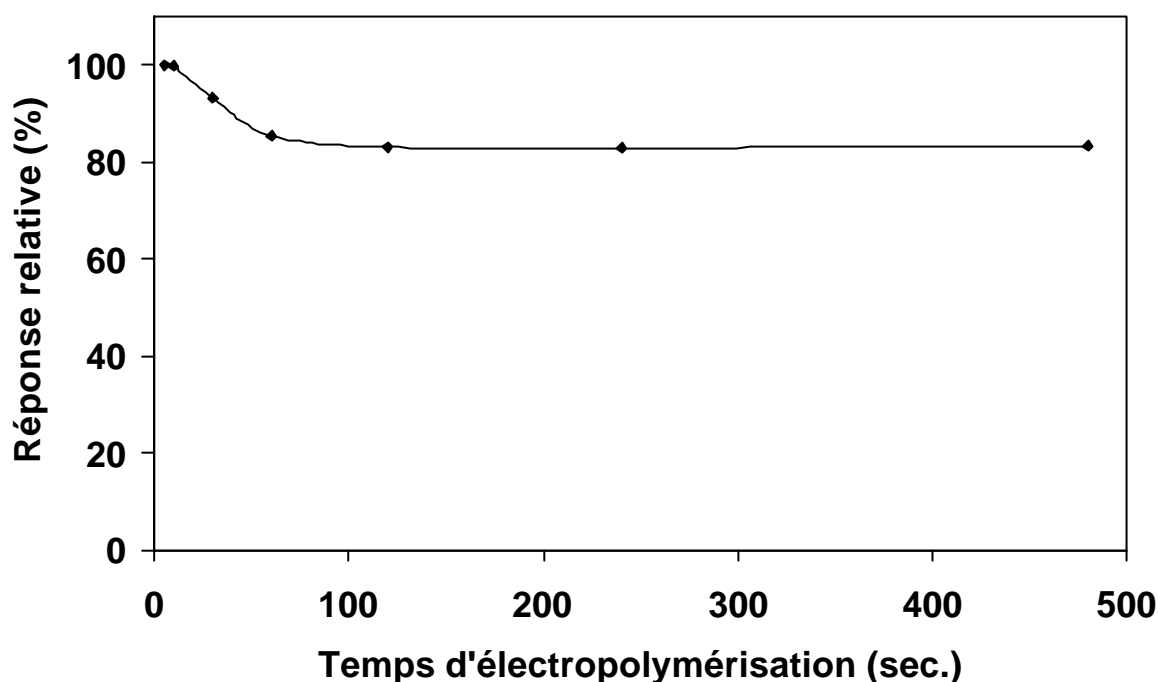


Figure IV.5 Influence du temps d'électropolymérisation sur la réponse d'une bioélectrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : concentration du catéchol 5 μM , tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, potentiel de mesure $-0,2$ V/ECS, température 25°C.

Nous voyons que la réponse ampérométrique relative du est élevé pour des temps d'électropolymérisation courts (5 et 10 secondes). Ensuite, nous observons une diminution de la réponse d'environ 15%. Au-delà de 60 secondes, elle reste constante. Pour un temps d'électropolymérisation très court, nous avons obtenu une meilleure réponse qui peut

s'expliquer par la formation d'une couche de polymère très fine favorisant la diffusion du substrat. Cependant, nous avons observé macroscopiquement des problèmes d'adhérence du film à la surface de l'électrode, ce qui peut entraîner une perte d'enzyme retenue et une diminution importante de la sensibilité du biocapteur dans le temps. Nous avons donc fixé un temps d'électropolymérisation de 120 secondes pour nous assurer que la stabilité du polymère est adéquate pour retenir l'enzyme, et une bonne adhérence du polymère à l'électrode.

IV.4.3 Choix du potentiel de travail

L'orthoquinone produite par la réaction enzymatique est un composé qui peut être réduit électrochimiquement en orthodiphénol correspondant. C'est ce mode de détection ampérométrique que nous utiliserons dans la suite de ce travail. La réponse en courant du biocapteur pour une concentration en catéchol de 5 μM a été mesurée pour des valeurs de potentiel comprises entre - 0,3 et + 0,3 V/ECS. Comme le montre la Figure IV.6, le courant de réduction maximal se trouve à - 0,2 V/ECS. Pour la suite des expériences, nous nous placerons à - 0,2 V/ECS.

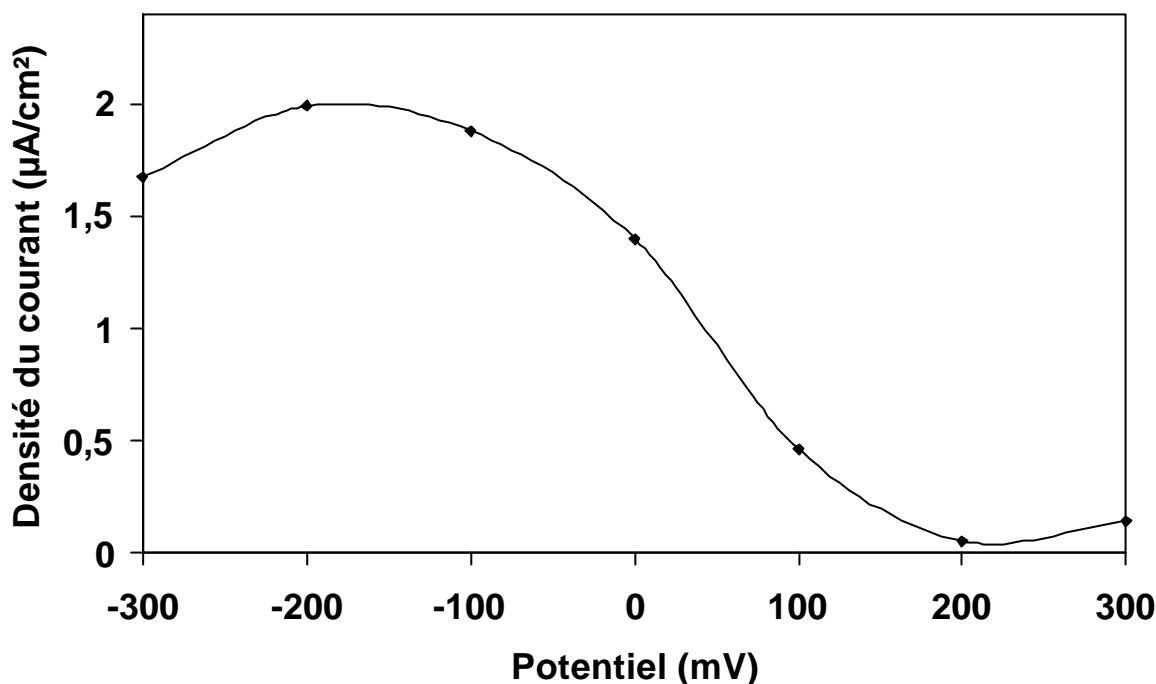


Figure IV.6 : Influence du potentiel de mesure sur la réponse en courant d'un biocapteur CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : concentration du catéchol 5 µM, tampon phosphate 0,1 M pH 6,5, température 25°C. Système sous agitation mécanique.

IV.4.4 Performances du biocapteur dans des conditions optimisées pour la détection de différents substrats

L'étude précédente a permis de définir une composition du film enzymatique et d'établir les conditions d'électropolymérisation. Les études ultérieures ont été réalisées avec des films élaborés par le dépôt de 25 µg de PPO et 75 nmoles de EDT.

Les figures IV.7, IV.8, IV.9 et IV.10 montrent les courbes de calibration obtenues pour quatre substrats différents de l'enzyme : catéchol, dopamine, épinéphrine et L-DOPA. Les réponses ampérométriques ont été enregistrées en solution tamponnée 0,1 M, pH 6,5 à 25°C et en appliquant un potentiel de -0,2 V/ECS.

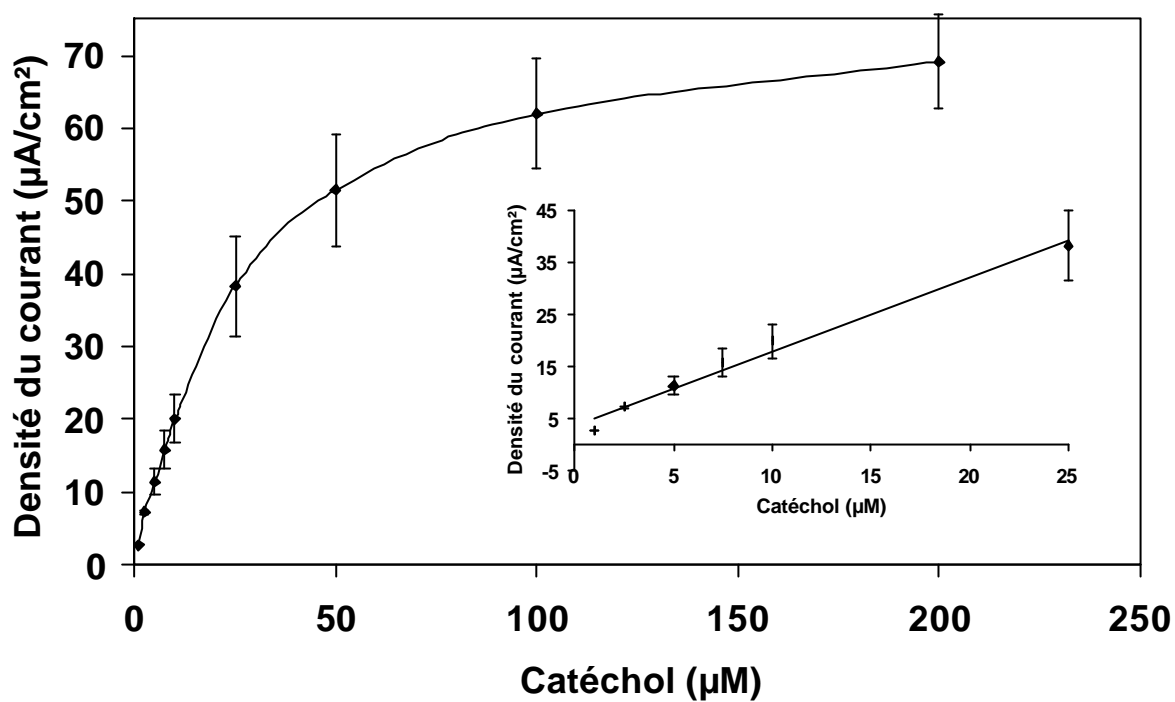


Figure IV.7 : Courbe d'étalonnage du catéchol obtenue avec une électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : - 0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

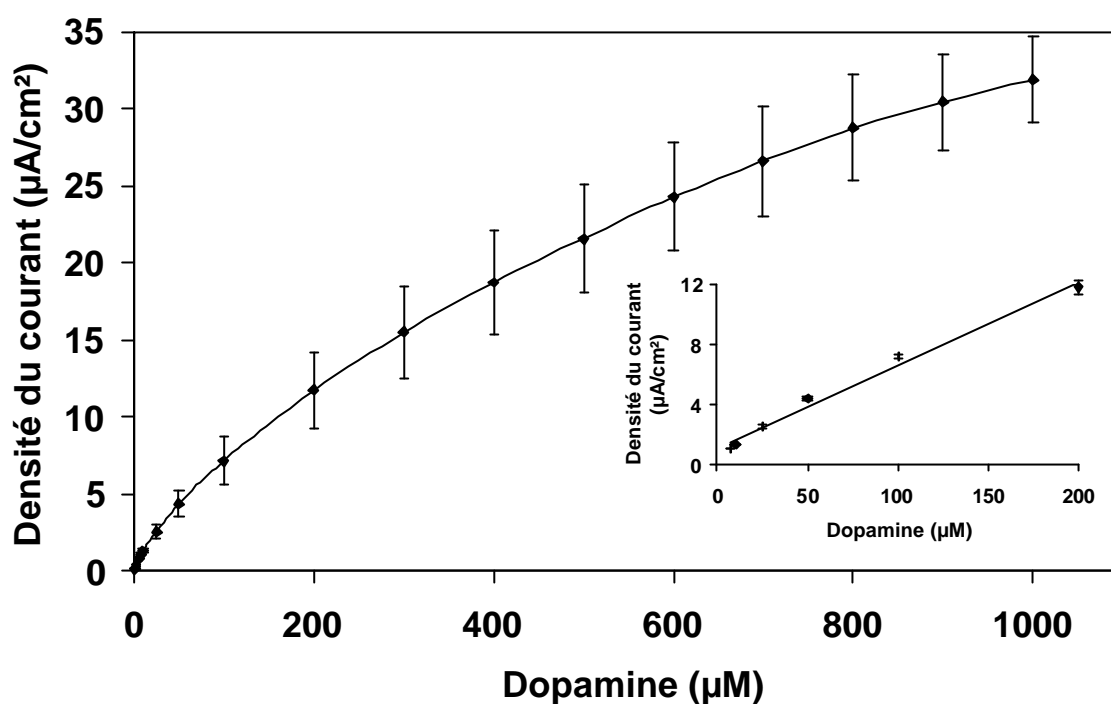


Figure IV.8 : Courbe d'étalonnage de la dopamine obtenue avec une électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : -0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

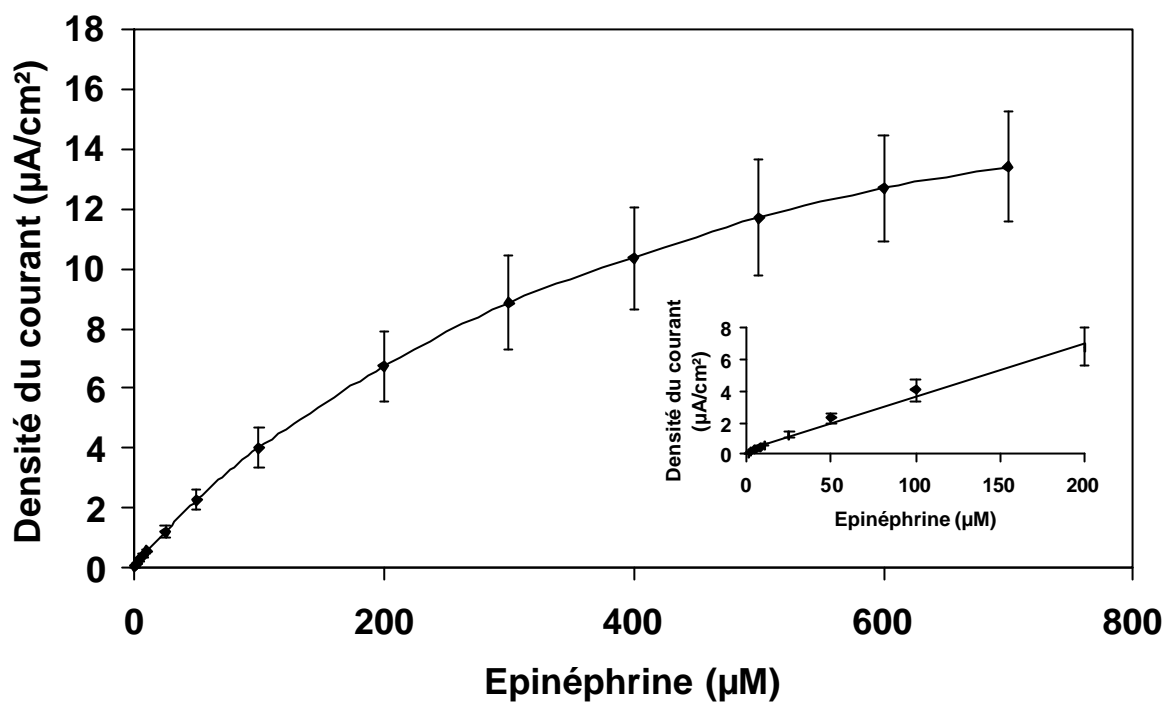


Figure IV.9 : Courbe d'étalonnage de l'épinéphrine électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : -0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

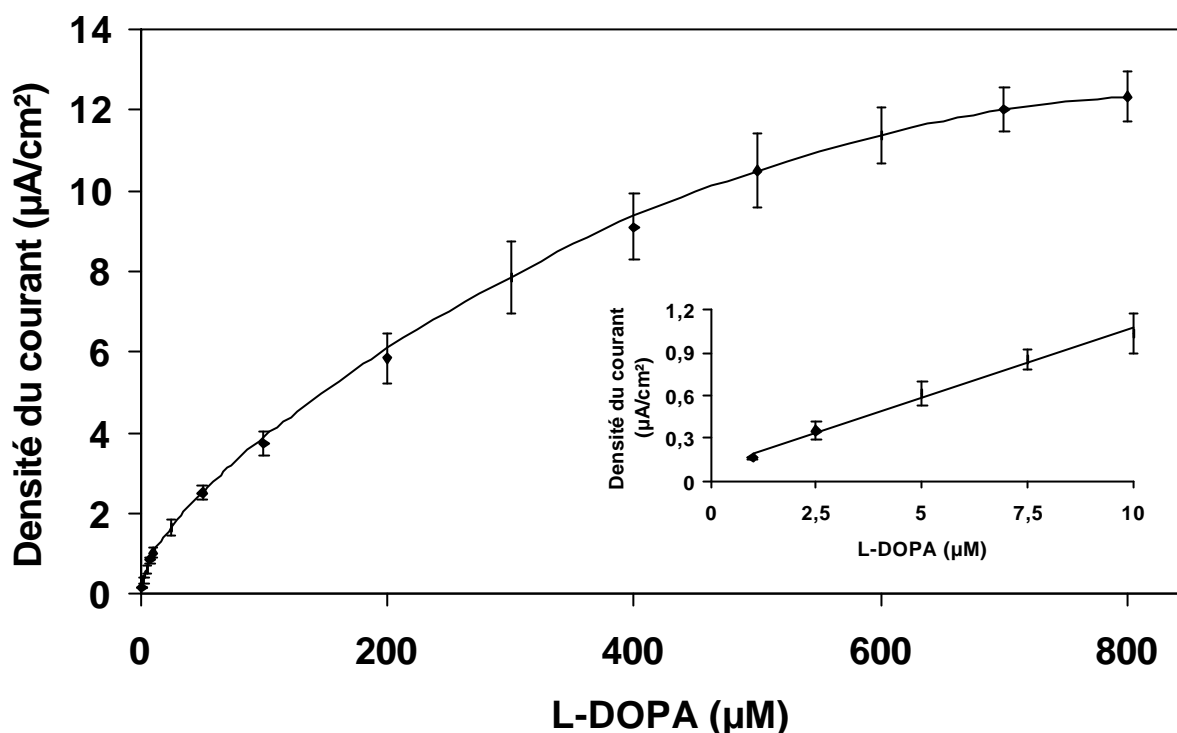


Figure IV.10 : Courbe d'étalonnage de la L-DOPA obtenue avec une électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : -0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

La sensibilité de la nouvelle électrode varie dans une gamme assez large en fonction du substrat utilisé et correspond au domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage. Le catéchol présente l'affinité la plus élevée pour l'enzyme. Tous les composés utilisés sont des dérivés du catéchol. Les valeurs de la limite de détection ont été obtenues pour un rapport signal/bruit égale à 3/1. Le tableau IV.2 présente les caractéristiques de la détection des quatre substrats utilisés.

Tableau IV.2 : Caractéristiques de la détection du catéchol, de la dopamine, de l'épinéphrine et de la L-DOPA. Valeurs obtenues avec une électrode (CV, diamètre 3 mm) CV/PEDT/PPO de composition : 25 μg de PPO et 75 nmoles de EDT. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : - 0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

Substrat	Sensibilité ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	Domaine linéaire (μM)	Limite de détection (μM)
Catéchol	1999	1-25	0,05
Dopamine	133	1-200	0,1
Epinéphrine	56	1-200	0,5
L-DOPA	104	1-10	0,5

IV.4.5 Etude de la reproductibilité de l'électrode CV/PEDT/PPO

Nous avons réalisé une étude afin de connaître la reproductibilité de la méthode de préparation de la bioélectrode CV/PEDT/PPO. Pour cela, le substrat de la PPO utilisé est le catéchol qui possède une grande affinité pour le site actif de l'enzyme et permet d'obtenir des sensibilités importantes du biocapteur. Le tableau IV.3 présente l'intensité de la réponse ampérométrique de 8 électrodes CV/PEDT/PPO à 5 μM de catéchol préparées selon un mode opératoire identique et avec le même lot d'enzyme. Ces résultats sont différents de ceux rapportés avant et résultent de l'emploi d'un lot d'enzyme moins active fourni par Sigma.

Tableau IV.3 : Etude de la reproductibilité de la préparation de l'électrode CV/PEDT/PPO. Valeurs obtenues avec une électrode (CV, diamètre 3 mm) CV/PEDT/PPO de composition : 25 μg de PPO et 75 nmoles de EDT. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : - 0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

N° d'électrode	Réponse ampérométrique à 5 μM de catéchol ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
1	6,62
2	4,00
3	6,20
4	6,60
5	5,54
6	8,34
7	4,92
8	4,95
Moyenne	5,90
Intervalle de confiance à 95%	0,90

La méthode de préparation du biocapteur présente une reproductibilité intéressante. On constate que les 8 électrodes préparées présentent une variation de 15 % de la valeur moyenne de leur sensibilité. Les écarts entre les valeurs de sensibilité pourraient provenir d'une variation de la concentration en monomère dans la solution de dépôt en raison de sa solubilité limite. La répétabilité de la réponse d'une même électrode est caractérisée par une déviation standard relative de 8% obtenue sur 5 mesures consécutives pour 5 μM de catéchol.

IV.4.6 Influence de la température sur la réponse du biocapteur

Il existe une zone de température 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 la réaction chute rapidement en raison de la dénaturation irréversible de l'enzyme. La réponse en courant du biocapteur CV/PEDT/PPO en présence de 5 μM de catéchol a été étudiée dans une gamme de température allant de 15 à 40°C (figure IV.11).

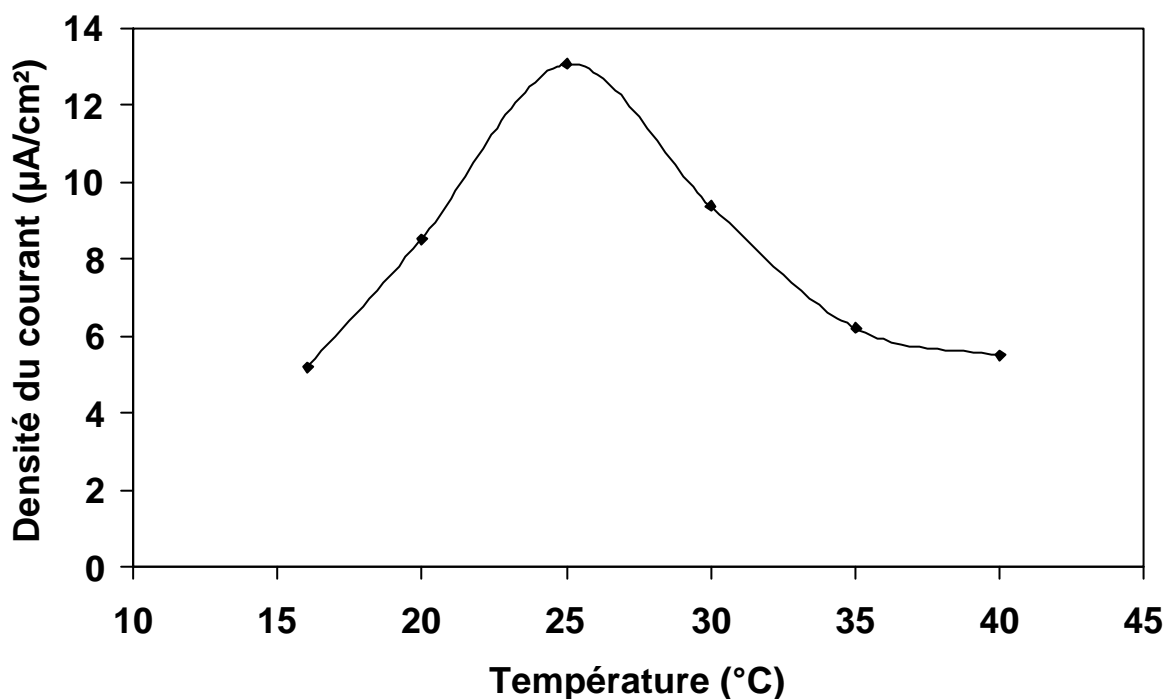


Figure IV.11 : Influence de la température sur la réponse en densité du courant d'une électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, Potentiel de mesure : - 0,2 V/ECS.

La figure IV.11 montre que l'intensité du courant augmente quand la température passe de 15 à 25°C, puis diminue pour des températures supérieures en raison de la

dénaturation thermique de la polyphénol oxydase. Nous avons choisi de travailler en milieu thermostaté à 25°C.

IV.4.7 Influence du pH sur la réponse du biocapteur

L'activité enzymatique étant dépendante du pH du milieu réactionnel, l'influence de ce paramètre sur la réponse ampérométrique du biocapteur a été examinée. L'étude a été réalisée entre pH 5 à 8 pour une concentration en catéchol de 5 μ M.

La figure IV.12 montrant les variations de la densité du courant en fonction du pH, présente une forme caractéristique en cloche. La réponse ampérométrique du biocapteur est optimale pour un pH de 6,5. Dans toute l'étude concernant l'immobilisation de la polyphénol oxydase dans la matrice de PEDT, nous avons choisi une valeur de pH de 6,5 pour le milieu d'analyse.

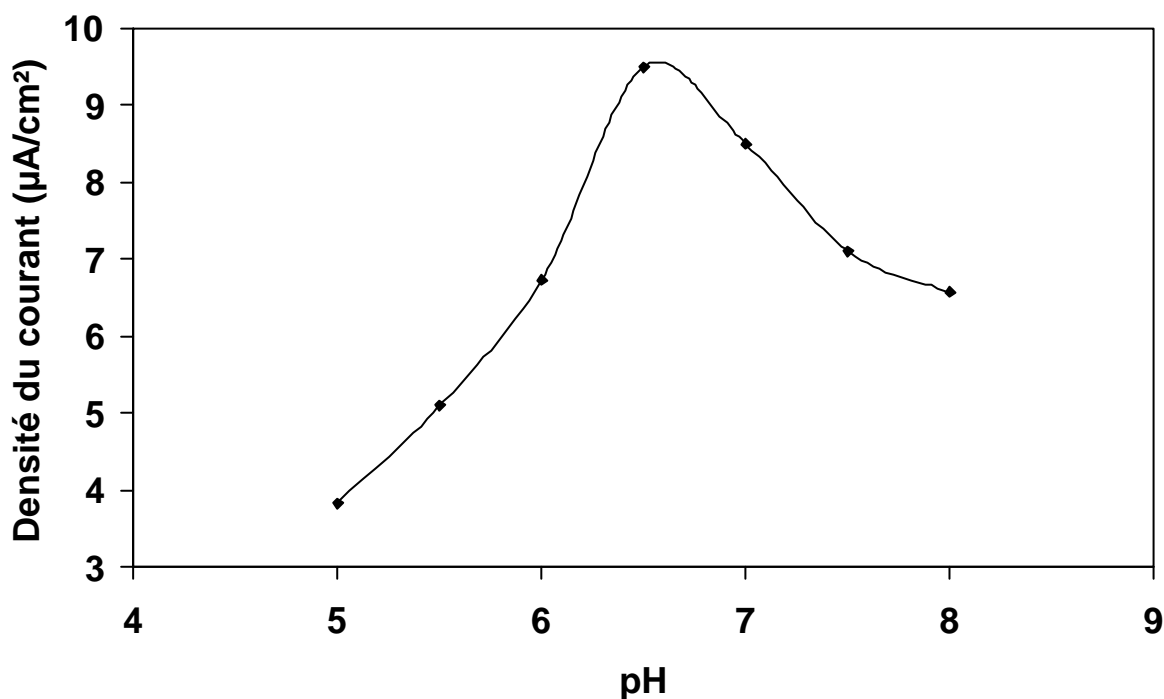


Figure IV.12 : Influence du pH sur la réponse ampérométrique d'une électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M. Potentiel de mesure : -0,2 V/ECS. Température 25°C. Système sous agitation mécanique.

IV.4.8 Stabilité en fonctionnement de l'électrode CV/PEDT/PPO

Pour déterminer les conditions optimales de la conservation de l'activité enzymatique des bioélectrodes, nous avons procédé à une conservation dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 6,5) à 4°C afin de maintenir une hydratation optimale du biomatériau.

Les réponses ampérométriques des biocapteurs ont été mesurées périodiquement (une fois par jour) par ajouts d'une même concentration en catéchol (5 μ M) dans la solution d'analyse. L'évolution de la réponse relative de la bioélectrode en fonction du temps de conservation est représentée dans la figure IV.13. Des pertes d'activité de 60 % sont enregistrées après 10 jours lorsque la bioélectrode est conservée à 4°C.

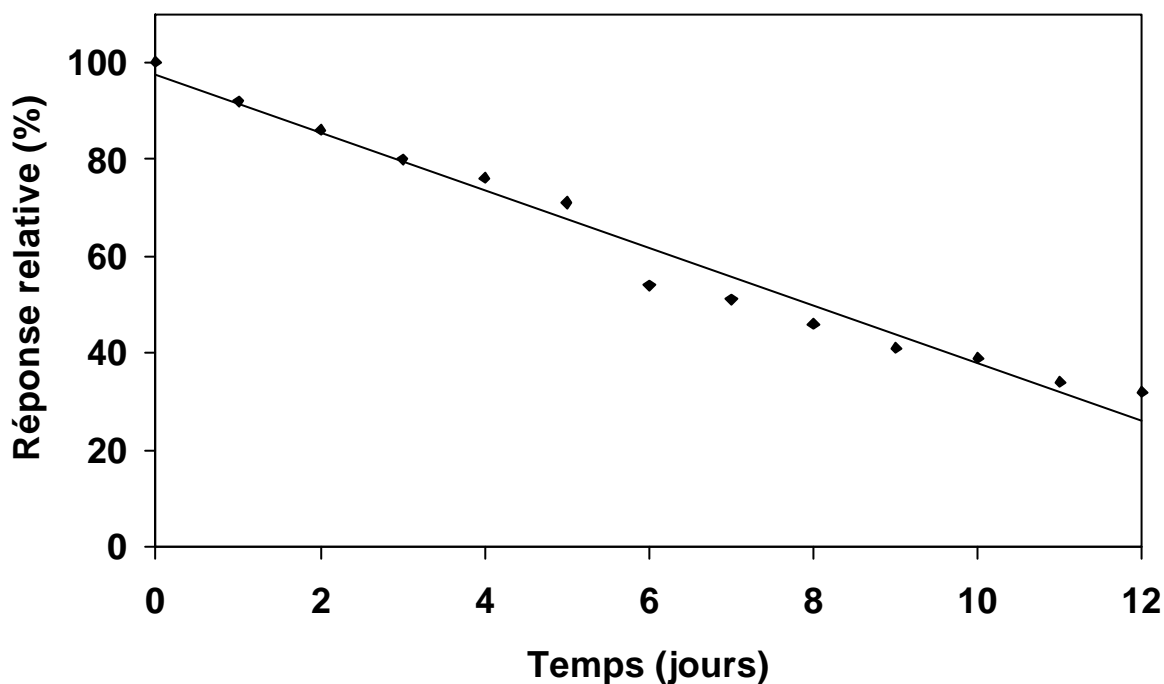


Figure IV.13 : Evolution de la réponse relative d'une électrode CV/PEDT/PPO en fonction du temps de conservation à 4°C dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5. La réponse du biocapteur est déterminée par des ajouts de catéchol en milieu tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 thermostaté à 25°C.

IV.4.9 Dosage direct du phénol

Le phénol et ses dérivés constituent une classe importante de polluants rencontrés dans l'eau. Ils proviennent essentiellement des rejets des industries du bois, du charbon ou du pétrole, mais également des activités domestiques puisque certains d'entre eux sont utilisés comme désinfectants. Le phénol est aussi un composé très toxique et possède une action destructrice sur les cellules de l'épiderme avec laquelle il entre en contact. Il tue la faune aquatique à des concentrations de 1 ppm. Pour ces raisons, la législation impose, pour les eaux destinées à la consommation humaine, que les phénols ne soient pas détectables organoleptiquement après l'ajout de chlore. En cas de détection, la concentration en phénol, exprimée en indice phénol, doit être inférieure ou égale à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, soit 5 nM.

L'électrode CV/PEDT/PPO peut déterminer directement la concentration du phénol. La figure IV.14 montre la réponse de l'électrode pour plusieurs additions de phénol. La sensibilité du biocapteur est de $608 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, le domaine linéaire s'étend de 1 à $25 \mu\text{M}$. La limite de détection est de $0,05 \mu\text{M}$ et correspond à un rapport signal/bruit égale à 3/1.

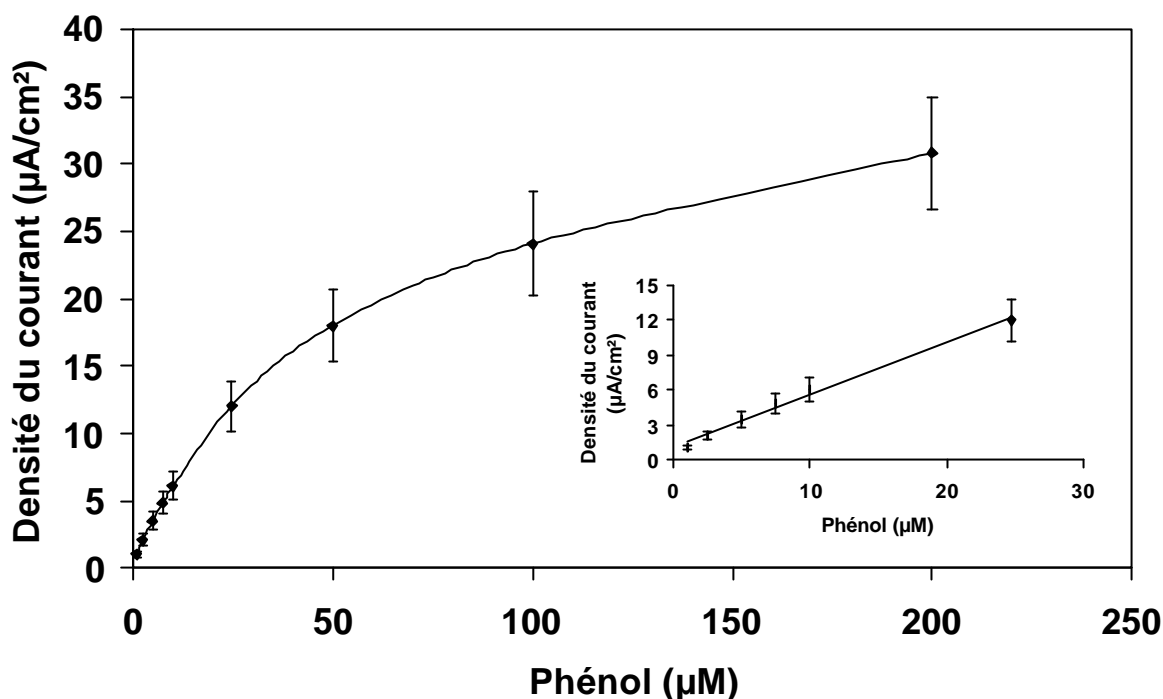


Figure IV.14 : Courbe d'étalonnage du phénol obtenue avec une électrode CV/PEDT/PPO. Conditions opératoires : solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, température 25°C. Potentiel de mesure : - 0,2 V/ECS. Système sous agitation mécanique.

La réponse du biocapteur à polyphénol oxydase au phénol est limitée par la proportion de la forme active (oxy) de l'enzyme. En conséquence, en solution, l'activité de crésolase ou monophénolase est caractérisée par un temps de latence élargie. Ainsi, l'étape critique dans la réponse du biocapteur à PPO est la réduction efficace de l'ortho-quinone parce que la formation de quantités significatives de la forme oxy de l'enzyme dépend de la présence, soit du catéchol soit d'un autre donneur d'électrons convenable. Le catéchol est capable de transformer les formes intermédiaires de l'enzyme dans la forme active-phénol en présence d'oxygène et donner lieu à une amplification de la production d'ortho-quinone.

Quand le phénol est utilisé comme substrat, seulement une petite quantité de la forme oxy de l'enzyme est active dû à l'absence du diphénol « activateur » nécessaire pour l'activation en cascade de la PPO. Dans les bioélectrodes, où la réduction de l'ortho-quinone est lente ou irréversible chimiquement, la cascade n'arrive pas à se compléter, les performances analytiques du biocapteur diminuent. Cela peut être une explication à la faible

sensibilité obtenu dans le cas de notre biocapteur. Une possible solution pour améliorer le système est l'incorporation des médiateurs rédox. Les plus couramment utilisés sont : le ferricyanure, le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) et le méthylphénazonium [133].

IV.5 CONCLUSION

Le travail exposé dans ce chapitre a permis de montrer que le PEDT peut être utilisé comme support pour l'électropolymérisation d'autres enzymes que la GOD. Dans ce cas-là, la polyphénol oxydase (PPO) a été immobilisée au sein d'une matrice de polymère.

L'immobilisation de la PPO a abouti à l'élaboration d'un biocapteur ampérométrique pour la détection de différents substrats ortho-diphénoliques d'intérêt médical.

Le biocapteur permet aussi le dosage des composés monophénoliques (phénol) dans une gamme de concentrations qui s'étend de 1 à 25 μM et avec une limite de détection de 0,05 μM .

La polyphénol oxydase immobilisée peut être utilisée comme biocatalyseur dans la conversion des composés phénoliques en catéchol et/ou quinone, étant donnée que l'enzyme en solution est désactivé par les produits de la réaction [134]. Cette application potentiel peut favoriser la biotransformation du phénol et/ou la dépollution des eaux contaminées. Par ailleurs, la tyrosinase a été étudié comme une alternative à l'utilisation des enzymes peroxydase pour le traitement des composés phénoliques et ses dérivés chlorés [135].

CONCLUSION GENERALE

Le travail présenté dans ce rapport concerne principalement l'utilisation de nouveaux biomatériaux d'électrode, avec pour principal objectif, la mise en œuvre et l'optimisation d'un biocapteur ampérométrique enzymatique pour la détection du glucose dans des milieux biologiques. En effet, une part importante de ce travail a été consacré à une application des biocapteurs dans le domaine biomédical. Par ailleurs, dans le domaine de l'environnement, nous avons optimisé un biocapteur pour la détection du phénol, polluant du milieu aqueux. L'optimisation de ces deux capteurs a été évalué au moyen de la glucose oxydase et de la polyphénol oxydase.

Nous avons montré que le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT) constitue un bon support pour l'électropolymérisation d'enzymes. Cependant, malgré leurs excellentes propriétés conductrices décrites dans la littérature scientifique, ce polymère conducteur n'est pas capable de connecter le site actif de l'enzyme à l'électrode et ainsi régénérer le cofacteur enzymatique de façon satisfaisante.

Le piégeage de la glucose oxydase dans une matrice hôte de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT) conduit à la mise en œuvre d'un biocapteur à glucose très performant, que ce soit en terme de sensibilité et de domaine de linéarité qu'en terme de temps de réponse.

Dans ce travail, pour améliorer la sélectivité du biocapteur à glucose vis-à-vis des interférents nous avons testé deux stratégies. La première est basée sur la platinisation des électrodes dans le but d'abaisser la surtension d'oxydation du peroxyde d'hydrogène. Les résultats obtenus sont prometteurs et nous encourageant à continuer des recherches dans cette voie. La deuxième méthode est fondée sur l'utilisation de médiateurs électrochimiques afin de substituer efficacement l'oxygène, médiateur naturel de la réaction de la GOD.

Cette étude nous a permis aussi de montrer l'applicabilité du système biocapteur-FIA. Dans ce cadre, les perspectives les plus intéressantes concernent la possible intégration à des systèmes automatisés.

Dans le domaine de l'environnement, l'immobilisation de la polyphénol oxydase permet l'élaboration d'un biocapteur ampérométrique sensible aux composés orthodiphénoliques et monophénoliques. Les performances analytiques de ce capteur sont intéressantes tant en sensibilité qu'en seuil de détection.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Tran-Minh, C. (1991). "Les biocapteurs. Principes, construction et applications." Paris, Masson.
- [2] Comtat, M. and A. Bergel (1997). "Biocapteurs: rêve ou réalité industrielle ?" *Biofutur* 171(octobre): 33-36.
- [3] Labuda, J. (1992). "Chemically modified electrodes as sensors in analytical chemistry." *Ion-selective electrode review* 14: 33-86.
- [4] Borman, S. (1987). "Biosensors: potentiometric and amperometric." *Anal. Chem.* 59(18): 1091A-1098A.
- [5] Frew, J. E. and H. A. O. Hill (1987). "Electrochemical biosensors." *Anal. Chem.* 59(15): 933A-944A.
- [6] Brett, A. M. O. (1993). *Electrochemical Biosensors. Uses of immobilized biological compounds.* M. M. G.G. Guilbault, Kluwer Academics: 201-210.
- [7] Coche-Guerente, L., S. Cosnier, et al. (1993). "Controlled electrochemical preparation of enzymatic layers for the design of amperometric biosensors." *Electroanalysis* 5: 647-652.
- [8] Schuhmann, W. (1995). "Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes." *Mikrochimica Acta* 121: 1-29.
- [9] Kauffmann, J. M. and G. G. Guilbault (1992). *Enzyme electrode biosensors: Theory and applications. Bioanalytical Applications of Enzymes/Methods of Biochemical Analysis Series*, John Wiley and Sons, Inc. 36: 63-113.
- [10] Stryer, L. (1985). "La Biochimie." Flammarion Médecine Sciences. Paris.
- [11] Dixon, M. and E. Webb (1971). "Enzymes." London, Longman Group Limited.
- [12] Borel, J. P., A. Randoux, et al. (1987). "Biochimie Dynamique." Paris, Maloine éditeur Paris.
- [13] Kennedy, J. F., E. H. M. Melo, et al. (1990). "Immobilized enzymes and cells." *Chem. Engin. Progress* 87(7): 81-89.
- [14] Carr, P. and L. Bowers (1980). "Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Fundamentals and applications." New York, John Wiley and Sons, Inc.
- [15] Hartmeier, W. (1988). "Immobilized biocatalysts: An introduction." Berlin, Springer-Verlag.
- [16] Weetall, H. (1975). "Immobilized enzymes, antigens, antibodies, and peptides. Preparation and characterization." New York, Marcel Dekker Inc.

- [17] Bowers, L. D. (1986). "Applications of immobilized biocatalysts in chemical analysis." *Anal. Chem.* 58(4): 513A-530A.
- [18] Zaborsky, O. (1974). "Immobilized enzymes." Ohio, CRC Press.
- [19] Weetall, H. H. (1974). "Immobilized enzymes: Analytical applications." *Anal. Chem.* 46(7): 602A-615A.
- [20] Richards, F. M. and J. R. Knowles (1968). "Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent." *J. Mol. Biol.* 37: 231-233.
- [21] Tran-Minh, C., S. Kumaran, et al. (1990). *Immobilisation des protéines.* France, F - 9011630.
- [22] Bartlett, P. N. and R. G. Whitaker (1987). "Electrochemical immobilization of enzymes. Part I. Theory." *J. Electroanal. Chem.* 224: 27-35.
- [23] Bartlett, P. N. and J. M. Cooper (1993). "A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films." *J. of electroanalytical chemistry* 362: 1-12.
- [24] Lewis, T. W., G. G. Wallace, et al. (1999). "Electrofunctional polymers: their role in the development of new analytical systems." *Analyst* 124: 213-219.
- [25] Wallace, G. G., M. Smyth, et al. (1999). "Conducting electroactive polymer-based biosensors." *Trends in analytical chemistry* 18(4): 245-251.
- [26] Cosnier, S. (2000). "Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 89: 127-138.
- [27] Heywang, G. and F. Jonas (1992). "Poly(alkylenedioxythiophene)s. New, very stable conducting polymers." *Adv. Mater.* 4(2): 116-118.
- [28] Bartlett, P. N. and P. R. Birkin (1993). "The application of conducting polymers in biosensors." *Synthetic Metals* 61: 15-21.
- [29] Koopal, C. G. J., M. C. Feiters, et al. (1992). "Third-generation amperometric biosensor for glucose. Polypyrrole deposited within a matrix of uniform latex particles as mediator." *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 29: 159-175.
- [30] Koopal, C. G. J., M. C. Feiters, et al. (1992). "Glucose sensors utilizing polypyrrole incorporated in track-etch membranes as the mediator." *Biosensors and Bioelectronics* 7: 461-471.
- [31] Bélanger, D., J. Nadreau, et al. (1989). "Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode." *J. Electroanal. Chem.* 274: 143-155.
- [32] Belanger, D., J. Nadreau, et al. (1989). *J. Electroanal. Chem.* 274: 37.

- [33] Schuhmann, W. (1998). Enzyme biosensors based on conducting polymers. *Methods in Biotechnology*. A. M. a. K. R. Rogers, Humana Press. 6: Enzyme and microbial biosensors: 143-156.
- [34] Fortier, G., E. Brassard, et al. (1990). "Optimization of a polypyrrole glucose oxidase biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* 5: 473-490.
- [35] Fortier, G. and D. Bélanger (1991). "Characterization of the biochemical behavior of glucose oxidase entrapped in a polypyrrole film." *Biotechnology and Bioengineering* 37: 854-858.
- [36] Coche-Guerente, L., A. Deronzier, et al. (1994). "Electrochemical immobilization of glucose oxidase in poly(amphiphilic pyrrole) films and its application to the preparation of an amperometric glucose sensor." *Analytica Chimica Acta* 289: 143-153.
- [37] Coche-Guerente, L., S. Cosnier, et al. (1995). "Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives." *Analytica Chimica Acta* 311: 23-30.
- [38] Shin, M. and H. Kim (1995). "Effects of enzyme concentration and film thickness on the analytical performance of a polypyrrole/glucose oxidase biosensor." *Anal. Letters* 28(6): 1017-1031.
- [39] Trojanowics, M., O. Geschke, et al. (1995). "Biosensors based on oxidases immobilized in various conducting polymers." *Sensors and Actuators B* 28: 191-199.
- [40] Benedetto, G. E. D., F. Palmisano, et al. (1996). "One-step fabrication of a bienzyme glucose sensor based on glucose oxidase and peroxidase immobilized onto a polypyrrole modified glassy carbon electrode." *Biosensors and Bioelectronics* 11(10): 1001-1008.
- [41] Cho, J.-H., M.-C. Shin, et al. (1996). "Electrochemical adsorption of glucose oxidase onto polypyrrole film for the construction of a glucose biosensor." *Sensors and Actuators B* 30: 137-141.
- [42] Ramanathan, K., S. Annapoorni, et al. (1996). "Immobilization of glucose oxidase in electrochemically prepared polypyrrole films." *Journal of materials science letters* 15: 124-128.
- [43] Cosnier, S. (1997). "Electropolymerization of amphiphilic monomers for designing amperometric biosensors." *Electroanalysis* 9(12): 894-902.
- [44] Wang, J., S. Chen, et al. (1989). "Use of different electropolymerization conditions for control of the size-exclusion selectivity at polyaniline, polypyrrole and polyphenol films." *J. Electroanal. Chem.* 273: 231-242.
- [45] Gao, Z., J. Bobacka, et al. (1994). "Electrochemical study of bilayer conducting polymers: polypyrrole/polyaniline system." *J. of Electroanal. Chem.* 364: 127-133.

- [46] Lu, S.-Y., C.-F. Li, et al. (1994). "Electron transfer on an electrode of glucose oxidase immobilized in polyaniline." *J. of Electroanal. Chem.* 364: 31-36.
- [47] Mu, S. and H. Xue (1996). "Bioelectrochemical characteristics of glucose oxidase immobilized in a polyaniline film." *Sensors and Actuators B* 31: 155-160.
- [48] Sandgodkar, H., S. Sukeerthi, et al. (1996). "A biosensor array based on polyaniline." *Anal. Chem.* 68: 779-783.
- [49] Sayre, C. N. and D. M. Collard (1997). "Electrooxidative deposition of polypyrrole and polyaniline on self-assembled monolayer modified electrodes." *Langmuir* 13: 714-722.
- [50] Yamato, H., M. Ohwa, et al. (1995). "Stability of polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for biosensor application." *J. Electroanal. Chem.* 397: 163-170.
- [51] Hiller, M., C. Kranz, et al. (1996). "Amperometric biosensors produced by immobilization of redox enzymes at polythiophene-modified electrode surfaces." *Adv. Mater.* 8(3): 219-222.
- [52] Sadik, O. (1999). "Bioaffinity sensors based on conducting polymers: a short review." *Electroanalysis* 11(12): 839-844.
- [53] Wang, J. (1993). *Anal. Chem.* 65: 450R.
- [54] Ghosh, S., J. Rasmusson, et al. (1998). "Supramolecular self-assembly for enhanced conductivity in conjugated polymer blends: ionic crosslinking in blends of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) and poly(vinylpyrrolidone)." *Adv. mater.* 10(14): 1097-1099.
- [55] Khan, M. A. and S. P. Armes (1999). "Synthesis and characterization of micrometer-sized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated polystyrene latexes." *Langmuir* 15: 3469-3475.
- [56] Garreau, S., G. Louarn, et al. (1999). "In situ spectroelectrochemical Raman studies of PEDT." *Macromolecules* 32: 6807-6812.
- [57] Piro, B., P. Minh-Chau, et al. (1999). "Electrochemical method for entrapment of oligonucleotides in polymer-coated electrodes." *J. Biom. Mat. Res.* 46(4): 566-572.
- [58] Jolly, R., S. Pairis, et al. (1998). "Viellissement comparé de trois polymères conducteurs." *J. Chim. Phys.* 95: 1400-1405.
- [59] Lerch, K., F. Jonas, et al. (1998). "Properties and applications of Baytron (PEDT)." *J. Chim. Phys.* 95: 1506-1509.
- [60] Sakmeche, N., J. J. Aaron, et al. (1996). "Anionic micelles; a new aqueous medium for electropolymerization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films on Pt electrodes." *Chem. Commun.:* 2723-2724.

- [61] Lima, A., P. Schottland, et al. (1998). "Electropolymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene and 3,4-ethylenedioxythiophene methanol in the presence of dodecylbenzenesulfonate." *Synthetic metals* 93: 33-41.
- [62] Li, G., G. Kobmelh, et al. (1999). "New conducting carrier materials: polyalkylthiophene functionalized with 1,2-diol group and its protected forms." *Acta Polym.* 50: 252-259.
- [63] Guerrieri, A., G. E. D. Benedetto, et al. (1998). "Electrosynthesized non-conducting polymers as permselective membranes in amperometric enzyme electrodes: a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer." *Biosensors and Bioelectronics* 13(1): 103-112.
- [64] Malitesta, C., F. Palmisano, et al. (1990). "Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in a electropolymerized poly(*o*-phenylenediamine)film." *Anal. Chem.* 62: 2735-2740.
- [65] Bartlett, P. N. and D. J. Caruana (1992). "Electrochemical immobilization of enzymes. Part V. Microelectrodes for the detection of glucose based on glucose oxidase immobilized in a polyphenol film." *Analyst* 117: 1287-1292.
- [66] Bartlett, P. N., P. Tebbut, et al. (1992). "Electrochemical immobilization of enzymes. 3. Immobilization of glucose oxidase in thin films of electrochemically polymerized phenols." *Anal. Chem.* 64: 138-142.
- [67] Pravda, M., C. M. Jungar, et al. (1995). "Evaluation of amperometric biosensors based on co-immobilisation of glucose oxidase with an osmium redox polymer in electrochemically generated polyphenol films." *Analytica Chimica Acta* 304: 127-138.
- [68] Warriner, K., S. Higson, et al. (1996). "Electrochemical characteristics of two model electropolymerized films for enzyme electrodes." *Biosensors and Bioelectronics* 11(6/7): 615-623.
- [69] Kang, T.-F., G.-L. Shen, et al. (1997). "Amperometric biosensor for glucose based on electropolymerized tetraaminophthalocyanatocobalt(II) and phenol films." *Analytical letters* 30(4): 647-662.
- [70] Nakabayashi, Y., M. Wakuda, et al. (1998). "Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer mediator." *Anal. Sci.* 14: 1069-1076.
- [71] Centonze, D., A. Guerrieri, et al. (1994). "Electrochemically prepared glucose biosensors: kinetic and Faradaic processes involving ascorbic acid and role of the electropolymerized film in preventing electrode-fouling." *Fresenius J. Anal. Chem.* 349: 497-501.
- [72] Centonze, D., C. Malitesta, et al. (1994). "Permeation of solutes through an electropolymerized ultrathin poly-*o*-phenylenediamine film used as an enzyme-entrapping membrane." *Electroanalysis* 6: 423-429.

- [73] Lowry, J. P., K. McAteer, et al. (1994). "Characterization of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes in vitro and in vivo: homogeneous interference by ascorbic acid in hydrogen peroxide detection." *Anal. Chem.* 66: 1754-1761.
- [74] Ateer, K. M. and R. O'Neill (1996). "Strategies for decreasing ascorbate interference at glucose oxidase-modified poly(*o*-phenylenediamine)-coated electrodes." *Analyst* 121: 773-777.
- [75] Dumont, J. and G. Fortier (1996). "Behavior of glucose oxidase immobilized in various electropolymerized thin films." *Biotechnology and Bioengineering* 49: 544-552.
- [76] Ekinçi, E., A. A. Karagözler, et al. (1996). "Electrochemical synthesis and sensor application of poly(1,4-diaminobenzene)." *Synthetic metals* 79: 57-61.
- [77] Castañón, M. J. L., A. J. M. Ordieres, et al. (1997). "Amperometric detection of ethanol with poly-(*o*-phenylenediamine)-modified enzyme electrodes." *Biosensors and Bioelectronics* 12(6): 511-520.
- [78] Garjonyte, R. and A. Malinauskas (1999). "Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(*o*-phenylenediamine) layer." *Sensors and Actuators B* 56: 85-92.
- [79] Pandey, P. C. (1988). "A new conducting polymer-coated glucose sensor." *J. Chem. Soc. Faraday Trans I* 84: 2259-2264.
- [80] Curulli, A. and G. Palleschi (1997). "Electropolymerization of pyrrole - 2 - carboxylic acid and 4,4'-dihydroxybenzophenone on platinum electrodes. Application to assemble novel glucose sensors." *electroanalysis* 9(14): 1107-1112.
- [81] Zhang, Z., H. Liu, et al. (1996). "A glucose biosensor on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized *o*-aminophenol film on platinized glassy carbon electrode." *Anal. Chem.* 68: 1632-1638.
- [82] Bartlett, P. N., P. Tebbut, et al. (1992). *Anal. Chem.* 64: 138.
- [83] Matsue, T. (1993). "Electrochemical sensors using microarray electrodes." *Trends in analytical chemistry* 12(3): 100-108.
- [84] Reynolds, E. R. and A. M. Yacynych (1994). "Direct sensing platinum ultramicrobiosensors for glucose." *Biosensors and bioelectronics* 9: 283-293.
- [85] Strike, D. J., N. F. d. Rooij, et al. (1995). "Electrochemical techniques for the modification of microelectrodes." *Biosensors and Bioelectronics* 10: 61-66.
- [86] Liang, J. F., Y. T. Li, et al. (2000). "Biomedical application of immobilized enzymes." *Journal of pharmaceutical sciences* 89(8): 979-990.

- [87] Marks, V. (1996). "Blood glucose: its measurement and clinical importance." *Clinica Chimica Acta* 251: 3-17.
- [88] Wilkins, E. and P. Atanasov (1996). "Glucose monitoring: state of the art and future possibilities." *Med. Eng. Phys.* 18(4): 273-288.
- [89] Kuhn, L. S. (1998). "Biosensors: Blockbuster or bomb ? Electrochemical biosensors for diabetes monitoring." *The electrochemical Society Interface*: 26-31.
- [90] Heller, A. (1990). "Electrical wiring of redox enzymes." *Acc. Chem. Res.* 23: 128-134.
- [91] Haouz, A., C. Twist, et al. (1998). "Dynamic and structural properties of glucose oxidase enzyme." *Eur. Biophys. J.* 27: 19-25.
- [92] Godet, C., M. Boujtita, et al. (1999). "Direct electron transfer involving a large protein: glucose oxidase." *New J. Chem.* 23: 795-797.
- [93] Hall, E. A. H. (1990). "Biosensors." London, Open University Press.
- [94] Piro, B., L. A. Dang, et al. (2001). "A glucose biosensor based on modified-enzyme incorporated within electropolymerised poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT)." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 512(1-2): 101-109.
- [95] Garreau, S., G. Louarn, et al. (1999). "Optical study and vibrational analysis of de PEDT." *Synthetic metals* 101: 312-313.
- [96] Barman, T. E. (1969). "Enzyme Handbook." Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- [97] Cosnier, S. and C. Innocent (1992). "A novel biosensor elaboration by electropolymerization of an adsorbed amphiphilic pyrrole-tyrosinase enzyme layer." *J. of Electroanal. Chem.* 328: 361-366.
- [98] Wang, J., Q. Chen, et al. (1995). "Screen-printed amperometric biosensors for glucose and alcohols based on ruthenium-dispersed carbon inks." *Anal. Chim. Acta* 300: 111-116.
- [99] Li, Q., B. Ye, et al. (1999). "Enhancement of the sensitivity and selectivity of oxidation of H₂O₂ on platinum wire at low working potential by platinization and covering of heteropolypyrrole film for amperometric micro-biosensor construction." *Fresenius J. Anal. Chem.* 363: 246-250.
- [100] Daly, D. J., C. K. O'Sullivan, et al. (1999). "The use of polymers coupled with metallised electrodes to allow H₂O₂ detection in the presence of electrochemical interferences." *Talanta* 49: 667-678.
- [101] Holdcroft, S. and B. L. Funt (1988). "Preparation and electrocatalytic properties of conducting films of polypyrrole containing platinum microparticulates." *J. Electroanal. Chem.* 240: 89-103.

- [102] Kim, C. and S. Oh (1996). "Enzyme sensors prepared by electrodeposition on platinized platinum electrodes." *Electrochimica Acta* 41(15): 2433-2439.
- [103] Zhang, Z., C. Lei, et al. (1996). "Electrochemical fabrication of amperometric glucose enzyme electrode by immobilizing glucose oxidase in electropolymerized poly(3,3'-diaminobenzidine) film on palladinized glassy carbon electrode." *Analyst* 121: 971-976.
- [104] Fultz, M. L. and R.A.Durst (1982). "Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation." *Analytica Chimica Acta* 140: 1-18.
- [105] Turner, A. P. F., I. Karube, et al. (1989). "Biosensors. Fundamentals and Applications." Oxford University Press.
- [106] Vaillancourt, M., J. Chen, et al. (1999). "Electrochemical and enzymatic studies of electron transfer mediation by ferrocene derivatives with nafion-glucose oxidase electrodes." *Electroanalysis* 11(1): 23-31.
- [107] Vidal, J. C., E. Garcia-Ruiz, et al. (2000). "Strategies for the improvement of an amperometric cholesterol biosensor based on electropolymerization in flow system: use of charge-transfer mediators and platinization of the electrode." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24: 51-63.
- [108] Garjonyte, R. and A. Malinauskas (2000). "Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized polypyrrole and poly(*o*-phenylenediamine) films on a Prussian Blue-modified electrode." *Sensors and Actuators B* 63: 122-128.
- [109] Pandey, P. C., V. Pandey, et al. (1994). "An amperometric enzyme electrode for lactate based on graphite paste modified with tetracyanoquinodimethane." *Biosensors and Bioelectronics* 9: 365-372.
- [110] Lima-Filho, J. L., P. C. Pandey, et al. (1996). "An amperometric flow injection analysis enzyme sensor for sucrose using a tetracyanoquinodimethane modified graphite paste electrode." *Biosensors and Bioelectronics* 11(8): 719-723.
- [111] Pandey, P. C., S. Upadhyay, et al. (1998). "Sensitivity, selectivity and reproducibility of some mediated electrochemical biosensors/sensors." *Analytical letters* 31(14): 2327-2348.
- [112] Saby, C., F. Mizutani, et al. (1995). "Glucose sensor based on carbon paste electrode incorporating poly(ethylene glycol)-modified glucose oxidase and various mediators." *Analytica Chimica Acta* 304: 33-39.
- [113] Savitri, D. and C. K. Mitra (1999). "Role of mediators in electron transport from glucose oxidase redox centre to electrode surface in a covalently coupled paste electrode." *J. Biosci* 24(March): 43-48.

- [114] Becerik, I. (1998). "glucose sensitivity of polypyrrole-glucose oxidase modified electrodes containing p-benzoquinone in biological buffer." *Annali di Chimica* 88: 697-704.
- [115] Serra, B., A. J. Reviejo, et al. (1999). "Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: Application to food samples." *Biosensors and Bioelectronics* 14: 505-513.
- [116] Milagres, B. G., G. d. O. Neto, et al. (1997). "A new amperometric biosensor for salicylate based on salicylate hydroxylase immobilized on polypyrrole film dopped with hexacyanoferrate." *Analytica Chimica Acta* 347: 35-41.
- [117] Losito, I. and P. G. Zambonin (1996). "Double electropolymer modified platinum electrode to follow the kinetic process $H_2O_2 +$ ascorbic acid. Influence of the reaction on amperometric biosensor applications." *J. of Electroanal. Chem.* 410: 181-187.
- [118] Belanger, D., E. Brassard, et al. (1990). "Enhancement of response by incorporation of platinum microparticles into a polypyrrole-glucose oxidase electrode." *Anal. Chimica Acta* 228: 311-315.
- [119] Adeloju, S. B., S. J. Shaw, et al. (1996). "Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea." *Analytica Chimica Acta* 323: 107-113.
- [120] Trojanowics, M., A. Lewenstan, et al. (1996). "Flow injection amperometric detection of ammonia using a polypyrrole-modified electrode and its application in urea and creatinine biosensors." *Electroanalysis* 8(3): 233-243.
- [121] Schuhmann, W. and R. Kittsteiner-Eberle (1991). "Evaluation of polypyrrole/glucose oxidase electrodes in flow-injection systems for sucrose determination." *Biosensors and Bioelectronics* 6: 263-273.
- [122] Kumaran, S. and C. Tran-Minh (1992). "Determination of organophosphorous and carbamate insecticides by flow injection analysis." *Anal. Biochem.* 200: 187-194.
- [123] Rippeth, J. J., T. D. Gibson, et al. (1997). "Flow-injection detector incorporating a screen-printed disposable amperometric biosensor for monitoring organophosphate pesticides." *Analyst* 122: 1425-1429.
- [124] Comtat, M. and P. Coulet *Biocapteurs électrochimiques pour le contrôle des bioprocédés. Capteurs et mesures en Biotechnologie.*
- [125] Gründig, B., B. Strehlitz, et al. (1993). "Development of a process-FIA system using mediator-modified enzyme electrodes." *J. of Biotechnology* 31: 277-287.
- [126] Yao, T., M. Satomura, et al. (1994). "Amperometric flow-injection determination of glucose, urate and cholesterol in blood serum by using some immobilized enzyme reactors and poly(1,2-diaminobenzene)-coated platinum electrode." *Analytica Chimica Acta* 296: 271-276.

- [127] Rogers, K. R. and J. N. Lin (1992). "Biosensors for environmental monitoring." *Biosensors and Bioelectronics* 7: 317-321.
- [128] Yaropolov, A. I., A. N. Kharybin, et al. (1996). "Electrochemical properties of some copper-containing oxidases." *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40(1): 49-57.
- [129] Fenoll, L. G., J. N. Rodríguez-López, et al. (2001). "Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable *o*-quinones." *Biochimica et Biophysica Acta* 1548: 1-22.
- [130] Rodríguez-López, J. N., L. G. Fenoll, et al. (2001). "Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of *o*-diphenol." *Biochimica et Biophysica Acta* 1548: 238-256.
- [131] Eicken, C., B. Krebs, et al. (1999). "Catechol oxidase-Structure and activity." *Current opinion in Structural Biology* 9: 677-683.
- [132] Coche-Guérente, L., V. Desprez, et al. (1999). "Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling Part I. Theoretical treatment of the catechol-polyphenol oxidase system." *J. of Electroanal. Chem.* 470: 53-60.
- [133] Hedenmo, M., A. Narvaez, et al. (1997). "Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes." *J. Electroanal. Chem.* 425: 1-11.
- [134] Burton, S. G., A. Boshoff, et al. (1998). "Biotransformation of phenols using immobilised polyphenol oxidase." *J. of Mol. Catalysis B: enzymatic* 5: 411-416.
- [135] Ikehata, K. and J.A.Nicell (2000). "Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols." *Bioresource Technology* 74: 191-199.

PUBLICATIONS

RESUME

Les biocapteurs ampérométriques décrits dans ce travail sont basés sur l'immobilisation d'enzymes oxydo-réductases dans un polymère conducteur déposé à la surface des électrodes. Les performances des biocapteurs sont conditionnées par la méthode d'immobilisation mise en œuvre ainsi que par les caractéristiques de la matrice qui en résulte. Une technique de polymérisation électrochimique a été utilisée pour fixer l'enzyme dans un dérivé du polythiophène, le poly(3,4-éthylendioxythiophène) (PEDT). Les potentialités de cette technique ont été démontrées pour deux enzymes différentes : la glucose oxydase et la polyphénol oxydase. L'optimisation des paramètres opérationnels a été conduite d'abord en système batch, puis étendue au système d'analyse en flux continu (FIA). Ce système biocapteur-FIA est très adapté pour des mesures en continu du glucose dans les échantillons biologiques. La sélectivité de ce biocapteur en présence de composés interférents a été améliorée par la platinisation de l'électrode, qui rehausse la réponse au glucose, ou l'utilisation des médiateurs rédox. Un biocapteur à polyphénol oxydase exploitant l'amplification enzymatique mise en jeu a permis la détection des polluants phénoliques jusqu'à 50 nM.

Mots clés : Biocapteurs ampérométriques, électrode à enzyme, glucose oxydase, polyphénol oxydase, PEDT, médiateurs rédox, FIA, glucose, phénol.

ABSTRACT

The amperometric biosensors presented in this work are based on immobilization of oxidoreductase enzymes in a conducting polymer deposited on electrode surfaces. The biosensor performance depends on the immobilisation method and the characteristics of the resulting matrix. An electrochemical polymerisation technique was used to entrap the enzymes in poly 3,4-ethylenedioxythiophene (PEDT) a polythiophene derivative. Potentialities of this technique were demonstrated with two enzymes: glucose oxidase and polyphenol oxidase. Optimized conditions were obtained first with a biosensor operating in batch mode and then in flow injection analysis (FIA). This latter is quite suitable for monitoring of glucose in biological samples. Selectivity of this biosensor in the presence of interferent species was improved by enhancing the response to glucose with electrode platinization or the use of redox mediators. Enzymatic amplification involved in polyphenol oxidase system allowed the corresponding biosensor to detect phenolic pollutants down to 50 nM.

Key words : Amperometric biosensor, enzyme electrode, glucose oxidase, polyphenol oxidase, PEDT, redox mediator, FIA, glucose, phenol.

