

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



جامعة باجي مختار – عنابة

Faculté des Sciences de l'Ingéniorat

Année 2015

Département de Génie des Procédés

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT 3^{ème} Cycle**

**Immobilisation d'enzymes dans des membranes
polymériques en vue d'élaborer des capteurs biologiques
pour la détection des polluants organiques**

Option:

Génie de l'Environnement

par

BAALI SOUAD

DIRECTEUR DE THESE : **KHERRAT Rochdi** Professeur Université **BM- Annaba**

DEVANT LE JURY

PRESIDENT :	DERRADJI Ahmed F.	Professeur	Université BM- Annaba
CO-DIRECTEUR :	DJEGHABA Z.Eddine	Professeur	Université BM- Annaba
EXAMINATEURS :	SAMAR Med El Hadi	Professeur	Université BM- Annaba
	BENOUNIS Messaoud	M.C.A	Université AL- Khenchela
	FERKOUS Fouad	Professeur	Université BM- Annaba

ملخص

هذا العمل يندرج في إطار تطوير لاقط بيولوجي يعتمد على تقنية الممانعة (impédimétrique) و هذا باستعمال إنزيم بكتيري (*la lipase de Candida rugosa*) محكم داخل مصفوفة عضوية مكونة من BSA و glutaraldéhyde. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة إمكانية تطوير لاقط بيولوجي قادر على استكشاف المبيدات العضوية الموجودة بكميات جد ضئيلة في المحاليل المائية.

المرحلة الأولى تنحصر في كيفية تدعيم (l'immobilisation) الإنزيم فوق القطب الكهربائي وكذا بروتوكولات حساب نشاط الليباز. مع العلم أن هذه الحسابات طبقت مع الأخذ بعين الاعتبار بعدد من المتغيرات التي تخص هذا النوع من الدراسة , وهذا لهدف معرفة عمل مختلف العناصر التي تدخل في إطار تكوين الجزء المستقبل لهذا اللاقط , من بينها : تأثير درجة الحرارة و درجة حموضة الوسط. وهذا فقد تبين أن الغشاء الإنزيمي الذي يحتوي علي الليباز (*Candida rugosa*) وهو جد حساس بوجود المبيد الكلورو عضوي (diclofop-méthyle). كذلك درسنا عملية انتقائية اللاقط بوجود بعض المعادن الثقيلة (الرصاص, الزنك, الكوبالت والكاديون), وكذا بعض المبيدات (Chlorothalonil, le Paraquat , و (مبيد عضوي) le Chlorpyrifos-éthyle). هذه النتائج مكنتنا من تطوير مختلف اللواقط البيولوجية لاستكشاف المبيدات الفوسفو كلورو عضوية.

التقنيات التي اخترناها (الممانعة, الناقلية وقياس التوتر الدوري), سمحت لنا بالحصول علي النتيجة التالية : اللاقط البيولوجي المطور يحتوي علي فعاليات جد ايجابية من ناحية الحساسية أكثر منها من ناحية الاستقرار, و أن عملية استكشاف الملوثات العضوية تتم عن طريق الاماهة بواسطة إنزيم الليباز.

لاستكشاف المبيد الكلورو عضوي (diclofop-méthyle) في الأوساط المائية, هناك دراسة مقارنة تجاوب لاقطين ببيولوجيين مكونان من إنزيمات من أصل مختلف: الليباز (*la lipase de Candida rugosa (CRL)*) و الليباز المستخلص من بنكرياس الخنزير (*la lipase de pancréas de porc (LPP)*).

الهدف من هذه الطريقة هو إعطاء و توفير لاقط جد متناه في الصغر وتطوير أدوات تحليلية جديدة و سهلة المنال, قادرة علي إعطاء معلومات في أوقات معلومة و مستعملة في مختلف المجالات.

الكلمات المفتاحية

لاقط بيولوجي , *lipase de Candida rugosa* , الممانعة , قياس التوتر الدوري , الناقلية , الليباز المستخلص من بنكرياس الخنزير (*LPP*) .

Résumé

Ce travail propose le développement d'un biocapteur impédimétrique utilisant une enzyme bactérienne (*la lipase de Candida rugosa*) immobilisée dans une matrice organique composé de BSA et de glutaraldéhyde. L'objectif principal de cette présente étude est d'étudier la possibilité d'élaborer un biocapteur capable de détecter les pesticides organochlorés à l'état de trace dans les milieux aqueux.

La première étape a donc consisté à optimiser l'immobilisation de l'enzyme sur les électrodes ainsi que les protocoles de mesures de l'activité de la lipase. Par ailleurs, ces mesures ont été réalisées en faisant varier un certain nombre de paramètres caractéristiques du système étudié afin de mieux définir le rôle des différents éléments qui interviennent dans l'élaboration de la partie réceptrice du capteur à savoir : L'effet de la température et l'effet du pH du milieu. Ainsi nous avons montré que la membrane enzymatique qui contient la lipase de *Candida rugosa* est sensible à la présence des pesticides organochlorés le diclofop-méthyle. Nous avons également étudié la sélectivité de la détection de la substance cible en présence d'interférents de quelques métaux lourds (Cadmium, Cobalt, Zinc et plomb) ainsi que d'autre pesticide (Paraquat, Chlorothalonil et le Chlorpyriphos-éthyle (pesticide organophosphoré)). Ces résultats nous ont permis de développer différents biocapteurs pour la détection des pesticides (organochloré et organophosphoré).

Les techniques choisies (les impédances, la voltamétrie cyclique et la conductimétrie) ont permis de conclure que le biocapteur élaboré présente des performances optimales tant du point de vue sensibilité que stabilité et que la détection de polluant organique se fait par l'hydrolyse de ce dernier par l'enzyme (la lipase de *Candida rugosa*).

Pour la détection de pesticide organochloré (le diclofop-méthyle) dans les milieux aqueux ; une étude comparative des réponses de deux biocapteurs à base des enzymes d'origine différents (*la lipase de Candida rugosa* (CRL) et *la lipase de pancréas de porc* (LPP)) a été présentée.

L'intérêt d'un tel système est d'offrir un capteur de dimensions très réduites et de mettre au point d'outils analytiques simples, capable de donner une information en temps réels dans des domaines d'application variés.

Mots clés :

Biocapteurs, *lipase de Candida rugosa*, Immobilisée, Diclofop-méthyle, Impédances, Voltamétrie Cyclique, la conductimétrie, *Lipase de Pancréas de Porc* (LPP).

Abstract

This work proposes the development of a biosensor using impedimetric bacterial enzyme (lipase from *Candida rugosa*) immobilized in an organic matrix consisting of BSA and glutaraldehyde. The main objective of the present study is to investigate the possibility of developing a biosensor capable of detecting organochlorine pesticides trace in aqueous environment.

The first step was to optimize the immobilization of the enzyme on the electrode and the measurement protocols of the lipase activity. Moreover, these measurements were carried out by varying a number of parameters characteristic of the system being studied in order to better define the role of the different elements involved in the development of the receiving part of the sensor as follows: The effect of temperature and the effect of the pH of the environment. Thus we have demonstrated that the enzymatic membrane containing the *Candida rugosa* lipase is sensitive to the presence of organochlorine pesticides diclofop-methyl. We also studied the selectivity of the detection of the target substance in the presence of interfering of some heavy metals (Cadmium, Cobalt, Zinc and lead) and other pesticides (Paraquat, Chlorothalonil and Chlorpyrifos-ethyl (organophosphorus pesticide)). These results have allowed us to develop different biosensors for the detection of pesticides (organochlorine and organophosphorus).

The techniques chosen (impedances, the cyclic voltammetry and conductivity) have concluded that the developed biosensor has optimum performance both in terms of stability and sensitivity for the detection of organic pollutants is by hydrolysis of the latter by the enzyme (lipase of *Candida rugosa*).

For the detection of organochlorine pesticide (diclofop-methyl) in aqueous environment, a comparative study of the responses of two biosensors based on different origin enzymes (lipase from *Candida rugosa* (CRL) and porcine pancreatic lipase (LPP)) was presented.

The advantage of such a system is to provide a very compact sensor and to develop simple analytical tools capable of providing information in real time in a variety of applications.

Key words:

Biosensors, Lipase from *Candida rugosa*, Diclofop-methyl, Impedances, Cyclic Voltammetry, Conductivity, Porcine Pancreatic Lipase (LPP).

*À la mémoire de ma mère,
À mon père, à mon frère et mes sœurs
À tous les membres de mon adorable famille
À Kamel
À Ilyes et Kossai.*

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire de génie de l'environnement du département de Génies des Procédés, dirigé par Monsieur le Professeur KHERRAT Rochdi, et le laboratoire de Chimie Organique Appliquée, département de Chimie, dirigé par Monsieur le Professeur DJEGHABA Zein Eddine. Ce présent manuscrit prend en considération les résultats obtenus des recherches des cinq dernières années. Il n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide et le soutien précieux que j'ai reçu durant tout mon parcours d'études.

Monsieur **KHERRAT Rochdi**, Professeur à l'Université de Annaba, a dirigé mes travaux de recherche avec un enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour l'orientation, la confiance, et la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon terme, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de ses conseils. Cette thèse doit beaucoup à son soutien et à ses encouragements.

Je remercie infiniment Monsieur **DJEGHABA Zein Eddine**, Professeur à l'Université de Annaba, de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des enzymes et de m'avoir accueilli au sein de son équipe de Chimie Organique Appliquée, je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir guidé et dirigé tout au long de ce travail de recherche. En tant que co-directeur de thèse, il s'est toujours montré disponible durant la réalisation de cette thèse. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Je suis très reconnaissante à l'égard de Monsieur **DERRADJI Ahmed Faouzi**, Professeur à l'Université de Annaba, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. C'est un grand plaisir pour moi d'avoir accepté de présider ma soutenance.

J'exprime ma grande gratitude à Monsieur **BENOUNIS Messaoud**, Docteur à l'Université de Khenchla, pour l'intérêt qu'il porte à ce travail en me faisant l'honneur de participer au jury.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **FERKOUS Fouad**, Professeur à l'Université de Annaba, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur **SAMAR Mohamed el Hadi**, Professeur à l'Université de Annaba, d'avoir accepté d'examiner ces travaux et de participer comme membre du jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur **TIFOUTI Lakhdar**, Professeur à l'Université de Annaba et Directeur du Laboratoire de Génie de l'environnement, Département de Génie des procédés, de m'avoir accueilli dans son équipe.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Madame **ZOUGAR Saida**, Docteur à l'Université de Annaba, de m'avoir fait découvrir le monde des capteurs électrochimiques, ainsi pour son épaulement tout au long de cette thèse, pour sa disponibilité, ses remarques pertinentes, et son aide pour la réalisation des capteurs électrochimiques.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à Madame **BENAMIA Fatiha**, Docteur à l'Université de Annaba. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour son aide scientifique qui m'a permis de mener à bien ce travail, pour la collaboration efficace établie depuis le début ainsi que pour la bienveillance et la confiance qu'elle a toujours bien voulu me témoigner, et pour le temps qu'elle a pu me consacrer pour m'aider à comprendre les principes et les techniques de l'immobilisation des enzymes, ainsi que sa contribution à la réalisation de l'étude de l'activité de l'enzyme et son aide dans l'interprétation de ces résultats.

Je remercie également, **HAMLAOUI Youcef**, Professeur à l'Université de Souk Ahrass, de m'avoir aidé à comprendre les principes et les techniques de la modélisation.

Je remercie Monsieur **HAMDAOUI Oualid**, Professeur à l'Université de Annaba, pour son aide matérielle et technique, ainsi que pour sa grande patience et sa compréhension dont il a su faire preuve durant les moments critiques de mes recherches. Qu'il soit assuré de mes sentiments de respects et de ma haute considération.

Je remercie tout le personnel du Département de Génie des Procédés. Sans oublier la responsable du département, Madame Menadjlia Leila, pour sa générosité et sa grande patience.

Mes remerciements également à mes collègues et à mes amis du laboratoire pour les moments agréables passés ensemble.

Table des matières

ملخص.....	I
Résumé.....	II
Abstract.....	III
Dédicace.....	IV
Remerciements.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XIII
Liste des abréviations	XIV

Introduction générale.....	01
-----------------------------------	-----------

Chapitre I : Etat de l'art sur les biocapteurs

I. Les biocapteurs : Principe de base et généralités.....	06
I.1. Historique	06
I.2. Définition : Qu'est ce qu'un biocapteur ?.....	07
I.3. Description du biocapteur.....	08
I.3.1. Le biorécepteur	08
I.3.2. Les transducteurs.....	09
I.4. Détection électrochimique.....	09
I.4.1 Détection ampérométrique.....	10
I.4.2. Détection conductimétrique.....	11
I.4.3. Les capteurs impedimétriques.....	12
I.4.4. Détection potentiométrique.....	12
I.5. Applications et perspectives des biocapteurs.....	14
Conclusion.....	14
II. Techniques d'immobilisations des biomolécules.....	16
II.1. Les méthodes d'immobilisations des enzymes.....	16
II.1.1. L'adsorption.....	17
II.1.2. La réticulation ou "Cross-linking".....	18
II.1.3. Le greffage covalent.....	20
II.1.4. L'encapsulation.....	20
Conclusion.....	21
III. Immobilisation de la lipase pour l'application en biocapteurs.....	22
III.1. Les biocapteurs à lipase.....	22
III.2. Choix de la lipase.....	23
III.3. Les lipases, catalyseurs du monde vivant	24
III.3.1. Principe général et enjeux.....	24
III.3.2. Caractéristiques structurales.....	25
III.4. Immobilisation des lipases.....	28
Conclusion.....	29
Références bibliographiques.....	30

Chapitre II : Les pesticides

Les pesticides.....	37
II.1. Les pesticides en Algérie : Un usage démesuré	38
II.2. Contaminants chimiques étudiés.....	40
II.2.1 Propriétés physico-chimiques des pesticides étudiés dans ce travail.....	40
II.3. La réaction d'hydrolyse de diclofop méthyle.....	41

II.4. Contaminants chimiques étudiés (les interférents).....	41
II.4.1. Chlorpyriphos-éthyle.....	41
II.4.2. le Chlorothalonil.....	42
II.4.3. le paraquat.....	42
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	45

Chapitre III : Les méthodes analytiques

III.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).....	48
III.1.1. Etude de l'interface Métal/Electrolyte.....	49
III.1.2. Principe de la spectroscopie d'impédance électrochimique.....	50
III.1.3. Présentation graphique de l'impédance.....	50
III.1.4. Etude de l'impédance pour un système électrochimique.....	51
III.2. La voltamétrie cyclique.....	52
III.2.1. Principe.....	53
III.3. Mesures conductimétriques.....	55
III.3.1. Présentation.....	55
III.3.2. Mesure de conductivité	55
III.3.3. Relation entre la concentration et la conductivité	56
Conclusion.....	57
Références bibliographiques.....	58

Chapitre IV : Matériels & méthode

IV.1. Définition des objectifs de la thèse.....	60
IV.2. Dispositif électrochimique expérimental.....	61
IV.3. Les techniques de caractérisation électrochimique.....	62
IV.3.1. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	62
IV.3.2. La voltammétrie cyclique.....	63
IV.3.3. Mesures conductimétriques.....	63
IV.4. Dispositifs expérimentaux d'analyse de surface.....	64
IV.5. Méthodes et conditions expérimentales.....	65
IV.5.1. Enzymes.....	65
IV.5.2. Réactifs.....	66
IV.5.3. Nettoyage des électrodes de platine.....	66
IV.6. Les biocapteurs à lipase	67
IV.6.1. Elaboration d'un biocapteur à base de la lipase.....	67
IV.6.2. Membranes à base d'albumine de sérum bovin (BSA).....	68
IV.7. Mesure de l'activité enzymatique d'une lipase.....	70
IV.7.1. Description du pH-stat.....	71
IV.7.2. Travail expérimental.....	71
IV.7.3. Modes opératoires.....	72
Conclusion.....	72
Références bibliographiques.....	73

Chapitre V : Résultats & discussion

I. Mesure de l'activité de la lipase de <i>Candida rugosa</i> (CRL).....	77
I.1. Dosage de l'activité de la lipase de <i>Candida rugosa</i>	77
Conclusion.....	80

II. Conditions électriques de fonctionnement optimales pour un biocapteur impédimétrique basé sur la Co-réticulation de la lipase (CRL) par le (GA) en présence de (BSA).....	82
II.1.Caractérisation de la couche enzymatique par la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).....	83
II.1.1. Propriétés électriques du film enzymatique à différents potentiels.....	84
II.1.2.Modélisation et analyse des diagrammes d'impédance de la couche enzymatique.....	85
II.1.3. Essai à blanc.....	88
II.1.4. Réponse de biocapteur enzymatique à différents potentiels.....	92
II.1.5. Réponses de biocapteurs à -200mv.....	96
II.2. Les paramètres influençant sur la réponse de biocapteur enzymatique élaboré.....	98
II.2.1. L'effet du pH du milieu	98
II.2.2. Etude de l'influence de la température.....	101
II.3. Caractérisation de la couche enzymatique par la voltamétrie cyclique.....	103
II.3.1. Le suivi du processus d'oxydoréduction par voltamétrie cyclique.....	103
II.3.2. Effet des vitesses de balayage sur le comportement de l'enzyme immobilisée.....	105
II.3.3. Caractérisation de la réponse du biocapteur enzymatique par la voltamétrie cyclique.....	106
II.4. Caractérisation de la couche enzymatique par Microscope Optique (MO).....	108
II.5. La détection de polluant organique par un biocapteur enzymatique conductimétrique	109
Conclusion.....	112
III. Etude des interférents de biocapteur impédimétrique à base de la lipase de <i>Candida rugosa</i> (CRL).....	113
III.1. Interférences des ions métalliques	113
III.2. Interférences des pesticides.....	117
Conclusion.....	120
IV. Etude de la durée de vie de biocapteur impédimétrique à base de la Lipase de <i>Candida rugosa</i> (CRL).....	121
IV.1. Stabilité du biocapteur.....	121
Conclusion.....	123
V. Nouveau concept d'un biocapteur impédimétrique à base de la lipase de Pancréas de Porc (LPP).....	124
V.1. Caractérisation par voltamétrie cyclique.....	126
V.2. Développement d'une méthodologie d'analyse pour étudier la réponse de biocapteur élaboré.....	127
V.3. Caractérisation par mesure d'impédance.....	128
V.4. Caractérisation par microscope optique.....	134
V.5. Comparaison de la réponse de biocapteur à base de la lipase de <i>Candida rugosa</i> et à base de la lipase de Pancréas de Porc.....	135
Conclusion.....	136
Références bibliographiques.....	137
Conclusion générale et perspectives.....	142

Liste des figures

Chapitre I : Etat de l'art sur les biocapteurs

Schéma I.1 : Représentation schématique d'un biocapteur.	08
Figure I.2 : Représentation schématique des différents biorécepteurs.	09
Figure I.3 : Principe de la détection ampérométrique.	10
Figure I.4 : Principe de la détection conductimétrique.	11
Figure I.5 : Mesure potentiométrique à l'aide d'une électrode à ion spécifique.	13
Figure I.6 : Principe de la détection basée sur l'effet de champ.	13
Figure I.7 : Adsorption des enzymes sur un support.	17
Figure I.8 : Réticulation et co-réticulation des enzymes.	18
Figure I.9 : Greffage covalent des enzymes.	19
Figure I.10 : Encapsulation des enzymes.	20
Figure I.11 : Réaction de l'hydrolyse de triacylglycérol dans les milieux aqueux catalysée par la lipase.	25
Figure I.12 : Représentations de la structure de la lipase extraite de <i>Thermomyces lanuginosus</i> en conformations « fermée » et « ouverte ».	25
Figure I.13 : Représentation schématique du mécanisme catalytique de la réaction d'hydrolyse d'un ester catalysée par une lipase.	27

Chapitre II : Les pesticides

Figure II.1 : Structure chimique de diclofop-méthyle.	40
Figure II.2 : réaction d'hydrolyse de diclofop-méthyle	41

Chapitre III : Les méthodes analytiques

Figure III.1 : Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution.	49
Figure III.2 : Schéma d'une fonction de transfert.	50
Figure III.3 : Diagramme de Bode pour un système faradique.	50
Figure III.4 : Diagramme de Nyquist pour un système faradique.	51
Figure III.5 : Circuit équivalent et tracé de l'impédance d'une cellule électrochimique.	51
Figure III.6 : Impédance du circuit de Randles.	52
Figure III.7 : Balayage de potentiel, en fonction du temps, appliqué lors d'une voltamétrie cyclique et aspect du voltammogramme obtenu avec un couple redox Ox/Red réversible.	54
Figure III.8 : Dispositif de mesures conductimétriques	55

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Figure IV.1 : Appareillages de mesures électrochimiques.	62
Figure IV. 2 : Dispositif de mesures conductimétriques.	64
Figure IV.3 : Microscope optique Leica DMLM.	65
Figure IV.4 : Structure de la protéine BSA.	68
Figure IV.5 : Photos des membranes enzymatiques (a) : BSA+CRL, (b) : BSA+ CRL+ Glycérol+ KH_2PO_4 .	69
Figure IV.6 : Représentation schématique d'un biorécepteur immobilisé dans une enzyme inerte (BSA) et un agent réticulant (GA).	69
Figure IV.7 : Le principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde.	69
Figure IV.8 : Montage utilisé dans la mesure de l'activité enzymatique.	71

Chapitre V : Résultats & discussion

Figure V.1: Présentation de la vitesse de la réaction de l'hydrolyse de diclofop-méthyle en fonction du temps le tampon phosphate (10 mM, pH 8).	78
Figure V.2 : réaction d'hydrolyse de diclofop-méthyle.	79
Figure V.3 : Diagrammes de Nyquist pour une couche enzymatique déposée sur une électrode du Platine obtenus à différents potentiels DC vs. SCE.	85
Figure V.4 : a) Spectre d'impédance de interface Platine /Lipase (CRL)/ BSA/ électrolyte dans le buffer de phosphate saline PBS (10mM pH7,4) à -0.2 V vs SCE.	86
Figure V.5 : Diagrammes de Bode (Déphasage) pour une couche enzymatique déposée sur une électrode du Platine obtenus à différents potentiels DC vs. SCE.	87
Figure V.6: Diagrammes de Bode (Module $ Z $) pour une couche enzymatique déposée sur une électrode du Platine obtenus à différents potentiels DC vs. SCE.	87
Figure V.7 : Diagrammes de Nyquist pour une électrode du Platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus à -200mV vs. SCE.	88
Figure V.8 : Variation de l'impédance représentée dans le diagramme de Bode pour une électrode de platine nu et pour l'électrode de platine modifiée.	89
Figure V.9 : Diagrammes de Nyquist pour une électrode du Platine modifiée par la couche enzymatique obtenus à -200mV vs. SCE.	91
Figure V.10 : Simulation par le circuit de la courbe expérimentale de l'électrode modifiée par le dépôt de la couche enzymatique de la figure V.5 à une polarisation de -0,2V.	91
Figure V.11 : spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différents potentiels.	93
Figure V.12 : spectres d'impédance pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique suivie de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle obtenus à -200mV vs. SCE.	96
Figure V.13 : Variation de la résistance du transfert suite à l'injection de différentes concentrations du Diclofop-méthyle pour le Pt.	97
Figure V.14 : spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différentes valeurs de pH du milieu. Les	99
Figure V.15 : Courbe de calibration présentant l'influence du pH du milieu sur la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations de diclofop-méthyle à -200mV.	101
Figure V.16 : spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différentes valeurs de la température du milieu.	102
Figure V.17 : Courbe de calibration présentant l'influence de la température du milieu sur la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations de diclofop-méthyle à -200mV.	102
Figure V.18 : Voltamogrammes des différentes couches constituant le biomembrane déposé sur une électrode de platine. Mesures effectuées dans 5mM de $K_3 [Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ dans le PBS (10 mM,pH 8) entre -0.7 et 0.7 V,	104
Figure V.19 : Voltamogrammes pour une électrode de platine modifiée par le biomembrane (BSA+CRL) à différentes vitesses de balayage de potentiel.	105
Figure V.20 : Représentations du courant anodique et cathodique en fonction de la racine carrée des vitesses de balayage de potentiel pour une électrode de platine modifiée	106
Figure V.21 : influence de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle sur les voltamogrammes pour une électrode de platine modifiée par la biomembrane (BSA+CRL).	107
Figure V.22 : Variation de la densité du courant suite à l'injection de différentes concentrations du Diclofop- méthyle dans le tampon PBS (10mM, pH 8) .Vitesse de balayage de 100 mV/s.	108

Figure V.23 : Photos (x60, x100 et x1200) d'une micro-cuve du Platine recouverte d'une couche enzymatique immobilisée dans une matrice organique composé de BSA et de GA.	109
Figure V.24 : Evolution de la réponse de la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en fonction du temps. Les mesures ont été réalisées dans la solution de PBS (10mM, pH 8).	111
Figure V.25 : Courbes de calibration pour un temps de réponse 9 minutes.	111
Figure V.26 : Influences des interférents métalliques sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle.	115
Figure V.27 : Courbes de calibration correspondantes à l'influences des interférents métalliques sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle.	116
Figure V.28 : Suite d'influences des interférents métalliques sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle.	118
Figure V.29 : Courbes de calibration correspondantes à l'influence des interférents pesticides sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle.	119
Figure V.30 : Durée de vie de biocapteur enzymatique. Toutes les mesures ont été réalisées dans une solution de PBS (10mM, pH 8) dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz à -200mV vs. SCE et avec une amplitude de 10mV.	122
Figure V.31 : Voltamétrie cyclique d'une électrode du platine nue (a) et d'une électrode fonctionnalisée par ledépot d'une couche du biomembrane constitué (BSA+LPP) (b). Mesures effectuées dans 5mM de $K_3 [Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ dans le PBS (10 mM,pH 8).	122
Figure V.32 : Schéma présenté d une lipase pancréatique du cochons	124
Figure V.33 : influence de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle sur les voltamogrammes pour une électrode de platine modifiée par le biomembrane (BSA+LPP). Mesures effectuées dans 5mM de $K_3 [Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ dans le PBS (10 mM,pH 8) entre -0.7 et 0.7 V. Vitesse de balayage de 100 mV/s.	126
Figure V.34 : Variation de la densité du courant suite à l'injection de différentes concentrations du Diclofop-méthyle pour le Pt dans du tampon PBS (10mM, pH 8)	127
Figure V.35 : Courbes de calibration obtenues par voltamètres cyclique représentant la variation de la densité du courant suite à l'injection de différentes concentrations du Diclofop-méthyle pour le Pt dans du tampon PBS (10mM, pH 8).	128
Figure V.36 : Diagrammes de Nyquist pour une électrode du Platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus à -200mV vs. SCE.	129
Figure V.37: Diagramme d'impédance correspond au Platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus (a) Bode : Module v.s. fréquence, (b) Bode : Phase v.s. fréquence.	129
Figure V.38 : Circuit électrique permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant à une couche enzymatique.	130
Figure V.39 : spectres d'impédance pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique suivie de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle obtenus à -200mV vs. SCE.	131
Figure V.40 : Variation de la résistance de transfert suite à l'injection de différentes concentrations du Diclofop méthyle pour le Pt dans du tampon PBS (10mM, pH 8).	133
Figure V.41 : Courbes des calibrations du biocapteur obtenus par mesures impédimétrique et par voltamétrie cyclique. Tampon PBS (10mM, pH 8).	133
Figure V.42 : Photos (x20 et x80) d'une microcuve du Platine recouverte d'une couche enzymatique immobilisée dans une matrice organique composé de BSA et de GA.	134
Figure V.43 : Comparaison de la variation de la résistance de transfert de charge pour différentes concentration de diclofop-méthyle pour le biocapteur élaboré à base de la lipase de <i>Candida rugosa</i> (CRL) et à base de Pancréas de Porc (LPP).	135

Liste des tableaux

Chapitre II : Les pesticides

Tableau II.1: Propriétés physico-chimiques et données de toxicité du diclofop-méthyle, le chlorpyriphos-éthyle, le chlorothalonil et le paraquat.	43
--	----

Chapitre V : Résultats & discussion

Tableau V.1 : Paramètres de simulation d'une électrode du Platine modifiée à l'aide d'une couche enzymatique, à différentes polarisations. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.4.	86
Tableau V.2 : Paramètres de simulation d'une électrode du Platine nue et modifiée par la couche enzymatique, à -200mV. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.4.	92
Tableau V.3: Paramètres de simulation des diagrammes de Nyquist pour la couche constituant le BSA+CRL obtenus à différents potentiels. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.4.	94
Tableau V.4 : Paramètres d'analyse des pics des courants pour une électrode de platine modifiée par le biomembrane (BSA+CRL) à différentes vitesses de balayage de potentiel.	106
Tableau V.5: Les structures chimiques des pesticides utilisés comme interférents.	118
Tableau V.6 : Paramètres de simulation d'une électrode du Platine nue et modifiée par la couche enzymatique, à -200mV. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.38.	130
Tableau V.7: Paramètres de simulation des diagrammes de Nyquist pour la couche constituant le BSA+LPP obtenus à différents potentiels. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.38.	132

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
cholOD : cholestérol oxydase.
T-Hg²⁺-T : thymine-ion mercure-thymine.
EIS : Electrode spécifique d'ions.
ISFET: Ion-Sensitive Field-Efect Transistor.
MOSFET: Metal-Oxide-Semiconductor Field- Effect Transistor.
HRP : horseradish peroxydase.
GA : glutaraldéhyde.
BSA : l'albumine de sérum bovine.
S: substrat
P: produit
MDHA : hexaméthylènediamine.
NHS : thiol amine.
(-COOH) : groupements de type carboxyliques.
(-NH₂) : groupements de type amine.
(-OH) : groupements de type hydroxyle.
(-SH) : groupements de type thiol.
CRL : lipase de *Candida rugosa*.
His : histidine.
Asp : aspartate.
Glu : glutamate.
TMOS : alkyltriméthoxysilanes.
SPTM : propyltriméthoxysilane.
BTMS : butyltriméthoxysilane.
LPP: lipase de pancréas de porc.
OMS : organisation mondiale de la santé.
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
EC : concentré émulsionnable.
EIS : la spectroscopie d'impédance électrochimique.
PIH : plan interne d'Helmholtz.
PEH : plan externe d'Helmholtz.
I : le courant.
E : le potentiel.
F : la fréquence.
Ω : Ohms.
R : la résistance.
Z : l'impédance.
∅ω : la phase de l'impédance.
φ : le déphasage.
CPE : Elément de phase constante.
Rs : résistance de la solution.
I_{dc} : double couche génère un courant.
C_{dl} : la capacité de la double couche.
ε : la permittivité relative du diélectrique.
ε₀ : la permittivité diélectrique du vide.
R_{ct} : la résistance de transfert de charge.
R : la constante des gaz parfait.
T : la température,
n : le nombre d'électrons transférés.
F : la constate de Faraday.
Z_w : impédance de Warburg.
Σ : coefficient de Warburg.

I_f : courant faradique.
 I_c : courant capacitif.
Ox : oxydation.
Red : réduction.
 λ_i : la conductivité de l'ion i.
 C_i : la concentration de l'ion i.
LPP : lipase de *Pancréas de Porc*.
ECS : électrode au calomel saturée.
mHz : millihertz.
KHz : Kilohertz.
PBS : buffer de phosphate saline.
Fe(CN) : cyanure de fer.
 μL : microlitre.
G : gramme.
L : Litre.
M : molaire.
SPTM : propyltriméthoxysilane.
DC : différence de potentiels.
V : volt.
 X^2 : la variance.
G: conductance.
L: espace entre les électrodes.
S: surface des électrodes.
 σ : Conductivité.

Introduction générale

De nombreux travaux ont démontré la présence et la persistance de pesticides dans les eaux, les sols, l'air mais aussi dans les produits alimentaires. Certains pesticides sont désormais considérés comme des polluants organiques persistants ou encore des perturbateurs endocriniens. Ils constituent à la fois une menace écologique et environnementale certaine mais également sanitaire. Afin de garantir la sécurité alimentaire des consommateurs et de préserver l'environnement, une législation concernant l'utilisation de ces composés a été mise en place. Dans de nombreux pays, celle-ci se traduit par une tolérance des résidus de ces micropolluants sous un certain seuil maximal (limite maximale de résidus). Il est alors aisé de comprendre pourquoi la problématique réside désormais dans la détermination et la quantification de ces pesticides dans différents milieux.

Les biocapteurs apparaissent comme une bonne alternative pour détecter des substances chimiques, tels que les polluants organiques (pesticides par exemple), les métaux ou les sels nutritifs (nitrates), ou des matériaux biologiques (algues toxiques). En effet, ils peuvent être sélectifs, sensibles et permettent d'obtenir des mesures rapides in situ. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio) chimique en un signal électrique facilement exploitable. Ces nouveaux moyens d'analyses ont connus un essor tout à fait remarquable grâce aux besoins de plus en plus pressants des différents secteurs touchant à la chimie et à la biochimie (environnement, alimentation, pharmacie, sécurité domestique et industrielle, diagnostic médical...). De manière générale, la conception d'un biocapteur se base sur l'association d'une macromolécule biologique faisant office de récepteur à un transducteur physique. Les propriétés de reconnaissance moléculaire de la biomolécule choisie confèrent une sélectivité à l'interaction biomolécule-analyte cible. Cette interaction est, grâce au transducteur, à l'origine d'un signal électrique, optique ou autre, facilement mesurable, qui après traitement peut être directement corrélé à la concentration de l'analyte cible.

L'augmentation de l'affinité entre le biomatériau et le substrat à détecter est la stratégie de ce secteur de recherche. Par ailleurs, les biomatériaux doivent répondre à plusieurs critères comme la fiabilité dans les milieux aqueux, l'absence d'effet toxique et interférent. Ce concept correspond à la création d'un biocapteur enzymatique destiné à la détection d'un pesticide organochloré (le diclofop-méthyle). C'est dans ce contexte général que se situe le sujet de la thèse.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'immobilisation d'une enzyme hydrolase (la lipase de *Candida rugosa*) à l'interface d'une électrode. Nous nous intéressons au processus de détection faisant intervenir des traitements par des logiciels appropriés pour convertir les interactions enzyme/substrat en un signal électrique exploitable et pour modéliser et simuler ce signal en paramètres électriques pour expliquer les phénomènes qui se déroulent à l'interface électrode modifiée par la couche enzymatique et le milieu réactionnel. Ce processus complexe correspond en réalité à l'étude des interactions électrode /enzyme /substrat. La diversité des acteurs impliqués électrode /enzyme /substrat et les différents types d'interactions spécifiques ou non spécifiques qui peuvent avoir lieu compliquent encore l'étude de ce processus. Le recours aux quatre approches complémentaires, physico-chimie, biologie, électricité et l'informatique est essentiel pour cerner les différents aspects du problème et mieux appréhender les mécanismes qui ont lieu aux interfaces.

Les enzymes sont des protéines, catalyseurs de réactions de transformation qui se produisent dans les organismes vivants. Il existe plusieurs familles d'enzymes selon leur activité. Nous avons choisi de tester des hydrolases comme les lipases permettant l'hydrolyse des composés organiques. Nous avons choisi de nous tourner vers l'utilisation d'enzymes commerciales qui présentent l'intérêt d'être déjà caractérisées et produites en grande quantité. Ce sont des enzymes généralement utilisées dans divers procédés industriels (alimentaire, textile, papeterie) et dans certains produits de grande consommation (lessives). Les enzymes, utilisées comme catalyseur dans l'élaboration des biocapteurs, présentent un coût relativement élevé, ce qui implique souvent la nécessité de les utiliser sous forme immobilisée afin de permettre leur réutilisation et d'augmenter leur stabilité.

L'immobilisation des lipases sur un support membranaire constitue une approche intéressante pour la conduite de réactions enzymatiques d'hydrolyse d'esters. Les membranes enzymatiques ainsi obtenues sont alors déposées à l'interface de l'électrode au sein de la quelle la réaction a lieu durant le transfert des substrats au travers des pores de la membrane. Parmi les méthodes d'immobilisation des enzymes on cite dans ce contexte la méthode de la co-réticulation de l'enzyme avec une enzyme inerte l'albumine de sérum bovin (BSA) activée par un agent bi-fonctionnel « le glutaraldéhyde » auquel les enzymes sont fixées ensuite par liaison covalente. Les avantages de cette méthode résident dans la méthode d'immobilisation elle même qui permet de préserver un microenvironnement favorable à l'activité enzymatique. Lors de la mise en œuvre des biocapteurs enzymatiques, il est nécessaire de travailler en milieu aqueux pour favoriser la réaction d'hydrolyse.

Le travail présenté dans cette thèse s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier chapitre permet de situer le contexte de cette étude. Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord un rappel bibliographique sur les biocapteurs et particulièrement sur les biocapteurs enzymatiques. Ce chapitre traite les principes de fonctionnement et les applications de quelques biocapteurs. Nous donnerons par la suite une vue d'ensemble sur les différentes techniques de l'immobilisation des enzymes. Nous nous attacherons ensuite aux principaux travaux précédemment effectués sur l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* (CRL), ainsi que les différentes applications de celle-ci dans le domaine des biocapteurs.

Le deuxième chapitre de cette thèse vise, grâce à une étude bibliographique, à donner un aperçu générale sur les pesticides. Ainsi qu'à présenter les principales caractéristiques des différents interférents abordés au cours de cette étude.

Le troisième chapitre rapporte les techniques de mesure utilisées pour caractériser les propriétés physicochimiques de la surface de l'électrode avant et après fonctionnalisation et pour corrélérer ces propriétés avec la détection et l'activité des enzymes sur ces matériaux, une adaptation de certaines techniques de mesure est nécessaire. Le détail des trois techniques, la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), la voltammétrie cyclique et la conductimétrie est illustré dans les méthodologies. La technique de la spectroscopie d'impédance dévoile les propriétés électriques de la surface fonctionnalisée. Ainsi, nous présenterons une nouvelle technique voltamétrique pour le suivi du substrat dans la cellule électrochimique, par la suite, la comparaison des résultats des biocapteurs électrode-enzyme-substrat est effectuée par le biais de deux techniques plus classiques qui sont la voltammétrie cyclique et la conductimétrie. La morphologie de la couche enzymatique est mise en évidence par microscopie optique.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit concernera la partie « matériel et méthodes » dans laquelle les produits ainsi que les pilotes utilisés dans cette étude seront présentés. Les différents protocoles d'immobilisation, de caractérisation et d'analyse seront également décrits.

Enfin, dans **le cinquième chapitre** de ce manuscrit, l'ensemble des résultats de cette étude sera présenté et discuté. L'étude s'articule sur cinq principaux axes.

Le premier sera essentiellement consacré au développement de nouveaux outils analytiques pour mesurer l'activité enzymatique vis-à-vis du substrat en milieu aqueux et pour valider son pouvoir catalytique à l'aide de réactions d'hydrolyse par le pH-stat.

Le second consiste à développer une membrane enzymatique de taille réduite en s'appuyant sur des travaux réalisés précédemment sur des membranes de petite taille et de valider son pouvoir catalytique de l'hydrolyse du substrat en milieu aqueux. Ce second volet consiste en la conception d'un pilote permettant la conduite de la réalisation du biocapteur enzymatique destiné à la détection de polluant organique en milieu aqueux, ainsi qu'en la détermination des conditions opératoires pouvant être mises en œuvre lors de la détection au sein de ce pilote. Cette partie consiste à évaluer les performances du biocapteur élaboré et à étudier l'effet des principaux paramètres opératoires.

D'autre part, une étude de l'interférence des métaux lourds et des pesticides est réalisée dans la troisième partie.

Le quatrième volet consiste à étudier la durée de vie de biocapteur impédimétrique à base de la lipase de *Candida rugosa* (CRL).

Enfin, dans le cinquième axe, les performances de ce biocapteur ont été comparées à celles obtenues avec un biocapteur à base d'autre origine de l'enzyme hydrolase (la lipase de *pancréas de porc* (LPP)).

Les résultats obtenus dans ce travail sont analysés dans le **chapitre V**. La microscopie optique caractérise l'état de surface de l'électrode en apportant des informations sur la topographie, l'hétérogénéité chimique, la déformation, le gonflement de surface et ses composantes. Les mesures de la réponse du biocapteur enzyme-substrat à l'aide des deux techniques, de la spectroscopie de l'impédance électrochimique (EIS) et la voltammétrie cyclique, sont appliquées à une cellule isolée. La réponse de biocapteur a été évaluée qualitativement par des mesures de variations de signal suite à l'injection de différentes concentrations du substrat dans le milieu réactionnel. Notre approche consiste à corrélérer les valeurs obtenues par impédance électrochimique du biosystème. En effet, grâce à l'utilisation de circuits électriques équivalents, il est possible de modéliser les propriétés électriques (résistance et capacité en parallèle) de chacune des composantes du système, à savoir : le substrat avec ses connexions électriques dans le milieu de mesure ; l'interface représentée par la couche de fonctionnalisation recouverte de composants du milieu de culture adsorbées et de

la matrice enzymatique. Ces différentes propriétés électriques sont liées à la réaction entre l'enzyme et le substrat. Ainsi que la comparaison à d'autres techniques plus classiques telles que la voltammétrie cyclique et la conductimétrie seront discutées.

Chapitre I

Etat de l'art sur les biocapteurs

I. Les biocapteurs: Principe de base et généralités

Les biocapteurs représentent un domaine de recherches important depuis plus de 50 années. Ce sont des outils analytiques applicables à de nombreux domaines tels que les sciences de la vie (agroalimentaire [1], médecine [2], biologie [3], l'environnement (pollution) [4], ou encore le bioterrorisme (prévention d'attaques biologiques) [5]. Ces capteurs peuvent être façonnés à la demande, et la cible à détecter doit réagir avec le système biologique (enzymes, ADN, anticorps...). Un « bon » biocapteur doit cependant être sélectif, sensible, rapide, fiable, portable et bon marché.

Le terme « biocapteur » 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.

Depuis le premier biocapteur développé par L.C. Clark et C. Lyons au début des années 1960 [6], des efforts considérables ont été faits pour mettre au point d'autres biocapteurs dans l'objectif de réaliser des dosages rapides, sensibles et spécifiques de molécules présentant un intérêt dans le domaine médical, agroalimentaire, ou environnemental. Les études actuelles sont centrées principalement sur la recherche de nouveaux matériaux d'immobilisation des biomolécules qui n'altèrent pas leur activité et permettent de la prolonger.

Cette partie a pour objectif de rappeler les principes de fonctionnement de biocapteurs basés sur des enzymes et de répertorier les biocapteurs de ce type dans lesquels l'enzyme est immobilisée dans une membrane organique.

I.1. Historique

Vers 1950, L.C. Clark a commencé le développement du premier capteur pour la mesure de la concentration d'oxygène dissout dans le sang. Sa collaboration avec C. Lyons en 1962, a permis la mise au point de ce biocapteur associant une membrane enzymatique renfermant le glucose oxydase et une électrode à oxygène en vue de l'adapter à la mesure de la concentration en glucose dans le sang [7].

Cinq années plus tard, S.J. Updike et G.P. Hickson ont élaboré une électrode enzymatique permettant de doser le glucose dans des solutions biologiques [8]. A la fin des années 60 (1969), George Guilbault a créé un dispositif pour doser l'urée dans le sang et

l'urine [9,10].

Depuis ces premières ébauches, les biocapteurs ne cessent de susciter l'intérêt des chercheurs et deviennent de plus en plus employés dans des domaines très variés. Citons par exemple l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique ou pétrochimique, ou bien encore le domaine biomédical, l'environnement, l'agriculture.

I.2. Définition : Qu'est ce qu'un biocapteur ?

Un biocapteur est un outil ou système analytique conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique [11]. Ce dispositif est basé sur l'accouplement spatial direct d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé "biorécepteur" ou "élément de reconnaissance biologique", avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique [12]. Le biocapteur emploie les systèmes biologiques à différents niveaux d'intégration pour identifier spécifiquement la substance à déterminer. La première étape de cette interaction est la formation d'un complexe spécifique de la substance active immobilisée avec l'analyte.

Le schéma I.1 représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans l'échantillon, toute information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour utilisation ultérieure [13]. Les biocapteurs sont, en effet, des outils qui peuvent fournir des mesures rapides, sensibles et peu coûteuses pour le contrôle des concentrations d'analyte de nature biologique. Les biocapteurs ont deux principaux avantages : les éléments de reconnaissance ont une sélectivité naturelle vis-à-vis des analytes biologiques et une capacité à réagir avec l'analyte de manière physiologique.

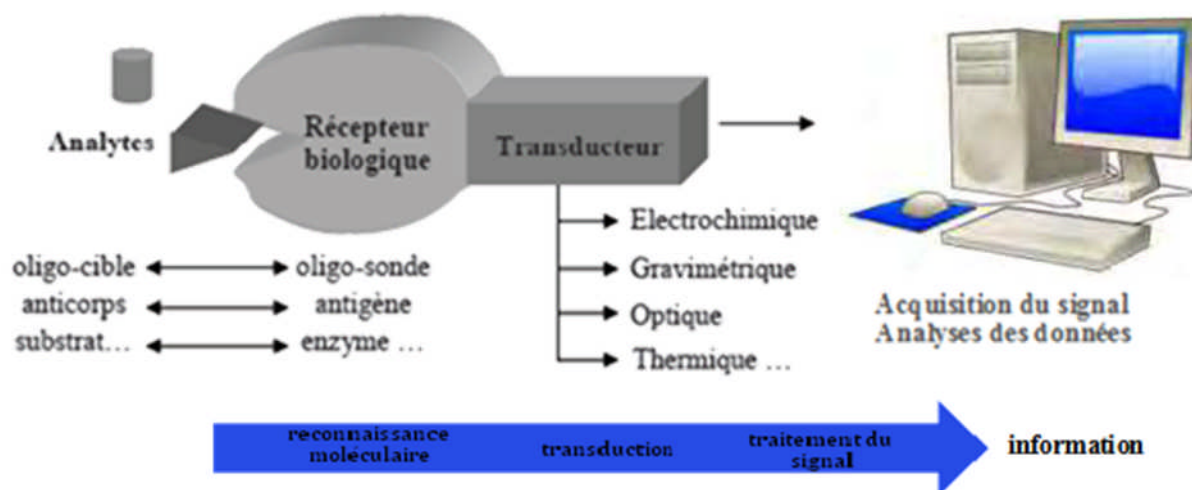


Schéma I.1 : Représentation schématique d'un biocapteur [14,15].

Le récepteur biologique peut être de diverses natures (enzymes, organites cellulaires, cellules, tissus...) catalyse des réactions biochimiques de substrats, ou interagit avec des structures complémentaires (antigène, anticorps, ADN ou récepteur-hormones...) conduisant à des changements de propriétés physiques, chimiques ou optiques des substrats. Ces différents changements de propriétés et leurs amplitudes nous permettent de déterminer la quantité de matière ayant interagit par unité de surface, c'est-à-dire le taux de recouvrement de notre biocapteur. Quant au transducteur, il convertit ce changement en un signal électrique mesurable. Ce signal électrique va finalement être transmis au système d'analyse de données et traité par des circuits électroniques [16], après avoir éventuellement subi une amplification.

I.3. Description du biocapteur

I.3.1. Le biorécepteur

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une molécule active (par exemple : enzyme, anticorps, ADN, cellule entière, micro-organisme) immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur. Dans un biocapteur, le biorécepteur offre une spécificité et une sensibilité élevée pour un groupe particulier d'analyte, ainsi qu'une réponse rapide. Plusieurs types de biorécepteurs ont été utilisés comme moyen de reconnaissances moléculaires pour le développement de biocapteurs (figure I.2). Parmi ces

biorecepteurs on cite par exemple les biocapteurs à enzymes qui utilisent généralement des enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, thermiques, acoustiques...). Ce type de biocapteurs à été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques, etc. [17]. Ce type de biocapteurs enzymatique est l'objet de notre étude.

Le biorecepteur microorganisme est utilisé comme biocapteur pour la synthèse pharmaceutique, le traitement des eaux usées et l'industrie alimentaire.

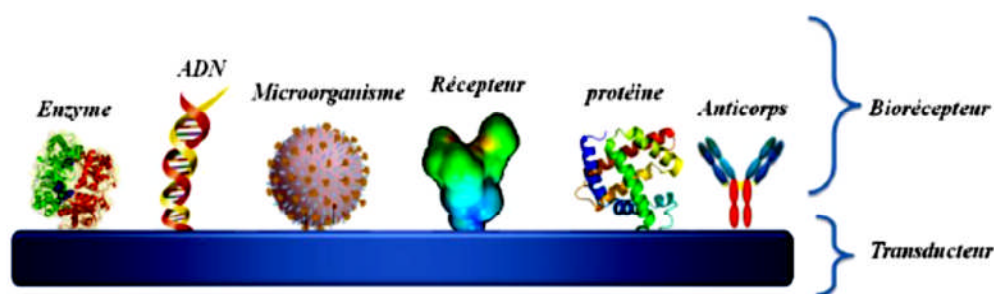


Figure I.2 : Représentation schématique des différents biorecepteurs [17].

I.3.2. Les transducteurs

Le transducteur représente l'élément physique du biocapteur. Il sert à exploiter la modification biochimique issue d'une interaction entre un analyte et le biorecepteur pour le transformer en un signal électrique. Suivant le type de modification biochimique, on choisira le type de transducteur approprié pour exploiter au mieux l'effet créé par le biorecepteur en présence de l'espèce cible et obtenir un signal sensible, facilement exploitable avec un seuil de détection plus bas en améliorant les performances du biocapteur [18].

Différents systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal électrique exploitable.

I.4. Détection électrochimique

Les transducteurs électrochimiques reposent sur la variation d'un courant, d'une impédance ou d'un potentiel suite à la reconnaissance moléculaire. Ils peuvent se classer suivant la grandeur observée: il existe ainsi des transducteurs ampérométriques (courant),

conductimétriques (conductance), potentiométriques (potentiel) et impedimétrique (résistance) [19, 20].

I.4.1. Détection ampérométrique

La détection par mesure ampérométrique repose sur le suivi du courant électrique associé aux électrons générés lors d'une réaction d'oxydoréduction. Après l'immobilisation de biorécepteurs à la surface d'une électrode de travail, l'interaction avec l'analyte peut provoquer une réaction directe ou indirecte de type redox, modifiant l'accumulation de charges au niveau de l'électrode par rapport à une électrode de référence (figure I.3).

Les mesures sont effectuées en appliquant une tension de polarisation constante entre ces deux électrodes et en mesurant le courant qui traverse le système. Le courant mesuré est directement lié à la variation de concentration des espèces électrochimiquement actives ou à la vitesse de réaction de production ou de consommation de ces espèces [21].

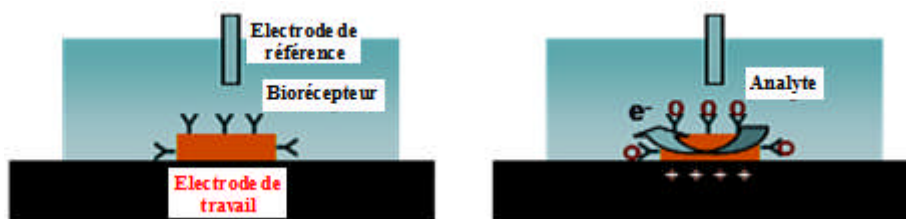
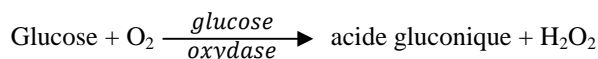
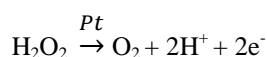


Figure I.3 : Principe de la détection ampérométrique.

La majorité des transducteurs ampérométriques utilisent les biorécepteurs catalytiques : c'est ainsi le courant généré par les électrons issus de la réaction catalytique qui est mesuré par l'électrode. L'exemple le plus connu est celui de la détection de glucose par l'intermédiaire de l'enzyme glucose oxydase. Cette enzyme catalyse en présence d'oxygène la décomposition du glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène :



La détection s'effectue en mesurant la variation de la concentration en peroxyde d'hydrogène. Celle-ci peut être suivie en mesurant le courant d'oxydation sur une électrode de platine polarisée à 0,7V par rapport à une électrode de référence de type Ag/AgCl :



La miniaturisation de ces dispositifs avec l'intégration sur une même puce des deux électrodes ainsi que le potentiel important du marché lié à la détection du glucose pour le diabète ont abouti au développement de plusieurs modèles commerciaux (ex : Accu-Check Performa Nano de Roche Diagnostics). Les efforts portent aujourd'hui sur l'optimisation des méthodes d'immobilisation du biorécepteur catalytique (membrane polymérique) et la conservation de son activité [22]. En effet, celle-ci est compromise par les potentiels mis en jeu qui sont à l'origine d'interférences avec le milieu biologique.

I.4.2. Détection conductimétrique

Le principe de la détection conductimétrique est de suivre la conductance d'un système électrode-électrolyte-électrode. Les mesures de la conductance sont effectuées en mode alternatif car la polarisation des électrodes en continu engendrerait une électrolyse. Suivant le type de capteurs, la variation de la conductance peut être liée au changement de la composition du milieu ou à des modifications des interfaces électrode/électrolyte, les électrodes pouvant être éventuellement fonctionnalisées (figure I.4).

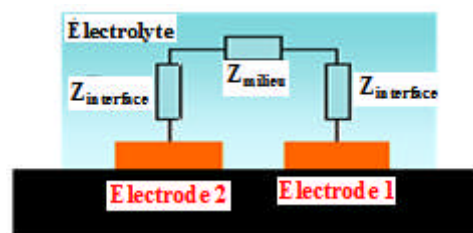


Figure I.4 : Principe de la détection conductimétrique.

Ce type de dispositif se distingue par sa simplicité de fabrication (pas besoin d'électrode de référence). Il s'est initialement développé pour des applications de détection chimique : les cellules de conductimétrie (Orion, Prolabo) sont aujourd'hui très utilisées en laboratoire et dans l'industrie. Par extension, les réactions enzymatiques, consommant ou produisant des ions en solution, ont été étudiées par cette même méthode. Plus récemment, des détections de protéines ou d'ADN ont été démontrées avec des sensibilités pouvant descendre jusqu'à des concentrations nanomolaires [23]. La sélectivité intrinsèque de ce type de transducteur reste le facteur limitant : des optimisations sont nécessaires afin d'améliorer la sélectivité de la détection (couplage avec une membrane polymérique par exemple) et de prendre en compte les effets d'une réaction biologique sur la composition de l'électrolyte.

I.4.3. Les capteurs impedimétriques

Le principe de ce type de capteur électrochimique repose sur la mesure de l'impédance d'une cellule électrochimique par la technique de spectroscopie d'impédance. Cette technique permet de contrôler le processus de transfert de charge à l'interface électrode / électrolyte. Pratiquement, la mesure de l'impédance s'effectue dans une cellule à trois électrodes, une électrode indicatrice sur laquelle est déposé l'élément sensible (biorécepteur), une électrode de référence et une électrode auxiliaire. En effet, un potentiel imposé avec une perturbation sinusoïdale de faible amplitude, entre l'électrode de référence et l'électrode indicatrice, permet la mesure d'un courant, de la même forme, généré entre l'électrode indicatrice et l'électrode auxiliaire. Le rapport de la tension appliquée à l'intensité du courant mesure définit l'impédance du système électrochimique.

Cette impédance peut être représentée par un circuit électrique équivalent selon le type du système (système faradique ou système non faradique). Ce circuit permet d'exprimer les paramètres électriques qui définissent le phénomène de transfert de charge qui se produit à l'interface électrode/ électrolyte. Dans un système de biocapteur ces paramètres varient lorsqu'il y aura des changements interfaciaux provenant des interactions biomoléculaires à la surface de l'électrode indicatrice.

I.4.4. Détection potentiométrique

Deux approches ont été envisagées pour la réalisation de capteurs potentiométriques.

- a. **Electrode spécifique d'ions (EIS) :** une électrode spécifique possède une membrane sensible et sélective pour un ion particulier, cette électrode immergée dans une solution, développe un potentiel qui est dû à une réaction sélective et spontanée [24]. On mesure ce potentiel par rapport à un potentiel de référence. Ce dernier est obtenu par une électrode de référence. Le dispositif de mesure est présenté dans la figure I.5.

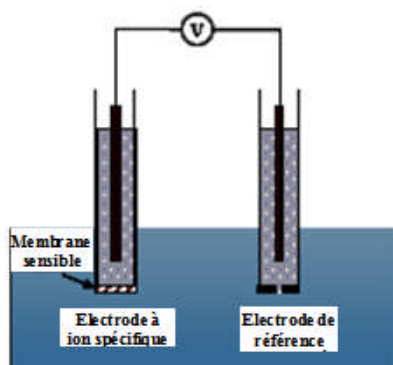


Figure I.5 : Mesure potentiométrique à l'aide d'une électrode à ion spécifique.

Pour la biodétection, ces électrodes ont essentiellement été associées à des enzymes dont l'activité consomme ou produit des ions H^+ [25]. La mesure consiste donc en le suivi de cette variation de la concentration en H^+ , ce qui se fait classiquement avec une électrode spécifique à membrane de verre. Le principal inconvénient de ce dispositif est qu'il souffre de signaux parasites (influence des autres ions de la solution).

b. Transistors à effet de champ : l'emploi de transistors à effet de champ constitue le deuxième volet des capteurs potentiométriques (figure I.6). L'ISFET (Ion-Sensitive Field-Effect Transistor) utilisé pour la détection est une évolution du transistor MOSFET classiquement utilisé en électronique.

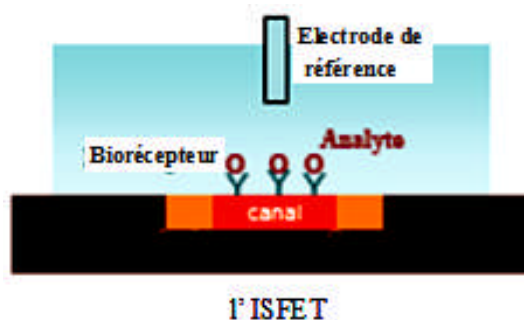


Figure I.6 : Principe de la détection basée sur l'effet de champ.

D'abord destiné à la détection chimique (H^+ , K^+ , Ca^{2+}), le principe du capteur a ensuite été étendu à la détection biologique avec l'intégration de couches permettant la reconnaissance moléculaire [26]. Un capteur ISFET à base de tributylphosphate pour la détection de Chrome hexavalent Cr^{6+} , a été développé par Zazoua et al. [27]. L'avantage de ces biocapteurs sur les électrodes EIS est leur faible coût et leur possibilité d'intégration dans des systèmes miniaturisés.

I.5. Applications et perspectives des biocapteurs

Les biocapteurs constituent une solution attractive permettant de fournir des systèmes simples et sélectifs pour l'analyse de différents composés. Le grand nombre d'enzymes en a fait des instruments analytiques.

De nombreuses électrodes à enzymes ont été décrites dans la littérature. La plupart n'existent qu'à l'échelle du laboratoire de recherche ; certaines ont abouti à la fabrication d'appareils commercialisés [28].

Les biocapteurs peuvent apporter des solutions originales et efficaces à des problèmes concernant de nombreux domaines : agro-alimentaire, environnement et santé. Concernant les utilisations actuelles et potentielles des biocapteurs, on peut faire les remarques suivantes :

- **Dans le domaine médical** : Leur emploi devrait permettre de diminuer le coût des analyses. Il permet également d'envisager des analyses rapides. Les dosages les plus courants sont ceux du glucose et de l'urée dans les fluides biologiques : sang total, sérum et urine.
- **Dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique** : Par exemple, le dosage de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase immobilisée sur une électrode à oxygène permet le suivi de la concentration en vitamine C dans les boissons telles que la bière, les jus de fruits frais et en conserve.
- **Dans le domaine de l'environnement et la dépollution** : Leur emploi peut faire espérer une systématisation des contrôles.

Conclusion

En conclusion, un biocapteur est un dispositif qui détecte, enregistre et transmet une information relative à un changement physiologique ou à la présence de différents composants chimiques ou biologiques dans l'environnement. Plus techniquement, c'est une sonde qui intègre un composant biologique (tissu, microorganisme, organite, récepteur cellulaire, enzyme, anticorps, etc.), couplé à un système de transduction (optique, électrochimique, thermoélectrique ou magnétique). Le but est de produire un signal électronique mesurable. La spécificité (étude de processus, détection de composants très spécifiques avec une grande exactitude), la rapidité (mesure directe et instantanée) et la

simplicité (récepteur et transducteur sont intégrés dans un seul capteur) sont les principales caractéristiques d'un biocapteur [29].

II. Techniques d'immobilisations des biomolécules

L'immobilisation des biomolécules sur la surface est une étape clé dans la fabrication des biocapteurs. En effet, la méthode d'immobilisation doit être efficace, reproductible, garantir une bonne homogénéité des plots, une densité de sondes élevée et surtout une immobilisation stable dans les conditions d'utilisation ultérieures. Selon les propriétés de la surface et des biomolécules, différents types d'interaction peuvent être mis en œuvre. De ce fait, différentes procédures d'immobilisation du biorécepteur ont été développées dans le but d'avoir une immobilisation efficace et stable des biomolécules actives sur la surface du transducteur, permettant de ce fait, une utilisation à long terme de l'enzyme tout en maintenant son activité biologique [30], de maintenir complètement les propriétés biologiques des biomolécules actives et de garantir une accessibilité et une réactivité maximales du biorécepteur [31-33]. La sélection d'une méthode d'immobilisation appropriée dépend de la nature de la molécule biologique, du type de transducteur utilisé, des propriétés physicochimiques de l'analyte et des conditions opératoires du biocapteur [11]. D'ailleurs, dans le cas de la fixation des enzymes, la variation de l'activité va dépendre de plusieurs paramètres et notamment de la nouvelle conformation du système qui pourra être favorable ou pas à la catalyse enzymatique. Une enzyme peut donc présenter aussi bien une augmentation qu'une diminution de son activité après immobilisation [34]. Plusieurs conditions doivent être respectées telles que :

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

II.1. Les méthodes d'immobilisations des enzymes

La méthode d'immobilisation est également un paramètre important. En effet, la diffusion des différents substrats va être fortement modifiée par rapport aux systèmes homogènes mais également en fonction de la méthode d'immobilisation [35].

On retrouve dans la littérature quatre grandes familles d'immobilisation des enzymes: l'immobilisation par encapsulation, par adsorption, par "Cross-linking" et par liaison

covalente [36]. Nous nous attacherons à décrire les avantages et inconvénients de ces différentes approches.

II.1.1. L'adsorption

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface [37-39] (figure I.7). La méthode par adsorption est particulièrement adaptée pour des biorécepteurs enzymatiques. Elle représente la méthodologie d'immobilisation la plus utilisée car la plus simple à mettre en place. En effet, dans la plupart des cas l'enzyme est diluée (en solution), puis la surface solide est mise en contact avec la solution pendant une période fixe. La surface est enfin rincée à l'aide d'une solution tampon pour nettoyer la surface des enzymes non adsorbées.

Les mécanismes d'adsorption d'enzymes sont principalement dus à des interactions de type Van der Waals, électrostatiques ou encore hydrophobiques. Les principales enzymes adsorbées sur surface solide ont été la glucose oxydase (pour la détection du glucose), l'uréase (pour la détection de l'urée), la lactateoxydase (pour la détection du lactose) et la HRP (horseradish peroxydase pour la détection de H_2O_2). Les limites de détection sont de l'ordre de 1.10^{-7} mol/L [40].

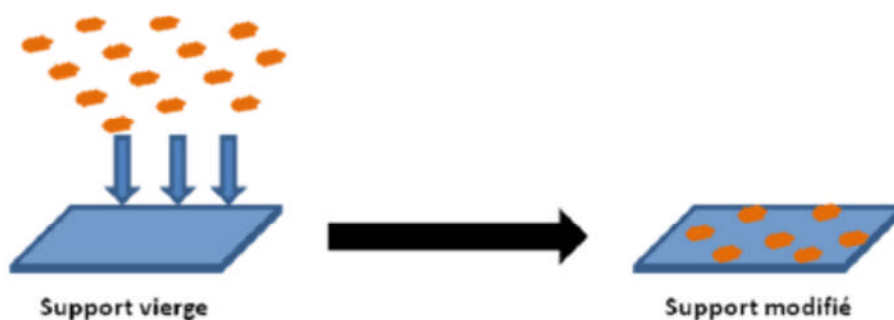


Figure I.7: Adsorption des enzymes sur un support [35].

Même si ce genre de méthodologie affecte peu l'activité de l'enzyme, elle présente certains désavantages. Le principal concerne la désorption des enzymes de la surface solide, qui peut être provoquée par un simple changement de pH, de température ou encore par un changement de la force ionique du liquide. Un autre désavantage de la technique réside dans la non spécificité de l'adsorption : il est possible en effet, après une première modification, que la surface adsorbe d'autres espèces non spécifiques lors de l'utilisation du biocapteur dans la solution contenant l'analyte cible [36].

II.1.2. La réticulation ou "Cross-linking"

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulants qui vont permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques [41-42]. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de co-réticulation (figure I.8).

Les enzymes, après avoir été adsorbées sur un support, sont mises en contact avec un agent réticulant afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble. Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez simple à mettre en œuvre et de plus de part les liaisons chimiques, elle offre une bonne stabilité au système. Cependant, une perte d'activité enzymatique peut être observée. En effet outre l'utilisation de réactifs potentiellement non biocompatibles et pouvant altérer l'activité de l'enzyme, les propriétés physiques du système sont modifiées, leur donnant des propriétés mécaniques médiocres [35].

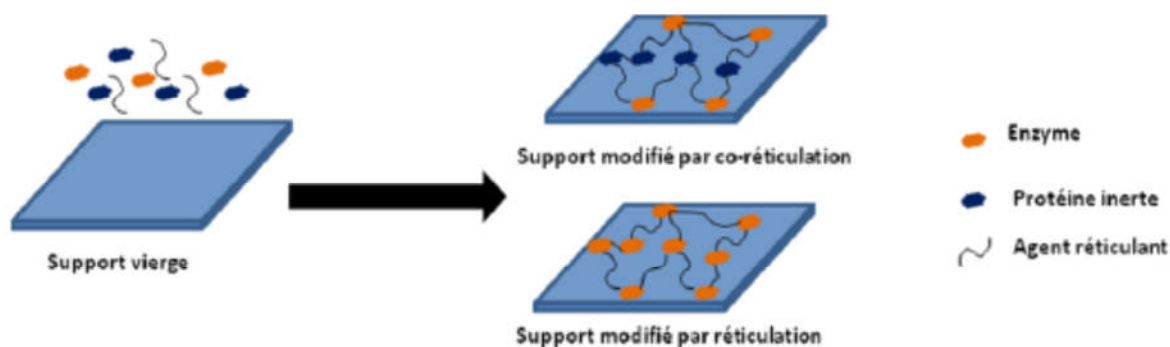


Figure I.8. Réticulation et co-réticulation des enzymes [35].

L'immobilisation par "Cross-linking" consiste donc à former un gel par co-réticulation d'enzyme avec par exemple du glutaraldéhyde (ou encore de l'hexaméthylènediamine) en présence de BSA. On forme ainsi des liaisons covalentes entre les protéines. Le gel peut être alors déposé sur une surface comme une électrode de travail pour l'obtention de biocapteurs. Ce type d'immobilisation a ainsi pu être reporté pour la détection de différentes molécules comme les métaux lourds [43], les nitrites [44], ou bien encore certains polluants organiques [45]. L'immobilisation par "Cross-linking" a permis de développer des biocapteurs enzymatiques [46].

Ces biocapteurs ont la particularité d'être mis en œuvre facilement et de posséder une bonne stabilité dans le temps. A titre d'exemple, il a été facilement démontré qu'un biocapteur développé pour la détection d'ions de métaux lourds par "Cross-linking" d'une phosphatase alcaline avec de la BSA dans du glutaraldéhyde sur une électrode, conservait son activité pendant un mois en solution à 4°C [43].

Le principal inconvénient de ce type d'immobilisation réside dans la méthode même de formation du gel. En effet, les liaisons chimiques formées au cours de la réaction tendent à modifier la géométrie de l'enzyme et conduisent à une perte d'activité, les propriétés physiques du système sont modifiées, leur donnant des propriétés mécaniques médiocres, donc une perte d'efficacité du biocapteur. Ces liaisons provoquent par ailleurs des changements conformationnels au sein de la structure de l'enzyme. De plus, des modifications chimiques des sites actifs peuvent également être affectées durant la formation du "Cross-linking".

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à cette technique pour l'immobilisation d'enzymes à la surface des électrodes dans le but d'élaborer des capteurs biologiques pour la détection des polluants organiques dans les milieux aqueux.

II.1.3. Le greffage covalent

Le principe de cette méthode d'immobilisation [47-48] est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif (figure I.9).

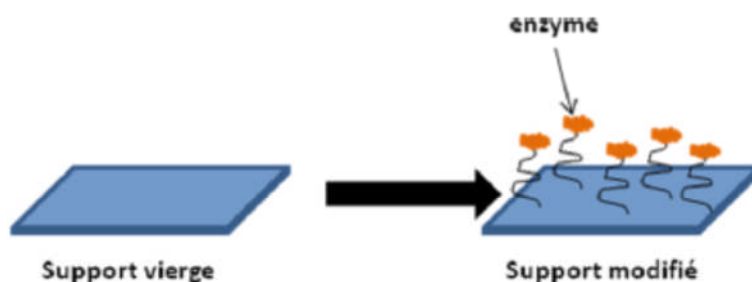


Figure I.9 : Greffage covalent des enzymes [35].

Le couplage covalent conduit à des liaisons fortes entre la biomolécule et la surface du transducteur. En effet, cette technique d'immobilisation exige la présence de groupements fonctionnels sur la surface du transducteur. Ces groupements sont en général de type carboxyliques (-COOH), amine (-NH₂), hydroxyle (-OH), thiol (-SH), (-PO₄) (dans le cas de

l'ADN), ou encore plus récemment (-N₃) [49, 50, 36] et n'étant que peu réactifs chimiquement, d'où la nécessité de les activer ou les traiter par des réactifs appropriés pour réagir dans des conditions douces avec les groupements fonctionnels de la biomolécule n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire. Les principaux agents activateurs sont les carbodiimides, le bromure de cyanogène, les sels de diazonium, les isocyanates, les thiols [51]. Cette technique d'immobilisation permet l'obtention de membranes monomoléculaires, des liaisons stables et des contraintes diffusionnelles limitées. Cependant, parmi les inconvénients du couplage covalent, on peut citer la nécessité d'une surface de transducteur facilement fonctionnalisable pour obtenir finalement un grand nombre de sites actifs.

II.1.4. L'encapsulation

Le principe de l'encapsulation est de fixer les enzymes dans une matrice [52-53] (figure I.10). L'immobilisation se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent. La matrice doit permettre la diffusion des petites molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Ces matrices peuvent être inorganiques (gels de silice) [54], organiques (nafion) [55], polymères (polyacrylamide, polyuréthanes...) [56] ou composites (pâte de carbone) [57].

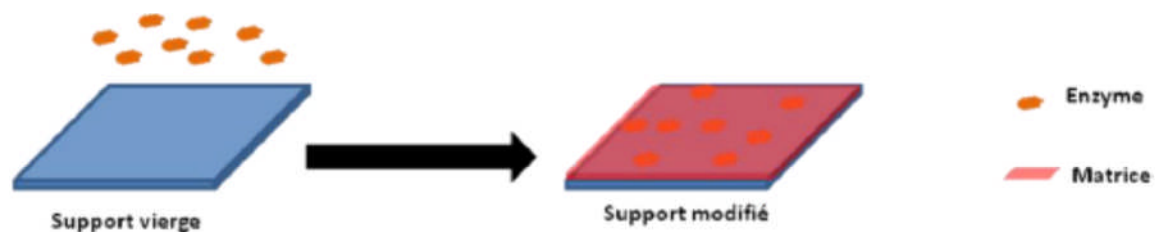


Figure I.10 : Encapsulation des enzymes [35].

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

Conclusion

Devant la grande diversité des biorécepteurs, des transducteurs et des méthodes d'immobilisation et dans le but de mettre au point un biocapteur environnemental, des choix sont à faire.

Celui du transducteur est conditionné par plusieurs paramètres : l'adéquation avec le type de mesure, le biorécepteur et le matériel à disposition.

Le choix du biorécepteur dépendra, quant à lui, de la sensibilité et la sélectivité par rapport à l'analyte.

L'exploitation des matrices organiques comme support enzymatique pour la fabrication de biocapteurs impédancemétriques a atteint un développement considérable. Dans certains cas, l'incorporation d'une membrane organique permet au biocapteur de surmonter des problèmes liés aux interférences et de réduire la taille des biocapteurs.

La fabrication de microélectrodes enzymatiques [58-60] présente un intérêt pour de futures applications, notamment agroalimentaire et environnementale. En effet, outre la simplicité de fabrication et la très grande sensibilité du mode de détection impédancemétrique, les biocapteurs permettent de délivrer une information en temps réel. La capacité de détecter des changements rapides de concentration des composés dans les milieux aqueux permet l'élaboration de systèmes miniaturisés qui sont, soit utilisés dans les contrôles agroalimentaires, soit dans les contrôles environnementaux, 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* [61].

La tendance actuelle dans le développement des biocapteurs s'oriente vers la miniaturisation et l'intégration dans les dispositifs de mesure. Jusqu'à maintenant, et malgré le coût relativement important des enzymes, de nombreux biocapteurs enzymatiques ont été développés en laboratoire et certains ont été commercialisés pour la détection de composés différents et des recherches sont en cours pour élargir les possibilités d'application. Chaque type de biocapteur comporte à la fois des points forts et des points faibles. Le manque de stabilité durable dans le temps et la difficulté de fabrication sont les problèmes les plus souvent cités.

III. Immobilisation de la lipase pour l'application en biocapteurs

Le développement rapide des biocapteurs dans le monde entier a permis de mettre en évidence une étape clé qui concerne l'immobilisation des biomolécules sur la surface du transducteur. En effet, les groupes de recherche impliqués dans ce domaine se sont retrouvés face à des défis majeurs afin de réaliser une immobilisation des récepteurs biologiques la plus idéale possible. Dans le cas idéal, il faut tout d'abord assurer un ancrage stable des biomolécules sur la surface du transducteur qui pourra ainsi conférer une bonne stabilité au biocapteur et ceci sans dénaturer la biomolécule utilisée. Il faut comprendre par cela que cette dernière (ou son site actif) doit conserver une bonne accessibilité et être orienté de façon à pouvoir interagir correctement avec la cible à détecter. Le dépôt biomoléculaire doit aussi être compact, homogène et comporter le minimum possible de défauts afin de profiter complètement de la surface ainsi fonctionnalisée et espérer atteindre des limites de détection faibles sur de petites surfaces.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés principalement aux biocapteurs à lipase. Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides (ester formés du glycérol et des acides gras). L'idée est de mettre au point un dispositif analytique consistant en un biocapteur enzymatique miniaturisé dont le but est de détecter un polluant organique dans un milieu aqueux. Cette problématique découle du souci de la surveillance et du maintien des taux des polluants organiques dans les milieux aquatiques à des niveaux normaux. Le principe de fonctionnement de ces biocapteurs est basé sur la reconnaissance sélective de polluants donnés par les enzymes.

III.1. Les biocapteurs à lipase

Au cours des dernières décennies, l'accroissement des connaissances des capacités biologiques des enzymes a permis de créer une nouvelle génération de produits et de procédés [62]. Parmi ces produits citons notamment les biocapteurs qui présentent des avantages en raison de leur spécificité inhérente, simplicité, coût relativement faible, une réponse rapide, permettant une surveillance continue. Par conséquent, ils offrent de nouvelles alternatives en matière d'analyse dans le diagnostic clinique, dans l'environnement et dans l'industrie agroalimentaire.

Les biocapteurs enzymatiques peuvent être des enzymes ou des supports multi-enzymatiques, des organites cellulaires, des cellules complètes ou un tissu animal ou végétal

[63-65]. Ces capteurs biologiques sont utilisés pour détecter la présence de l'un des substrats qui participent à la réaction par détection de la disparition d'un substrat connu distinct du substrat recherché, ou par l'apparition d'un produit connu ; les capteurs biologiques ne sont pas consommés et peuvent être réutilisés [65-66]. Fondamentalement, dans des biocapteurs enzymatiques les enzymes sont immobilisées dans un transducteur potentiométrique, ampérométrique, optométrie, calorimétrique ou piézoélectrique [63].

Parmi les enzymes, les lipases sont les plus sollicitées ; elles sont utilisées en tant que biocapteurs dans l'industrie des graisses et des huiles, dans la technologie alimentaire et dans le diagnostic clinique pour la détermination quantitative de triglycérides est d'une grande importance [67]. Les lipases sont des catalyseurs à faible coût et l'usage de celles-ci présente l'avantage d'avoir un temps de réponse très court. Depuis le milieu des années 1980, les lipases ont été de plus en plus étudiées. Il est maintenant bien établi qu'elles catalysent non seulement l'hydrolyse de leurs substrats naturels, les triglycérides, mais également de nombreuses autres molécules contenant la fonction ester, pour donner respectivement le glycérol, des acides gras, un alcool et un acide carboxylique [68].

Les lipases sont utilisées comme biocapteurs dans les aliments et l'industrie des boissons pour la détermination des acides gras, dans le contrôle de l'environnement, analyse de la pollution, en particulier la contamination par les pesticides et sur les aspects cliniques, le contrôle des taux de lipides dans le sang des patients atteints d'affections cardiovasculaires [69].

Les biocapteurs potentiométriques à base de lipase de *Candida rugosa* destinés à la détection de pesticide organophosphoré a été décrit par Kartal et *al.* [70]. La lipase est immobilisée sur l'électrode de verre au moyen d'une membrane de gélatine, qui est ensuite réticulée avec du glutaraldéhyde. Le principe du biocapteur est basé sur la mesure de la variation du pH due à la production d'acide découlant de l'hydrolyse enzymatique d'un ester [70].

III.2. Choix de la lipase

On a mentionné précédemment que les enzymes étaient des protéines qui catalysaient un grand nombre de réactions chimiques. On a vu certains des avantages et inconvénients prêtés généralement à l'immobilisation des enzymes par co-réticulation ainsi que des exemples d'applications de celles-ci dans la détection des métaux lourds [43], des nitrites

[44], ou bien encore certains polluants organiques [45] et dans le développement de biocapteurs [46,43]. La lipase (hydrolase de triglycérides, EC 3.1.1.3) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides à monoglycérides et des acides gras. Pour notre étude, le choix de la lipase a été motivé principalement pour les raisons suivantes:

- c'est une enzyme facilement disponible chez plusieurs fournisseurs et elle est utilisée dans différentes applications industrielles ou de laboratoire,
- il existe des substrats synthétiques couramment commercialisés permettant une mesure simple et précise de son activité enzymatique à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible,
- elle est souvent citée dans la littérature, ce qui facilite la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres techniques d'immobilisation,
- elle constitue un bon modèle de la large classe des hydrolases, dont le marché, en tonnage et en diversité d'applications, est très important.

III.3. Les lipases, catalyseurs du monde vivant

III.3.1. Principe général et enjeux

Les lipases ou triacylglycérols hydrolases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes qui agissent en milieu hétérogène. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols à l'interface huile/eau [71, 72] (figure I.11). Leur particularité vient du fait que ces enzymes sont plus actives sur les lipides qui sont sous forme agrégée [73]. Les lipases sont présentes dans la plupart des tissus animaux [74] et végétaux [75] ainsi que chez les microorganismes [76-78] qui constituent une source importante de production de lipases à grande échelle.

À ce jour, de nombreuses lipases de microorganismes ont été purifiées et caractérisées et certaines d'entre elles ont été cristallisées (*lipase de Pseudomonas glumae* [79], *lipase de Rhizomucor miehei* [80], *lipase Geotrichum candidum* [81], *lipase de Candida rugosa* [82]...). La lipase de *Candida cylindracea* (qui est l'ancien nom de *Candida rugosa*) a été cristallisée en présence et en l'absence d'inhibiteurs [83]. Il s'agit d'une alpha/beta hydrolase comprenant 11 brins beta entourés par 8 hélices alpha [82]. La triade catalytique est cachée sous un flap constitué de 26 résidus d'acides aminés. La lipase est un biocatalyseur unique avec une grande spécificité de substrat. Maintenant, il est largement utilisé dans la synthèse organique [84, 85], la médecine [86-88], et l'industrie des pâtes et papiers [89-91]. Les lipases hydrolysent les triacylglycérols en monoacylglycérol, diacylglycérol, glycérol et acide gras libres :

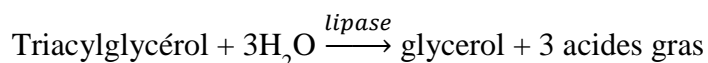


Figure I. 11: Réaction de l'hydrolyse de triacylglycérol dans les milieux aqueux catalysée par la lipase.

III.3.2. Caractéristiques structurales

Les lipases, dont la fonction biologique première est d'assurer le catabolisme des triacylglycérols, également appelés triglycérides (~ 90% des lipides alimentaires), en acides gras et en glycérol, présentent la particularité de reconnaître une large gamme de substrats distincts. En outre, les lipases peuvent être extraites de différentes souches, animales, végétales ou microbiennes (*i.e.*, issues de levures, bactéries ou champignons filamenteux), augmentant ainsi considérablement les potentialités de substrats et de réactions [92-93]. Néanmoins, en dépit d'une certaine hétérogénéité des séquences peptidiques recensées, les lipases, au sens strict, présentent une structure tridimensionnelle commune, caractérisée par un repliement dit α/β (*alternance d'hélices α et de feuilletts β*) [94], une triade catalytique Sérine-Aspartate/Glutamate-Histidine typique, et la présence d'une hélice α mobile, appelée « couvercle » ou « volet », pouvant recouvrir le site actif (figure I.12).

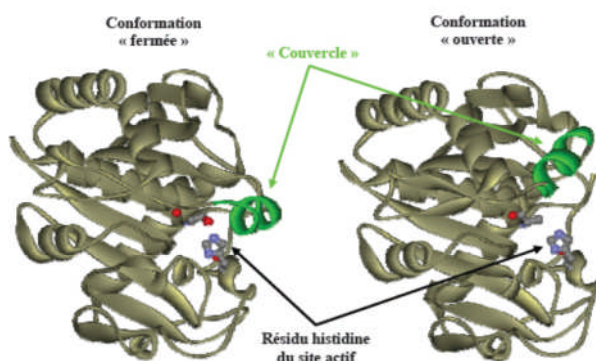


Figure I. 12 : Représentations de la structure de la lipase extraite de Thermomyces lanuginosus en conformations « fermée » et « ouverte ». Le « couvercle » est une hélice α mobile, indiquée en vert sur le schéma [94].

En effet, dans un milieu aqueux homogène (*les lipases sont hydrosolubles*), le site actif est préférentiellement isolé par une boucle polypeptidique amphiphile hélicoïdale. L'enzyme est alors en conformation dite « fermée », ou plus précisément, dans un état d'équilibre déplacé vers la conformation « fermée ». Cependant, en présence d'une interface hydrophobe [95], induite par une goutte d'huile (*la phase huile pouvant être le substrat triglycéride*) [96], un solvant organique, un support solide [97], ou une protéine appropriée

[98], l'ouverture du « couvercle » est favorisée. Ainsi, en conformation dite « ouverte » ou « active » (ou plus précisément, dans un état d'équilibre déplacé vers la conformation « ouverte » ; figure I.12), la face hydrophobe de la boucle polypeptidique, initialement orientée vers l'intérieur du site actif, interagit préférentiellement avec l'interface et expose, dès lors, les groupements catalytiques de l'enzyme au milieu réactionnel. Ce mécanisme complexe, nommé « activation interfaciale », a été très largement étudié [99], et constitue la première étape du processus biocatalytique global.

Le site actif des lipases contient donc une triade catalytique composée d'un résidu sérine nucléophile (*Ser*), activé par une liaison hydrogène avec un résidu histidine (*His*), lui-même activé *via* une liaison hydrogène avec un résidu acide carboxylique, aspartate ou glutamate (*Asp* ou *Glu*) [100-101]. Le mécanisme catalytique de la réaction d'hydrolyse d'un ester ou d'un triester par les lipases peut se décomposer en six étapes [102,103] (figure I.13).

Dans un premier temps, le substrat se lie au site actif *via* les résidus histidine et sérine pour former un complexe de Michaelis non-covalent (*étape 1*). La sérine nucléophile attaque alors le groupement carbonyle de l'ester, pour former un intermédiaire tétraédrique covalent (*étape 2*). Le noyau imidazole de l'histidine capte le proton libéré, formant ainsi un ion imidazolium. Cette étape est facilitée par l'effet de polarisation de l'ion carboxylate non-solvaté du résidu aspartate ou glutamate de la triade catalytique (*non-représenté dans la figure I.13.*), lié par liaison hydrogène au résidu histidine. En outre, la déformation conformationnelle induite par l'intermédiaire tétraédrique, entraîne l'oxygène du groupe carbonyle du substrat plus profondément à l'intérieur du site actif. Il s'installe alors dans un site jusqu'alors inoccupé, appelé le trou de l'oxyanion, au sein duquel il va former des liaisons hydrogène avec des résidus amides ou hydroxyles de l'enzyme. L'intermédiaire tétraédrique se décompose ensuite, pour donner un intermédiaire acyl-enzyme et libérer le produit alcool (*étape 3*). Le groupement alcool partant est alors remplacé par une molécule d'eau du milieu (*étape 4*). L'intermédiaire acyl-enzyme est ensuite rapidement désacylé *via* un intermédiaire tétraédrique covalent (*étape 5*), puis le produit carboxylate résultant est libéré (*étape 6*). La lipase est alors régénérée sous sa forme active.

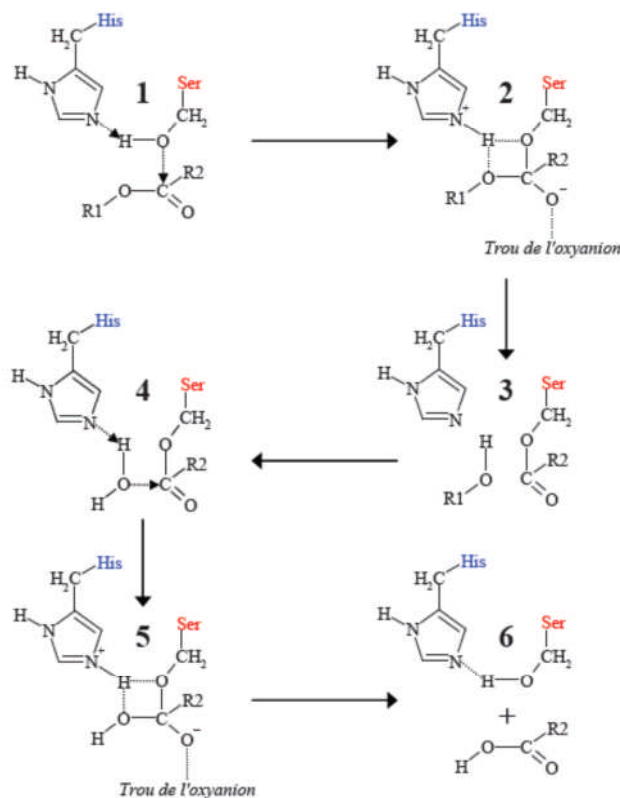


Figure I.13. Représentation schématique du mécanisme catalytique de la réaction d'hydrolyse d'un ester catalysée par une lipase. His et Ser désignent respectivement les résidus histidine et sérine du site actif de l'enzyme. (1) Complexe de Michaelis non-covalent ; (2) Attaque nucléophile par la sérine du site actif et formation de l'intermédiaire tétraédrique ; (3) Décomposition de l'intermédiaire tétraédrique pour donner un intermédiaire acyl-enzyme et libération du produit alcool ; (4) Remplacement et attaque nucléophile par une molécule d'eau ; (5) Formation d'un deuxième intermédiaire tétraédrique ; et (6) Libération de l'acide gras et régénération de l'enzyme sous sa forme active. Adapté de D. Voet et al. Biochimie (De Boeck Université), 2005, 521-523 [104].

Au-delà des réactions d'hydrolyse d'esters d'acides gras ou de triesters, réalisées en milieu aqueux, les lipases sont capables de catalyser des réactions inverses, telles que l'alcoolyse des triglycérides (*aussi appelée transestérification*) ou l'estérification d'acides gras, selon un mécanisme réactionnel similaire (*figure I.13; l'ester de l'étape (1) est alors remplacé respectivement par un triester ou un acide gras, et la molécule d'eau de l'étape (3) par un alcool*). Le développement de ces réactions enzymatiques originales constitue un véritable défi dans le secteur énergétique, notamment pour l'obtention de «biodiesels». Ces carburants alternatifs sont produits par la réaction de transestérification d'un triglycéride (*issu d'une huile végétale ou de graisses animales*) en esters d'acide gras, en présence de méthanol ou d'éthanol. Néanmoins, en raison de restrictions cinétiques et thermodynamiques évidentes, la biocatalyse des réactions d'estérification ou de transestérification par des lipases doit être

réalisée dans un solvant organique [105,106]. La faisabilité de tels systèmes catalytiques a été mise en évidence par A. Klibanov et al. en 1985 [105].

En outre, une amélioration de la stabilité des enzymes [106], associée à une solubilisation et une séparation plus aisées d'une large gamme de réactifs et produits organiques, a ouvert de nombreuses perspectives technologiques et industrielles pour la biocatalyse [107]. Cependant, l'activité enzymatique dans les solvants organiques est souvent très faible, et une insolubilité avérée peut exalter le phénomène néfaste d'agrégation des particules biologiques. De plus, les enzymes sont des macromolécules relativement coûteuses. Or, la séparation et la réutilisation des biocatalyseurs en suspension dans un solvant restent très délicates. Par conséquent, un transfert technologique vers l'industrie nécessite une amélioration conjointe de leur activité, de leur stabilité et de leur recyclabilité. L'immobilisation ou l'encapsulation d'enzymes au sein de supports poreux constitue une alternative séduisante, largement exploitée au cours de ces dernières décennies [97,108].

III.4. Immobilisation des lipases

Actuellement, une grande attention est portée sur la recherche de nouvelles stratégies d'immobilisation des enzymes. Ces dernières sont fortement impliquées dans la réalisation des biocapteurs et des bioréacteurs pour répondre aux attentes de plusieurs secteurs tels que l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'agrochimie (pesticides), l'industrie des détergents, l'industrie des cosmétiques et des parfums, l'industrie du papier, l'industrie du cuir, etc. [109-115]. La phase critique dans ces domaines est l'optimisation des protocoles d'immobilisation sans que l'activité biologique soit altérée. Parmi ces enzymes, la lipase qui a de nombreuses applications dans les domaines biomédicaux et alimentaires. Dans ce contexte, un biocapteur a été développé intégrant une matrice organique à base de glutaraldéhyde servant de support d'immobilisation de la lipase.

La lipase a été immobilisée sur la surface de nombreux matériaux de support comme les résines échangeuses d'ions [116], des matériaux inorganiques (sable, la silice), des biopolymères, notamment d'alginate de sodium [117], des polymères synthétiques tels que le polypropylène, le polyéthylène, le polyméthacrylate [118], de la célite [119], en céramique [120], complexes comme polypropylèneimine-agarose ont été utilisés pour immobiliser les lipases. Deux types de chitosane (flocons et poreux) ont été utilisés pour immobiliser la lipase d'une source microbienne (*Candida rugosa*), et les cellules animales (les lipases

pancréatiques de porc) [121]. Le coût élevé des supports populaires (transporteurs à base de silice et de polymères synthétiques) provoque beaucoup à chercher un substitut moins cher comme CaCO_3 [122], balles de riz et de paille de riz [123] ou la chitine et le chitosane [124-125]. Silicates hydrophobes dérivés d'un mélange de TMOS et alkyltriméthoxysilanes comme le propyltriméthoxysilane (SPTM) et le n-butyltriméthoxysilane (BTMS) ont été identifiés comme étant les meilleurs supports pour la lipase [126]. Des matériaux de silice mésoporeuse avec une grande surface et des structures poreuses ordonnées ont été également utilisées pour immobiliser la lipase. L'enzyme ainsi immobilisée a été trouvée plus efficace et plus stable que l'enzyme libre [127]. Dans notre travail, la lipase sera immobilisée dans une matrice organique composée de glutaraldéhyde et de l'albumine de sérum bovin dont le but est de réaliser un biocapteur impédimétrique pour la détermination des pesticides organochlorés (le diclofop-méthyle) [128]. Le chapitre suivant décrit cet herbicide (le diclofop-méthyle).

Conclusion

Les lipases, comme nous l'avons vu, sont capables de catalyser de très nombreuses réactions avec des substrats de nature très variée, qu'elles n'ont en général jamais rencontrés dans la nature.

Parmi les très nombreuses lipases disponibles, la technique consiste à trouver celle ayant les meilleures performances et ensuite à mettre en œuvre différentes techniques pour les rendre compatibles avec une utilisation industrielle.

References bibliographiques

- [1]. Viswanathan, S., Radecka, H., Radecki, J. *Monatsh. Chem.* 140, 891-899, **2009**.
 - [2]. Vaddiraju, S., Tomazos, I., Burgess, D. J., Jain, F. C.; Papadimitrakopoulos, F. *Biosens. Bioelectron.*, 25, 1553-1565, **2010**.
 - [3]. Rasooly, A., Herold, K. E. *Biosensors and Biodetection*, Éd. Humana Press, Vol. 504, **2009**.
 - [4]. Bilitewski, U., Turner, A. P. F. *Biosensors for environmental monitoring*, Éd. Taylor & Francis, **2000**.
 - [5]. Paddle, B. M. *Biosens. Bioelectron.*, 11, 1079-1113, **1996**.
 - [6]. L.C. Clark, C. Lyons, NY. *Ann. Acad. Sci.*, 102, 29-45, **1962**.
 - [7]. L.C. Clark and C. Lyons, *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*, *Annals of New York Academy of Sciences*, 29. **1962**.
 - [8]. S.J. Updike and G.P. Hickson, *The Enzyme Electrode*, *Nature* 214, 986, **1967**.
 - [9]. G. Guilbault and J. Montalvo, *A Urea Specific Enzyme Electrode*, *Journal of the American Chemical Society*, 91, 2164, **1969**.
 - [10]. Guilbault and J. Montalvo, *An Improved Urea Specific Enzyme Electrode*, *Anal. Lett.* 2, 283, **1969**.
 - [11]. C. Tran-Minh, *Les biocapteurs. Principe, construction et applications*, Thèse de l'Université de Paris, Masson **1991**.
 - [12]. E.A.H. Hall, *Biosensors*, Open University Press, Buckingham, **1990**.
 - [13]. N. Comtat and A. Bergel, "Biocapteur : rêve ou réalité industrielle ? " *Biofutur* 171 (Octobre) : 33- 36, **1997**.
 - [14]. Baur Jessica, *Autoassemblage de macromolécules biologiques via des poly (pyrroles) et/ou des nanotubes de carbone fonctionnalisés*, Thèse de l'Université Grenoble, **2010**.
 - [15]. A. T. MAI, *Développement des biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse*, Thèse de l'Université Lyon, **2004**.
 - [16]. Gaëlle C. LE GOFF, *Immobilisation de biomolécules pour l'analyse multiparamétrique sur biopuces. Application au génotypage érythrocytaire haut-débit*, Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon 1, **2011**.
 - [17]. Hafaid Imen, "Etudes physico-chimiques de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales " , Thèse de l'université de Claude Bernard Lyon I, **2009**.
 - [18]. N. Comtat and A. Bergel, "Biocapteur : rêve ou réalité industrielle ? " *Biofutur* 171 (Octobre): 33- 36, **1997**.
 - [19]. M.MEHRVAR, M.ABDI, *Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors*, *Analytical sciences*, 20, 1113-1126, **2004**.
 - [20]. Gaëlle Lehoucq, *Transistors à nanofils de silicium top-down. Application à la détection biologique*, Thèse de l'Ecole Polytechnique Paris Tech, **2010**.
 - [21]. N. Jaffrezic-Renault, C. Marterlet, and P. Clechet. *Capteurs chimiques et biochimiques. Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 10(P360) :360-360, **1994**.
 - [22]. W. K. Ward, L.B. Jansen, E. Anderson, G. Reach, J.C. Klein, and G.S. Wilson. *A new amperometric glucose microsensor: in vitro and short-term in vivo evaluation*. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(3):181_189, **2002**.
-

- [23]. S. J. Park, T.A. Taton, and C.A. Mirkin. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes, **2002**.
- [24]. G. Durand. Potentiométrie. Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation, 4(P 2115), **1983**.
- [25]. H. Nilsson, AC Akerlund, and K. Mosbach. Determination of glucose, urea and penicillin using enzyme-pH electrodes. *Biochimica et biophysica acta*, 320(2):529, **1973**.
- [26]. S. Caras and J. Janata. Field effect transistor sensitive to penicillin. *Analytical Chemistry*, 52(12):1935-1937, **1980**.
- [27]. A. Zazoua, S.Zougar, R. Kherrat, M.H. Samar, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid and A. Abbaci. Development of hexavalent chromium ISFET sensor with a polymeric membrane including tributylphosphate. *Materials Science and Engineering C26*, 568-570, **2006**.
- [28]. I. BEN ASSAKER, " Synthèse électrochimique de films d'hydroxydes doubles lamellaires -application aux biocapteurs ", thèse de l'université d'Evry val d'Essonne, **2009**.
- [29]. Lebreton, M. Un biocapteur colorimétrique biomimétique pour l'étude de phénomènes membranaires. *Daguessh*, No. 53, pp. 6-7, **2004**.
- [30]. C. Bourdillon, M. J. Laval, D. Thomas. *J. Electrochem Soc: Electrochemical Science and technology* 706 Avril **1986**.
- [31]. A. P. F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, (Eds.), *Biosensors, fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford, **1987**.
- [32]. G. G. Guilbault, *Handbook of immobilized enzymes*. Marcel Dekker, New York, **1984**.
- [33]. L. J. Blum, P.R. Coulet, (Eds.), *Biosensor principles and applications*, Marcel Dekker, New York, **1991**.
- [34]. A. M. Klibanov, Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv Appl Microbiol* 29, 1-28, **1983**.
- [35]. Haytem JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, **2011**.
- [36]. Audrey Sassolas, Loïc J Blum, and Béatrice D Leca-Bouvier. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv*, 30: 489-511, **2012**.
- [37]. U. Spohn, D. Narasaiah, L. Gorton, D. Pfeiffer, A bienzyme modified carbon paste electrode for the amperometric detection of l-lactate at low potentials. *Analytica Chimica Acta* 319, 79-90, **1996**.
- [38]. G. Palleschi, A.P.F. Turner, Amperometric tetrathiafulvalene-mediated lactate electrode using lactate oxidase absorbed on carbon foil. *Analytica Chimica Acta* 234, 459-463, **1990**.
- [39]. M.G. Boutelle, C. Stanford, M. Fillenz, W.J. Albery, P.N. Bartlett, An amperometric enzyme electrode for monitoring brain glucose in the freely moving rat. *Neuroscience Letters* 72, 283-288, **1986**.
- [40]. Haibin Shi, Yu Yang, Jiadong Huang, Zixia Zhao, Xinhua Xu, Jun-Ichi Anzai, Tetsuo Osa, and Qiang Chen. Amperometric choline biosensors prepared by layer-by-layer deposition of choline oxidase on the Prussian blue-modified platinum electrode. *Talanta*, 70 : 852-858, **2006**.
- [41]. M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret, Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69, 153-163, **2000**.
- [42]. Y. G. Li, Y. X. Zhou, J. L. Feng, Z. H. Jiang, L. R. Ma, Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Analytica Chimica Acta* 382, 277-282, **1999**.

- [43]. A. L. Berezhetskyya, O.F. Sosovska, C. Durrieub, J.-M. Chovelonc, S.V. Dzyadevycha, and C. Tran-Minh. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. *IRBM*, 29:136–140, **2008**.
- [44]. Zhiqiang Zhang, Siqing Xia, Didier Leonard, Nicole Jaffrezic-Renault, Jiao Zhang, François Bessueille, Yves Goepfert, Xuejiang Wang, Ling Chen, Zhiliang Zhu, Jianfu Zhao, M Gabriela Almeida, and Célia M Silveira. A novel nitrite biosensor based on conductometric electrode modified with cytochrome c nitrite reductase composite membrane. *Biosens Bioelectron*, 24:1574–1579, **2009**.
- [45]. E. V. Gogol, G. A. Evtugyn, J. L. Marty, H. C. Budnikov, and V. G. Winter. Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors. *Talanta*, 53: 379–389, **2000**.
- [46]. Arnaldo C. Pereira, Marina R. Aguiar, Alexandre Kisner, Denise V. Macedo, and Lauro T. Kubota. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and methyl blue coimmobilized on multiwall carbon-nanotube. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 124 :269– 276, **2007**.
- [47]. M. Pellissier, F. Barrière, A.J. Downard, D. Leech, Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting. *Electrochemistry Communications* 10, 835-838, **2008**.
- [48]. Z.F. Li, E. T. Kang, K. G. Neoh, K. L. Tan, Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid. *Biomaterials* 19, 45-53, **1998**.
- [49]. Lu Shin Wong, Farid Khan, and Jason Micklefield. Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chem Rev*, 109: 4025–4053, **2009**.
- [50]. Niina J Ronkainen, H Brian Halsall, and William R Heineman. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*, 39: 1747–1763, **2010**.
- [51]. W. Göpel., *Sensors: a comprehensive survey*. Vol.3. Chemical and biochemical sensors. VCH Weinheim **1991**.
- [52]. M. Mazur, A. Krywko-Cendrowska, P. Krysiński, J. Rogalski, Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route towards polypyrrole microcontainers. *Synthetic Metals* 159, 1731-1738, **2009**.
- [53]. L. Zhang, Y. Jiang, J. Shi, X. Sun, J. Li, Z. Jiang, Biomimetic polymer-inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation. *Reactive and Functional Polymers* 68, 1507-1515, **2008**.
- [54]. I. Gill, A. Ballesteros, Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnology* 18, 282-296, **2000**.
- [55]. N. L. Akers, C.M. Moore, S.D. Minter, Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes. *Electrochimica Acta* 50, 2521-2525, **2005**.
- [56]. A. K. Poulsen, A.M. Scharff-Poulsen, L.F. Olsen, Horseradish peroxidase embedded in polyacrylamide nanoparticles enables optical detection of reactive oxygen species. *Analytical Biochemistry* 366, 29-36, **2007**.
- [57]. M. C. Rodríguez, G.A. Rivas, Highly Selective First Generation Glucose Biosensor Based on Carbon Paste Containing Copper and Glucose Oxidase. *Electroanalysis* 13, 1179-1184, **2001**.
- [58]. Matsue, T. "Electrochemical sensors using microarray electrodes". *Trends in analytical chemistry* 12(3): 100-108, **1993**.
- [59]. Reynolds, E. R. and A. M. Yacynych. "Direct sensing platinum ultramicrobiosensors for glucose". *Biosensors and bioelectronics* 9: 283-293, **1994**.

- [60]. Strike, D. J., N. F. d. Rooij, et al. "Electrochemical techniques for the modification of microelectrodes". *Biosensors and Bioelectronics* 10: 61-66, **1995**.
- [61]. Liang, J. F., Y. T. Li, et al. "Biomedical application of immobilized enzymes". *Journal of pharmaceutical sciences* 89(8): 979-990, **2000**.
- [62]. Velasco-García, M.N., and T. Mottram, Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. *Biosyst. Eng.* 84:1-12, **2003**.
- [63]. Davis, J., D. Huw Vaughan, and M.F. Cardosi, Elements of biosensors construction. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1030-1035, **1995**.
- [64]. Mello, L.D., and L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* 77:237-256, **2002**.
- [65]. Wilson, G.S., and R. Gifford, Review biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosens. Bioelectron.* 20:2388-2403, **2005**.
- [66]. Gajovic, N., G. Binyamin, A. Warsinke, F.W. Scheller, and A. Heller, Operation of a miniature redox hydrogel-based pyruvate sensor in undiluted deoxygenated calf serum. *Anal. Chem.* 72:2963- 2968, **2000**.
- [67]. Kynclova E, Hartig A & Schalkhammer T, Oligonucleotide labeled lipase as a new sensitive hybridization probe and its use in bio-assays and biosensors, *J Mol Recognit*, 8, 139-145, **1995**.
- [68]. Pandey A, Benjamin S, Soccol C R, Nigam P, Krieger N et al, The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnol Appl Biochem* , 29, 119-131, **1999**.
- [69]. Banu ÖZTÜRK, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, thèse de l'institut de technologie de İzmir, Türkiye. **2001**.
- [70]. Kartal F, A Kilinc and S Timur, Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. Vol. 87:715-722, **2007**.
- [71]. Verger R, de Haas GH. Enzyme reactions in a membrane model. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids*, 10 : 127-36, **1973**.
- [72]. Singer T.P. et Hofstee B.H.J., Studies on wheat germ lipase. I. Methods of estimation, purification and general properties of the enzyme. *Archives of biochemistry*. 18, 229-243, **1948**.
- [73]. Sarda L, Desnuelle P. Action of pancreatic lipase on emulsified esters. *Biochim Biophys Acta*, 30: 513-21, **1958**.
- [74]. Carrier, F., Bezzine, S., and Verger, R., *J. Mol. Catalysis B*, vol. 3, p. 55, **1997**.
- [75]. Borgstrom, B. and Brockman, H.L., *Lipases*, Amsterdam, **1984**.
- [76]. Jaeger, K.E., Ransas, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., and Misset, O., *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 15, p. 29, **1994**.
- [77]. Gilbert, E.J., *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 15, p. 634, **1993**.
- [78]. Wohlfahrt, S. and Jaeger, K.E., *Bio Eng.*, vol. 9, p. 39, **1993**.
- [79]. Noble Nem, Cleasby A, Johnson LN, Egmond MR, Frenken LGJ. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals partially redundant catalytic aspartate. *FEBS lett*, 331: 121-8, **1993**.
- [80]. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, et al.. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343: 767-70, **1990**.

Références bibliographiques

- [81]. Schrag JD, LI Y, WU S, Cygler M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351: 761-4, **1991**.
- [82]. Grochulski P, LI Y, Schrag JD, et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem*, 268: 12843-7, **1993**.
- [83]. Ghosh D, Wawrsak Z, Pletnev VZ, et al.. Structure of uncomplexed and linoleate-bound *Candida cylindracea* cholesterol esterase. *Structure*, 3: 279-88, **1995**.
- [84]. Gutman, A.L. and Shapira, M., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 52, p. 87, **1995**.
- [85]. Chopineau, J., Kieboom, P.G., Klibanov, A.M., and Riva, S., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, p. 584, **1998**.
- [86]. Wicke-Planquart, C., Canaan, S., Riviere, M., Dupius, L., and Verger, R., *Protein Eng.*, vol. 9, p. 1225, **1996**.
- [87]. Carriere, F., Moreau, H., Raphel, V., Laogier, R., Benicourt, C., Junien, J.L., and Verger, R., *Eur. J. Biochem.*, , p. 75, **1991**.
- [88]. Suzuki, A., Mizumoto, A., Sarr, M.J., and Dimagno, E.P., *Gastroenterology*, **1997**, vol. 112, p. 2048.
- [89]. Fijita, Y., Matsukura, M., Hata, K., Shimoto, H., Sharyo, M., Skaguchi, H., and Gibson, K., *Tappi J.*, vol. 75, p. 117, **1992**.
- [90]. Reetz, M.T. and Jaeger, K.-E., *TIBTECH*, vol. 161, p. 396, **1998**.
- [91]. Reetz, M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 6, p. 145, **2002**.
- [92]. Karl-Erich Jaeger et Manfred T. Reetz, "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology," *Trends in Biotechnology* 16, no. 9, 396-403, Septembre 1, **1998**.
- [93]. Karl-Erich Jaeger et Thorsten Eggert, "Lipases for biotechnology," *Current Opinion in Biotechnology* 13, no. 4, 390-397, Août 1, **2002**.
- [94]. D.L. Ollis et al., "The α/β hydrolase fold," *Protein Engineering* 5, no. 3, 197-211, **1992**.
- [95]. P. Reis et al., "Lipases at interfaces: A review," *Advances in Colloid and Interface Science* 147-148, 237-250, Mars **2009**.
- [96]. N. Miled et al., "Interfacial catalysis by lipases," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, no. 4-6 : 165-171, Janvier 22, **2001**.
- [97]. M.T. Reetz, A. Zonta, et J. Simpelkamp, "Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials," *Biotechnology and Bioengineering* 49, no. 5, 527-534, **1996**.
- [98]. José M. Palomo et al., "Solid-Phase Handling of Hydrophobins: Immobilized Hydrophobins as a New Tool To Study Lipases," *Biomacromolecules* 4, no. 2, 204-210, Mars 1, **2003**.
- [99]. A. M. Brzozowski et al., "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase inhibitor complex". *Nature* 351, no.6, 6326, 491-494, **1991**.
- [100]. Leo Brady et al., "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase," *Nature* 343, no. 6260, 767-770, Février 22, **1990**.
- [101]. F. K. Winkler, A. D'Arcy, et W. Hunziker, "Structure of human pancreatic lipase," *Nature* 343, no. 6260 (Février 22, 771-774, **1990**.
- [102]. Donald Voet, Judith G. Voet, et Guy Rousseau, *Biochimie De Boeck Université*, **2005**.

- [103]. H. D. Beer et al., "Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants", *Protein Engineering* 9, no. 6, 507-517, **1996**.
- [104]. D. Voet et al. *Biochimie* (De Boeck Université), 521-523, **2005**.
- [105]. A Zaks et A M Klibanov, "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, no. 10, 3192-3196, Mai 1, **1985**.
- [106]. Alexander M. Klibanov, "Improving enzymes by using them in organic solvents". *Nature* 409, no. 6817, 241-246, Janvier 11, **2001**.
- [107]. Roberto Fernandez-Lafuente, "Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62, no. 3-4, 197-212, Mars **2010**.
- [108]. Cesar Mateo et al., "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". *Enzyme and Microbial Technology* 40, no. 6, 1451-1463, Mai 2, **2007**.
- [109]. Jaeger K. E., Reetz M. T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16, 396-403, **1998**.
- [110]. Schmid R. D., Verger R.. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 1608-1633, **1998**.
- [111]. Jaeger K. E., Dijkstra B. W., Reetz M.T., *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 315-351, **1999**.
- [112]. Jaeger K. E., Eggey T., Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390-397, **2002**.
- [113]. Houde A., Kademi A., Leblanc D., Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118, 155-170, **2004**.
- [114]. Gotor-Fernandez V., Brieva R., Gotor V., Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J.Mol. Catal. B: Enz.*, 40, 111-120, **2006**.
- [115]. Ghanem A., Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63, 1721-1754, **2007**.
- [116]. Benamia F. , Bouchagra S., Saihi Y., Djeghaba Z. Rebbani N. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43:1, 33-47, **2013**.
- [117]. Cheirsilp B., P. Jeamjounkhaw and A.H. Kittikun, Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 59: 206-211, **2009**.
- [118]. Salis A., M.S. Bhattacharyya, M. Monduzzi and V. Solinas, Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 57: 262-269, **2009**.
- [119]. Liu C.H., Y.H. Lin, C.Y. Chen and J.S. Chang, Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 40: 359-363, **2009**.
- [120]. Al-Zuhair, S., A. Dowaidar and H. Kamal, Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. *Biochem. Eng. J.*, 44: 256-262, **2009**.
- [121]. E.B.Pereira, G.M.Zanin, H.F.Castro, Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions, *Braz. J. Chem. Eng.* vol.20 no.4 São Paulo Oct./Dec. **2003**.
- [122]. Rosu R., Iwasaki, Y., Shimizu, N., Doisaki, N. and Yamane, T., Intesification of Lipase Performance in a Transesterification Reaction by Immobilization on CaCO₃ Powder, *Journal of Biotechnology*, 66, 51-59, **1998**.

- [123]. Tantrakulsiri, J., Jeyashoke, N. and Krisanangkura, K., Utilization of Rice Hull Ash as Support Material for Immobilization of *Candida cylindracea* Lipase, Journal of American Oil Chemist's Society, 74, 173-175, **1997**.
- [124]. Krajewska, B., Chitin and its Derivatives as Supports for Immobilization of Enzymes, Acta Biotechnologica, 11 (3), 269-277, **1991**.
- [125]. Felse, P.A. and Panda, T., Studies on Applications of Chitin and its Derivatives, Bioprocess Engineering, 20, 505-512, **1999**.
- [126]. Furukawa, S., T. Ono, H. Ijima and K. Kawakami, Effect of imprinting sol-gel immobilized lipase with chiral template substrates in esterification of (R)-(+)- and (S)-(-)-glycidol. J. Mol. Catal. B. Enz., 17: 23-28, **2002**.
- [127]. Kato, K. and S. Seelan, Enhancing activity and stability of Burkholderia cepacia lipase by immobilization on surface-functionalized mesoporous silicates. J. Biosci. Bioeng., 109: 615-617, **2010**.
- [128]. S. Baali, S. Zougar, R. Kherrat, Z. Djeghaba, .F. Benamia, N. jaffrezic-Renault, Electrochemical characterization of enzymatic impedimetric biosensor destined to detect organochlorine pesticide: the diclofop-methyl. Sensors & Transducers, Vol. 149, Issue 2, pp. 135-142, February **2013**.

Chapitre II

Les pesticides

L'usage des insecticides, herbicides, fongicides, etc. regroupés sous le nom de pesticides ou encore produits phytosanitaires, a permis d'améliorer les rendements et la diversité des cultures afin de satisfaire la demande nutritionnelle liée à l'accroissement de la population mondiale. Cependant, cette utilisation a également provoqué des effets indirects et néfastes sur l'environnement. Ainsi des études ont montré la présence de résidus de pesticides dans les aliments [1] ainsi que la contamination des eaux souterraines et superficielles [2].

Malheureusement, une très grande partie des pesticides répandus n'atteint pas leur cible. Une partie importante des pesticides répandus est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou des sols sur lesquels ils ont été répandus. Disséminés par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage, ils retombent avec les pluies directement sur les plans d'eau et sur les sols d'où ils sont ensuite drainés jusqu'aux milieux aquatiques par les eaux de pluie (ruissellement et infiltration) [3]. Les pesticides sont ainsi aujourd'hui à l'origine d'une pollution diffuse qui contamine toutes les eaux continentales : cours d'eau, eaux souterraines et zones littorales.

Si les pesticides sont d'abord apparus bénéfiques, leurs effets secondaires nocifs ont été rapidement mis en évidence. Leur toxicité, liée à leur structure moléculaire, ne se limite pas en effet aux seules espèces que l'on souhaite éliminer. Ils sont notamment toxiques pour l'homme [4,5].

Parallèlement à leurs effets bénéfiques dans la défense des cultures et la protection des récoltes, les pesticides expriment en sourdine leurs effets néfastes sur la santé humaine [4,5] et environnementale, effets nuisibles rapidement établis avec des preuves certaines par les scientifiques [6, 7, 8]. En effet, outre leur toxicité intrinsèque, la plupart de ces pesticides sont persistants (résistance aux dégradations chimique, photochimique et biologique) et s'accumulent dans l'environnement et chez l'homme à travers la chaîne alimentaire, provoquant ainsi des pathologies diverses et autres désordres physiologiques souvent très sévères [9, 10, 11].

Estimer les effets sur les écosystèmes d'une pollution liée aux pesticides s'avère difficile, car il existe un millier de familles de pesticides, soit des dizaines de milliers de principes actifs. Ils sont en outre utilisés à faibles doses et leurs comportements sont très divers. Leur impact dépend à la fois de leur mode d'action (certains sont beaucoup plus toxiques que d'autres), de leur persistance dans le temps (certains se dégradent beaucoup plus

rapidement que d'autres) et de leurs sous-produits de dégradation lesquels sont parfois plus toxiques et se dégradent moins vite que la molécule mère [12-13]. Leurs effets sur les êtres vivants sont, eux aussi, encore très mal connus. Ceci a conduit à des réglementations plus ou moins dures visant la restriction de leur utilisation ou leur interdiction totale pure.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) considère que 80% des maladies qui affectent la population mondiale sont directement véhiculées par l'eau : 400 millions de personnes sont atteintes en permanence de gastro-entérites, 160 millions de paludisme et 30 millions d'onchocercose [14]. Malgré les apparences, la transmission des maladies par une eau polluée n'est pas l'apanage des pays en voie de développement et l'élaboration de normes sur l'eau destinée à la consommation humaine vise à fournir aux consommateurs une eau ne constituant pas de risques pour la santé humaine.

II.1. Les pesticides en Algérie : Un usage démesuré [15]

En Algérie, la fabrication des pesticides a été assurée par des entités autonomes de gestion des pesticides: Asmidal, Moubydal. Mais avec l'économie de marché actuelle, plusieurs entreprises se sont spécialisées dans l'importation d'insecticides et divers produits apparentés. Ainsi, environ 400 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie, dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs. C'est la loi n° 87-17 du 1er août 1987, relative à la protection phytosanitaire (JO 1995), qui a instauré au départ les mécanismes qui permettent une utilisation efficace des pesticides. Cette loi régit les aspects relatifs à l'homologation, l'importation, la fabrication, la commercialisation, l'étiquetage, l'emballage et l'utilisation des pesticides. Récemment, dans notre pays, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est le milieu agricole d'abord qui utilise des tonnes de pesticides et des raticides; ces produits sont consacrés en majorité pour le traitement des cultures, la lutte contre les rongeurs et pour augmenter la production agricole. Ainsi, l'épandage de pesticides est courant sur les champs de pommes de terre dans le but de détruire les parasites pour la protection des récoltes.

La lutte antiacridienne menée au cours de cette dernière décennie a entraîné par ailleurs le déversement de milliers de tonnes d'insecticides. Par exemple, au cours de la campagne de lutte antiacridienne de 2004-2005, plusieurs tonnes de pesticides (des organophosphorés, des carbamates et la Deltaméthrine) ont été utilisées par épandage ou par pulvérisation dans les régions infestées par le criquet pèlerin, dans les régions du Sud et dans

le Tell. Puis, depuis les cinq dernières années, une autre forme d'utilisation intensive de pesticides se généralise dans de nombreuses wilayas du pays, dans le cadre du Programme national de lutte contre les zoonoses et plus particulièrement dans la lutte contre une pathologie vectorielle : la leishmaniose, une maladie qui a pris de l'ampleur malheureusement dans toutes les régions du pays, compte tenu des bouleversements écologiques et des dégradations environnementales urbaines et rurales. Ces divers types de traitements par les pesticides se font généralement pour parer à l'urgence, mais sans souci aucun des conséquences environnementales directes et des conséquences sanitaires sur le long terme liées aux infiltrations de ces substances non dégradables dans les sols, dans les sources et les nappes, puis vers les écosystèmes: les végétaux, les animaux et nécessairement l'homme.

Les analyses des résidus de pesticides pour évaluer le degré de contamination des milieux naturels (les cultures, les eaux superficielles...) ne sont pas faites systématiquement. Le dispositif de déclaration des cas d'intoxications par les pesticides, mis en place par le Ministère de la Santé en mai 2004, a permis d'enregistrer quelques dizaines de cas de contaminations accidentelles des manipulateurs par les pesticides au cours des opérations de lutte antiacridienne. Il y a quelques années déjà, dans certaines régions du pays, les concentrations en pesticides dans les eaux de source et des nappes souterraines étaient élevées. Des analyses effectuées sur des échantillons d'eau prélevés dans la région de Staoueli (Alger) ont montré que dans plus de 30% des échantillons, la concentration de certaines molécules organochlorées (lindane, H.chlore, 2,4 et 4,4 DDT, 2,4 et 4,4 DDE) et des organophosphorés (diazinon, parathion), dépasse les valeurs guides préconisées par l'OMS.

En plus, selon le Cadastre national des déchets dangereux, il existe plus de 2.300 tonnes de pesticides périmés répartis sur 500 sites détenus majoritairement par les anciennes Entreprises nationales et usines de produits phytosanitaires (Onapsa, Asmidal (Fertial)...).

Cette sur utilisation nationale des produits phytosanitaires dans les cultures et dans le cadre de la lutte antivectorielle fait craindre une pollution massive des sols, des eaux superficielles, des nappes souterraines et de tous les milieux physiques dans toutes les régions du pays. Cela, sans oublier que selon les statistiques des urgences médicales, le nombre de cas d'intoxications aux pesticides (accidentels ou tentatives de suicide) ne cesse d'augmenter.

Cette sur utilisation est d'autant plus préoccupante que l'usage des pesticides doit être répété périodiquement. Cette répétition à la longue entraîne nécessairement une accumulation

en pesticides et de leurs résidus dans tous nos milieux naturels, mettant en danger ainsi toute notre population par leur toxicité multiforme.

II.2. Contaminants chimiques étudiés

Notre étude s'intéresse particulièrement à la détection des polluants organiques dans les milieux aqueux. Notre attention s'est essentiellement portée sur un type de polluant organique qui contient la fonction ester pour étudier la possibilité de l'hydrolyse de ce polluant par la lipase de *Candida rugosa*. Notre choix s'est porté sur un herbicide contenant une fonction ester. La substance utilisée est l'herbicide diclofop-méthyle (en formulation commerciale Calliofop 36EC) qui en Algérie, est utilisé comme moyen de protection contre les graminées dans l'agriculture et plus particulièrement comme moyen de lutte des mauvaises herbes.

II.2.1. Propriétés de diclofop méthyle

Le diclofop-méthyle ou 2-[4-(2,4-dichlorophénoxy) phénoxy] propanoate de méthyle, est un herbicide organochloré de postlevée qui inhibe le métabolisme cellulaire des végétaux. Il appartient à la famille des dérivés aryloxy-propioniques et est utilisé en grande quantité (plus de un million de kilogrammes en 1986) pour lutter contre les graminées annuelles dans les cultures céréalières et légumières [16]. La préparation commerciale testée dans cette étude est le Calliofop 36EC contenant 360 g/L de la molécule active, elle se présente sous la forme d'un concentré émulsifiable. C'est un produit Arysta Life Science commercialisé par Bayer CropScience.

La concentration maximale acceptable de diclofop-méthyle dans l'eau potable est de $0,009 \text{ mg.L}^{-1}$ ($9 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$).

La structure chimique de diclofop-méthyle est formée par une structure de l'éther de diphényle avec un accessoire avec une chaîne d'acide propionique lié à l'atome d'oxygène du groupement phénoxyacides à la position [17] tel qu'il est présenté dans la figure II.1.

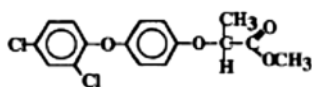


Figure II.1 : Structure chimique de diclofop-méthyle.

L'herbicide diclofop-méthyle est un composé considéré comme étant un pesticide non persistant, il est maintenant détecté chaque année dans l'environnement en grandes quantités. Depuis la détection de diclofop-méthyle, l'ester méthylique de 2 - (4 - (2,4 - dichlorophénoxy) phénoxy) méthylpropanoic, dans les eaux de rivière et les échantillons d'air [18, 19], il a été ajouté à la liste des pesticides nécessitant un suivi post-homologation au Canada [20].

II.3. La réaction d'hydrolyse de diclofop méthyle

Dans le sol, le diclofop-méthyle est rapidement hydrolysé à diclofop acide (fig.II.2), qui subit alors une décomposition lente [21-25]. Cette étape semble impliquer des enzymes hydrolases avec des micro-organismes viables [24].

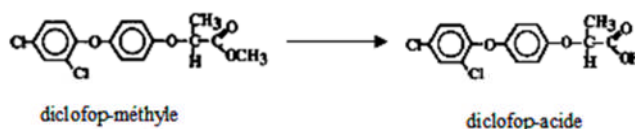


Figure II.2 : réaction d'hydrolyse de diclofop-méthyle [26].

II.4. Autres contaminants chimiques étudiés (les interférents)

Le choix de l'étude a porté sur trois substances : le chlorpyrifos-éthyle, le chlorothalonil et le paraquat.

La première substance utilisée est l'insecticide chlorpyrifos-éthyl (en formulation Dursban) qui en Algérie, est utilisé comme moyen de protection contre les insectes dans l'agriculture et plus particulièrement comme moyen de lutte antiacridienne, en usage préventif et curatif pendant les épisodes d'invasions du criquet.

La deuxième substance utilisée est l'herbicide le chlorothalonil (en formulation Bravo) qui en Algérie, est utilisé comme moyen de protection contre les graminées dans l'agriculture et plus particulièrement comme moyen de lutte des mauvaises herbes.

La troisième substance utilisée est l'herbicide le paraquat (en formulation Gramoxone) est un herbicide non sélectif à large spectre.

II.4.1. Chlorpyrifos-éthyle

Le chlorpyrifos-éthyl ou O, O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, est un insecticide non systémique, à large spectre. Il appartient à la famille des

organophosphorés et agit au niveau du système nerveux, en inhibant l'acétylcholine estérase qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur majeur [28-33]. Ce sont des esters de l'acide phosphorique dont les noms de matières actives sont le plus souvent identifiables par leurs terminaisons en "phos" ou en "thion". La formulation commerciale testée dans cette étude est le Dursban 4® contenant 480 g/L de la molécule active.

La concentration maximale acceptable de chlorpyrifos-éthyle dans l'eau potable est de 0,09 mg.L⁻¹ (90 µg.L⁻¹).

II.4.2. Le Chlorothalonil

Le chlorothalonil (C₈Cl₄N₂) est un fongicide foliaire non systémique dont le nom est 2, 4, 5,6-tétrachloro-1,3-benzènedicarbonitrile [34]. Le chlorothalonil a été homologué sous les noms commerciaux Daconil 2787, Bravo, Nopocide et Nuocide. Il a une action fongicide et qui appartient à la famille chimique des chloronitriles.

La concentration maximale acceptable de chlorothalonil dans l'eau potable est de 0,1mg.L⁻¹ (100 µg.L⁻¹).

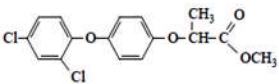
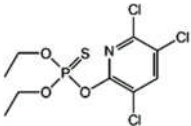
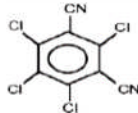
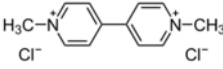
II.4.3. Le paraquat

Le paraquat ou (1,1'-Diméthyl-4,4'-bipyridinium) est un produit phytosanitaire (pesticide) ayant un effet herbicide très toxique. Il appartient à la famille chimique des pyridines qui comprend d'autres produits phytosanitaires possédant des propriétés similaires le diquat, le cyperquat...

La concentration maximale acceptable de paraquat dans l'eau potable est de 0,01 mg.L⁻¹ (10 µg.L⁻¹).

Les pesticides

Tableau II.1: Propriétés physico-chimiques du diclofop-méthyle, chlorpyriphos-éthyle, chlorothalonil et du paraquat.

Pesticide	Diclofop-méthyle	le Chlorpyriphos-éthyle	le Chlorothalonil	le Paraquat
Famille	Aryloxyphénoxypropionates	organophosphoré	chloronitriles	pyridines
Formule brute	$C_{16}H_{14}Cl_2O_4$	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	$C_8Cl_4N_2$	$C_{12}H_{14}N_2Cl_2$
Structure				
Solubilité dans l'eau à 20°C (mg.L ⁻¹)	0,8 mg·l ⁻¹	2 mg·l ⁻¹	0,8 mg·l ⁻¹	620 mg·l ⁻¹
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	341,186 ± 0,019 g·mol ⁻¹	350,586 ± 0,02 g·mol ⁻¹	265,910 g·mol ⁻¹	186,253 ± 0,01g·mol ⁻¹
Nature	herbicide	insecticide	fongicide	herbicide

La plupart des pesticides sont dégradés dans l'environnement par les microorganismes. La majorité de ces composés sont dégradés de manière indépendante par plusieurs populations microbiennes.

Conclusion

Lorsque l'eau est polluée par des substances toxiques et persistantes, un traitement adéquat est nécessaire pour la protection de l'environnement. Il existe des techniques classiques d'élimination des pesticides tels que les méthodes physiques de transfert de masse (décantation [35], précipitation [36], adsorption des polluants sur le charbon actif [37], l'incinération [38], ou par voie biologique [39]. L'expérience a montré que tous ces procédés sont soit inefficaces devant l'ampleur de cette pollution, soit d'un coût rédhibitoire, soit source de pollution secondaire (formation de boue). En effet, les traitements physicochimiques requièrent des quantités considérables d'agents oxydants (coûteux) et conduisent parfois à la formation de produits intermédiaires indésirables et même toxiques.

De plus certains produits résistent à ce type de traitement. Bien que les traitements biologiques soient massivement employés, ils restent impuissants devant certains composés toxiques et persistants tels que les pesticides d'où la nécessité de rechercher de meilleures alternatives.

D'autres alternatives pour détecter les polluants organiques récalcitrants font aujourd'hui l'objet d'études, notamment les biocapteurs dont la particularité est de détecter les composés organiques polluants et capables de décomposer la plupart de ces polluants les plus récalcitrants en molécules biologiquement dégradables ou en composés moins toxiques.

Références bibliographiques

- [1]. Cunnif P. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Edition. Editeur : Arlington, VA: AOAC international, ISBN/ISSN 0935584544, **1995**.
 - [2]. Di Corcia A, Marchetti M. Method Development for Monitoring Pesticides in Environmental Waters: Liquid-Solid Extraction Followed by Liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 26:1, 66-74, **1992**.
 - [3]. Fenske R.A, Kedan G, Lu C, Fisker-Andersen J.A, Curl C.L. Assessment of organophosphorus pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. *J. Exposure Analysis Environ. Epidemiol.*, 12, 21-28, **2002**.
 - [4]. Meyer A, Chrisman J, Moreira J.C, Koifman S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res.*, 93, 264-271, **2003**.
 - [5]. Viel J.F, Challier B, Pitard A, Pobel D. Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. *Arch. Environ. Health*, 53, 65-70, **1998**.
 - [6]. Hickey JJ, Keith JA, Coon FB. An exploration of pesticides in a Lake Michigan Ecosystem. Pesticides in the environment and their effects on wildlife. *Journal of Applied Ecology* vol. 3 (Suppl.) 141-154, **1966**.
 - [7]. Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, Shenoy U, Shenoy R, Rajmohan H, Patel K, Kashyap R, Kulkarni P, Rajan B. Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ. Health Perspect.* 111:1958–1962, **2003**.
 - [8]. Lemaire G, Terouanne B, Mauvais P, Michel S, Rahmani R. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196:235–246, **2004**.
 - [9]. Fisk AT, Hobson KA, Norstrom RJ. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the northwater polynya marine food web. *Environ Sci Technol* 35:732-738, **2001**.
 - [10]. Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* 16(8):1768-1776, **2001**.
 - [11]. Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *American Journal of Epidemiology.* 157(5): 409-414, **2003**.
 - [12]. Forman S, Novák J, Tykva R, Kás J, Wimmer Z, Ruml T. Evaluation of toxicity of pesticides and their biodegradation products using human cells. *Chemosphere*, 46, 209-217, **2002**.
 - [13]. Guillard C, Fischer M, Herrmann J.M, Agüera A, Tejedor A, Piedra L, Fernandez-Alba A. Analyse des métabolites de dégradation photocatalytique de divers pesticides dans les eaux de la région d'Almería (Espagne). Actes du 30ème congrès du groupe français des pesticides, pp. 29-37, **2001**.
 - [14]. Desjardins R. Le traitement des eaux, 2ème Ed, Montréal : Ecole Polytechnique de Montréal, pp. 1-10, **1997**.
 - [15]. L'usage immodéré des pesticides : De graves conséquences sanitaires, Dr. Mustapha Bouziani - Epidémiologiste, Faculté De Médecine d'Oran, le 26 juin **2007**.
 - [16]. Environnement Canada/Agriculture Canada. Sondage auprès des fabricants de pesticides enregistrés, rapport de 1987. Direction des produits chimiques commerciaux, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa **1987**.
 - [17]. Kilpi, S. Degradation of some phenoxy acid herbicides by mixed cultures of bacteria isolated from soil treated with 2-(2-methyl-4-chloro)phenoxypropionic acid. *Microb. Ecol.* 6: 26 1-270, **1980**.
-

Références bibliographiques

- [18]. Williamson, D.A.. A preliminary investigation into the presence of agricultural pesticides in the Lasalle and Assiniboine Rivers, Manitoba, Canada. Manitoba Dept. Of Environ., Water Environ., Water Standards and Studies Rpt. No.84-5.37 pp, **1984**.
- [19]. Muir, D.C.G. and Grift, N.P. Herbicide levels in rivers draining two prairie agricultural watersheds (1984). J. Environ. Sci. Health B22: 259-284, **1987**.
- [20]. O'Sullivan, P.A. Diclofop, in "Monograph series", Weed Science Society of America, Champaign, Ill. vol. 6, pp. 32 1-345, **1990**.
- [21]. Smith, A.E. Degradation of the herbicide dichlorfop-methyl in prairie soils. J. Agric. Food Chem. 25: 893-898, **1977**.
- [22]. Martens, R. Degradation of the herbicide (¹⁴C) diclofop-methyl in soil under different conditions. Pestic. Sci. 9: 127-134, **1978**.
- [23]. Smith, A.E. Transformation of [¹⁴C] diclofop-methyl in small field plots. J. Agric. Food Chem. 27: 1145-1148, **1979**.
- [24]. Gaynor, J.D. Diclofop-methyl persistence in southwestern Ontario soils and effect on pH on hydrolysis and persistence. Can. J. Soil Sci. 64: 283-291, **1984**.
- [25]. Smith, A.E., Grover, R., Cessna, A.J., Shewchuk, S.R., and Hunter, J.H.. Fate of diclofop-methyl after application to a wheat field. J. Environ. Qual. 15: 234-238, **1986**.
- [26]. Xu Gu, Yuele Lu, Peng Wang, Ziheng Dang, Zhiqiang Zhou, Enantioselective degradation of diclofop-methyl in cole (*Brassica chinensis* L.), Food Chemistry, Volume 121, Issue 1, Pages 264–267, 1 July **2010**.
- [27]. Louise Laramée, Genetic Characterization of a Diclofop-Methyl-Degrading Bacterial Consortium, Thesis of McGill University, Montreal, **1997**.
- [28]. Doran *et al.*, **2001** ; Doran W.J., Cope W.G., Rada R.G. and Sandheinrich M.B. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblema plicata*) by chlorpyrifos : implications for biomonitoring. Ecotoxicological and Environmental Safety, 49: 91-98. , **2001**.
- [29]. Tomlin, Tomlin C.D.S., 2000. The pesticide manual. 12th edn, British crop protection council. Farnham, Surrey, UK, **2003**.
- [30]. Barata *et al*; Barata C., Solayan A. and Porte C., Role of β -esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 66: 125-139, **2004**.
- [31]. Buchwalter *et al*; Buchwalter D.B., Sandahl J.F., Jenkins J.J. and Curtis L.R. Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in fourth instar *Chironomus riparius* (Meigen). Aquatic Toxicology, 66: 149-157., **2004**.
- [32]. Lukaszewicz-Hussain; Lukaszewicz-Hussain A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity. Short review. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98: 145-150, **2010**.
- [33]. Čolović M.B., Krstić D.Z., Ušćumlić G.S. and Vasić V.M. Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100: 16-22, **2011**.
- [34]. Tomlin, C. (éd.). The pesticide manual: A world compendium. 10^{ème} éd. (Incorporating the Agrochemicals handbook), British Crop Protection Council et Royal Society of Chemistry, Thornton Heath, GB, **1994**.
- [35]. Allegre C, Maiseub M, Charbita F, Moulina P. Coagulation–flocculation–decantation of dye house effluents: concentrated effluents. J. Hazard. Mater. B116, 57-64, **2004**.
- [36]. Sado J. Les plans d'expériences : de l'expérimentation à l'assurance qualité. Afnor Technique, **1991**.

Références bibliographiques

- [37]. Ormad M.P, Miguel N, Claver A, Matesanz J.M, Ovelleiro J.L. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, 71, 97-106, **2008**.
- [38]. Ahling B, Wiberger K. Incineration of Pesticides Containing Phosphorus. *J. Environ. Qual.*, 8, 12-13, **1979**.
- [39]. Vroumsia T, Steiman R, Seigle-Murandi F, Benoit-Guyod J.L, Khadrani A. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. *Chemosphere*, 33, 2045-2056, **1996**.

Chapitre III

Les méthodes analytiques de caractérisation

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

Dans un premier temps, une étude de l'interface métal/électrolyte est présentée. Dans un deuxième temps nous présentons les techniques électrochimiques telles que la spectroscopie d'impédance, et la voltammétrie cyclique ainsi leur intérêt dans le développement de biocapteurs. Dans un troisième temps, nous décrivons la mesure conductimétrique. Nous présentons également les techniques d'analyse électrochimique afin de permettre l'obtention d'informations souvent complémentaires nécessaires pour l'interprétation des résultats obtenus par les techniques de caractérisations électrochimiques.

III.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) est une technique fiable et puissante pour étudier les propriétés électriques des systèmes électrochimiques. Ainsi elle est largement répandue dans différents champs de recherche tels que la corrosion [1], la caractérisation des couches minces, la cinétique d'électrode et les batteries [2]. Cette méthode d'analyse a été introduite en 1960 par Sluyters [3]. Elle consiste à analyser la réponse du système en fonction de la fréquence du signal alternatif d'excitation. Le signal fréquentiel de faible amplitude est superposé ou non à une tension continue de polarisation.

Dans la dernière décennie, l'EIS a pris une importance croissante dans les domaines des technologies liées aux biocapteurs [4, 5]. Cette popularité est due à son aptitude à fournir un bon nombre d'informations. Elle permet une meilleure et plus complète compréhension d'un système électrochimique que les autres techniques électrochimiques. Dans ce qui suit nous commençons par définir le principe de la mesure par spectroscopie d'impédance. Par la suite nous présentons graphiquement l'impédance.

III.1.1. Etude de l'interface Métal/Electrolyte [6, 7]

Lorsqu'un métal est placé au contact d'un électrolyte, une interface électrique est immédiatement développée. La zone de l'interface métal/solution où coexistent les espèces chargées est appelée double couche électrique. A un potentiel donné, l'interface électrode/solution est caractérisée par une capacité de double couche, C_{dl} .

Le côté de la double couche situé dans la solution est constitué de plusieurs couches. Celle qui est le plus proche de l'électrode est appelée couche d'Helmholtz [6-9]. Elle contient les molécules de solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbées sur l'électrode. Le lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH), situé à une distance x_1 de l'électrode. L'orientation des dipôles dépend de la charge de l'électrode [9, 6]. Les ions solvatés ne peuvent s'approcher du métal qu'à une distance au plus égale à x_2 ; le lieu des centres des ions solvatés situés à cette distance (x_2) est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des ions solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH au sein de la solution (Figure III.1).

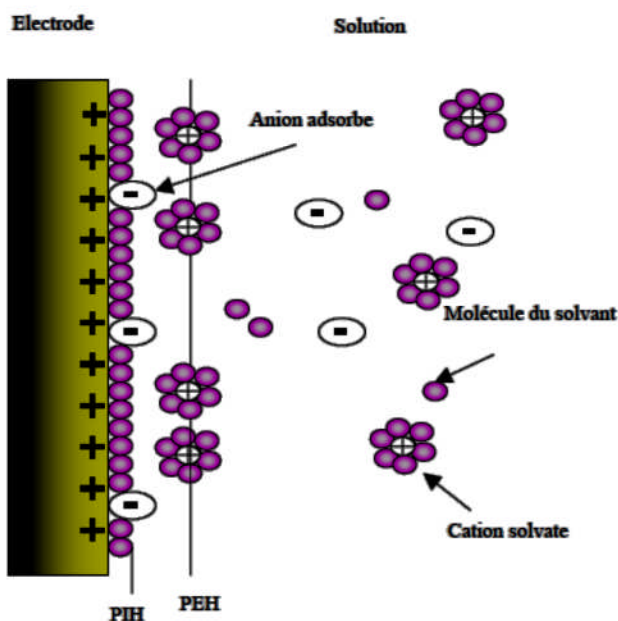


Figure III.1 : Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution [10].

III.1.2. Principe de la spectroscopie d'impédance électrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode non stationnaire qui permet d'avoir des informations sur les étapes élémentaires qui constituent le processus électrochimique global. En général, cette technique repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation du système électrochimique étudié. Ce système peut être considéré comme étant une «Boîte noire» qui réagit en émettant un signal $y(t)$ quand il est soumis à une perturbation $x(t)$ (figure III.2). Les deux signaux $x(t)$ et $y(t)$ sont alors reliés par une fonction de transfert $H(\omega)$ telle que $y(\omega) = H(\omega) \cdot x(\omega)$ et $y(\omega)$ étant respectivement les transformées de Fourier $x(t)$ et $y(t)$. Avec ω est la pulsation [11].

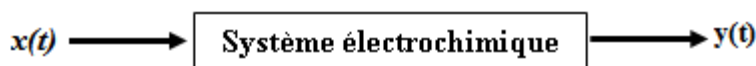


Figure III.2 : Schéma d'une fonction de transfert.

III.1.3. Représentation graphique de l'impédance [11]

Les données d'impédance sont typiquement représentées suivant deux types de représentations: le diagramme de Bode et le diagramme de Nyquist.

1. Diagramme de Bode

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

$$\log|\overline{Z(\omega)}| = f_1(\log f)$$

$$\varphi = f_2(\log f)$$

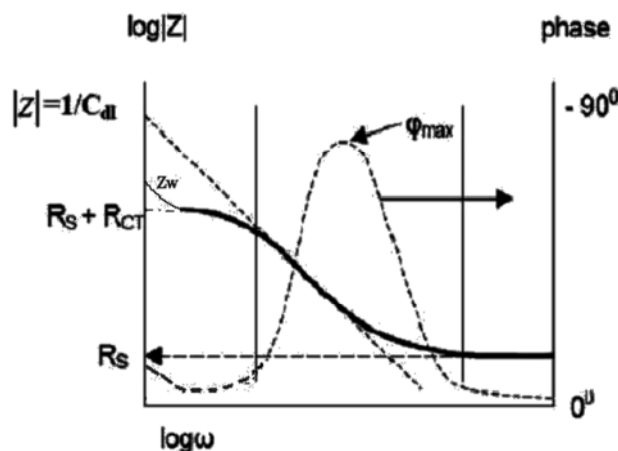


Figure III.3: Diagramme de Bode pour un système faradique.

2. Diagramme de Nyquist

Le diagramme de Nyquist, est une représentation graphique dans un plan complexe; l'axe des abscisses d'un système de coordonnées cartésiennes correspond à la partie réelle de l'impédance $Z(\omega)$, alors que l'axe des ordonnées correspond à sa partie imaginaire (figure III.4).

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

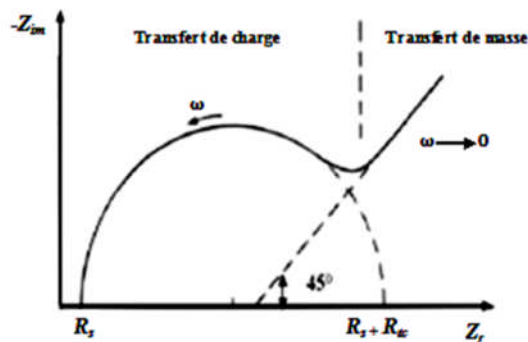


Figure III.4: Diagramme de Nyquist pour un système faradique.

III.1.4. Etude de l'impédance pour un système électrochimique

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

Deux types de tracé sont utilisés pour décrire un système électrochimique; ils sont illustrés sur la figure III.5.

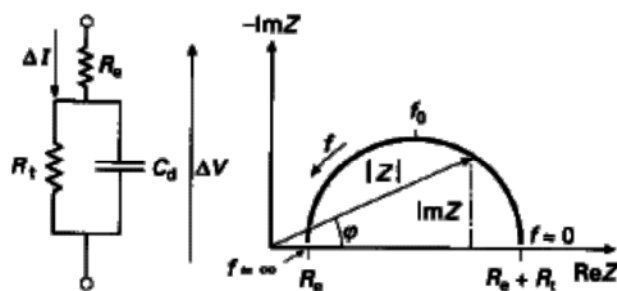


Figure III.5 : Circuit équivalent et tracé de l'impédance d'une cellule électrochimique.

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

Prenons comme exemple le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé pour les systèmes électrochimiques, le circuit de Randles [17]. Il se compose généralement de quatre éléments : une résistance représentant la résistance due à la chute ohmique, R_s , un condensateur représentant la capacité de double couche, C_{dl} , une résistance de transfert de charge, R_{ct} , et l'impédance de Warburg, Z_ω , représentant le phénomène de diffusion des espèces redox. La forme générale du circuit équivalent est présentée sur la figure III.6.

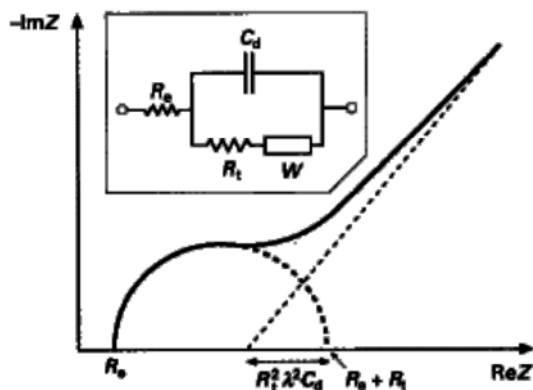


Figure III.6 : Impédance du circuit de Randles.

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

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

III.2. La voltamétrie cyclique

Dans la pratique, on peut obtenir plus d'informations sur le système électrochimique étudié à partir d'une seule expérience, en appliquant à l'électrode un balayage de potentiel variant avec le temps et en enregistrant directement la courbe $I=f(E)$ correspondante. Si le

mode de balayage correspond à une variation linéaire de potentiel avec le temps et on enregistre le courant en fonction du potentiel alors c'est la voltamétrie à balayage linéaire.

La voltamétrie est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés tests présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes (travail et référence). Elle permet d'identifier et de mesurer quantitativement un grand nombre de composés (cations, anions) et également d'étudier les réactions chimiques incluant ces composés.

III.2.1. Principe [18]

La voltamétrie cyclique est une méthode d'analyse pour détecter et caractériser des composés oxydables et réductibles en solution. Comme son nom l'indique, on mesure (*métrie*) un courant (*ampère*) en appliquant une tension (*volt*).

En voltamétrie, le potentiel E appliqué à l'électrode de travail varie en fonction du temps et le courant i est mesuré en fonction du potentiel E . Les courbes $i = f(E)$ obtenues sont appelées voltammogrammes. La variation du potentiel E peut être linéaire ou modulée. Le courant i dans le circuit est principalement la somme de deux courants : le courant faradique, i_f , et le courant capacitif, i_c .

En principe, on porte une électrode (électrode de travail) à un potentiel donné par rapport à une électrode de référence. L'électrode de travail est chimiquement inerte, elle ne réagit donc ni avec la solution, ni par application d'un potentiel. Par contre, des substances présentes en solution peuvent être oxydées ou réduites à la surface de l'électrode (figure III.7).

La voltammétrie cyclique consiste à soumettre l'électrode stationnaire à une différence de potentiel variant linéairement en fonction du temps selon une fonction en dents de scie, dont les côtés sont symétriques. La première partie du voltammogramme est comparable à la courbe enregistrée en voltammétrie linéaire. Le balayage retour apporte des informations quant à la réversibilité de la réaction électrochimique par la position et l'intensité des courants faradiques enregistrés. L'analyse et l'interprétation des courbes intensité/potentiel ont fait l'objet de nombreux travaux et d'ouvrages de synthèse [19-21].

Cette technique est souvent utilisée pour étudier le comportement des espèces en solution. Lors d'une expérience de voltamétrie cyclique, un balayage de potentiel aller, imposé à une électrode de travail, induit un courant de réduction (ou d'oxydation) d'un système redox réversible sur cette même électrode. Un balayage de potentiel retour (de sens opposé) provoque un courant d'oxydation (ou de réduction) de signe opposé. Pour un système réversible, il présente pour chaque balayage un pic de courant suivi d'une décroissance d'origine diffusionnelle. Plusieurs cycles aller-retour successifs sont possibles.

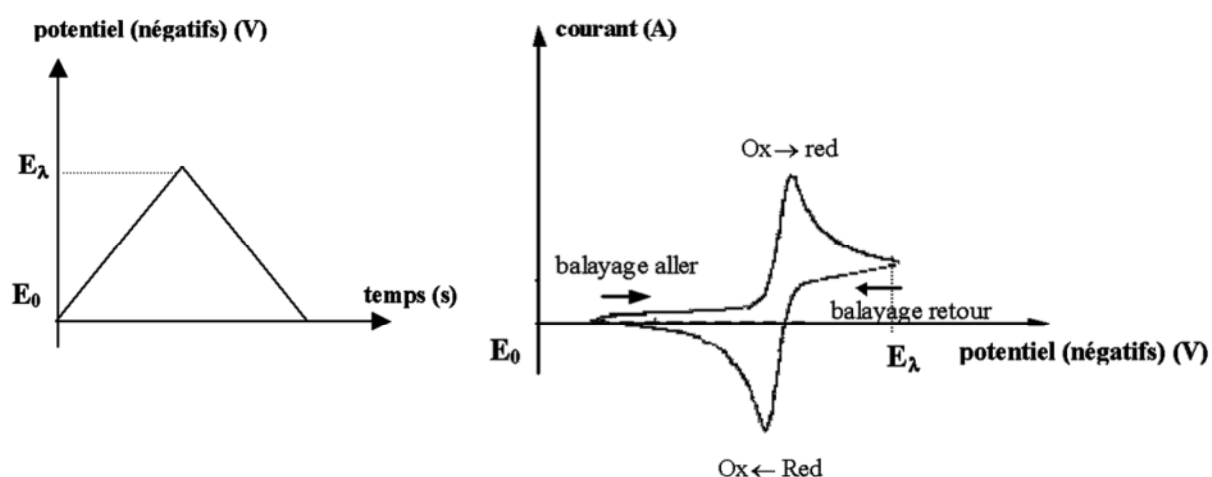


Figure III.7 : Balayage de potentiel, en fonction du temps, appliqué lors d'une voltamétrie cyclique et aspect du voltammogramme obtenu avec un couple redox Ox/Red réversible.

En voltamétrie cyclique, on varie continuellement le potentiel de l'électrode de travail : en partant d'un potentiel initial E_0 , il augmente jusqu'au potentiel E_{\max} avant de retourner à E_0 . Un enregistreur trace le courant en fonction du potentiel. En absence d'une réaction chimique, il y a seulement un courant capacitif. Dès qu'une réaction chimique se déroule à la surface de l'électrode de travail, le courant augmente. Il passe par un maximum avant d'atteindre un palier. Cette forme particulière s'explique par l'évolution de la concentration de la substance électrochimiquement active au voisinage de l'électrode.

Dans le cas d'une réaction réversible, on trouve un courant inverse au retour de balayage de potentiel. L'intensité du courant est la même, par contre les potentiels aux maximas sont décalés de $0,059/n$ Volt (n = nombre d'électrons échangés dans la réaction).

Si l'on observe les deux signaux symétriques, le produit de la réaction redox est stable pendant le temps de la mesure. On parle alors d'un système réversible.

III.3. Mesures conductimétriques

Afin de rivaliser avec les méthodes analytiques les plus sensibles, l'électrochimie s'est dotée de techniques modernes comme la spectroscopie d'impédance électrochimique, la voltamétrie. Nous allons dans cette partie, nous limiter à la présentation d'une méthode couramment employée dans ce manuscrit, la conductimétrie.

III.3.1. Présentation

La conductivité est la capacité d'une solution, d'un métal ou d'un gaz autrement dit de tous les matériaux à faire passer un courant électrique dans une solution, ce sont les anions et les cations qui transportent le courant alors que dans un métal ce sont les électrons.

La conductivité se mesure en appliquant un courant électrique alternatif (**I**) à deux électrodes immergées dans une solution et en mesurant la tension (**E**) qui en résulte (figure III.8). Lors de cette expérience les cations migrent en direction de l'électrode négative, les anions se dirigent vers l'électrode positive et la solution se comporte comme un conducteur électrique [22].

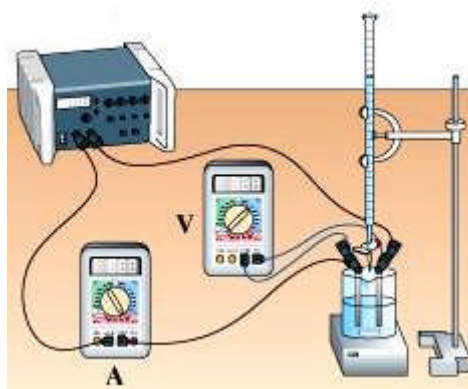


Figure III.8 : dispositif de mesures conductimétriques.

III.3.2. Mesure de la conductivité

La conductivité spécifique d'un électrolyte est généralement calculée à partir de la mesure de la résistance d'un dispositif à géométrie fixe constitué de deux électrodes métalliques de même nature immergées dans cet électrolyte. La fiabilité et la précision d'une telle mesure sont liées à la valeur de la résistance à mesurer, aux paramètres géométriques de la cellule, aux propriétés des interfaces solide/solution et aux paramètres

du signal électrique d'excitation du système. La résistance mesurée est inversement proportionnelle à la conductance de la cellule.

La conductance et la conductivité sont liées par la relation suivante :

$$G = \frac{1}{R} = \sigma \cdot \frac{S}{L}$$

Avec : **G**: conductance (**S**), **R**: résistance, **L**: espace entre les électrodes, **S** : surface des électrodes, **σ** : Conductivité (**S.cm⁻¹**).

La résistivité et la conductivité sont indépendantes de la géométrie de la cellule. Celle-ci étant difficile à déterminer et la distribution des lignes de courant n'étant pas nécessairement uniforme, le rapport S / L représente la constante de la cellule. Pour chaque cellule de mesure, cette constante peut être déterminée en mesurant la résistance de solution de conductivité connue.

$$K = \frac{S}{L} \quad \text{et} \quad G = \sigma \cdot K$$

S/L : constante de cellule (cm^{-1}).

III.3.3. Relation entre la concentration et la conductivité

Puisque la charge des ions en solution facilite la conductance d'un courant électrique, la conductivité d'une solution est fortement proportionnelle à sa concentration en ions. On sait que la conductivité n'est pas une technique spécifique, le calcul de concentration réalisé à partir de mesures de conductivité n'est donc valable que pour des échantillons contenant une seule espèce.

La première étape dans les mesures de concentration est de connaître la conductivité de la solution en fonction de la concentration de l'espèce qui nous intéresse. On trouve cette donnée soit dans des documents publiés, courbes «conductivité en fonction de la concentration» pour divers électrolytes, soit grâce aux mesures réalisées au laboratoire.

La conductivité augmente avec la concentration sur plusieurs décades, mais peut atteindre un maximum avant de redescendre alors que la concentration continue à augmenter. Lorsqu'on utilise la mesure de conductivité pour déterminer la concentration, il est important de travailler à la même température lors de l'étalonnage et lors des mesures car la conductivité varie avec la température et le pH.

Conclusion

Dans ce chapitre, les principales méthodes analytiques pour la mesure de l'élément cible (le diclofop-méthyle) sont décrites. Certaines, principalement la voltamétrie cyclique et la conductimétrie, serviront à comparer les résultats obtenus avec les méthodes électrochimiques (la spectroscopie d'impédance électrochimique EIS) adaptées ou mises au point dans la suite de cette étude. Un rappel des principes physiques des différentes techniques expérimentales qui seront exploitées pour l'étude des biocapteurs développés dans ce travail est également présenté. Les résultats obtenus et leurs discussions feront l'objet des chapitres suivants.

Références bibliographiques

- [1]. C.F. Dong,a, H.B. Xue,a X.G. Li,a H.B. Qi,b Y.F. Cheng, Electrochemical corrosion behavior of hot-rolled steel under oxide scale in chloride solution, *Electrochimica Acta*, Accepted Manuscript.
- [2]. S. Hong et L. Tai-Chin, Electrochemical Impedance Spectroscopy for Battery Research and Development. Rapport technique 31, Solartron, **1996**.
- [3]. www.nico2000.net/datasheets/ammopaper.html.
- [4]. Bobby Pejic, Roland De Marco, Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization, *Electrochimica Acta* 51, 6217-6229, **2006**.
- [5]. Saloua Helali, conception et réalisation de matériaux bifonctionnel pour des dispositifs capteurs impédométriques; Thèse en CO-TUTELLE Lyon, **2005**.
- [6]. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochimie, Principes, méthodes et applications*, Masson, **1983**.
- [7]. Jean Besson, *Precis de thermodynamique & cinétique électrochimiques*, Ellipses, **1984**.
- [8]. P. Bergveld. Thirty years of ISFETOLOGY, What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors & Actuators : B. Chemical*, 88, 1-20, **2003**.
- [9]. A. Amari : Etude de la réponse au pH de structures microélectroniques à membranes de nitrure de silicium fabriqué par LPCVD, Thèse de doctorat de l'UPS de Toulouse, **1984**.
- [10]. Amira BOUAFSOUN, Caractérisation et quantification de l'adhésion des cellules endothéliales à des biomatériaux fonctionnalisés, Thèse en CO-TUTELLE Lyon, **2006**.
- [11]. Hafaid Imen, "Etudes physico-chimiques de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales"; thèse de l'université de Claude Bernard Lyon I, **2009**.
- [12]. *Impedance Spectroscopy*", JR Macdonald, ed., John Wiley. Sect. 2.2.3.4, **1987**.
- [13]. J. Newman, Frequency dispersion in capacity measurements at a disk electrode. *J. Electrochem. Soc.*, 117, 198-203, **1970**.
- [14]. S. Amokrane et J. P. Badiali: Modern aspects of electrochemistry, chapitre Analysis of the capacitance of the metal-solution interface, Plenum press, Numero 22, 1-91, **1992**.
- [15]. L.Bousse, N.F.de Rooij, P.Bergveld, "Operation of Chemically Sensitive Field-Effect Sensor as a function of the Insulator- Electrolyte Interface", *IEEE Trans. Electron Devices* ED-30, 1263-1270, **1983**.
-

Références bibliographiques

- [16]. C. Gabrielli, Identification of electrochemical processes by frequency response analysis. Rapport technique 004/83, Solartron, **1998**.
- [17]. J. Randles, Discuss. Faraday Soc. 1, 11, **1947**.
- [18]. Hubert H. Girault, Electrochimie: physique et analytique, Presses polytechnique et universitaires romandes.
- [19]. D. Bauer, M. Lamache, C. Collin et G. Cote, «Voltampérométrie sur électrode Solide». Techniques de l'Ingénieur, 10, 161, **1984**.
- [20]. A. J. Bard, et L. B. Faulkner, « Electrochimie : principe, méthodes et applications » Editions Masson, **1983**.
- [21]. P. T. Kissinger et W. R. Heinemann, « Laboratory techniques in electroanalytical Chemistry », Marcel Dekker, New York, **1984**.
- [22]. http://www.analytical-chemistry.uoc.gr/files/items/6/618/agwgimometria_2.pdf.

Chapitre IV

Matériels & méthodes

Nous décrivons l'ensemble des dispositifs expérimentaux permettant l'étude et la caractérisation des différents biocapteurs développés au cours de cette thèse. Une deuxième partie sera consacrée à la présentation des protocoles de fabrication de l'élément sensible (biorécepteur) ainsi que leur mise en œuvre pour le développement des biocapteurs.

La fonctionnalisation contrôlée des surfaces se révèle en effet très intéressante pour l'immobilisation de nombreuses macromolécules biologiques (capteurs enzymatiques). Enfin, une étude préliminaire, visant à mesurer l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) lors de l'hydrolyse du diclofop-méthyle (substrat), sera présentée dans ce chapitre.

L'ensemble des réactifs et des produits chimiques utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich, sauf pour certains dont l'origine est alors précisée. Concernant les lipases nous avons choisi une lipase sous forme d'une poudre commercialisée. Nous pouvons ainsi tester une lipase d'origine animale la Lipase de *Pancréas de porcs* (LPP) dont le but est de faire une étude comparative avec la lipase de *Candida rugosa* (CRL) vis-à-vis du diclofop méthyle (substrat).

IV.1. Définition des objectifs de la thèse

Compte tenu des applications ciblées, nous souhaitons développer un dispositif sensible, rapide et compact permettant l'identification d'un polluant organique qui est un herbicide organochloré (le diclofop-méthyle). Nous privilégierons donc les critères de sensibilité, de facilité de préparation de l'échantillon (détection ou non) et d'intégration.

Différentes voies de recherche possibles déjà réalisées ont montré que les biocapteurs enzymatiques impédancemétriques, semblent être les meilleures conditions pour répondre à nos critères [1].

Ils sont les seuls à pouvoir atteindre la détection d'une molécule unique, et qui ne nécessite pas de marqueurs miniaturisables. Bien que les biocapteurs enzymatiques présentent une sensibilité intéressante, leur intégration en milieu liquide est délicate: la détection du polluant n'a pu être démontrée qu'après injection de ce dernier. De plus, l'intégration de biorécepteurs enzymatiques n'est pas facile à mettre en œuvre. Sauf que notre choix s'est porté sur les biocapteurs enzymatiques et plus précisément, les hydrolases où nous avons choisis comme enzyme la lipase de *Candida rugosa*. La CRL a été immobilisée dans une matrice

organique composée de BSA et glutaraldehyde (GA), la membrane enzymatique est ensuite déposée sur la surface de l'électrode pour obtenir une meilleure sensibilité.

L'objectif de cette thèse est donc la conception et la réalisation d'un biocapteur enzymatique pour la détection biologique.

Notre premier défi consistera à adapter le biocapteur (la membrane enzymatique) à une utilisation en milieu liquide, et à valider son fonctionnement en mode capteur. Cette validation sera démontrée par le suivi d'une variation de l'impédance ou bien la variation de la résistance de transfert de charge (R_{tc}). Le deuxième défi nous permettra de comparer les résultats du biocapteur impédancemétrique avec ceux trouvés par une caractérisation par la voltammétrie cyclique et par la conductimétrie.

Notre objectif étant désormais clairement défini, nous allons dans cette partie expérimentale revenir plus en détails sur le principe de fonctionnement des capteurs de type impédimétriques.

IV.2. Dispositif électrochimique expérimental

Toutes les expériences électrochimiques (l'impédance électrochimique et la voltammétrie cyclique) sont basées sur le montage expérimental de la figure IV.1. Ce dernier est composé d'un potentiostat, d'un analyseur d'impédance, d'un ordinateur pour le pilotage des appareils ainsi que l'acquisition et le traitement des données et d'une cellule électrochimique constituée de trois électrodes :

- Une électrode de travail sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer.
- Une électrode de référence dont le potentiel est constant et connu ce qui permet ainsi de contrôler le potentiel à l'électrode de travail.
- Une électrode auxiliaire appelée aussi contre-électrode qui permet de boucler le circuit électrique dans la cellule électrochimique.

a. Cellule électrochimique

La plus part des expériences électrochimiques sont réalisées dans une cellule électrochimique thermostatée en verre, de volume 30 ml, à trois électrodes : une électrode de travail (WE), une électrode de référence (RE) et une contre-électrode. La géométrie de cette

cellule permet une disposition bien déterminée des trois électrodes. Il est important en effet, afin d'assurer une densité de courant homogène à l'électrode de travail, de minimiser le phénomène de la chute ohmique et de maintenir aussi proche que possible l'électrode de travail et l'électrode de référence.

b. Appareil de mesure électrochimique

L'impédance électrochimique, et la voltamétrie cyclique, ont été réalisées avec un analyseur d'impédance Voltalab 40 auquel la cellule électrochimique, placée dans une cage de Faraday. Pour les mesures d'impédance, cet appareil sert à la fois à générer le signal sinusoïdal avec l'amplitude et la fréquence désirées et à extraire les parties réelles et imaginaires de l'impédance du système étudié (voir figure IV.1). L'analyseur d'impédance est piloté par un ordinateur à l'aide du logiciel Volta Master 4.

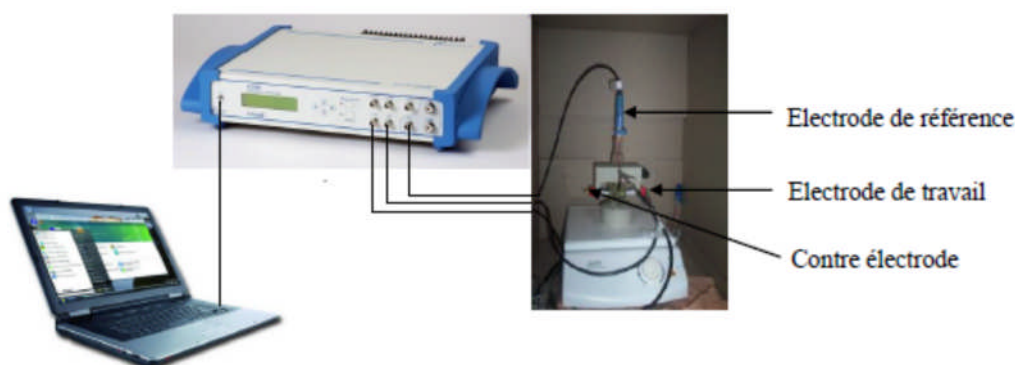


Figure IV.1: Appareillages de mesures électrochimiques.

Afin de pouvoir traiter les propriétés des différents systèmes, les diagrammes de SIE sont généralement normés par la surface analysée afin de ramener les valeurs à l'unité de surface ($\Omega \cdot \text{cm}^2$). Les diagrammes d'impédance sont traités à l'aide du logiciel Zview2 (Scribner Associate, Inc) qui permet la construction de circuits électriques équivalents et l'ajustement des spectres à l'aide de ces circuits [2,3].

IV.3. Les techniques de caractérisation électrochimique

IV.3.1. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est fréquemment utilisée pour caractériser les propriétés électriques d'une couche de biomolécules liée à un support métallique, elle permet aussi de rendre compte du comportement de l'interface liquide/solide modifiée, qui joue un rôle prépondérant sur les performances du biocapteur [2-11].

Ces mesures sont faites dans la gamme des fréquences allant de 100 mHz à 100 kHz et une modulation de 10mV. Le milieu de test est un tampon PBS de 10mM à pH =7,4. Toutes les mesures expérimentales sont réalisées dans une cage de faraday pour éviter les charges photo-induites dans le conducteur. Le dispositif des mesures électrochimiques est donné sur la figure IV.1. Ces mesures ont été obtenues en représentant la partie imaginaire de l'impédance complexe en fonction de la partie réelle de l'impédance ($\text{Im}(Z) = f(\text{Re}(Z))$) appelée Nyquist Z. et par la représentation du Bode.

IV.3.2. La voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique est une technique électrochimique qui a servie à caractériser les couches enzymatiques déposées sur des électrodes métalliques et à vérifier leur intégrité. Cette technique nous a permis également d'obtenir des informations sur la capacité des ions dans une solution qui traverse la couche et atteint le substrat sur lequel sont immobilisées les enzymes.

Cette technique consiste à soumettre l'électrode de travail à une rampe de potentiel (balayage triangulaire) et à mesurer le courant résultant. Le potentiel appliqué varie entre deux valeurs E_1 (-700mV) et E_2 (+700mV) avec une vitesse de balayage $100 \text{ mV} \cdot \text{S}^{-1}$ dans un tampon PBS (10mM, pH 8) en présence du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ [10, 11].

IV.3.3. Mesures conductimétriques

Le conductimètre utilisé dans cette étude est le CDM210 (voir figure IV.2), c'est un conductimètre / résistimètre de haute précision et facile à utiliser. En mesure de conductivité, le CDM210 offre une gamme très étendue allant de $0.001 \mu\text{S}/\text{cm}$ à $5.99 \text{ S}/\text{cm}$. La mesure de la conductivité peut se faire par rapport à une température de 30°C . La température des échantillons peut être mesurée automatiquement ou entrée manuellement.

Le CDM210 calcule et affiche la conductivité d'une solution sur la base de :

- La conductance G mesurée.
- La résistance du câble de liaison.

La cellule à deux pôles est d'une conception traditionnelle basée sur deux plaques de platine, elles conviennent parfaitement aux mesures de routine et à une utilisation avec un passeur d'échantillons grâce à leur facilité de rinçage.

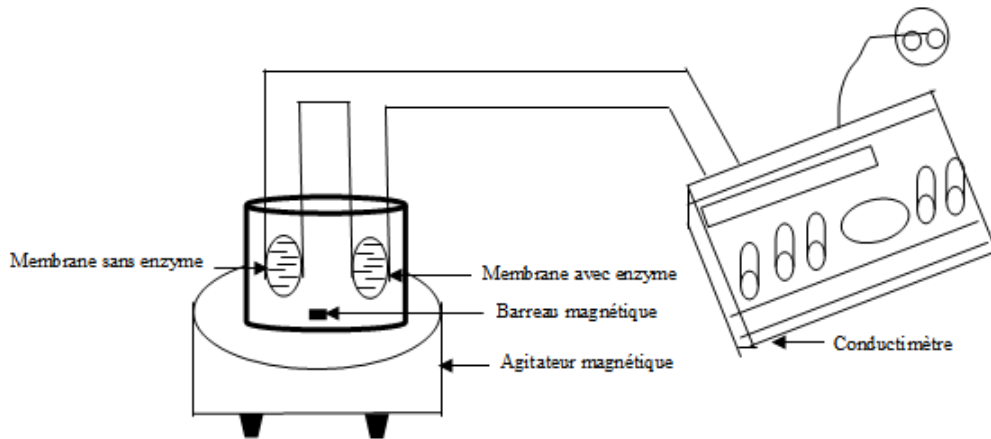


Figure IV. 2 : Dispositif de mesures conductimétriques.

Les mesures conductimétriques sont basées sur une mesure différentielle entre l'électrode de travail (sur laquelle est déposée la couche enzymatique contenant le BSA+ CRL) et l'électrode de référence (sur laquelle est déposée la couche enzymatique contenant le BSA seul). Ces mesures ont été effectuées à la lumière du jour et à température de 30°C dans une cellule en verre de 30 mL. Le biocapteur a été immergé dans un tampon PBS (10mM, pH 8) vigoureusement remuée. Après stabilisation du signal, différentes quantités de substrat ont été ajoutés dans la cellule de mesure.

IV.4. Dispositifs expérimentaux d'analyse de surface

L'analyse de surface est effectuée en utilisant la technique microscopique. Pour cela deux types de microscopes ont été utilisés.

Les électrodes modifiées par le dépôt des membranes enzymatiques (électrode placé extemporanément entre lame et lamelle) ont toutes été observées avec un grossissement (objectif×X) à l'aide d'un microscope optique: LEICA MICROSCOPY stems Wetzlar GmbH (DMLM/1188500) et photographiées avec une caméra digitale LEICA DC180 associée au logiciel de stockage et d'analyse d'images LEICA IM500 (figure IV.3).



Figure IV.3 : Microscope optique Leica DMLM.

Les images obtenues pour la caractérisation du biocapteur utilisant la lipase de *Candida rugosa*, ont été effectuées au laboratoire de Métallurgie université d'Annaba. Ces biocapteurs enzymatiques ont été analysés avec un microscope optique Leica DMLM/P/1188500 où la lumière se transmet en utilisant un système conoscopie LabESed polarisant. L'acquisition des images est réalisée directement avec un appareil de type Leica DC180 attaché. Cet appareil photo sert à réaliser des photomicrographies avec un grossissement de l'objectif (60X, 100X et 1200X). Les images obtenues pour la caractérisation du biocapteur à base de la lipase de Pancréas de Porc ont été obtenues avec un microscope de type Veeco instruments, du Laboratoire de biologie université d'Annaba.

IV.5. Méthodes et conditions expérimentales

IV.5.1. Enzymes

Les enzymes utilisées au cours de cette étude sont des enzymes commerciales brutes. En outre, aucune purification n'a été effectuée avant l'étape d'immobilisation sur les enzymes juste un alicotage. Deux origines de lipases commerciales différentes, une extraite d'une levure, c'est la lipase de *Candida rugosa* (CRL), et la seconde d'origine animale c'est la lipase pancréatique de porc (LPP), qui est un extrait brut de pancréas de porc sous forme de poudre. L'immobilisation de ces deux lipases a été effectuée au laboratoire de chimie organique appliquée (chez Mr. Le Pr. Djeghaba Zeine Eddine), département de chimie, Université Badji Mokhtar, Annaba. L'albumine de sérum bovine (BSA) est commercialisée par Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Allemagne).

Les enzymes utilisées dans cette étude sont la lipase microbienne brute extraite de *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3) (Type VII) et la lipase pancréatique porcine (Type II)

commercialisées par Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Elles ont été utilisées pour des expériences sans purification supplémentaire.

En milieu aqueux, ces enzymes sont capables d'hydrolyser une large gamme de substrats. Elles peuvent également fonctionner en milieu organique pour la synthèse d'esters en présence d'une quantité très faible d'eau. Les enzymes se présentent sous formes d'une poudre.

IV.5.2. Réactifs

L'herbicide organochloré le diclofop-méthyle ((*R,S*)-2-[4-(2,4-dichloro-phénoxy)] propionate de méthyle), le fongicide organochloré le chlorothalonil (tétrachloro-isophthalonitrile (2,4,5,6-tétrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile)), l'herbicide paraquat ; (dichlorure de (1,1'-diméthyl-4,4' bipyridilium dichlorure)), l'insecticide organophosphoré le chlorpyrifos-éthyl (diéthoxy-sulfanylidene-(3,5,6 trichloropyridin-2-yl) oxyphosphorane); tous ces composés ont été commercialisés par l'agrochimie Bayer et utilisés tels que reçus.

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

La solution tampon utilisée pour mesurer l'activité lipasique et aussi effectuer les mesures impédimétriques est le tampon phosphate salin (PBS) contenant 140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,1 mM de Na_2HPO_4 et 1,8 mM de KH_2PO_4 , ajusté à pH 8 avec la soude NaOH. Les réactifs utilisés pour la préparation des tampons phosphate sont de qualité analytique et sont commercialisés par Sigma Aldrich (France).

IV.5.3. Nettoyage des électrodes de platine

Il est nécessaire que l'électrode soit nettoyée avant toute analyse. Un traitement différent s'avère nécessaire pour ces électrodes à cause de leur épaisseur et de leurs différentes conceptions. En effet les microélectrodes de platine sont nettoyées en deux étapes. L'électrode est tout d'abord trempée dans l'acétone pendant 10 min. Ensuite, elle est séchée

sous flux d'air. La deuxième étape de nettoyage est la plus importante où l'électrode de platine est nettoyée en utilisant le mélange "piranha" [12]. Cette solution est composée d'un mélange de 2/3 d'acide sulfurique concentré (96%), H_2SO_4 , et de 1/3 d'eau oxygénée, H_2O_2 . L'échantillon est laissé 1 minute dans la solution. Après ce traitement, l'électrode est rincée à l'eau ultra pure et séchée sous un flux d'azote.

IV.6. Les biocapteurs à lipase

Dans cette partie, nous allons donner quelques informations nécessaires à la bonne compréhension du sujet traité dont le but est de réaliser l'immobilisation d'une enzyme par co-réticulation avec l'enzyme inerte, l'albumine bovine sérique (BSA) et le glutaraldéhyde (GA). Nous avons présenté, dans le chapitre I, les intérêts de l'immobilisation de biomolécules (enzymes) sur la surface des électrodes. Puis, nous avons résumé les différents procédés permettant l'immobilisation des enzymes. Parmi ces méthodes, nous nous focaliserons sur l'immobilisation par co-réticulation. Au cours de cette présentation, nous effectuerons une synthèse des travaux déjà effectués à travers des résultats issus de la littérature concernant la modification de surface des électrodes. Puis nous détaillerons plus particulièrement les résultats de la littérature concernant les biocapteurs à lipase.

IV.6.1. Elaboration d'un biocapteur à base de la lipase

Dans cette partie du travail, le but recherché est l'élaboration d'une membrane sensible par la technique d'impédance électrochimique qui est déposé sur le conducteur en platine, dans le but de détecter le diclofop-méthyle (Herbicide organochloré).

L'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* constitue la première étape dans la réalisation des biocapteurs. Une membrane active est nécessaire pour les mesures différentielles.

IV.6.1.1. La protéine BSA

Différentes expériences menées pour déterminer la forme de la BSA, indiquent que la protéine est ellipsoïdale de dimensions de l'ordre de $40 \times 140 \text{ \AA}$, comme le montre la figure IV.4. La BSA contient de 50 à 68 % de la structure d'hélice α et de 16 à 18% de la structure en feuillet β . Les proportions de ces structures et la forme de la protéine peuvent changer en

fonction du pH. La BSA est fortement soluble dans l'eau et dans les solutions salines et légèrement dans les alcools, la solubilité diminue à pH acide. [13].



Figure IV.4 : Structure de la protéine BSA.

IV.6.2. Membranes à base d'albumine de sérum bovin (BSA)

Le protocole de fabrication des membranes à base de BSA a été mis au point à partir des travaux effectués par Dzyadevych *et al.* (1994) sur les capteurs enzymatiques [14-17]. La lipase microbienne brute extraite de *Candida rugosa* (540 mg) est préalablement réticulée dans une matrice de BSA : La co-réticulation de la lipase de *Candida rugosa* par le glutaraldéhyde en présence d'une protéine inerte (l'albumine de sérum bovin (BSA)) a été envisagée par Alexey P. Soldatkin *et al.* [18]. Dans ce travail, l'électrode utilisée pour la conception du biocapteur à base de la lipase était constitué par conducteur en platine. Dans notre cas, ce conducteur est associée à une biomembrane déposée à partir d'un mélange lipase-BSA (figure IV.5).

La membrane a été préparée comme étant un mélange qui contient un ratio d'enzyme /support [5% (w/w) enzyme /5 % (w/w) albumine de bovine sérique] solubilisé dans 90 μL d'un tampon à 20mM de KH_2PO_4 . Par ailleurs, du glycérol est rajouté dans la membrane pour améliorer sa plasticité et éviter les phénomènes de "retrait" de la membrane. Il est bien évident que l'enzyme n'était active que dans une certaine gamme de pH. Il est important de se placer à la valeur du pH permettant une activité catalytique optimale. Dans cette étude cela correspond à une valeur de pH égal à 7,4.

La figure IV.6 montre une représentation schématique des différentes étapes de la procédure de l'élaboration du biocapteur à base de la lipase de *Candida rugosa*.

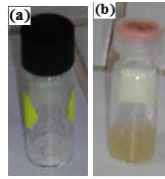


Figure IV.5 : photos des membranes enzymatiques (a) : BSA+CRL, (b) : BSA+CRL+Glycérol+KH₂PO₄.

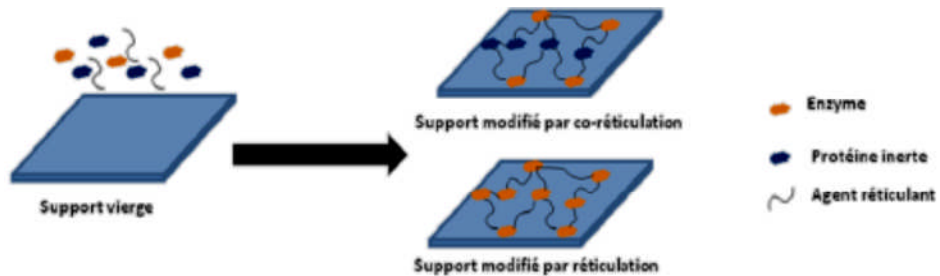


Figure IV.6 : Représentation schématique d'un biorécepteur immobilisé dans une enzyme inerte (BSA) et un agent réticulant (GA).

Dans ce travail, nous avons biofonctionnalisé nos capteurs (les biocapteurs impédimétriques, ampérométriques et conductimétriques) en utilisant un système enzyme/protéine réticulé par le glutaraldéhyde (GA). La réaction avec le glutaraldéhyde en solution a été proposée par Richard et Knowles [19] ainsi que Mosan [20] (figure IV.7).

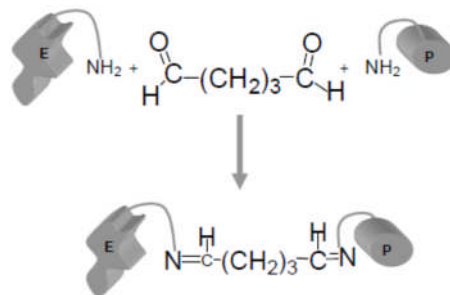


Figure IV.7 : Le principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde.

Le GA est un réactif bifonctionnel utilisé fréquemment pour le couplage des protéines. Il réagit avec les fonctions amines primaires et plus particulièrement avec les fonctions amines de la lysine des protéines. Le glutaraldéhyde couramment employé en biochimie permet donc de réticuler les protéines tout en conservant leur activité.

Dans notre cas, des vapeurs de GA (Merck) ont été utilisées pour éviter toutes réactions non contrôlées de polymérisation. Seul le monomère se vaporise [21]. La membrane enzymatique, dans notre cas, est co-réticulée en présence d'une protéine dite de charge

l'albumine de sérum bovin (BSA) pour permettre une meilleure répartition de l'enzyme sans altérer les propriétés mécaniques de la membrane obtenue.

Pour l'élaboration de biocapteur à base de la lipase de pancréas de porc, nous avons suivi le même protocole utilisé dans le cas du biocapteur à base de la lipase de *Candida rugosa*.

La membrane de référence utilisée dans les mesures conductimétrique a été préparée comme étant un mélange qui contient [10% (w/w) albumine de bovine sérique et 10 μ L de glycérol] solubilisé dans 90 μ L d'un tampon à 20mM de KH_2PO_4 à pH = 7,4.

La solution tampon utilisée pour toutes les expériences est le tampon phosphate salin (phosphate buffer saline (PBS)), contenant 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,01 M de KH_2PO_4 et 0,01 M de K_2HPO_4 , à pH= 7,4. Toutes les solutions aqueuses ont été réalisées à partir d'une eau ultrapure purifiée et désionisée par le système Milli Q® d'une résistance de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

IV.7. Mesure de l'activité enzymatique d'une lipase

Les lipases sont des hydrolases qui catalysent la rupture de la liaison ester carboxylique de substrat insolubles dans l'eau. Ces substrats sont en émulsion et la catalyse se produit à l'interface eau/lipide.

Cette partie concerne la mesure de l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) lors de l'hydrolyse du diclofop-méthyle (substrat). Cette partie a été effectuée au laboratoire de chimie organique appliquée groupe Bioconversion et Synthèse Organique. Département de chimie, Université Badji Mokhtar, Annaba.

Les mesures de l'activité enzymatique consistent à suivre la cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'ester en dosant par une solution de soude (NaOH) l'acide qui se forme. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un pH-stat, qui est un appareil permettant le dosage automatique de l'acide formé. Il est relié à un ordinateur qui récupère et traite directement les données du dosage.

V.7.1. Description du pH-stat

V.7.1.1. Principe

Le dosage de l'activité de la CRL utilisant le pH-stat, consiste à mesurer, en fonction du temps, la quantité de NaOH à 0,01 N qu'il faut ajouter au système réactionnel pour neutraliser l'acide gras libéré par hydrolyse de l'ester et maintenir le pH constant (pH= 8, pH optimum de la CRL).

IV.7.1.2. Descriptions de l'appareil

Le suivi des réactions d'hydrolyse a été effectué automatiquement par l'intermédiaire d'un pH-stat piloté par un micro-ordinateur (pH M290, Meter lab™, Abu 901 Auto Burette). Ce dernier est constitué de :

- Un pH-mètre muni d'une électrode combinée reliée à une seringue. Le déplacement du piston est commandé par le pH-mètre qui détecte la variation de pH qui se produit dans le milieu réactionnel.
- Un dispositif de titrage constitué d'un support réglable en hauteur portant l'électrode, d'un agitateur magnétique et d'un tuyau d'arrivée de la solution de NaOH.
- Un ordinateur doté d'un logiciel permettant l'acquisition et le traitement des données fournis par le pH-mètre. (figure IV.8).

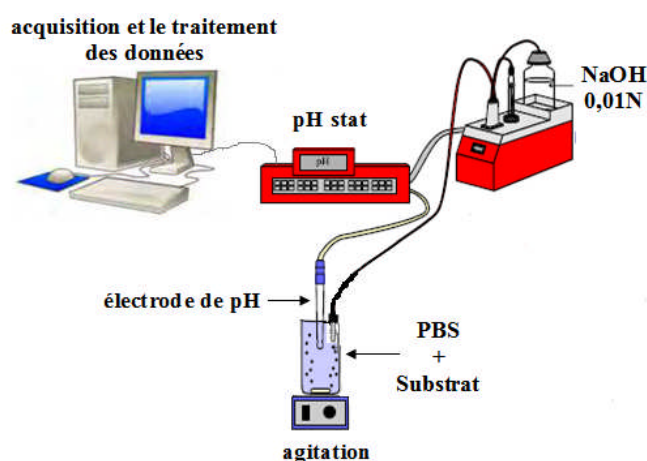


Figure IV.8: Montage utilisé dans la mesure de l'activité enzymatique.

IV.7.2. Travail expérimental

Le substrat utilisé ici est le diclofop-méthyle. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée à 30°C (cette température a été optimisée dans la partie de l'optimisation des

conditions du travail du biocapteur) et à pH= 8 (pH optimum de l'enzyme et du biocapteur), en présence d'un tampon PBS, utilisant une concentration de substrat de 3,6 g.L⁻¹, avec une quantité d'enzyme constante.

IV.7.3. Mode opératoire

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

- Dans un bécher de dosage, on met 5 ml de solution tampon PBS et y ajouter 100µL de diclofop-méthyle (3.6 g.L⁻¹).
- Dans un bécher, on met 300 mg de CRL dissout dans 5 ml de solution tampon PBS (pH 8; 0,01M), ce mélange a été remuer sous agitation douce en raison de précipiter la majorité des protéines correspondants.
- L'échantillon a été placé sur l'agitateur du pH-stat et stabiliser à 30 °C.
- L'électrode est plonger dans le bécher et vérifier qu'elle est bien centrée.
- Mettre le tuyau d'arrivée de la solution de NaOH au dessus du bécher.
- On prend la valeur du pH et on ajuste à pH= 8 par ajout de quelques gouttes de NaOH (0,01M).
- la solution de CRL préparé précédemment a été ajoutée à l'aide d'une pipette dans le bécher.
- Déclencher simultanément le programme de dosage du pH-stat.

On peut suivre sur l'écran de l'ordinateur la baisse de pH provoquée par l'apparition de l'acide produit résultant de l'action de la CRL. Ce programme dure environ 15 mn.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différents dispositifs expérimentaux qui ont été utilisés durant ce travail. Ensuite nous avons présenté les protocoles de fabrication des biocapteurs et la mesure de l'activité de l'enzyme.

Enfin, avant de passer aux résultats permettant l'élaboration de ces biocapteurs, on note que ces performances et les technologies associées à ces dispositifs représentent l'étude de l'activité de l'enzyme vis-à-vis d'un polluant organique cible qui sera étudié

Références bibliographiques

- [1]. Haytem JARRAR, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles ; Thèse de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, **2011**.
 - [2]. Hafaid Imen, "Etudes physico-chimiques de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales "; Thèse de l'université de Claude Bernard Lyon I, **2009**.
 - [3]. Saloua HELALI, Conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impedimétriques; Thèse de l'université de CO-TUTELLE, **2005**.
 - [4]. Nadir Meini, Rochdi Kherrat, and N. Jaffrezic-Renault, Effect of Nature of Polymeric Matrix on the Impedimetric Detection of Cobalt with a Calix[6]arene Based Membrane/Gold Electrode, *SENSOR LETTERS* Vol. 9, 2127–2129, **2011**.
 - [5]. K. Morakchi, A. Hamel, A. Zazoua et R. Kherrat, Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique des inhibiteurs de corrosion destinés au circuit de refroidissement, *Revue des Energies Renouvelables* Vol. 11 N°3 357 – 362, **2008**.
 - [6]. S. Zougar, K. Morakchi, A. Zazoua, S. Saad, R. Kherrat, N. Jaffrezic-Renault, Characterization of ammonium ion-Sensitive membranes in solution with electrochemical impedance spectroscopy, *Materials Sciences and Engineering C* 28, 1020-1023, **2008**.
 - [7]. A. Zazoua, R. Kherrat, M. H. Samar, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, F. Bessueille, D. Léonard. Characterization of TBP containing polysiloxane membrane/insulator/semiconductor structures for hexavalent chromium detection, *Materials Sciences and Engineering C* 28, 1014-1019, **2008**.
 - [8]. N. Zabat, M. Abbessi, R. Kherrat, N. Jaffrezic-Renault, S. Zougar, A. Grid, Elaboration of an impedancemetric sensor for cobalt detection by polymeric membrane incorporating a heteropolyanion of Dawson type, *Materials Sciences and Engineering C* 28, 1006-1009, **2008**.
 - [9]. S. Zougar, O. Bechiri, S. Baali, R. Kherrat, M. Abbessi, N. Jaffrezic-Renault, N. Fertikh, Development of an Impedimetric Sensor Based on Heteropolyanions with Additional Nafion Membrane, *SENSOR LETTERS*, Vol. 9, 2287–2290, **2011**.
 - [10]. S. Baali, S. Zougar, R. Kherrat, Z. Djeghaba, F. Benamia, N. Jaffrezic-Renault, Electrochemical characterization of enzymatic impedimetric biosensor destined to detect organochlorine pesticide: the diclofop-methyl. *Sensors & Transducers*, Vol. 149, Issue 2, pp. 135-142, February **2013**.
 - [11]. N. Meini, C. Farre, C. Chaix, R. Kherrat, S. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, a sensitive and selective thrombin impedimetric aptasensor based on tailored aptamers obtained by solid-phase synthesis, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**.
 - [12]. S. Hileli , C. Martelet , A. Abdelghani , N. Burais , N. Jaffrezic-Renault, Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer, *Sensors and Actuators B* 113, 711–717, **2006**.
 - [13]. T. Peters, "All about albumin: Biochemistry, genetics and medical applications", Academic Press San Diego **1996**.
 - [14]. SHUL'GA A., DZYADEVYCH S.V., SOLDATKIN A.P., et al. Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 9, n°3, pp.217-223 **1994**.
 - [15]. DZYADEVYCH S.V., SHUL'GA A.A, PATSKOVSKY S.V., et al. Thin-film conductometric sensors for enzyme biotransducers; *Russian Journal of Electrochemistry*, Vol. 30, n°8, pp. 987-991, **1994**.
-

Références bibliographiques

- [16]. DZYADEVYCH S.V., KORPAN Y.I., ARKHIPOVA V.N., et al. Conductometric enzyme biosensor for formaldehyde determination; Eurosensors XIV, August 20-27, Copenhagen, Denmark **2000**.
- [17]. SOLDATKIN A.P., EL'SKAYA A.V., SHUL'GA A.A, et al. Glucose sensitive conductometric biosensor with additional Nafion membrane : reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range ; *Analytica Chimica Acta*, Vol. 288, pp. 197-203, **1994**.
- [18]. Liu, C.H., Y.H. Lin, C.Y. Chen and J.S. Chang; Characterization of Burkholderia lipase immobilized on celite carriers. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 40: 359-363, **2009**.
- [19]. F. Richards, J.R. Knowles, *J. Mo. Biol.*, 37, 331, **1968**.
- [20]. P. Mosan, G. Puzo, H. Mazarguil, *Biochimie*, 57, 160, **1975**.
- [21]. S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, V.N. Arkhipova, M.Y. Alesina, C. Martelet, A.V. El'skaya, A.P. Soldatkin, *Biosens. Bioelectron.* 14, 283,**1999**.

Chapitre V

Résultats & discussions

L'augmentation considérable de la productivité agricole à l'hectare n'aurait pas été possible sans la généralisation de l'emploi des engrais et pesticides. Mais aujourd'hui, ces produits sont mis en cause dans la dégradation de l'environnement, particulièrement sensible dans les régions d'agriculture intensive, notamment à travers la pollution des rivières et des nappes par les pesticides. La lutte contre la pollution des eaux passe par une meilleure connaissance des mécanismes de fixation, de transformation et de transport des molécules chimiques au niveau du sol, et par la mise au point de stratégies de gestion des risques.

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

Ainsi, ces dernières années ont vu l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs. Ces nouveaux moyens d'analyses ont connus un essor tout à fait remarquable grâce aux besoins de plus en plus pressants des différents secteurs touchant à la chimie et à la biochimie (environnement, alimentation, pharmacie, sécurité domestique et industrielle, diagnostic médical...). En particulier, plusieurs biocapteurs basés sur la lipase ont été développés pour la détermination des pesticides [1].

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. Les lipases sont présentes dans la plupart des tissus animaux chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez des nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires, on les retrouve aussi bien dans le règne végétal [2, 3].

Des travaux antérieurs ont montré que les lipases bactériennes notamment font preuve d'une meilleure stabilité [4]. Pour ces raisons, les recherches se sont orientées vers l'utilisation d'une enzyme hydrolase la lipase de *Candida rugosa* (CRL). L'activité de cette enzyme bactérienne (CRL) vis-à-vis le diclofop-méthyle vient d'être testé et mis au point avant l'élaboration du biocapteur. L'étude de l'activité est indispensable dans l'élaboration du

biocapteur de diclofop-méthyle malgré que la structure et le mécanisme enzymatique de la lipase, encore peu connue alors dans le domaine de l'application dans les biocapteurs.

Cette thèse aura pour objectif; d'une part, de réaliser un biocapteur enzymatique impédimétrique miniaturisé basé sur un enzyme hydrolase la lipase de *Candida rugosa* (CRL) immobilisée dans une matrice organique composée de BSA (Albumine sérum bovin) et de glutaraldéhyde (GA) ; pour la détermination des pesticides organochlorés (diclofop-méthyle) à l'état de trace dans les milieux aqueux. Notre biocapteur est conçu pour produire un signal proportionnel à la concentration de la substance à détecter.

Deux approches ont été développées afin d'améliorer l'activité enzymatique. La première approche, tout à fait innovante, consistera à modifier par co-réticulation l'enzyme par une autre enzyme inerte et par un agent réticulant. Une seconde approche, inspirée des travaux réalisés en biocapteur en milieu aqueux, consistera à étudier l'activité de l'enzyme par injection de différentes concentrations de l'élément cible.

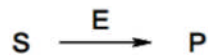
Dans un premier temps, les travaux ont consisté à rechercher une méthode rapide et simple à mettre en œuvre afin de réaliser l'analyse du signal dû au comportement des électrodes modifiées par le dépôt des membranes enzymatiques. Plus particulièrement, l'origine de la controverse concernant l'application de la technique analytique ; la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour étudier les propriétés électriques du notre biocapteur élaboré on se basant sur l'étude de l'effet de la tension de polarisation et l'effet de la concentration de l'élément cible. Cette technique nous a permis de différencier les différents phénomènes qui permettent d'avoir lieu dans une cellule électrochimique et de conclure que la détection de polluant organique se fait par l'hydrolyse de ce dernier par l'enzyme (la lipase). L'étude du signal produit a été analysée ; les limites de la méthode ainsi que les utilisations possibles seront mises en évidence afin de pouvoir développer de nouvelles méthodes améliorant leurs performances dans les milieux aqueux afin qu'il soit mieux sensible et plus actif en présence de l'élément cible.

Par ailleurs, ces mesures ont été réalisées en faisant varier un certain nombre de paramètres caractéristiques du système étudié afin de mieux définir le rôle des différents éléments qui interviennent dans l'élaboration de la partie réceptrice du capteur à savoir : Composition de la membrane, l'effet de la température et l'effet du pH du milieu.

Outre l'application possible de ces méthodes à l'obtention d'un biocatalyseur actif et par conséquent exploitable dans le domaine de la biocatalyse ou au niveau de domaines faisant intervenir des enzymes tel que l'élaboration de biocapteurs. Ces recherches ont également une importance fondamentale afin de mieux comprendre les phénomènes responsables de l'inactivation des enzymes tels que l'interférence des métaux lourds ou des pesticides.

I. Mesure de l'activité de la lipase de *Candida rugosa* (CRL)

La fonction d'une enzyme E est de catalyser une réaction chimique conduisant d'un substrat S à un produit P :



L'activité enzymatique se manifeste donc par une accélération des vitesses de réaction en présence de l'enzyme par rapport à la réaction non-catalysée. On peut décomposer les différentes étapes réactionnelles de la manière suivante :



L'activité d'une enzyme dépend donc de plusieurs paramètres telle que sa concentration, celle du substrat, l'effet potentiel inhibiteur de certains produits et/ou substrats, sa dénaturation due à la température de réaction et la diffusion des molécules dans le milieu réactionnel. L'étude des cinétiques réactionnelles permet d'étudier ces paramètres influents l'activité enzymatique et procéder à leur optimisation.

Dans notre étude nous avons procédé à l'hydrolyse de diclofop-méthyle par la lipase de *Candida rugosa*. Le protocole de mesure de l'activité de l'enzyme vis-à-vis du substrat diclofop-méthyle sera présenté dans ce chapitre.

I.1. Dosage de l'activité de la lipase de *Candida rugosa*

L'activité enzymatique a été déterminée à partir de la réaction d'hydrolyse du diclofop-méthyle. Le protocole opératoire est le suivant :

L'enzyme poudre (0,3 g) a été ajouté à 10 ml de tampon phosphate (pH 8; 0,01 M) contenant la solution de substrat préparée par dissolution de 100 µL de diclofop-méthyle (3,6 gL⁻¹) dans du tampon phosphate à 10 mM pH 8. Ensuite, la réaction est conduite dans un bécher de 20 ml agité à 300 rpm à 30°C. La vitesse de la réaction est déterminée en suivant la formation

Résultats & discussions

d'acide gras libéré après l'hydrolyse de l'ester. La valeur initiale du pH a été enregistrée à l'aide d'un pH-stat (PHM 290 MÈTRES LAB TM Autoburette ABU 901). La quantité d'acide formé a été neutralisée par ajout d'une solution de NaOH (0,01 M). La vitesse initiale a été déterminée à partir de la pente de régression linéaire de l'acide gras par rapport au temps (Figure V.1). La réaction est suivie pendant 15 minutes.

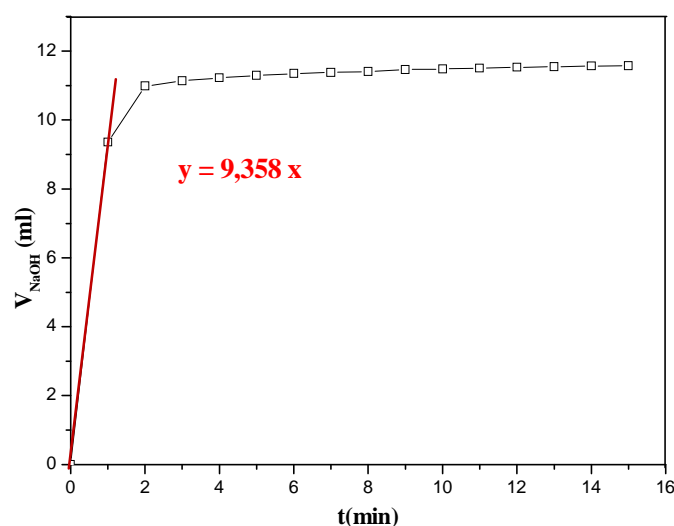


Figure V.1: Présentation de la vitesse de la réaction de l'hydrolyse de diclofop-méthyle en fonction du temps dans le tampon phosphate (10 mM, pH 8 et 30°C).

L'activité des solutions enzymatiques a été évaluée par dosage de l'acide libéré lors de l'hydrolyse de diclofop-méthyle. La réaction est effectuée dans un bécher agité en présence de 100 μ L d'une solution de substrat. Le démarrage de la réaction se fait par ajout de l'enzyme (*Candida rugosa*). L'acide libéré dans le milieu est alors neutralisé en continu par addition de soude à l'aide d'un pH-stat.

Le titre exact de la soude est vérifié par un dosage titrimétrique. La réaction est suivie pendant 15 minutes et la vitesse de production de l'acide est déduite du graphe représentant le volume de soude ajouté en fonction du temps. Par conséquent, l'augmentation de l'activité de l'enzyme peut être due à la grande accessibilité de substrat aux sites actifs de l'enzyme. De plus, l'optimisation de processus de l'hydrolyse du diclofop-méthyle par la lipase devrait conduire à un nouveau système d'une grande efficacité et utile pour le processus de biotechnologie (détection de diclofop-méthyle). Il est important de savoir si la lipase aurait une activité spécifique sur la cinétique de réaction enzymatique pour hydrolyser le diclofop-méthyle sans qu'il en résulte une dénaturation des propriétés des enzymes, ce système a été

choisi comme une réaction de la lipase dans un microsysteme aqueux, la concentration de diclofop-méthyle dans le systeme d'essai était de 3,6 g.L⁻¹.

Les lipases catalysent, à l'interface eau/substrat insoluble, l'hydrolyse des liaisons esters formées par des acides gras et du glycérol [5, 6]. Certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques [7, 3]. Le substrat utilisé (diclofop-méthyle), de par sa structure est susceptible d'être hydrolysé et constitue donc un modèle intéressant pour l'étude de la sélectivité réactionnelle lors de son hydrolyse enzymatique par la CRL. L'étude de ces enzymes a contribué à l'élaboration d'une enzymologie interfaciale, la catalyse se produit en milieu hétérogène à l'interface eau/corps gras. Il en résulte que les propriétés biochimiques de ces enzymes dépendent autant de la qualité de cette interface que de certains paramètres classiques tels que le pH ou la force ionique [8].

La réaction d'hydrolyse de l'enzyme CRL peut être exprimée dans la figure V.2:

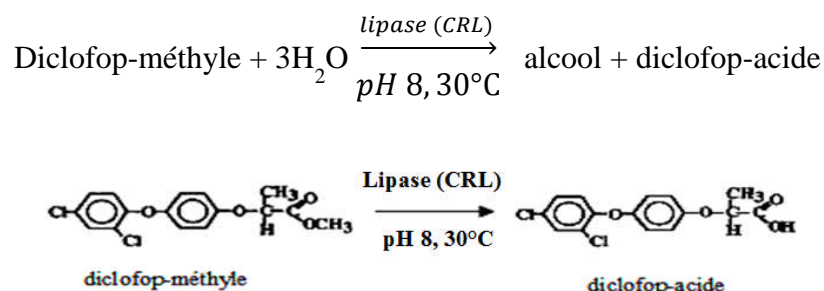


Figure Figure V.2: Réaction d'hydrolyse de diclofop-méthyle [9].

Il a été démontré dans des travaux antérieurs [6, 10] que la vitesse d'hydrolyse dépend de la quantité de substrat présent dans le milieu. Dans notre cas, on observe effectivement que la source de lipase donne de bons résultats et la réaction est très rapide. La concentration du substrat choisie (3,6 g.L⁻¹ de diclofop-méthyle) influe positivement sur l'augmentation de la vitesse d'hydrolyse, comme le montre la figure V.2.

L'activité hydrolytique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) est calculée dans ce cas à partir de la quantité de NaOH neutralisant l'acide formé. La valeur de cette activité qui signifie aussi la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse est égale à 9,358 ml/min/mg. Cette activité donnée en quantité de substrat transformé est de 93,58 µM/mn/mg d'enzyme (93,58UI/mg d'enzyme).

La valeur de l'activité hydrolytique de la lipase donnée pour ce processus est 93,56UI/mg d'enzyme. Quand on augmente la concentration en substrat, l'activité de la lipase est considérablement accrue avec un substrat insoluble (comme l'émulsion) et donc l'enzyme atteint un seuil de saturation très rapidement sans que toute la quantité totale du substrat soit transformée.

Les lipases ont été définies également comme une catégorie spéciale d'estérases efficaces dans l'hydrolyse de molécules agrégées [3, 11].

Cette expérience permet donc de conclure, que les lipases sont des biocatalyseurs importants et sont particulièrement adaptés pour des applications industrielles, comme ils sont très stables et actif [12]. Ceci représente la première étape dans le développement de (BSA+CRL)/ électrode (Pt) comme un système combiné pour applications de biocapteurs où le développement de ce dernier fait l'objet de la partie suivante.

Conclusion

Les résultats obtenus de cette partie du travail montrent que :

La concentration de la lipase est un peu faible devant celle du substrat c'est pour cela que toute l'enzyme a réagit et donc pas de possibilité que le reste du substrat soit hydrolysé.

Les mesures de l'activité lipasique effectuées à une température de 30°C nous ont permis de constater que la quantité maximale d'acide libérée pendant l'hydrolyse est obtenue après 60 secondes et à pH = 8. Ces résultats montrent que la température de 30°C initialement choisie pour les mesures courantes a donc été jugée favorable et n'a pas été modifiée.

En conséquence, la quantité d'acide libérée en 60 secondes exprime bien la totalité de l'activité lipasique qui s'est manifestée pendant cette période de temps. Une unité lipase correspond à la libération de 1µM d'acide par min par mg d'enzyme.

Dans cette partie, nous avons présenté d'abord, le protocole de mesure de l'activité de la lipase de *Candida rugosa* vis-à-vis du substrat (diclofop-méthyle) par une réaction d'hydrolyse dans un tampon phosphate. Les résultats obtenus montrent que le substrat diclofop-méthyle est susceptible d'être hydrolysé par la lipase de *Candida rugosa* (CRL). Ces résultats nous permettent de développer un capteur enzymatique pour la détection de cet élément par hydrolyse dans un tampon phosphate. Ceci nous a permis de passer aux étapes de

Résultats & discussions

fabrication de biocapteur enzymatique à base de la lipase de *Candida rugosa* (CRL). Ces étapes feront l'objet de la partie suivante.

II. Conditions électriques de fonctionnement optimales pour un biocapteur impédimétrique basé sur la Co-réticulation de la lipase (CRL) par le (GA) en présence de (BSA)

Actuellement, une grande attention est portée sur la recherche de nouvelles stratégies d'immobilisation des enzymes. Ces dernières sont fortement impliquées dans la réalisation des biocapteurs et des bioréacteurs pour répondre aux attentes de plusieurs secteurs : alimentaire, clinique, pharmaceutique, agriculture, cosmétique... [13]. La phase critique dans ces domaines est l'optimisation des protocoles d'immobilisation sans que l'activité biologique soit altérée. Parmi ces enzymes, notre choix c'est porté sur une enzyme hydrolase la lipase de *Candida rugosa* qui a un rôle crucial dans plusieurs domaines.

De nos jours, la lipase est utilisé dans de nombreuses applications différentes, par exemple, dans les modifications régiosélective de composés polyhydroxlique, modifiés des huiles et graisses, les additifs alimentaires et les saveurs de fabrication de produits pharmaceutiques, biodétergents, cosmétiques, parfums, de nouveaux matériaux biopolymères, le biodiesel, les produits agrochimiques, les biocapteurs et les pesticides [1].

La lipase qui a de nombreuses applications dans les domaines biomédicaux et alimentaires. Dans ce travail, plusieurs biocapteurs des polluants organiques (les pesticides organochlorés) ont été développés intégrant une matrice organique à base de l'albumine de sérum bovin (BSA) servant de support d'immobilisation de la lipase. Plusieurs travaux antérieurs ont été étudiés l'immobilisation de la lipase dans plusieurs supports.

La lipase peut être immobilisée sur différents types de supports hydrophobes ou hydrophiles [14]. Divers Matériaux sont utilisés comme supports pour la lipase tels que les résines échangeuses d'ions (Amberlite IRC-50) [15], des matériaux inorganiques (sable, silice), des biopolymères, nommément l'alginate de sodium [16], les polymères synthétiques tels que le polypropylène, le polyéthylène, le polyméthacrylate [17], de la célite [18], en céramique [29], tels que les complexes polypropylèneimine-agarose ont été déjà utilisés pour immobiliser la lipase. Silicates hydrophobes dérivés d'un mélange de TMOS et alkyltriméthoxysilanes comme propyltriméthoxysilane (SPTM) et le n-butyltriméthoxysilane (BTMS) ont été identifiés comme des meilleurs supports pour les lipases [20]. Matériaux mésoporeux de silice avec une grande surface et des structures des pores ordonnées ont été

utilisés pour immobiliser la lipase. Donc l'enzyme immobilisée est plus efficace et plus stable que l'enzyme libre [21].

Dans une autre stratégie, uréase et le catalase ont été immobilisé par Co-réticulation par le glutaraldéhyde en présence d'une protéine dite de charge l'albumine de sérum bovin (BSA), dont l'uréase est utilisée pour application du biocapteur en hémodialyse rénale [22] et le catalase pour la détermination du cyanure [23] alors que l'objectif de ce travail est de mettre au point un biocapteur impédimétriques pour la détection des pesticides organochlorés par la lipase immobilisée.

De ce fait, différentes techniques de caractérisations ont été utilisées pour la caractérisation de biocapteur enzymatique. La microscopie optique a été utilisée pour voir la morphologie de la biomembrane déposé sur la surface de l'électrode. Les propriétés électriques ont été caractérisées par la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS). La voltamétrie cyclique a été utilisé pour analyser les différentes couches déposées sur la surface de l'électrode et pour évaluer la cinétique électronique de l'interface de celle-ci. Une étude par la technique conductimétrique a été faite pour comparer les résultats de la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS) et de la voltamétrie cyclique. L'étude expérimentale d'EIS a été faite avec des différents potentiels DC afin de montrer, d'une part, le comportement de la couche enzymatique pour ces différents potentiels et d'autre part, de trouver le potentiel pour lequel le biocapteur enzymatique est plus sensible et stable.

II.1. Caractérisation de la couche enzymatique par la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

Comme les performances du biocapteur sont intimement liées aux caractéristiques du film d'enzyme, dans un premier temps, nous avons optimisé la composition de la membrane enzymatique qui permet d'obtenir un film homogène et adhérent et cela dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire et l'équipe de Chimie organique appliqué, groupe Bioconversion et Synthèse Organique de l'Université de Badji Mokhtar Annaba Algérie. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les propriétés électriques de la biomembrane pour différents potentiels DC par la spectroscopie d'impédance électrochimique.

Afin de déterminer l'influence de la tension de polarisation sur les réponses fréquentielles du biocapteur élaboré, nous avons balayé la tension de - 0,4V à 0V. La détermination du potentiel du travail est très importante pour la suite des expériences réalisés.

En générale on utilise un sel d'électrolyte support (milieu tampon PBS à pH = 7,4) totalement dissocié permettant de saturer la solution. Nous avons choisi de travailler dans des solutions neutres pour favoriser l'activité de l'enzyme ; comme le montre les figures V.3, V.4 et V.5. Les effets de la tension sur la réponse fréquentielle du capteur ne sont pas négligeables et l'impédance du système est plus faible.

Nous assistons à un courant non faradique produit par l'application d'un potentiel à l'électrode et provient du réarrangement des ions en solutions à la surface de l'électrode, c'est un courant intrinsèque à toutes les méthodes électrochimiques. En appliquant un potentiel négatif de (-0,2V) dans une gamme de fréquence 100kHz à 100mHz, il y aura augmentation de la concentration des cations de la solution à la surface de l'électrode, causant un déplacement des électrons pour balancer les charges de part et d'autre de l'interface électrode/électrolyte.

II.1.1. Propriétés électriques du film enzymatique à différents potentiels

Nous avons procédé à l'étude des propriétés électriques du film enzymatique à différents potentiels DC par spectroscopie d'impédance électrochimique. Les résultats exposés dans la figure V.3 présentent les diagrammes de Nyquist des films de la lipase de *Candida rugosa* (CRL)/BSA-GA à différents potentiels DC appliqués.

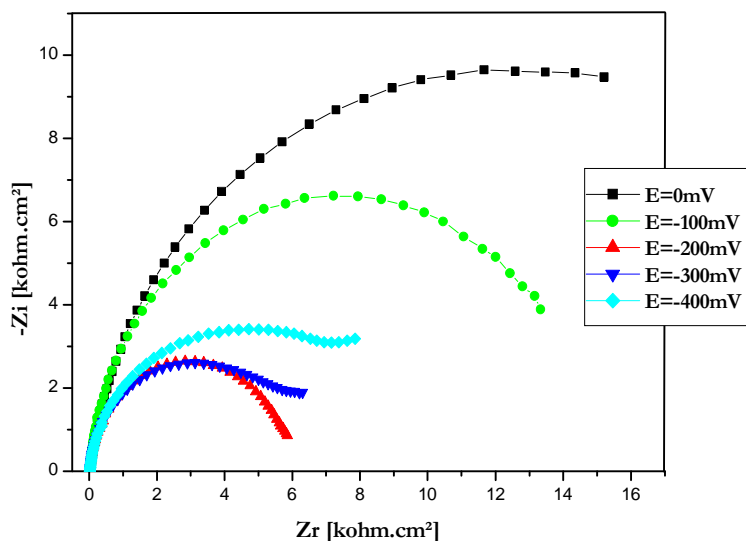


Figure V.3 : Diagrammes de Nyquist pour une couche enzymatique déposée sur une électrode du Platine obtenus à différents potentiels DC vs. SCE. Les potentiels dc utilisés sont : 0,-100,-200,-300 et -400mV. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10mV.

II.1.2. Modélisation et analyse des diagrammes d'impédance de la couche enzymatique

Ces digrammes ont été analysés en employant plusieurs modèles des circuits électriques équivalents qui sont appropriés pour les biomembrane enzymatique à base de l'albumine de sérum bovin (BSA) qui a été envisagée par Alexey P. Soldatkin et al [24] aussi par N. Bouyahia [23]. La majorité des fittes obtenus ont été peu satisfaisants (la variance χ^2 été insuffisante). En revanche, nous avons obtenu les meilleurs fittes avec une variance $\chi^2 \approx 10^{-3}$, pour une gamme de fréquences de 100 KHertz à 100 mHertz. Cette modélisation a été effectué en utilisant le circuit équivalent représenté dans figure V.4 (d), où R_s , CPE , R_{tc} et W représentent respectivement: la résistance de l'électrolyte, l'élément constant de phase, la résistance de transfert de charge et l'impédance de Warburg. Les paramètres électriques modélisés sont présentées dans le tableau V.1.

Résultats & discussions

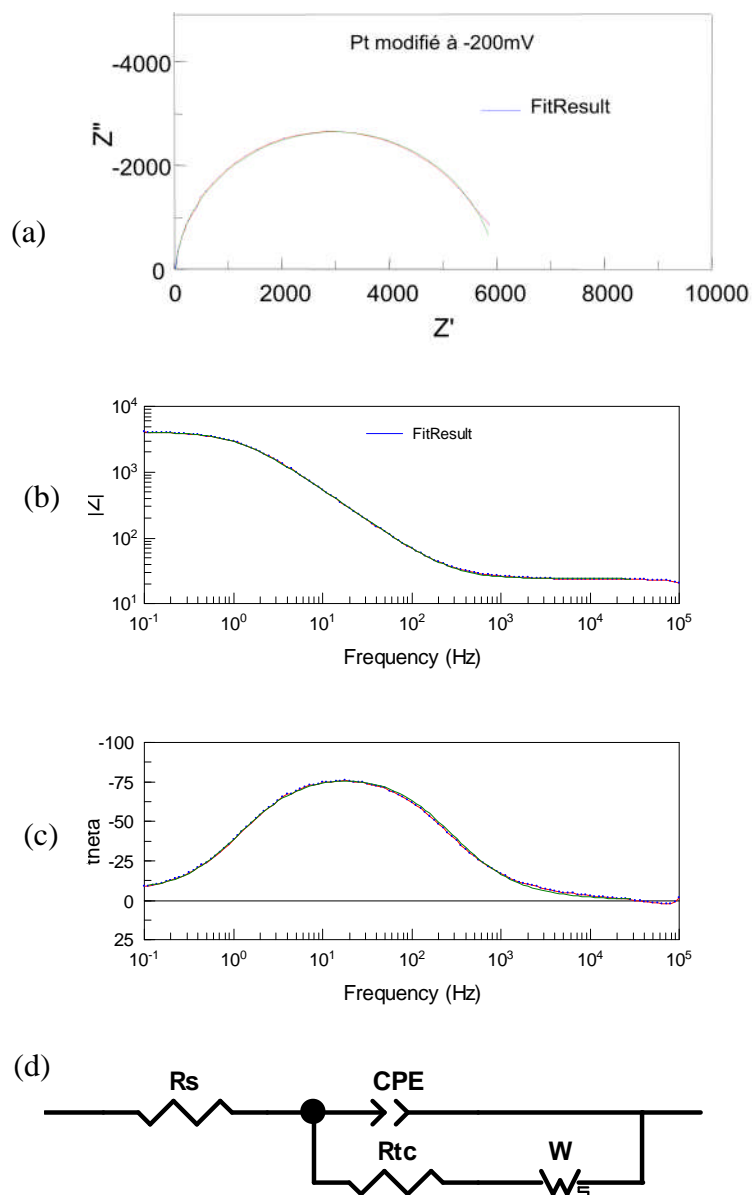


Figure V.4 : a) Spectre d'impédance de l'interface Platine/Lipase(CRL)/BSA/électrolyte dans le buffer de phosphate salin PBS (10mM pH7,4) à -0.2 V vs SCE. dans la gamme de fréquence de 100mHz-100kHz. b) le Fitte du module $|Z|$ v.s. fréquence, c) le Fitte de phase θ v.s. fréquence, d) Circuit électrique permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant à une couche enzymatique.

Tableau V.1 : Paramètres de simulation d'une électrode du Platine modifiée à l'aide d'une couche enzymatique, à différentes polarisations. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.4.

Potentiel (mV)	R_s (Ω)	CPE-T (μ F)	n	R_{tc} (Ω)	W_0-R (Ω)	W_0-T	W_0-P	$\chi^2 (\times 10^{-3})$
-400	23,25	38,3	0,93	5941	16239	85,77	0,415	3,5
-300	33,34	35,9	0,94	5400	52489	1240	0,529	3,5
-200	23,6	35,5	0,94	4821	260,5	3,255	0,685	2
-100	23,39	36,7	0,93	14748	1217	15,62	0,957	3,7
0	36,78	39,8	0,91	20542	2,03E5	2141	0,627	3,7

Résultats & discussions

Les spectres d'impédance ont été mesurés dans une gamme de potentiel DC entre -0.4 et 0 V. Les spectres montrent un changement considérable avec le changement de potentiel dans toute la gamme de fréquence.

Dans toute la gamme de fréquence allant de 100 KHz à 100 mHz sur les diagrammes de Nyquist, nous remarquons l'apparition d'un demi-cercle (figure V.3) permettant de définir les paramètres électriques du film enzymatique.

Dans toute la gamme de fréquence sur les diagrammes de Nyquist, les réponses d'impédance aux potentiels DC appliqués sont différentes. Ceci pourrait être attribué à la diminution de la résistance de transfert de charge (R_{tc}) qui est due au phénomène redox se produisant à l'interface membrane/ électrolyte, ainsi que l'impédance de Warburg qui est due au transfert de masse de l'espèce redox sur l'électrode. Il est important de noter qu'à -200 mV, la membrane enzymatique présente la résistance de transfert de charge la plus faible avec une faible impédance de Warburg ($R_{tc} = 4,821 \text{ k}\Omega$ et $W = 0,260 \text{ k}\Omega$). Contrairement aux autres potentiels, nous notons que le phénomène de diffusion est plutôt élevé. Il est également important de noter que le potentiel -0,2V appartient au domaine de polarisation de l'électrode modifiée par la couche enzymatique.

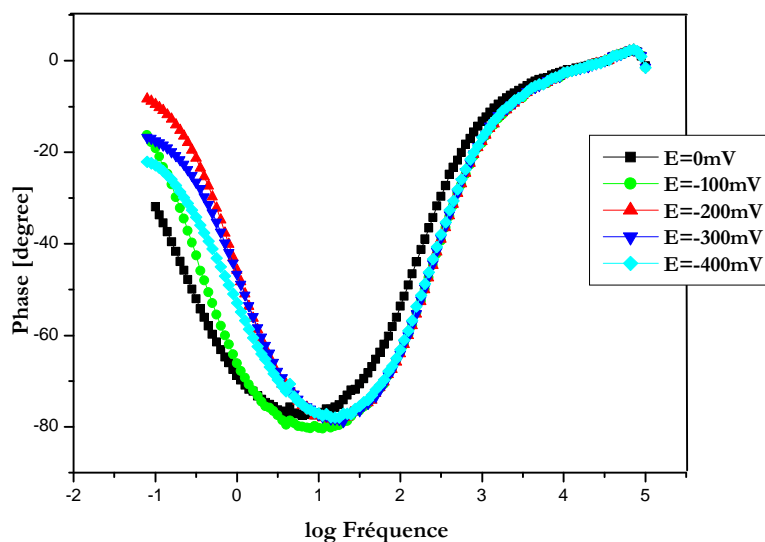


Figure V.5 : Diagrammes de Bode (Déphasage) pour une couche enzymatique déposée sur une électrode du Platine obtenus à différents potentiels DC vs. SCE. Les potentiels DC utilisés sont : 0, -100, -200, -300 et -400 mV. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100 mHz-100 kHz dans la solution de PBS (10 mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10 mV.

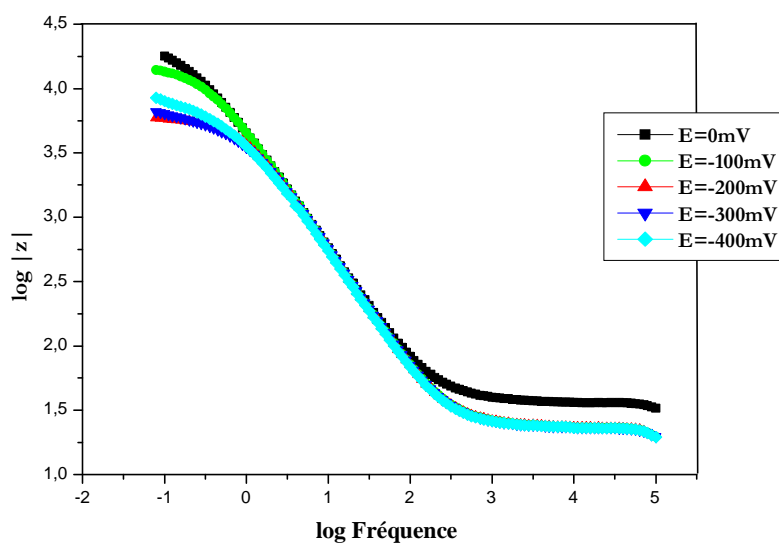


Figure V.6: Diagrammes de Bode (Module $|Z|$) pour une couche enzymatique déposée sur une électrode de Platine obtenus à différents potentiels DC vs. SCE. Les potentiels de travail utilisés sont : 0, -100, -200, -300 et -400 mV. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100 mHz-100 kHz dans la solution de PBS (10 mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10 mV.

L'effet de la tension de polarisation sur les spectres d'impédance dans le plan de Bode est illustré sur les figures V.5 et V.6.

Nous constatons que, dans le milieu tampon PBS à pH = 7,4, l'allure des courbes obtenues reste la même quelle que soit la polarisation. A haute fréquence, les courbes se superposent et la polarisation n'a pas d'effet, cependant, à basses fréquences l'allure des courbes est la même mais il y a une diminution dans l'impédance Warburg.

L'impédance de Warburg est minimum à une polarisation de -0,2 volt. Ainsi, à une telle valeur de polarisation le courant qui circule dans la cellule électrochimique quelque soit le milieu de travail est très proche de zéro.

II.1.3. Essai à blanc

Nous nous attacherons à analyser la réponse des électrodes modifiées sans couche sensible (la couche enzymatique (BSA+CRL) afin de mettre en évidence les effets dus aux électrodes elles même ou à la solution à analyser puis nous étudierons les effets dus à la couche sensible. Cette étude portera aussi bien sur les courbes impédancemétrique que sur les voltammogrammes. La caractérisation a été réalisée dans le milieu tampon PBS à pH = 7,4 de concentration de 10 mM qui assure une force ionique stable. La gamme de fréquence choisie

varie entre 100kHz-100mHz. L'amplitude de la tension alternative a été fixée à 10mV et la tension de polarisation à -0,2V / SCE.

Des graphes impédancemétrique (diagrammes de Nyquist et diagramme de Bode) figures V.3, V.5 et V.6 illustrent les phénomènes d'échange interpréter par la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique.

Des mesures d'impédances réalisées avant et après l'immobilisation de l'enzyme dans le PBS (10 mM, pH 7,4) à -0,2 volt, dans les plans complexes (Nyquist et Bode) sont présentées dans la figure (V.7).

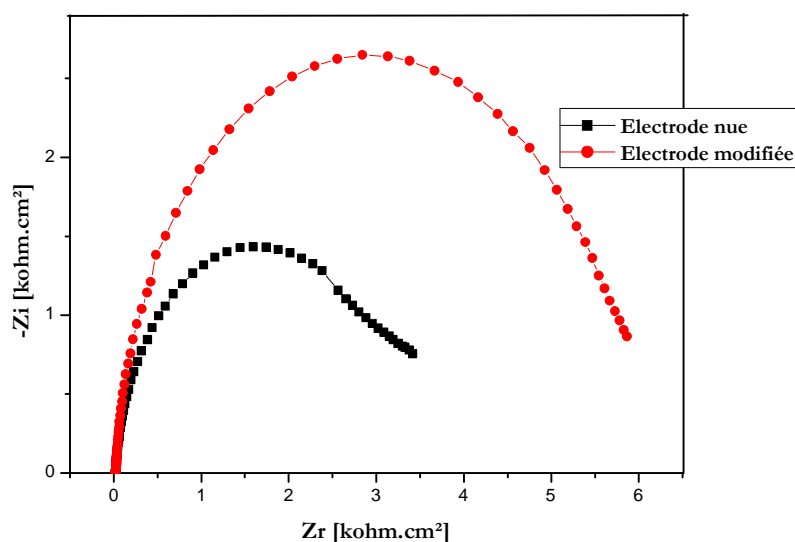


Figure V.7 : Diagrammes de Nyquist pour une électrode du platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus à -200mV vs. SCE. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10mV.

La figure V.7 présente un demi-cercle, caractéristique d'une résistance en parallèle avec une capacité (électrode nue). Le diamètre du demi-cercle de Nyquist augmente nettement après la formation de la couche enzymatique. Cependant, la forme du demi-cercle de la couche enzymatique n'est pas idéale à cause de la différence de longueur entre les molécules de l'enzyme l'albumine de sérum bovin (BSA) et celles de la lipase de *Candida rugosa*.

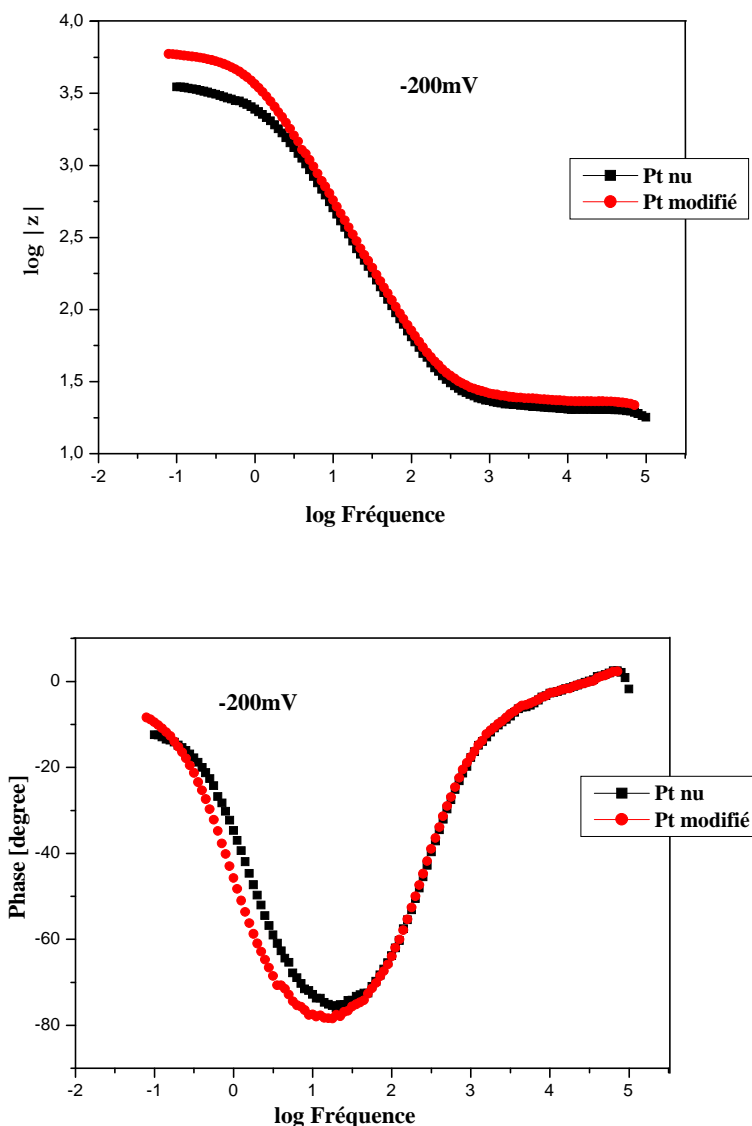


Figure V.8 : Variation de l'impédance représentée dans le diagramme de Bode pour une électrode de platine nu et pour l'électrode de platine modifiée. Bode : Module v.s. fréquence, Bode : Phase v.s. fréquence. Mesures effectuées à -200mV dans le PBS (10 mM, pH 7,4).

En effet, les résultats montrent un changement de spectre lors de dépôt de la couche enzymatique. Sur le diagramme de Nyquist nous remarquons l'apparition d'un demi-cercle caractérisant la couche d'enzyme vers les hautes fréquences. Ceci est vérifié par l'augmentation de la phase qui est présentée sur le diagramme de Bode (figure V.8).

Sur les figures V.9 et 10, nous présentons une simulation expérimentale et théorique des spectres d'impédance en utilisant le circuit dans la figure V.3. Comme on peut le remarquer, la courbe théorique coïncide quasi totalement avec les points expérimentaux soulignant ainsi la pertinence du modèle proposé.

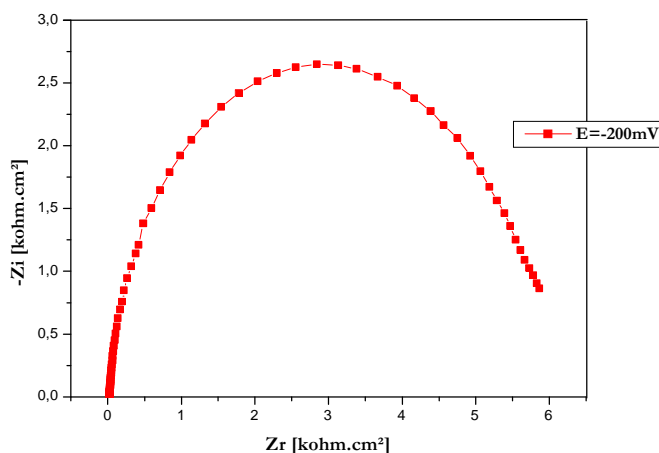


Figure V.9 : Diagramme de Nyquist pour une électrode du Platine modifiée par la couche enzymatique obtenus à -200mV vs. SCE. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10mV.

Pour bien comprendre les phénomènes électrochimiques à l'interface solide/liquide, la modélisation apparaît un outil puissant pour représenter cette interface par un circuit équivalent et donc relier l'impédance complexe mesurée au comportement électrique du système formé par le conducteur, la matrice biosensible et l'électrolyte. Dans notre cas, les spectres Nyquist Z sont ajustés par le logiciel Zview2 (Scribner Associates Inc.) [24]. La figure V.10 montre le fit d'un spectre de Nyquist Z obtenu dans le cas du conducteur en platine fonctionnalisée par le matériau BSA-lipase.

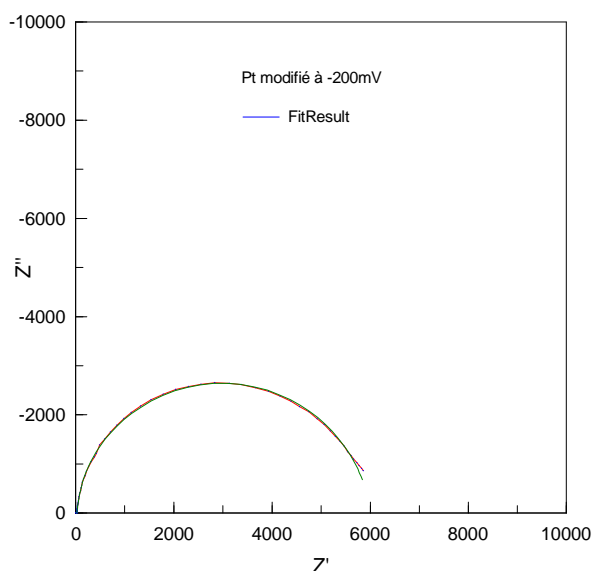


Figure V.10 : Simulation par le circuit de la courbe expérimentale de l'électrode modifiée par le dépôt de la couche enzymatique de la figure V.9 à une polarisation de -0,2V.

Résultats & discussions

Les paramètres de simulation de l'électrode du platine nue et modifiée par la couche enzymatique sont récapitulés dans le tableau V.2.

Tableau V.2 : Paramètres de simulation d'une électrode du platine nue et modifiée par la couche enzymatique, à -200mV. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.4.

Electrode	R_s (Ω)	CPE-T (F)	n	R_{tc} (Ω)	W_0-R (Ω)	W_0-T	W_0-P	χ^2 ($\times 10^{-3}$)
Electrode en platine nue	20,32	41,2	0,93	3136	73025	6518	0,57	2,8
5mgBSA+5mgCRL/Pt	23,6	35,5	0,94	5838	260,5	3,255	0,685	2

II.1.4. Réponse de biocapteur enzymatique à différents potentiels

Les interactions enzyme-polluant ont été suivies par la spectroscopie d'impédance à différents potentiels (0, -100, -200, -300 et -400 mV) dans le but de confirmer les résultats obtenus pour la détermination des conditions électriques optimales de fonctionnement de biocapteur élaboré. Sur la figure V.11 sont reportés pour chaque potentiel appliqué les diagrammes de Nyquist d'une l'électrode modifiée par la couche enzymatique (BSA+CRL) suivit des spectres obtenus après injection de polluant organique (pesticide organochloré qui est le diclofop-méthyle) à différentes concentrations (de 0 à $5,99 \cdot 10^{-12}$ g/L) de celui-ci dilués dans une solution PBS pH 7, 4.

Résultats & discussions

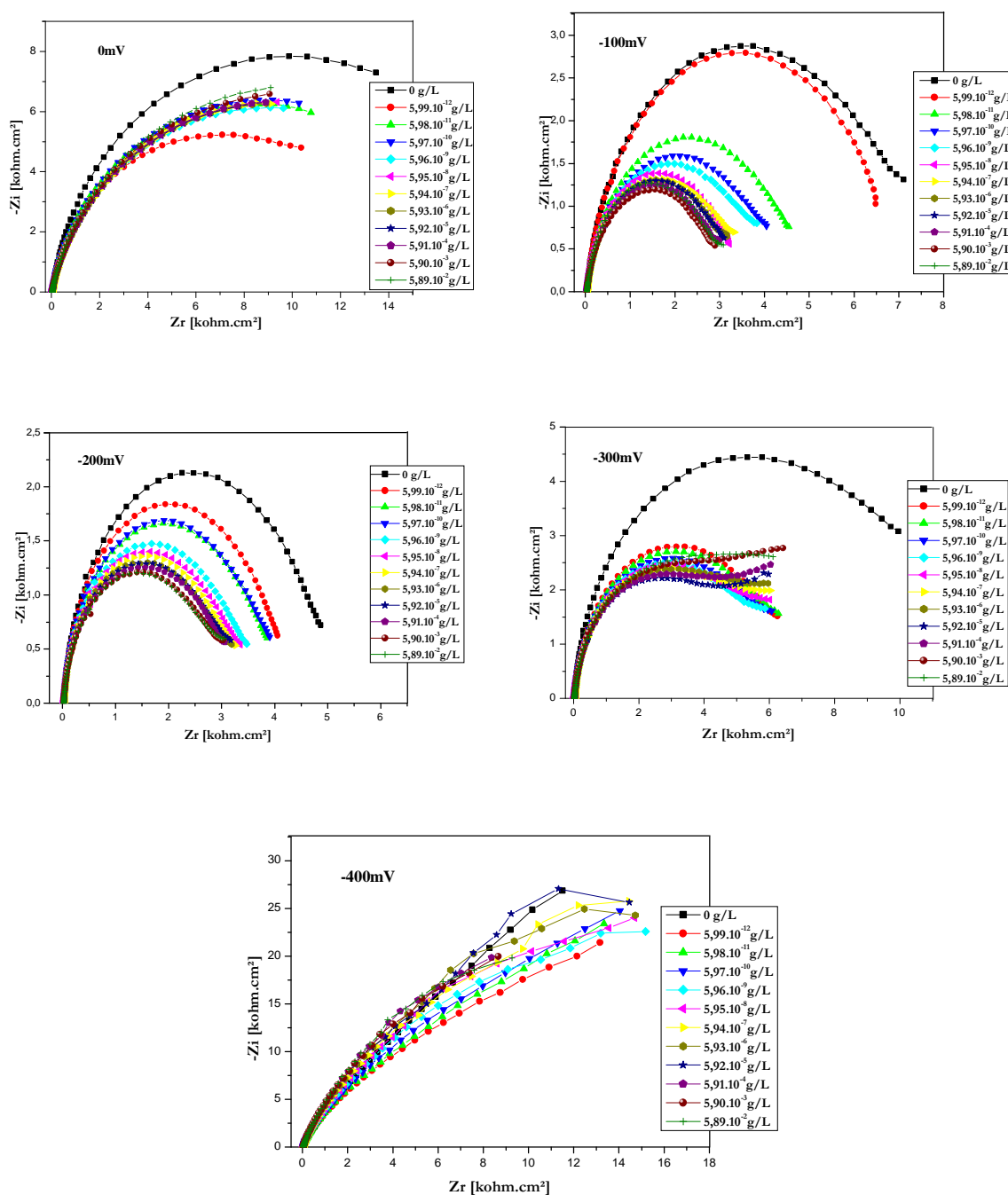


Figure V.11 : Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de diclofenac pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différents potentiels. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10mV.

Tous ces diagrammes ont été modélisés en utilisant le circuit équivalent représenté dans la figure V.4. Les paramètres électriques modélisés sont présentés dans le tableau V.3.

Résultats & discussions

Tableau V.3: Paramètres de simulation des diagrammes de Nyquist pour la couche constituant le BSA+CRL obtenus à différents potentiels. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.4.

Potentiel (mV)	Concentration g/L	Rs (Ω)	CPE-T (μF)	CPE-P	R _{tc} (Ω)	W-R (Ω)	W-T	W-P	X ²
0	0	35,80	4,09.10 ⁻⁵	0,91	12369	6278	1,43	0,43	0,0012
	5,99.10 ⁻¹²	36,34	4,58.10 ⁻⁵	0,89	11017	2559	2,29	0,54	0,0025
	5,98.10 ⁻¹¹	34,53	4,81.10 ⁻⁵	0,89	11460	5123	2,84	0,44	0,0023
	5,97.10 ⁻¹⁰	34,30	5,05.10 ⁻⁵	0,88	9388	9183	4,37	0,36	0,0020
	5,96.10 ⁻⁹	33,68	5,43.10 ⁻⁵	0,88	7925	9296	3,15	0,37	0,0018
	5,95.10 ⁻⁸	34,00	4,92.10 ⁻⁵	0,90	3276	12007	2,07	0,42	0,0012
	5,94.10 ⁻⁷	31,89	5,92.10 ⁻⁵	0,87	5942	11137	2,31	0,36	0,0017
	5,93.10 ⁻⁶	31,95	5,98.10 ⁻⁵	0,88	4606	12368	2,24	0,35	0,0003
	5,92.10 ⁻⁵	32,34	6,25.10 ⁻⁵	0,88	5785	10643	1,94	0,38	0,0017
	5,91.10 ⁻⁴	32,33	6,24.10 ⁻⁵	0,88	5752	10890	2,06	0,36	0,0018
	5,90.10 ⁻³	32,82	6,38.10 ⁻⁵	0,88	6857	9944	1,91	0,39	0,0017
5,90.10 ⁻²	31,93	6,73.10 ⁻⁵	0,88	8703	7965	1,71	0,43	0,0021	
-100	0	34,72	3,52.10 ⁻⁵	0,90	6902	212,7	1,46	0,74	0,0028
	5,99.10 ⁻¹²	37,71	3,37.10 ⁻⁵	0,90	6637	52470	4,35.10 ⁷	0,39	0,0020
	5,98.10 ⁻¹¹	36,35	4,30.10 ⁻⁵	0,88	4364	1,03.10 ⁵	2,12.10 ⁷	0,36	0,0030
	5,97.10 ⁻¹⁰	33,52	4,94.10 ⁻⁵	0,88	3917	1,19. 10 ⁶	1,27.10 ⁷	0,53	0,0040
	5,96.10 ⁻⁹	32,21	5,24.10 ⁻⁵	0,88	3687	2,62. 10 ⁶	7,52.10 ⁶	0,58	0,0040
	5,95.10 ⁻⁸	33,29	4,59.10 ⁻⁵	0,88	3312	4216	29,28	0,94	0,0028
	5,94.10 ⁻⁷	33,14	5,33.10 ⁻⁵	0,88	3226	17808	529,5	0,67	0,0030
	5,93.10 ⁻⁶	31,81	5,46.10 ⁻⁵	0,88	3151	22616	293,4	0,82	0,0038
	5,92.10 ⁻⁵	31,92	5,50.10 ⁻⁵	0,88	3143	22924	216,9	0,89	0,0038
	5,91.10 ⁻⁴	32,75	5,40.10 ⁻⁵	0,88	2982	14242	152,8	0,85	0,0030
	5,91.10 ⁻³	31,57	5,44.10 ⁻⁵	0,88	2869	9528	161,5	0,79	0,0040
5,90.10 ⁻²	31,50	5,11.10 ⁻⁵	0,89	3006	18384	256,4	0,85	0,0040	
-200	0	23,57	3,76.10 ⁻⁵	0,93	4821	2464	165,2	0,69	0,0040
	5,99.10 ⁻¹²	23,71	3,88.10 ⁻⁵	0,93	4088	3810	28,27	0,93	0,0030
	5,98.10 ⁻¹¹	23,58	3,94.10 ⁻⁵	0,93	3704	2514	83,12	0,54	0,0010
	5,97.10 ⁻¹⁰	23,06	3,94.10 ⁻⁵	0,93	3787	9,42.10 ⁹	1,41.10 ¹²	0,63	0,0030
	5,96.10 ⁻⁹	22,91	4,02.10 ⁻⁵	0,92	3312	5,54.10 ⁷	5,28.10 ⁸	0,61	0,0030
	5,95.10 ⁻⁸	22,72	4,06.10 ⁻⁵	0,92	3137	1,29.10 ⁵	80632	0,54	0,0030
	5,94.10 ⁻⁷	22,44	4,11.10 ⁻⁵	0,92	3042	1,68.10 ⁵	1,23.10 ⁵	0,55	0,0030
	5,93.10 ⁻⁶	22,55	4,15.10 ⁻⁵	0,92	2904	1,65.10 ⁵	2,39.10 ⁵	0,50	0,0030
	5,92.10 ⁻⁵	22,32	4,27.10 ⁻⁵	0,92	2877	1,62.10 ⁵	2,02.10 ⁵	0,50	0,0030
	5,91.10 ⁻⁴	22,47	4,26.10 ⁻⁵	0,92	2814	1,05.10 ⁵	82071	0,50	0,0030
	5,91.10 ⁻³	22,23	4,30.10 ⁻⁵	0,92	2658	19917	5261	0,45	0,0030
5,91.10 ⁻²	22,40	4,28.10 ⁻⁵	0,92	2587	17802	6732	0,41	0,0011	

Résultats & discussions

-300	0	25,38	$3,38.10^{-5}$	0,93	9490	1516	1,92	0,58	0,0022
	$5,99.10^{-12}$	25,36	$3,47.10^{-5}$	0,93	6090	3380	14,49	0,65	0,0021
	$5,98.10^{-11}$	25,54	$3,45.10^{-5}$	0,93	5764	5353	41,19	0,50	0,0020
	$5,97.10^{-10}$	25,19	$3,48.10^{-5}$	0,93	5421	11905	186,30	0,48	0,0022
	$5,96.10^{-9}$	25,52	$3,52.10^{-5}$	0,93	5197	12270	121,7	0,51	0,0021
	$5,95.10^{-8}$	25,29	$3,56.10^{-5}$	0,93	5177	1926	3,04	0,55	0,0021
	$5,94.10^{-7}$	25,16	$3,57.10^{-5}$	0,93	4927	2361	3,05	0,52	0,0022
	$5,93.10^{-6}$	25,43	$3,63.10^{-5}$	0,93	4782	2908	3,64	0,49	0,0022
	$5,92.10^{-5}$	24,72	$3,65.10^{-5}$	0,93	4563	2694	2,81	0,56	0,0023
	$5,91.10^{-4}$	24,77	$3,66.10^{-5}$	0,93	4551	3276	3,24	0,53	0,0023
	$5,91.10^{-3}$	24,74	$3,66.10^{-5}$	0,93	4729	3946	3,27	0,51	0,0022
$5,90.10^{-2}$	24,49	$3,71.10^{-5}$	0,93	4533	5697	7,471	0,43	0,0023	
-400	0	36,3	$3,90.10^{-5}$	0,92	217933	86433	3,82	0,52	0,0026
	$5,99.10^{-12}$	36,41	$3,82.10^{-5}$	0,92	17017	64082	6,68	0,46	0,0029
	$5,98.10^{-11}$	34,86	$3,77.10^{-5}$	0,92	20629	55979	4,25	0,50	0,0032
	$5,97.10^{-10}$	34,79	$3,77.10^{-5}$	0,92	22600	55010	5,36	0,50	0,0032
	$5,96.10^{-9}$	34,72	$3,74.10^{-5}$	0,93	24978	54978	54962	3,92	0,0038
	$5,95.10^{-8}$	34,61	$3,77.10^{-5}$	0,93	21406	72661	9,54	0,37	0,0019
	$5,94.10^{-7}$	35,36	$3,83.10^{-5}$	0,93	27736	56621	4,20	0,43	0,0044
	$5,93.10^{-6}$	32,98	$3,86.10^{-5}$	0,93	34794	52011	3,34	0,50	0,0021
	$5,92.10^{-5}$	32,59	$3,99.10^{-5}$	0,93	3896	42926	2,38	0,51	0,0030
	$5,91.10^{-4}$	32,93	$4,09.10^{-5}$	0,93	55072	27690	1,905	0,69	0,0065
	$5,91.10^{-3}$	32,94	$4,12.10^{-5}$	0,93	50614	32914	2,96	0,45	0,0060
$5,91.10^{-2}$	33,32	$4,16.10^{-5}$	0,93	73324	6520	2,236	0,94	0,0061	

Pour chacun des potentiels, les résultats montrent que la résistance de transfert de charge R_{tc} diminue clairement avec l'augmentation de la concentration après l'injection de diclofop-méthyle ce qui prouve l'interaction spécifiques entre le polluant organique (le diclofop-méthyle) et l'enzyme qui est immobilisée sur la surface de l'électrode en platine et perturbe les propriétés électriques de la couche enzymatique.

Par ailleurs, les spectres d'impédance obtenus à -400 mV indiquent que la résistance de transfert de charge R_{tc} augmente clairement avec l'augmentation de la concentration, et indiquent un comportement de diffusion par rapport aux autres potentiels, donc, nous ne pouvons pas observer la résistance de transfert de charge puisque l'impédance de Warburg est très élevée par rapport à cette dernière.

Par contre, à -200 mV, nous avons obtenu des faibles impédances de Warburg qui sont attribuées à la diminution du mouvement ionique de l'interface couche enzymatique-électrolyte.

Afin d'étudier la réponse de biocapteur élaboré, pour différents potentiels DC, la modélisation de tous ces diagrammes de la figure V.11 en utilisant le circuit équivalent représenté dans figure V.4 montre que la résistance de transfert de charge diminue avec l'augmentation de la concentration de polluant organique (le diclofop-méthyle).

II.1.5. Réponses de biocapteurs à -200mv

La réponse de biocapteur enzymatique élaboré a été suivie au cours du temps lors d'injections successives de diclofop-méthyle comme le montre la figure V.12.

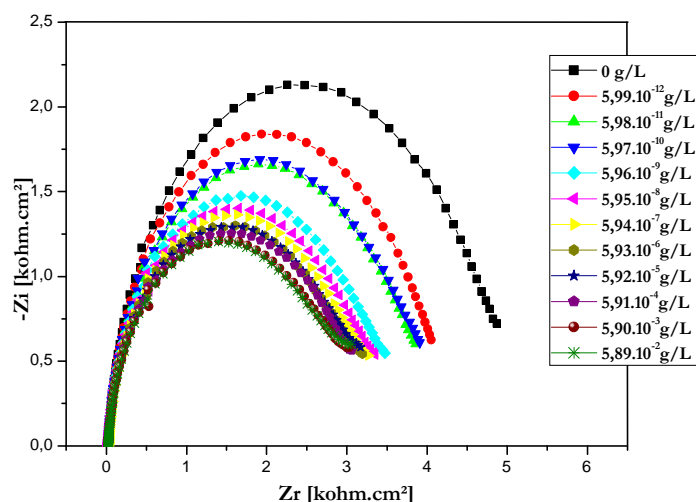


Figure V.12 : Spectres d'impédance pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique suivie de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle obtenus à -200mV vs. SCE. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10mV.

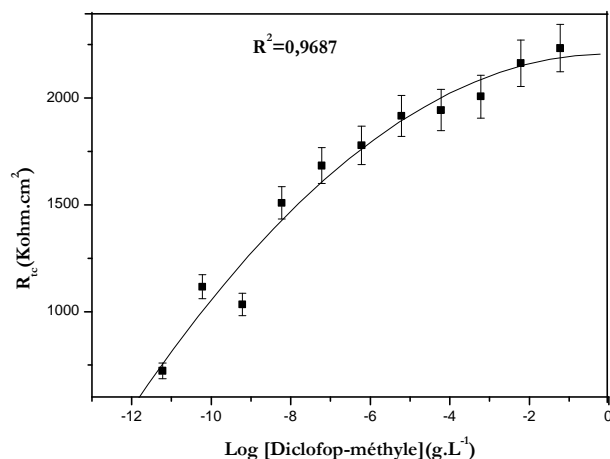


Figure V.13 : Variation de la résistance du transfert suite à l’injection de différentes concentrations du diclofop-méthyle pour le Pt.

La figure V.12 présente les variations des spectres d’impédance pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique suivie de l’injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle de $5,99.10^{-12}$ g/L à $5,90.10^{-2}$ g/L obtenus à -200 mV vs. SCE. Ces mesures d’impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 7,4) avec une amplitude de 10mV et permet de déterminer la résistance de transfert de charge de la membrane avant et après l’injection. Ce qui mène au traçage de courbe de calibration correspondant à la variation de la résistance de transfert de charge (Rtc) en fonction des différentes concentrations de diclofop-méthyle dans la solution de PBS pour le potentiel -200mv.

La variation de la résistance de transfert de charges a été calculée à partir de l’équation suivante :

$$\Delta R_{tc} = R_{tc}^{C=0} - R_{tc}^C$$

Ou $R_{tc}^{C=0}$ et R_{tc}^C représente la résistance de transfert de charge de la membrane obtenue avant et après l’injection de diclofop-méthyle, respectivement. Nous avons tracé la courbe de variation de ΔR_T en fonction du logarithme décimale de la concentration en diclofop-méthyle.

La figure V.13 présente la courbe d’étalonnage résultant du suivi de la réponse impédancemétrique de l’électrode modifiée par la couche enzymatique (BSA+CRL). Cette courbe a l’allure typique des courbes obtenues pour des biocapteurs impédancemétriques à enzyme : la première partie de la courbe (faibles concentrations en diclofop-méthyle)

augmente linéairement tandis que dans la seconde partie ; la réponse de biocapteur est presque constante et correspond à la saturation de la couche d'enzyme.

II.2. Les paramètres influençant sur la réponse de biocapteur enzymatique élaboré

II.2.1. L'effet du pH du milieu

Dans le premier chapitre, nous avons présenté la définition d'un biocapteur, celui-ci est constitué de deux composants: le transducteur et le biorécepteur. On peut dire que le capteur devient un biocapteur si un biorécepteur est fixé sur sa surface autrement dit le capteur est biofonctionnalisé.

Pour étudier le fonctionnement du biocapteur, le choix de l'électrolyte support joue un rôle crucial dans la détermination de ses performances analytiques. Soldatkin et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la nature de l'électrolyte support et de son pouvoir tampon sur le fonctionnement du biocapteur [25]. Dans notre travail, l'électrolyte support sélectionné est un tampon PBS à 10mM.

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

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

La figure V.14 montre les spectres d'impédance du système Pt/CRL-BSA obtenu à différentes pH du milieu pour différentes concentrations en diclofop-méthyle.

Résultats & discussions

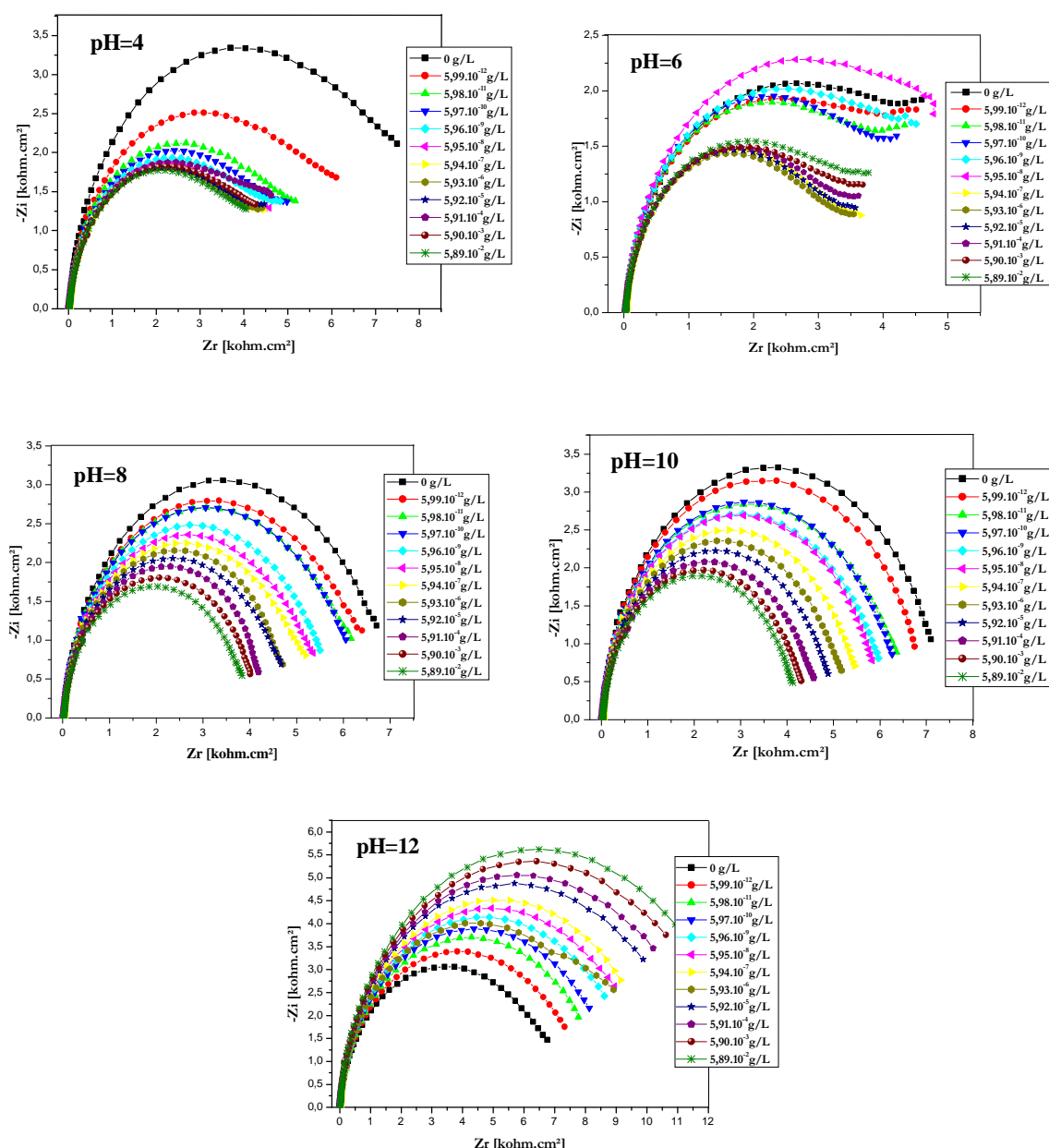


Figure V.14 : Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différentes valeurs de pH du milieu. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM) avec une amplitude de 10mV.

Pour les valeurs de pH de milieu de 4 à 10, nous observons une diminution du diamètre du spectre d'impédance avec l'augmentation de la concentration de diclofop-méthyle. La diminution des spectres impédancemétriques indiquant l'immobilisation de la couche d'enzyme sur l'électrode modifiée. Egalement, nous remarquons que les diamètres des spectres d'impédance diminuent avec l'augmentation de [diclofop-méthyle] dans le PBS, ce qui est dû à l'interaction spécifique entre l'enzyme et le diclofop-méthyle.

Par ailleurs, à pH=4, nous remarquons une faible diminution du diamètre du spectre d'impédance avec l'augmentation de [diclofop-méthyle] dans le PBS indiquant la saturation de l'enzyme.

Tandis que, à pH=12, nous remarquons une augmentation du diamètre du spectre d'impédance correspondant à l'adsorption de diclofop-méthyle sur la couche enzymatique indiquant la dénaturation de l'enzyme. De plus, nous remarquons que les spectres d'impédances correspondant à un pH alcalin ne présentent pas le phénomène de diffusion vers les basses fréquences. Ceci indique l'inactivation de l'enzyme par un blocage des sites spécifiques de la couche enzymatique

Vanessa et al. (2008) ont montré que le diclofop-méthyle s'hydrolyse rapidement dans les milieux alcalins pour donner le diclofop-acide. La solubilité de ce dernier dans l'eau peut diminuer leur toxicité par rapport au diclofop-méthyle [28, 29].

Les lipases sont catalytiquement actives seulement à certaines valeurs de pH. Le pH agit non seulement sur l'activité enzymatique mais aussi sur la solubilité des réactifs dans le milieu, ainsi que sur le partage de l'enzyme entre la phase aqueuse et l'interface. Le pH optimal pour la plupart lipases est compris entre 7,0 et 9,0, bien que les lipases puissent être stables sur une large plage d'acide et des valeurs de pH alcalines, d'environ 4 à 10 [30].

Les lipases microbiennes montrent une stabilité profonde autour de pH 6,0-7,5 avec beaucoup de stabilité à pH acide allant jusqu'à 4,0 et un pH alcalin allant jusqu'à 8,0. Par exemple, lipase de *Pseudomonas* est active de façon optimale à pH 7,0 et à pH stable de 5,0 à 10,5 [30]. Le pH optimal de la lipase de *Candida rugosa* est de 7,1 [30, 31].

Nos résultats confirment les résultats obtenus par Vanessa et ces collaborateurs et nous a permis de tirer la valeur optimale de pH du milieu à pH=8 pour élaborer un biocapteur de diclofop-méthyle présentant des performances analytiques satisfaisantes.

Par ailleurs, tous ces diagrammes ont été modélisés en utilisant le circuit équivalent représenté sur la figure V.4. La variation des paramètres électriques obtenus sont présentées sur la figure V.15.

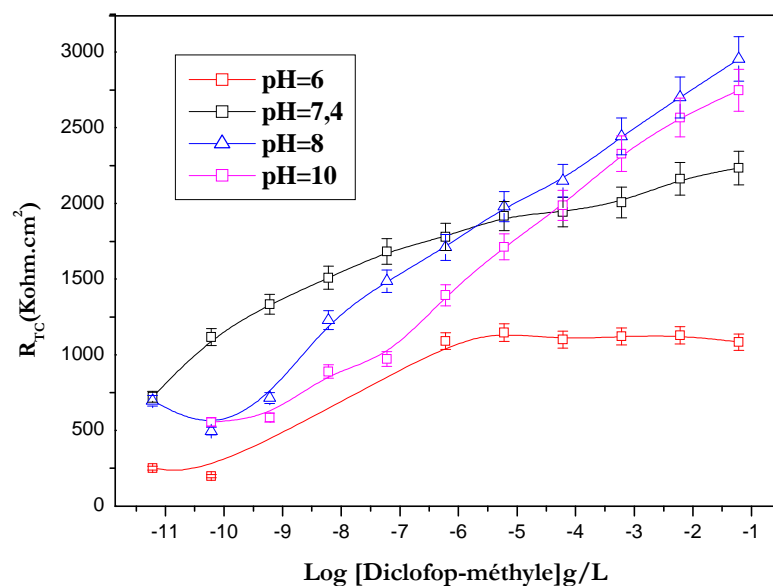


Figure V.15 : Courbe de calibration présentant l'influence du pH du milieu sur la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations de diclofop-méthyle à -200mV. Détection effectuée dans le PBS (10 mM).

Les figures V.14 et V.15 montrent bien la variation de la réponse du biocapteur élaboré à différentes valeurs de pH du milieu d'étude. D'après ces figures, on peut voir que la réponse optimale du biocapteur est observée pour un pH légèrement alcalin.

Dans le milieu alcalin on a observé que plus pH est élevé du 6 à 8, plus l'activité de l'enzyme a été obtenue par contre ; dans le milieu acide la réponse du biocapteur est presque stable. La valeur optimale de pH est égale à 8.

II.2.2. Etude de l'influence de la température

Il est connu que la vitesse de la plupart des réactions enzymatiques s'élève quand la température augmente. Ce phénomène peut déformer l'information obtenue lorsque l'on réalise des mesures à température non contrôlée. C'est la raison pour laquelle l'influence de la température doit être prise en compte si l'on réalise des mesures sur site.

Pour ce fait, on mesure le signal de sortie de biocapteur immergé dans un tampon PBS en augmentant puis en diminuant la température.

Résultats & discussions

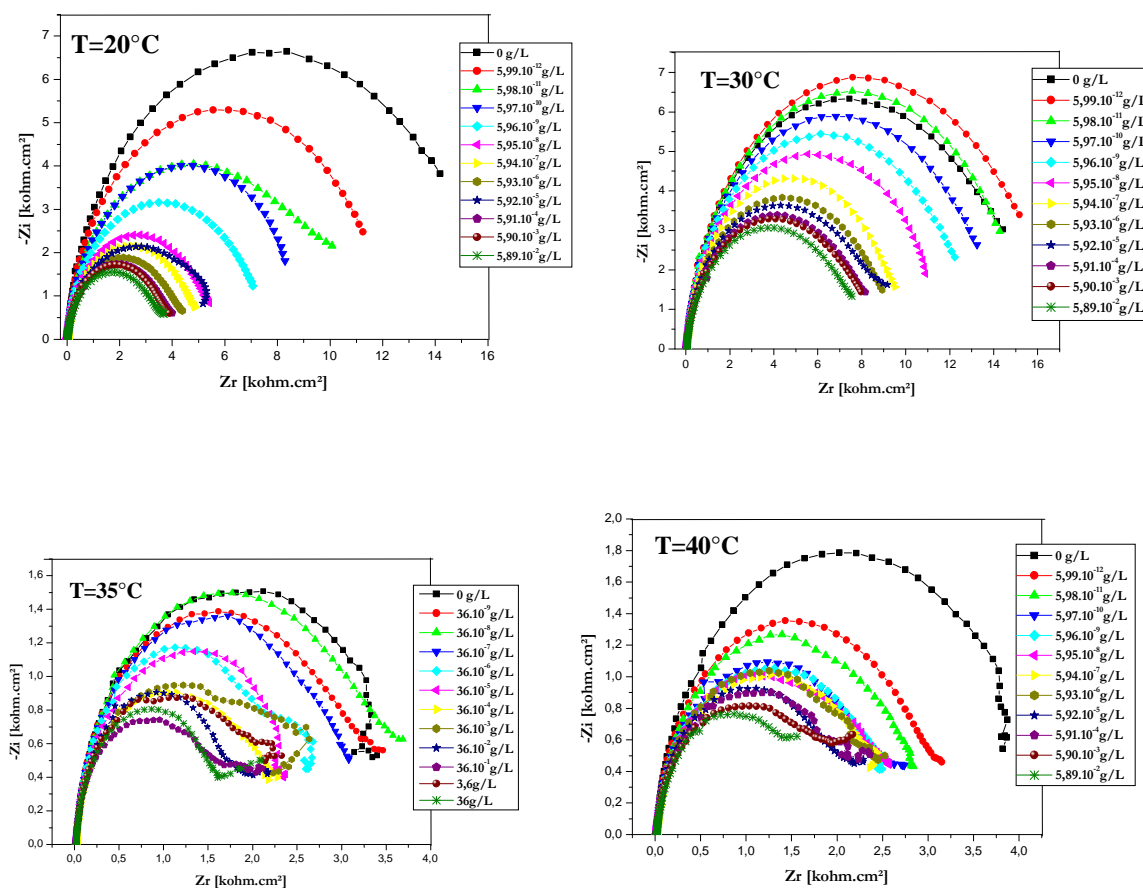


Figure V.16 : Spectres d'impédance obtenus avant et après injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle pour une électrode modifiée avec la membrane enzymatique obtenus à différentes valeurs de la température du milieu. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM) avec une amplitude de 10mV.

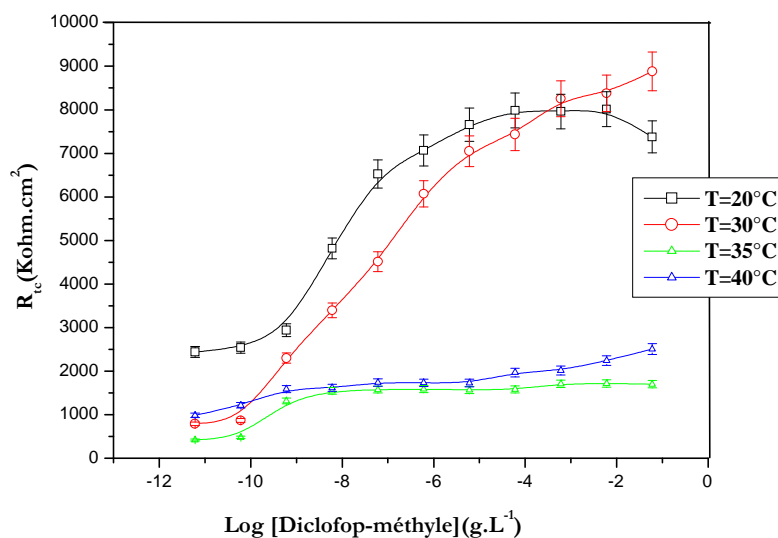


Figure V.17 : Courbe de calibration présentant l'influence de la température du milieu sur la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations de diclofop-méthyle à -200mV. Détection effectuée dans le PBS (10 mM).

En général, les lipases sont connues actifs sur une large plage de températures. Les lipases d'origines animales et végétales sont généralement moins thermostables que les lipases microbiennes extracellulaires. La lipase pancréatique perd son activité à des températures supérieures à 40°C [30]. Tandis que la lipase la lipase de *Candida rugosa* est stable à une température comprise entre 30 et 35°C [31].

Il est montré dans les figures V.16 et V.17 que la réponse du biocapteur dépend linéairement de la température lorsque le biocapteur est dans un tampon PBS. La réponse ne dépend pas de la façon dont varie la température (augmentation ou diminution). La seule différence en ce qui concerne ces réponses (figure V.16 T=35°C et 40°C) peut être attribuée à l'altération de la couche enzymatique.

Nous observons une augmentation de la réponse du biocapteur lorsque la température passe de 20 à 30°C puis une diminution pour des températures supérieures à 30°C en raison de la dénaturation thermique de la lipase de *Candida rugosa*.

De nombreux travaux consacrés à l'activité de l'hydrolyse des huiles végétales par la lipase de *Candida rugosa* montrent une valeur de température optimale proche de 30°C [32].

Pour un résultat précis sur l'analyte à déterminer (le diclofop-méthyle), on doit donc prendre en compte l'influence de la température. Pour ce faire, on peut maintenir la température constante par un thermostat en laboratoire ou rajouter sur le circuit de mesure un système de compensation thermique. La température optimale pour ce biocapteur est de 30°C.

II.3. Caractérisation de la couche enzymatique par la voltamétrie cyclique

II.3.1. Le suivi du processus d'oxydoréduction par voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique d'une espèce électro-active comme $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{4-}/\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-}$ est un excellent outil pour évaluer la cinétique électronique de l'interface d'une électrode.

Quand la surface d'une électrode est modifiée par l'addition des couches enzymatiques, on peut examiner les changements du comportement de l'électrode à l'interface métal/électrolyte en utilisant le ferrocyanure comme espèce électro-active et observer la cinétique de transfert électronique qui sera par conséquent perturbée.

Les propriétés électrochimiques de chaque couche constituant la biomembrane ont été analysées par la voltamétrie cyclique. En effet, chaque couche est caractérisée par ses

propriétés de transfert électronique en présence du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. La figure V.18 présente la courbe I (V) d'une électrode de platine nu successivement avec une électrode modifiée par une couche d'Albumine Bovine Sérique (BSA), et une autre fonctionnalisée par une couche d'Albumine Bovine Sérique (BSA) et de la Lipase de *Candida rugosa* (CRL). les mesures ont été effectués en présence de couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

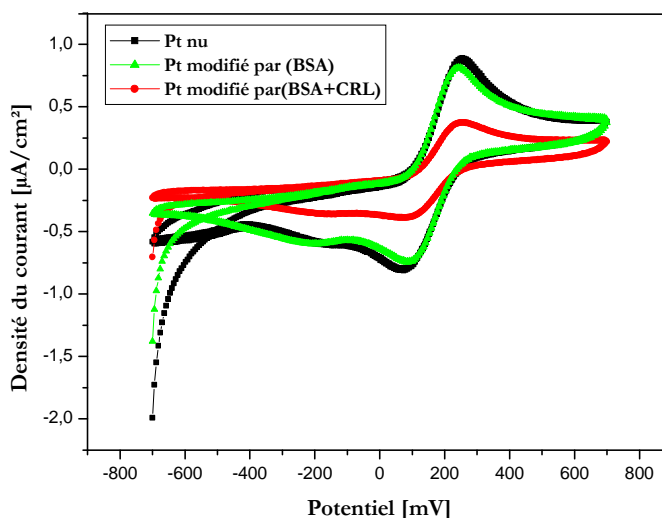


Figure V.18 : Voltamogrammes des différentes couches constituant le biomembrane déposé sur une électrode de platine. Mesures effectuées dans 5mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dans le PBS (10 mM, pH 8) entre -0.7 et 0.7 V, avec une vitesse de balayage de potentiel à 100 mV/s .

Le voltamogramme correspondant au platine nu (électrode nue) montre un large signal où le potentiel d'oxydation est dans la gamme de 249,740 mV et celui de la réduction à 77,920 mV/ ECS. La présence d'une couche d'Albumine Bovine Sérique (BSA) entraîne une diminution du courant correspondant aux pics d'oxydoréduction et à la variation du potentiels d'oxydation à 244,70 mV/ESC et celui de réduction à 77,142 mV/ESC. En effet, cette couche favorise le transfert d'électron à l'interface de l'électrode du platine, donc elle augmente la conductivité du système d'où l'augmentation de la densité de transfert de charge. En plus, la présence d'enzyme (BSA) permet d'augmenter la surface spécifique.

La formation de la couche d'enzyme sur la surface de platine a engendré une diminution dans les pics du courant et un petit décalage dans les pics du potentiel relatif au couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. La voltamétrie cyclique montre la formation de la couche enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) sur la surface de platine. En revanche, la couche enzymatique, constituée des particules d'oxyde de fer, possède une certaine

conductivité ce qui explique l'apparition des deux pics d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ l'interface n'étant pas entièrement bloquante du point de vue électrique.

II.3.2. Effet des vitesses de balayage sur le comportement de l'enzyme immobilisée

La figure V.19 montre l'apparition des deux pics d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, cette apparition des pics désigne le phénomène de transfert direct d'électrons à l'interface de l'électrode relatif à l'immobilisation de l'enzyme à des vitesses de balayage différentes. Le rapport des courants cathodique et anodique est voisin de l'unité $I_{pc}/I_{pa} \approx 1$. Les potentiels de pic cathodique et anodique décalent très légèrement dans des directions opposées avec le changement de vitesse de balayage. Comme le montre la figure V.19 une illustration typiques des voltammogrammes cycliques de capteur enzymatique dans une solution de PBS (10 mM, pH 8) contenant 5mM de couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ à des vitesses de balayage différentes. Le résultat obtenu par cette méthode de crête à crête (peak-to-peak) ; montre que la séparation des pics du courants à différentes vitesses de balayage est similaire à ceux obtenus par la mesure d'impédance (méthode suivante). Le large pic E_{pa} / E_{pc} est probablement imputable à l'immobilisation des molécules d'enzyme dans diverses orientations [33].

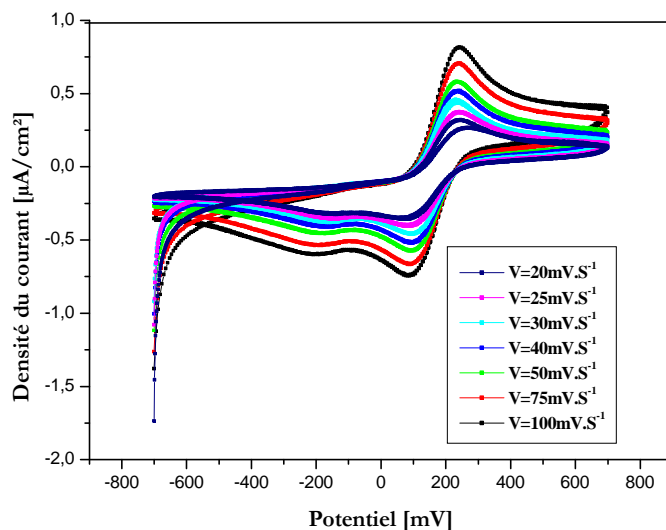


Figure V.19 : Voltammogrammes pour une électrode de platine modifiée par la biomembrane (BSA+CRL) à différentes vitesses de balayage de potentiel $V = 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100$ mV/s. Mesures effectuées dans 5mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dans le PBS (10 mM, pH 8) entre -0.7 et 0.7 V.

Résultats & discussions

Tableau V.4 : Paramètres d'analyse des pics des courants pour une électrode de platine modifiée par la biomembrane (BSA+CRL) à différentes vitesses de balayage de potentiel.

Vitesse (mV.S ⁻¹)	20	25	30	40	50	75	100
Ea(mV)	228,500	234,501	228,001	235,000	230,001	236,001	242,000
Ec(mV)	82,001	82,001	94,000	97,500	94,000	97,001	94,000
Ia(μA.cm ²)	0,320	0,375	0,438	0,515	0,579	0,705	0,816
Ic(μA.cm ²)	-0,358	-0,404	-0,457	-0,512	-0,570	-0,665	-0,738

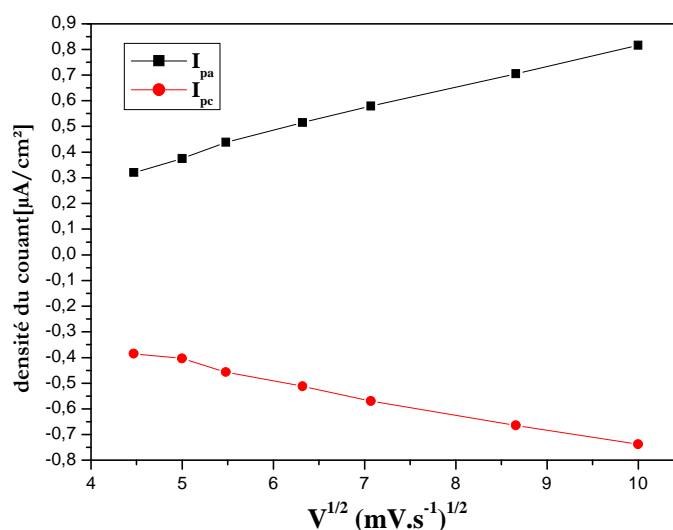


Figure V.20 : Représentations du courant anodique et cathodique en fonction de la racine carrée des vitesses de balayage de potentiel pour une électrode de platine modifiée par la biomembrane (BSA+CRL) à différentes vitesses de balayage de potentiel $V = 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100$ mV/s. Mesures effectuées dans 5mM de $K_3 [Fe(CN)_6] / K_4 [Fe(CN)_6]$ dans le PBS (10 mM, pH 8) entre -0.7 et 0.7 V.

La relation linéaire entre les pics de courant d'oxydo-réduction et la racine carrée de la vitesse de balayage ($v^{1/2}$) (figure V.20) indique que les pics du courant sont contrôlés par le phénomène de la diffusion. Ainsi, les formes oxydées et réduites de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ dans la solution ne sont pas adsorbés sur la surface de platine modifié.

II.3.3. Caractérisation de la réponse du biocapteur enzymatique par la voltamétrie cyclique

L'effet de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle sur la réponse du l'électrode modifiée par la couche enzymatique de BSA+CRL a été étudié par la voltamétrie cyclique dans les conditions optimales mentionnées précédemment.

Afin de vérifier l'influence de diclofop-méthyle sur la réponse de l'électrode modifiée par le dépôt de la couche enzymatique composé de BSA et de lipase de *Candida rugosa* (CRL). Différentes concentrations de diclofop-méthyle ont été ajoutées à la cellule électrochimique (figure V.21).

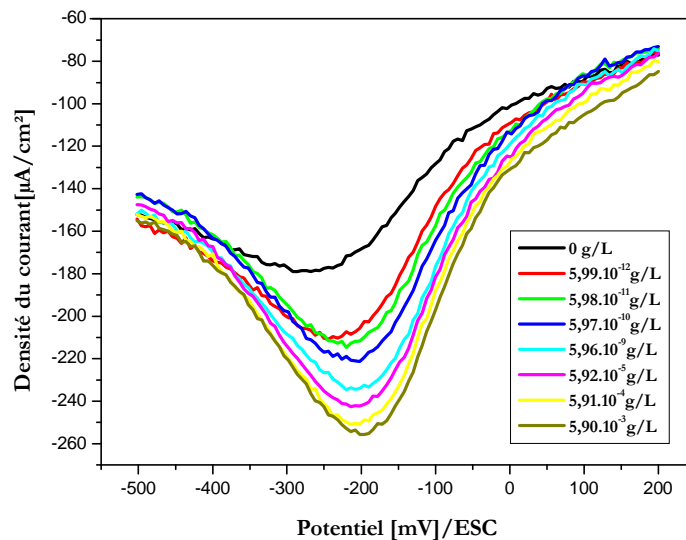


Figure V.21 : Influence de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle sur les voltammogrammes pour une électrode de platine modifiée par la biomembrane (BSA+CRL). Mesures effectuées dans le PBS (10 mM, pH 8) entre -0.7 et 0.7 V. Vitesse de balayage de 100 mV/s.

L'injection de diclofop-méthyle dans la cellule électrochimique a créé un changement des voltammogrammes de l'électrode fonctionnalisée par la couche enzymatique. En effet un déplacement des pics du courant de réduction a été observé dans les voltammogrammes de la figure V.21.

Le déplacement des sommets des pics du courant de réduction du à la relation linéaire entre les pics cathodiques et la concentration en diclofop-méthyle dans la gamme de [5,99.10⁻¹² - 5,90.10⁻⁶ g.L⁻¹], cela est vérifié par la courbe d'étalonnage de la figure V.22. L'équation de régression linéaire et le coefficient de corrélation sont les suivants :

$$I_{pc} = 86,5554 + 4,87433 \times \log [C] ; R^2 = 0,9939$$

D'après la figure V.22 on voit que la courbe d'étalonnage le pic I_{pc} montre un meilleur coefficient de corrélation et une limite de détection inférieure en raison de la cinétique de la réaction de diclofop-méthyle. Les valeurs de courant de l'état d'équilibre ont augmenté de façon linéaire avec la concentration du diclofop-méthyle jusqu'à 5,90.10⁻⁶ g.L⁻¹ avec un

coefficient de corrélation de 0,9939 (figure V.22). Ces résultats indiquent que le biocapteur est plus sensible au diclofop-méthyle.

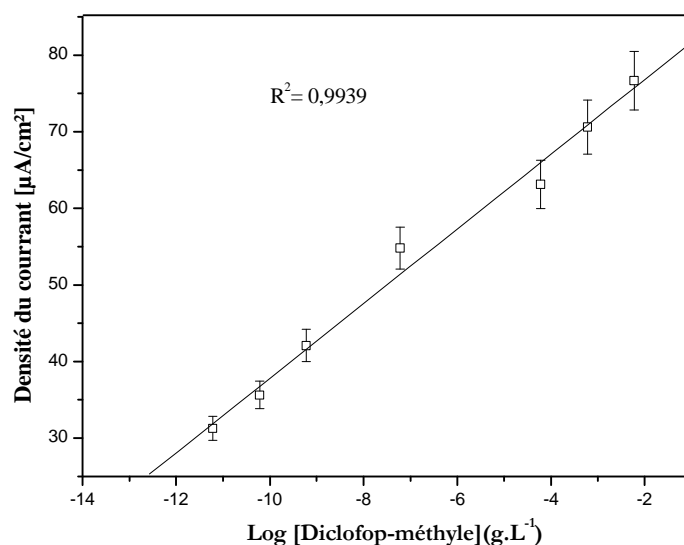


Figure V.22 : Variation de la densité du courant suite à l'injection de différentes concentrations du diclofop-méthyle dans le tampon PBS (10mM, pH 8) .Vitesse de balayage de 100 mV/s.

La haute sensibilité du capteur peut être due à la haute densité et l'activité catalytique de l'enzyme qui est bien conservée dans la matrice organique de BSA et du glutaraldéhyde (GA). Comme il est connu que la réponse en courant des biocapteurs enzymatiques a été influencée par la quantité et l'activité de biomatériaux à la surface de l'électrode [33].

II.4.Caractérisation de la couche enzymatique par Microscope Optique (MO)

La morphologie des couches enzymatiques préparées par réticulation de la lipase de *Candida rugosa* par le glutaraldéhyde en présence d'une protéine inerte l'albumine de sérum bovin (BSA) a été examinée par le microscope optique (MO).

La photo (x 100), figure V.23, des électrodes modifiées démontre bien la présence d'un tapis enzymatique recouvrant la surface de l'électrode en platine. L'image prise par le microscope optique montre la distribution irrégulière de biorécepteurs immobilisés par co-réticulation sur la surface de l'électrode en platine.

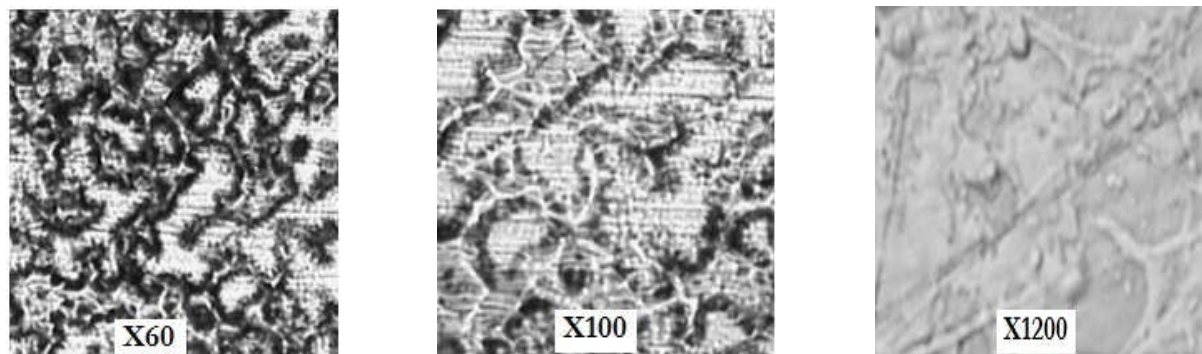


Figure V.23 : Photos (x60, x100 et x1200) de l'électrode de platine modifiée par une couche enzymatique immobilisée dans une matrice organique composé de BSA et de GA.

Plusieurs électrodes, observées au microscope optique, ont donné le même résultat. Cette expérience a permis d'optimiser le dépôt de la couche enzymatique afin d'obtenir les meilleures conditions permettant de se rapprocher d'une monocouche d'enzymes. Les couches enzymatiques les plus homogènes ont été obtenues pour un mélange de 15 μ l du mélange enzyme-BSA.

Les techniques que nous avons utilisées pour analyser les polluants en question sont principalement la spectroscopie d'impédance, la voltamétrie cyclique. Pour la validation des méthodes proposées, nous avons comparé nos résultats à ceux trouvés en utilisant les méthodes conductimétriques de référence.

II.5. La détection de polluant organique par un biocapteur enzymatique conductimétrique

La conductivité électrique des solutions est, directement liée à la présence de charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions dans la solution. En effet, la conductivité des liquides est le résultat de la dissociation de la substance dissoute, l'électrolyte, en ions et la migration de ces derniers sous l'effet d'un champ électrique. En présence du champ électrique, les électrolytes se dissocient pour donner des ions ou des groupes d'ions. Quand l'électrode est soumise à une différence de potentiel, un champ électrique se crée dans l'électrolyte ce qui provoque le mouvement de ces ions (les anions sont attirés par la cathode alors que les cations vont vers l'anode).

Le suivi de la conductance d'une solution a été à la base utilisé comme moyen de détermination des vitesses de réaction. En effet, ces capteurs conductimétriques permettent de mesurer les changements de conductance dus à la migration d'ions. Étant donné que plusieurs réactions enzymatiques ont comme conséquence un changement de la concentration totale

d'ions elles sont bien adaptées pour leur utilisation en tant qu'élément sensible pour le développement de biocapteurs conductimétriques. Ainsi, ces dernières années plusieurs publications sont apparues traitant de l'utilisation de ces microélectrodes pour la détection de métaux lourds comme dans les travaux de Chouteau *et al.* [34] et Tuan *et al.* [35], de pesticides comme dans les travaux de Dzyadevich *et al.* [36,37], du glucose comme dans les travaux de Soldatkin *et al.* [38] et de S. V. Dzyadevich *et al.* [39] ou de l'urée comme dans les travaux de Lee *et al.* [40]. De plus, certains articles passant en revue le développement de biocapteurs conductimétriques comme celui de Dzyadevych *et al.* [41] qui constitue une revue des microélectrodes enzymatiques permettant l'analyse de l'activité catalytique de l'enzyme pour son substrat ou de son inhibition par l'analyte, ont été publiés.

Dans ce chapitre nous allons présenter le principe de fonctionnement des capteurs conductimétriques, la méthode de fabrication des électrodes conductimétriques et leur mise en œuvre pour le développement de biocapteurs.

Dans cette partie nous allons déterminer le diclofop-méthyle dans une solution de PBS (10mM, pH 8) par un biocapteur conductimétrique à base de la lipase de *Candida rugosa*. L'enzyme a été immobilisé sur la partie sensible de biocapteur par réticulation par la vapeur saturée de glutaraldéhyde (GA) pendant 30 min en présence d'une protéine dite de charge l'albumine de sérum bovin (BSA). La mesure du polluant dans une solution de PBS était déterminée par la comparaison du signal de sortie (pourcentage de l'activité enzymatique) du biocapteur avant et après le contact avec le polluant. La mesure de l'activité enzymatique a été effectuée en utilisant le substrat diclofop-méthyle dont les temps de réponse allant de 1 à 10min.

La figure V.24 représente l'évolution de la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique (BSA+CRL) en fonction du temps. Ces courbes ont l'allure typique de diclofop-méthyle en fonction de différentes concentrations de ce substrat, dans une solution de PBS (10mM, pH 8).

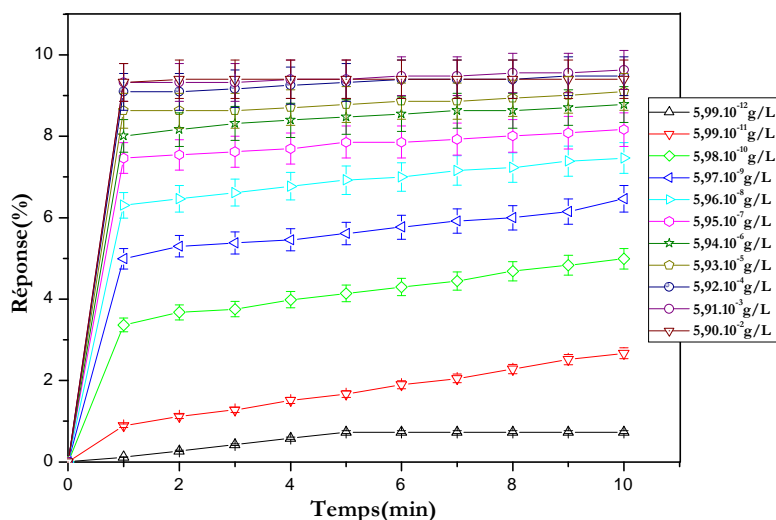


Figure V.24 : Evolution de la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en fonction du temps. Les mesures ont été réalisées dans la solution de PBS (10mM, pH 8).

Ces courbes montrent la stabilité du signal, après une période d'environ 1 minute suivant l'ajout de diclofop-méthyle à diverses concentrations.

La figure V.25 présente la courbe de calibration de biocapteur conductimétrique relative au temps de réponse de 9 minutes.

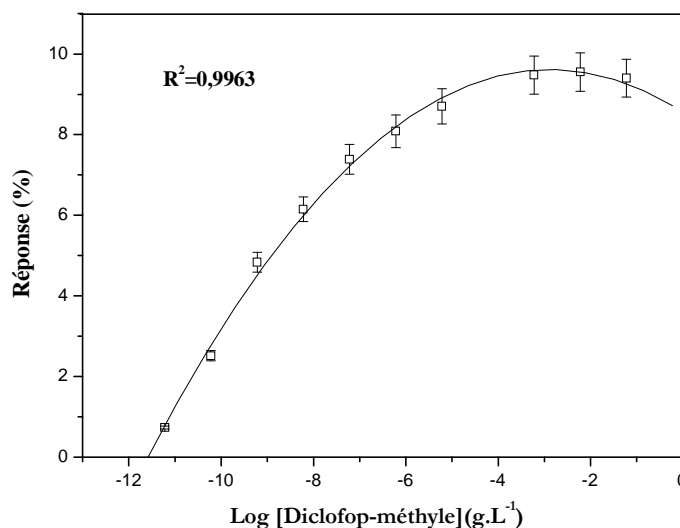


Figure V.25 : Courbes de calibration pour un temps de réponse 9 minutes.

Cette figure présente deux régions, la première à faibles concentrations, comprise entre $5,99.10^{-12}$ g/L à $5,90.10^{-3}$ g/L. Dans la deuxième région, le biocapteur est proche de la saturation quand la concentration de diclofop-méthyle atteint $5,90.10^{-3}$ g/L.

On obtient donc une courbe de calibration avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,9963 et dans ce cas, le biocapteur élaboré présente une réponse linéaire dans la gamme de concentration comprise entre $5,99.10^{-12}$ g/L à $5,90.10^{-2}$ g/L, la limite de détection est de l'ordre de $5,99.10^{-12}$ g/L. Cette technique confirme les résultats obtenus par la technique des impédances.

Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté une nouvelle méthode pour le développement des biocapteurs utilisant une enzyme bactérienne (la lipase de *Candida rugosa*) immobilisée dans une matrice organique composé de BSA et de glutaraldéhyde. L'objectif principal de cette présente étude est d'étudier la possibilité d'élaborer un biocapteur capable de détecter les pesticides organochlorés à l'état de trace dans les milieux aqueux.

Premièrement, nous avons démontré qu'en employant la spectroscopie électrochimique d'impédance combinée avec les modèles théoriques de circuits équivalents, il est possible de déterminer les propriétés électriques et d'étudier le comportement de biocapteur élaboré pour différents potentiel. Nous avons également prouvé que l'EIS peut être employé pour contrôler la construction de la membrane de la couche enzymatique à coté de microscope optique.

L'étude de la réponse de biocapteur à différents potentiels de polarisation nous a permis de déterminer les conditions électriques optimales où le capteur est plus sensible. Les résultats montrent que le potentiel -200mV mène à la plus sensible variation du signal d'impédance.

Les lipases présentent des propriétés catalytiques variables suivant les différentes espèces. La lipase de *Candida rugosa* a un pH optimum de 8.

Concernant la température, l'étude électrochimique de biocapteur enzymatique montre que la lipase microbienne (la lipase de *Candida rugosa*) a une activité maximale de 30 °C.

III. Etude des interférents du biocapteur impédimétrique à base de la Lipase de *Candida rugosa* (CRL)

Les milieux aqueux sont particulièrement vulnérables aux pollutions du fait que la majorité des affluents industriels et agroalimentaires y sont déversés. Les biocapteurs constituent donc également des outils intéressants pour leur surveillance. C'est pourquoi nous avons choisi de faire évoluer et d'adapter au milieu aqueux les systèmes mis au point sur les milieux aqueux.

Nous avons noté que l'influence de la température et de pH de milieu sur la réponse de biocapteur sont des facteurs qui doivent être pris en compte au cours des mesures. De même, la présence d'autres espèces dans la solution est aussi un facteur qui peut influencer les résultats analytiques. Ces substances sont nombreuses et nous pouvons citer par exemple des ions tels que les nitrates les sulfates, ou encore des ions de métaux lourds et des pesticides (Chlorothalonil, Paraquat et le Chlorpyriphos-éthyle), etc.

III.1. Interférences des ions métalliques

Des études antérieures ont montré que l'examen de l'effet des ions réactifs sur l'activité de la lipase a montré que les ions des métaux lourds inhibent l'activité lipasique tandis que la plupart des ions de métaux alcalins améliorent son activité. L'ion le plus efficace sur l'activité de la lipase est le calcium Ca^{2+} [42].

L'hydrolyse catalysée par une lipase peut être affectée par la présence de différents cations (Cd^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , K^{+}) et activée en présence de sels biliaires [43]. Les cofacteurs ne sont pas exigés généralement pour l'activité de lipase, mais les cations bivalents tels que le calcium stimulent souvent l'activité enzymatique [44, 45].

D'autres travaux antérieurs ont montré que l'activité de la lipase est inhibée de façon drastique par Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} et Sn^{2+} , tandis qu'elle est légèrement inhibée par Zn^{2+} , Mg^{2+} , EDTA et SDS [46, 47]. Etant donné que la majorité des métaux lourds et des composés organiques ont une toxicité élevée vis-à-vis l'activité enzymatique.

Pour ces raisons, les recherches se sont orientés vers l'utilisation des biocapteurs pour la détection des pesticides et notamment les pesticides organochlorés en présence de

différents métaux lourds en vue d'améliorer la réponse de ces outils biologiques et de tester s'il existe parmi ces métaux lourds un activateur ou inhibiteur de la lipase.

De fait que l'irrigation des terres agricoles se fait par le biais d'une eau de rivière se trouvant à proximité d'industrie sidérurgique et des conserveries qui déversent leur eau de lavage contaminée par différents types des métaux lourds (Cd, Pb,...etc.) sans traitement dans ces eaux de rivières. Bien que l'utilisation excessive d'engrais (les fertilisants) contamine les eaux souterraines par des nitrates, nitrites et phosphates [48,49].

Dans ce travail, différents types des ions métalliques sont utilisés dans l'étude de l'influence de ceux-ci qui peuvent être des inhibiteurs ou activateurs de la lipase de *Candida rugosa* (CRL). De ce fait, nous avons réalisé des mesures avec la même procédure que dans le cas de la détection de diclofop-méthyle sans la présence des interférents. Nous avons d'abord tracé la courbe de calibration avec le substrat diclofop-méthyle afin de choisir la concentration dite "concentration saturante" où le signal de sortie ne varie plus. On a ensuite immergé pendant 60 minutes le biocapteur dans une solution contenant le diclofop-méthyle avec une concentration définie. Puis, on a refait des mesures de la réponse de biocapteur suite à l'injection des différentes concentrations des ions métalliques dilués dans une solution PBS (10 mM, pH 8) en présence de substrat à concentration saturante. Le nouveau signal de sortie est noté et alors comparé avec celui qui avait été réalisé avant le contact avec la solution contenant les ions métalliques.

Les figures V.26 et V.27 présentent les diagrammes de Nyquist correspondantes à l'influence de l'injection des différentes concentrations des ions métalliques sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* et les courbes de calibration pour ces différents ions métalliques pour le potentiel -200 mV.

Résultats & discussions

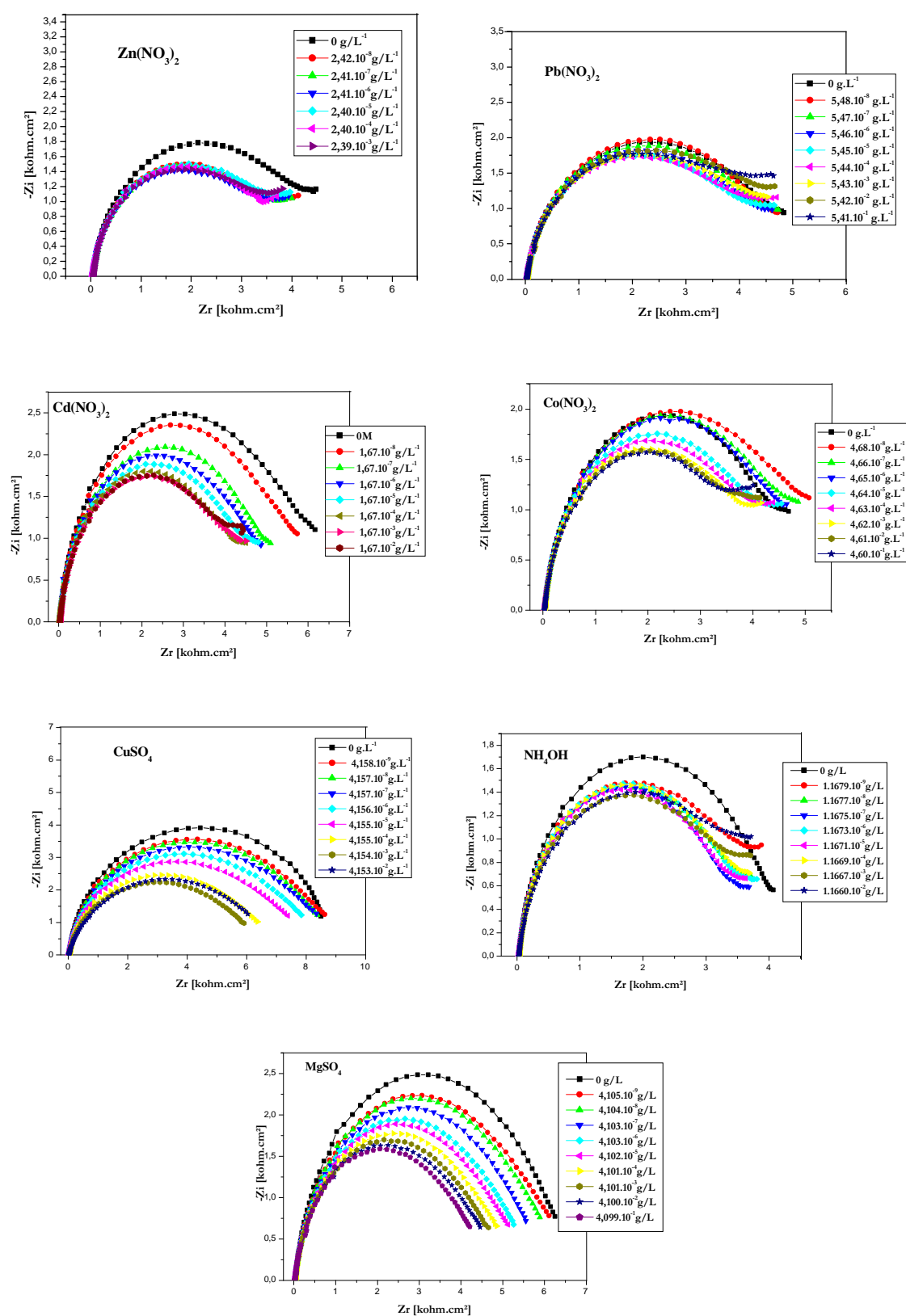


Figure V.26 : Influences des interférents métalliques sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 8) à -200mV vs. SCE et avec une amplitude de 10mV.

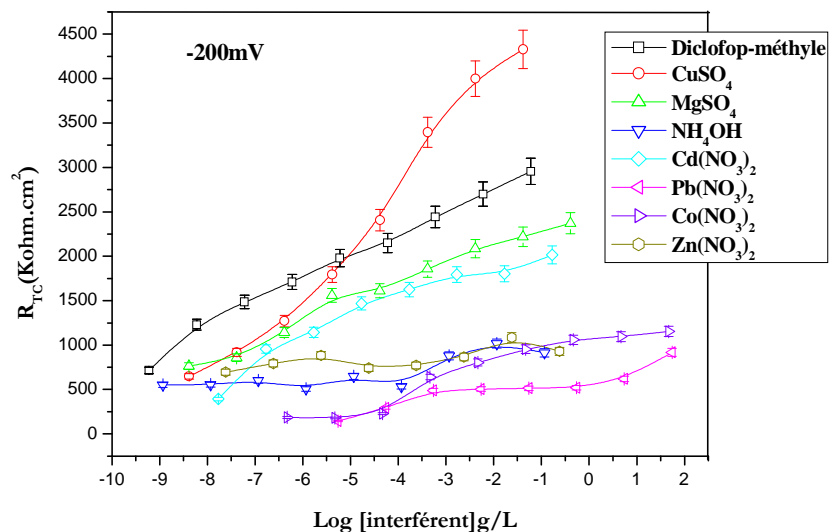


Figure V.27 : Courbes de calibration correspondantes à l’influences des interférents métalliques sur la réponse de l’électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle.

En terme d’activité de l’enzyme, les résultats ont montré que la lipase de *Candida rugosa* est légèrement influencée par la présence des ions Cd^{2+} et Mg^{2+} (figure V.26). En effet, l’activité de la lipase reste presque inchangée après l’injection de la concentration $4,10.10^{-3}$ g/L de Mg^{2+} dans la solution PBS contenant $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle. Ainsi que l’ion Cd^{2+} inhibe légèrement l’activité lipasique comme le montre le figure V.27. Tandis que, la réponse du biocapteur augmente vis-à-vis l’augmentation de la concentration de Cu^{+2} , l’augmentation de la réponse est due au phénomène de l’activation de l’enzyme.

Par contre, la présence des ions Pb^{+2} , Co^{2+} , NH_4^+ et Zn^{+2} inhibe brusquement l’activité de la lipase de *Candida rugosa* comme le prouve la figure V.28. Ces ions métalliques injectés dans le milieu PBS sont adsorbés à l’interface de la couche enzymatique conduisant à l’inactivation de l’enzyme.

Godtfredsen SE et ces collaborateurs (1990) [50], Ghosh PK et al (1996) [51], et R Aravindan et al (2007) [52] ont prouvé que l’activité de la lipase est inhibée brusquement par la présence de l’ion Co^{2+} mais légèrement par l’ion Mg^{+2} . En effet, nos résultats sont confirmés par ces études antérieures qui ont été réalisé. La présence de cobalt dans la solution conduit à un réarrangement de la distribution des ions Co^{2+} dans des sites actifs de l’enzyme.

L’inhibition de l’activité de la lipase de *Candida rugosa* est plus forte pour des concentrations allant de $5,48.10^{-7}$ à $5,41 \text{ g.L}^{-1}$ pour le plomb, de $4,68.10^{-8}$ à $4,59 \text{ g.L}^{-1}$ pour le

cobalt, de $1,167.10^{-8}$ à $1.166.10^{-1}$ g.L⁻¹ pour l'ammonium et de $2,42.10^{-8}$ à $2,39.10^{-1}$ g.L⁻¹ pour le zinc.

En terme de détection de l'élément cible (le diclofop-méthyle) et d'après ces précédents résultats, on conclut qu'on ne peut pas détecter le diclofop-méthyle en présence de : cuivre, magnésium et de cadmium ; car ces éléments sont des éléments gênants pour la détection de diclofop-méthyle.

III.2. Interférences des pesticides

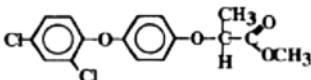
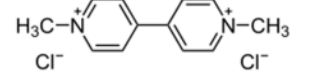
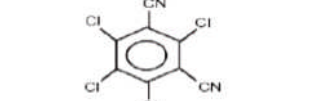
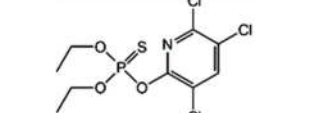
Différents pesticides utilisés dans la production alimentaire peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux des animaux, ainsi que l'utilisation excessive de ces pesticides contamine les eaux souterraines [48, 49]. Nous avons réalisé des études sur l'influence de ces éléments sur la réponse de biocapteur.

Pour évaluer l'influence des pesticides sur la réponse de biocapteur de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et notamment sur l'activité lipasique, nous avons réalisé des mesures avec trois pesticides. Notre choix s'est porté sur : le chlorothalonil, le chlorpyriphos-éthyle et le paraquat. Ces trois pesticides sont fréquemment utilisés dans l'agriculture. Le chlorothalonil et le paraquat ne contiennent pas la fonction ester, par contre, le chlorpyriphos-éthyle contient la fonction ester qui va servir de molécule modèle pour la lipase de *Candida rugosa* (CRL). Dans cette étude, nous avons réalisé des mesures avec la même procédure que dans le cas des métaux.

Les structures chimiques des pesticides utilisés dans cette étude sont présentées dans le tableau V.5.

Résultats & discussions

Tableau V.5: Les structures chimiques des pesticides utilisés comme interférents.

Structure chimique	Nom chimique
	diclofop-méthyle
	Le paraquat
	le Chlorothalonil
	le Chlorpyrifos-éthyle

La figure V.28 présente les diagrammes de Nyquist à -200 mV obtenus avant et après injections des différentes concentrations des pesticides dans une solution contenant une concentration définie diclofop-méthyle ($5,90 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz à 100kHz dans la solution PBS (10mM pH 8).

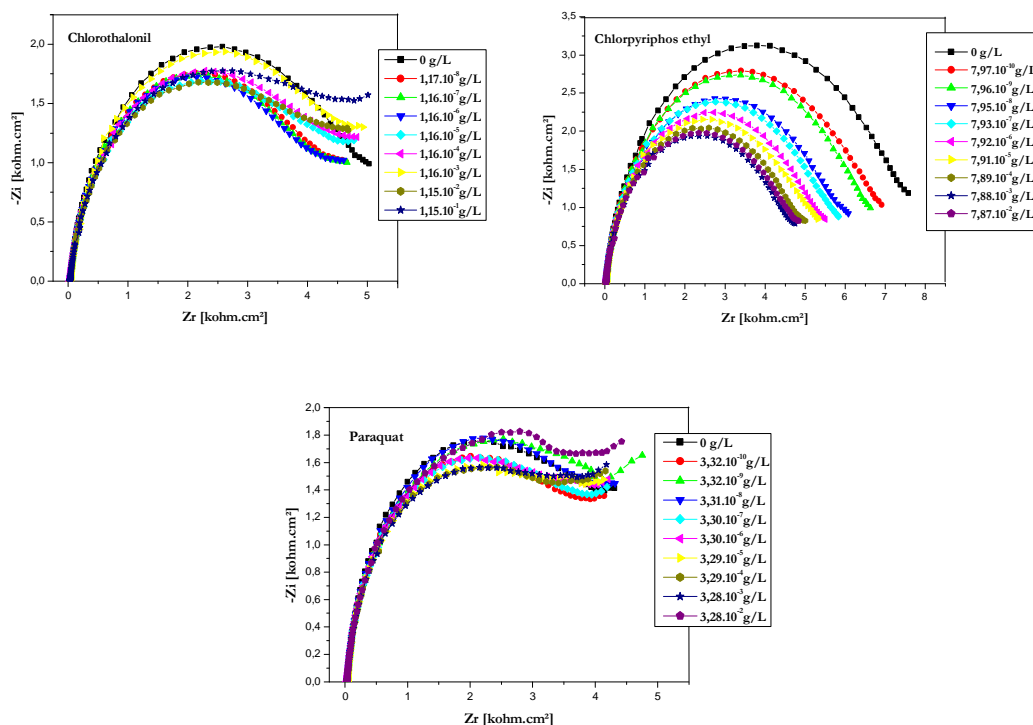


Figure V.28 : Influences des interférents pesticides sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$ de diclofop-méthyle. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 8) à -200mV vs. SCE et avec une amplitude de 10mV.

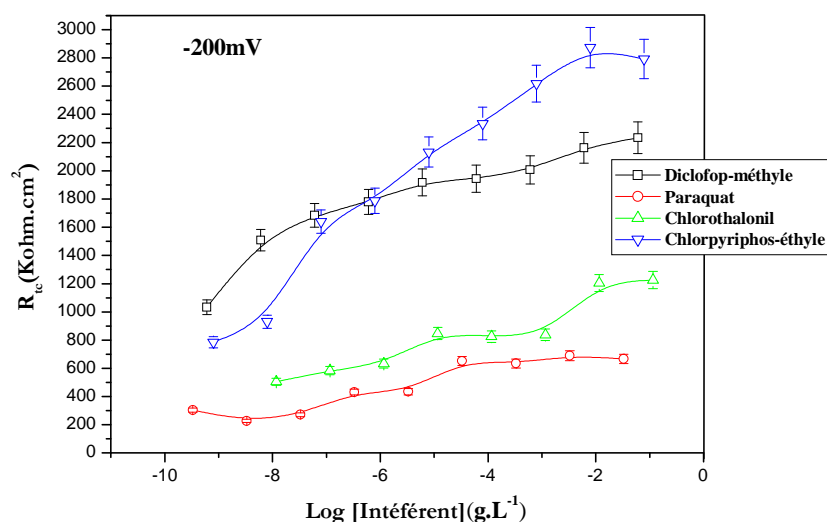


Figure V.29 : Courbes de calibration correspondantes à l'influence des interférents pesticides sur la réponse de l'électrode modifiée par la couche enzymatique en présence de $5,90.10^{-3}$ g/L de diclofop-méthyle.

La figure V.29 montre qu'à chaque concentration en paraquat (herbicide organique appartient à la famille chimique des pyridines) et en chlorothalonil (fongicide organique appartient à la famille chimique des organochlorés dérivés du benzène), l'activité lipasique est plus faible en présence de $5,90.10^{-3}$ g.L⁻¹ de diclofop-méthyle par rapport au cas où le biocapteur est immergé dans une solution contenant uniquement le diclofop-méthyle. Par contre, l'activité de l'enzyme (CRL) augmente vis-à-vis de l'augmentation de la concentration en chlorpyriphos-éthyle (insecticide organophosphoré) dans la solution de PBS contenant $5,90.10^{-3}$ g.L⁻¹ de diclofop-méthyle. Donc, le biocapteur de la lipase de *Candida rugosa* est plus actif et plus sensible pour le chlorpyriphos-éthyle que pour le diclofop-méthyle.

La figure V.29 montre qu'en terme d'activité de l'enzyme ; le paraquat et le chlorothalonil inhibent l'activité de la lipase de *Candida rugosa* quelque soit la concentration de ces deux pesticides. Par contre, dans la gamme de concentration de $7,97.10^{-10}$ à $7,93.10^{-7}$ g.L⁻¹ en Chlorpyriphos-éthyle, on observe une faible interférence par rapport au biocapteur de diclofop-méthyle. Cette figure montre la différence de l'activité lipasique pour les différents pesticides utilisés en présence de $5,90.10^{-3}$ g.L⁻¹ de diclofop-méthyle.

D'après ces résultats, on conclut que le chlorpyriphos-éthyle est un élément gênant pour la détection de diclofop-méthyle. Donc, on ne peut pas détecter ce dernier en présence de chlorpyriphos-éthyle.

Ces résultats sont très importants lorsqu'on réalise des mesures sur sites. Ils nous permettent de prendre en compte des possibilités d'erreurs afin d'obtenir des résultats analytiques meilleurs.

Conclusion

Les résultats montrent que ce n'est pas que la composition de la couche enzymatique, la température et le pH sont des paramètres influents sur la réponse de biocapteur élaboré à base de la lipase de *Candida rugosa*, la présence d'interférents (métaux lourds et pesticides) aussi doit être prise en compte afin d'obtenir les meilleurs résultats analytiques.

IV. Etude de la durée de vie du biocapteur impédimétrique à base de la lipase de *Candida rugosa* (CRL)

Au cours des dernières décennies, le développement de la biotechnologie a fait l'objet de nombreuses recherches pour la mise au point et la mise en application de biocapteurs avec intérêt majeur, d'une part, l'amélioration de leurs performances et leurs caractéristiques et d'autre part, leur faible coût, leur cesseribilité mais surtout leur facilité de fonctionnalisation et de miniaturisation.

Dans ce cadre, la recherche acquise dans le domaine des biocapteurs des pesticides nous a conduit à élaborer un biocapteur rapide et fiable pour la mesure de concentrations en diclofop-méthyle permettant d'exécuter une évaluation efficace, d'une manière anticipée et dès le premier diagnostic.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux de recherche ont été consacrés à l'immobilisation des enzymes à la surface d'une électrode pour l'élaboration de biocapteurs. Malgré ces efforts, la commercialisation de ce type de ces capteurs n'a pas encore vu le jour. La dénaturation de l'enzyme et la faible durée de vie du biocapteur sont parmi les nombreuses raisons qui peuvent expliquer cet échec de commercialisation. La majorité des biocapteurs présentent des durées de vie de quelques jours voire au mieux de quelques mois [53, 54]. Or il faut souligner que la conservation d'une activité intéressante sur une longue durée constitue un atout décisif pour un biocapteur, en vue d'une application industrielle. Nous allons étudier la stabilité des biocapteurs préparés suivant la procédure d'immobilisation décrite précédemment.

IV.1. Stabilité du biocapteur

Pour tester la réponse de biocapteur de la lipase de *Candida rugosa* (CRL), nous avons réalisé des mesures avec la même procédure que dans le cas de la détection de diclofop-méthyle.

Le biocapteur impédimétrique à base de la lipase de *Candida rugosa* a été conservé dans un tampon PBS à 4°C à l'obscurité pour éviter la contamination bactérienne. On a ensuite immergé pendant 60 minutes le biocapteur dans une solution contenant le diclofop-méthyle avec une concentration définie. Puis, on a refait des mesures de la réponse de

Résultats & discussions

biocapteur suite à l'injection des différentes concentrations de diclofop-méthyle dilués dans une solution PBS (10mM, pH 8). Le nouveau signal de sortie est noté. Après chaque mesure on conserve le biocapteur dans le tampon PBS à 4°C et on refait les mesures de la réponse de biocapteur pour chaque jour jusqu'à la disparition de la réponse dans les mêmes conditions.

La figure V.30 montre l'évolution de la réponse des biocapteurs en fonction du temps de conservation dans un tampon PBS (10mM, pH 8) à 4 °C.

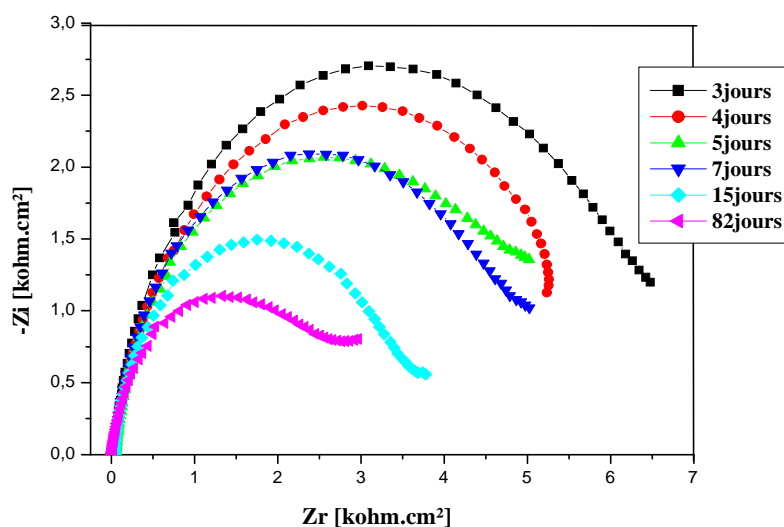


Figure V.30 : Durée de vie de biocapteur enzymatique. Toutes les mesures ont été réalisées dans une solution de PBS (10mM, pH 8) dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz à -200mV vs. SCE et avec une amplitude de 10mV.

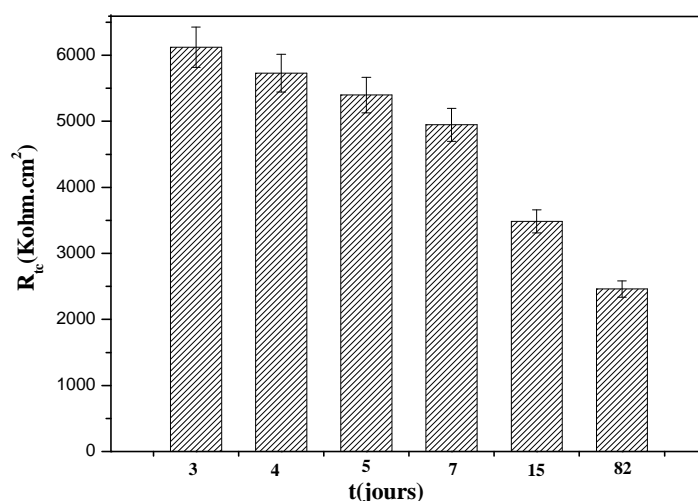


Figure V.31 : Histogramme présentant la variation de la résistance de transfert de charge de biocapteur enzymatique dans le temps.

D'après la figure V.30 nous observons une diminution de la sensibilité du biocapteur préparé selon la procédure décrite précédemment, après 3 jours de stockage dans le tampon PBS 10mM, puis elle devient presque stable.

La figure V.31 montre que la résistance de transfert de charge diminue avec le temps. Cette diminution conduit à la diminution de la sensibilité qui peut s'expliquer par le fait que, lorsque l'électrode entre en contact avec l'électrolyte pour une durée prolongée, il s'établit un phénomène d'échange entre les BSA-Lipase et le diclofop-méthyle. Cet échange provoque le gonflement de la matrice d'immobilisation et par conséquent modifie l'accessibilité des sites actifs de la lipase pour le diclofop-méthyle.

Conclusion

Nous avons testés la réponse de biocapteur élaboré à base de la lipase de *Candida rugosa* pendant presque trois mois et nous remarquons que la réponse de biocapteur est bonne, donc le biocapteur donne de bons résultats pendant les trois mois, après ces trois mois le biocapteur ne répond plus et le graphe est une courbe qui n'a aucune forme précise.

V. Nouveau concept d'un biocapteur impédimétrique à base de la Lipase de Pancréas de Porc (LPP)

Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques, elles sont largement présentes chez les plantes et chez les animaux ainsi que chez les microorganismes [55]. Ces enzymes appartiennent au groupe des sérines hydrolases et n'exigent la présence d'aucun cofacteur nécessitant la régénération pour leur activité [56, 57].

Des travaux antérieurs ont montré que les lipases bactériennes notamment font preuve d'une meilleure stabilité [4]. Pour ces raisons, les recherches se sont orientées vers l'utilisation d'autres sources de lipases. Un nouveau substitut d'enzymes hydrolases, à base de lipase pancréatiques, vient d'être testé et mis au point dans l'élaboration du biocapteur de diclofop-méthyle malgré que la structure et le mécanisme enzymatique de la lipase, encore peu connue alors dans le domaine de l'application dans les biocapteurs.

La lipase pancréatique (figure V.32) est la principale enzyme responsable de la digestion des lipides alimentaires. Elle agit principalement sur les di-glycérides libérés par la lipase gastrique. Elle est sécrétée dans le duodénum et fonctionne à des pH légèrement alcalins, contrairement à la lipase gastrique [58]. Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques. Ces enzymes appartiennent au groupe des sérines hydrolases [11, 59]. Les lipases sont définies comme étant des carboxyl-estérases catalysant l'hydrolyse et la synthèse d'esters formés de glycérine et des acides gras de longues chaînes [6]. Les lipases ressemblent aux estérases, mais elles se différencient par leur capacité d'agir sur les esters insolubles dans l'eau [45, 60].

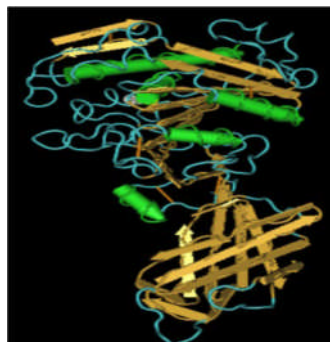


Figure V.32 : Schéma présenté d'une lipase pancréatique du cochon.

La lipase pancréatique de porc a été choisie pour une étude plus approfondie pour évaluer le comportement de l'enzyme et pour étudier son pouvoir catalytique vis-à-vis le diclofop-méthyle, on a mentionné auparavant que la lipase pancréatique appartient à la famille des hydrolases, donc cette étude a été faite dont le but d'étudier l'impact de l'origine de la lipase sur le phénomène de la détection de diclofop-méthyle.

La lipase peut être immobilisée dans plusieurs supports, l'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et supports. La lipase du pancréas de porc a été immobilisée sur polyacrylamide activé par le carbodimide et a ainsi été appliquée à l'hydrolyse de l'huile d'olive [61].

Dans la partie précédente de ce chapitre nous avons optimisé les conditions électriques de fonctionnement pour le développement d'un biocapteur impédimétrique basé sur l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* dans une matrice de BSA et de glutaraldéhyde (GA) pour la détermination de diclofop-méthyle dans le PBS.

En effet, les résultats obtenus en élaboration de cet biocapteur nous a permis de développer un nouveau concept de biocapteur enzymatique à base de la lipase de Pancréas de porc destiné à la détection de diclofop-méthyle dans un tampon PBS.

De ce fait, dans cette partie, nous nous intéressons à la mise au point de cet biocapteur pour la détection de polluant modèle en se basant sur les conditions optimales définies dans la première partie de ce chapitre. Nous nous sommes intéressés à l'étude de la spécificité de la réponse de biocapteur dans le milieu tampon (PBS). D'autre part il sera nécessaire de travailler dans les mêmes conditions de l'élaboration de biocapteur à base de la lipase de *Candida rugosa* pour comparer les résultats obtenues de ces deux biocapteurs.

La caractérisation électrique, les étapes de l'élaboration de biocapteur ont été présentées dans la partie précédente. Dans cette partie nous nous intéressons à l'étude de la détection de polluant modèle (le diclofop-méthyle) dans un milieu (PBS) en utilisant la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), la voltamétrie cyclique et la microscopie optique.

V.1. Caractérisation par voltamétrie cyclique

Après avoir élaboré le biocapteur, nous avons effectué la détection dans la solution de PBS afin d'étudier ses caractéristiques. La figure V.33 présente les voltamogrammes obtenus avant et après la fonctionnalisation de l'électrode par une couche d'Albumine Bovine Sérique (BSA) et de la Lipase de Pancréas de Porc (LPP). Les mesures ont été effectués dans la solution PBS (10 mM, pH 8) en présence de couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

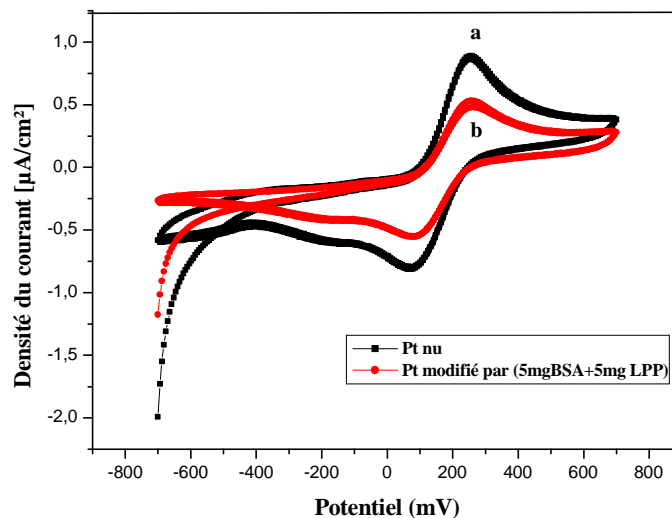


Figure V.33 : Voltamétrie cyclique d'une électrode du platine nue (a) et d'une électrode fonctionnalisée par le dépôt d'une couche de biomembrane constituée (BSA+LPP) (b). Mesures effectuées dans 5mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dans le PBS (10 mM, pH 8).

Pour remonter aux caractéristiques isolantes de la couche enzymatique déposée sur l'électrode de platine, nous avons utilisé la voltamétrie cyclique. La figure V.34 montre la courbe I (V) de platine nu et de platine fonctionnalisé avec la couche enzymatique constituée de BSA et de la lipase de Pancréas de Porc en présence du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

La courbe I(V) de platine nu (a) montre un processus réversible d'une réaction d'oxydoréduction à la surface de platine. Après le dépôt de la couche enzymatique, les pics du processus d'oxydoréduction diminuent, ce qui montre que la couche déposée diminue le processus faradique. Lors de l'immobilisation de la couche enzymatique le courant diminue encore et l'interface n'étant pas entièrement bloquante du point de vue électrique. La voltamétrie cyclique montre la formation de la couche enzymatique sur la surface de platine.

V.2. Développement d'une méthodologie d'analyse pour étudier la réponse de biocapteur élaboré

L'effet de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle sur la réponse du biocapteur élaboré a été étudié par la voltamétrie cyclique. Cette étude est basé sur l'étude de Tina R. et ces collaborateurs pour déterminer le phosphore dans le biodiesel à l'aide d'électrodes 1:12 phosphomolybdique modifié par voltamétrie cyclique [62].

Afin de vérifier l'influence de diclofop-méthyle sur la réponse de l'électrode modifiée par le dépôt de la couche enzymatique composé de BSA et de lipase de Pancréas de porc (LPP). Différentes concentrations de diclofop-méthyle ont été ajoutées à la cellule électrochimique (Figure V.34).

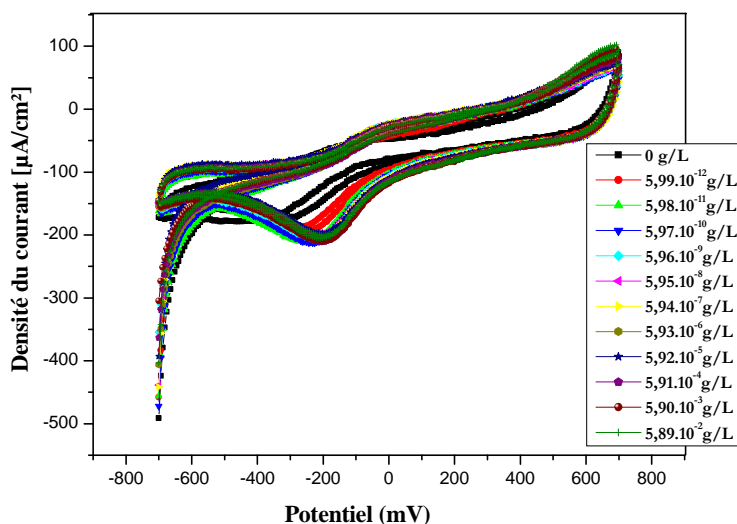


Figure V.34 : Influence de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle sur les voltammogrammes pour une électrode de platine modifiée par la biomembrane (BSA+LPP). Mesures effectuées dans 5mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dans le PBS (10 mM, pH 8) entre -0.7 et 0.7 V. Vitesse de balayage de 100 mV/s.

L'injection de diclofop-méthyle dans la cellule électrochimique a créé un changement des voltammogrammes de l'électrode fonctionnalisée par la couche enzymatique. En effet, les pics d'oxydation ont presque disparus par contre un déplacement des pics du courant de réduction a été observé dans les voltammogrammes de la figure V.34.

Le déplacement des sommets des pics du courant de réduction du à la relation linéaire entre les pics du courant de réduction et la concentration en diclofop-méthyle, cela est vérifié par la courbe d'étalonnage de la figure V.34.

La figure V.35 présente les courbes d'étalonnage obtenu par voltamétrie cyclique suite à l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle.

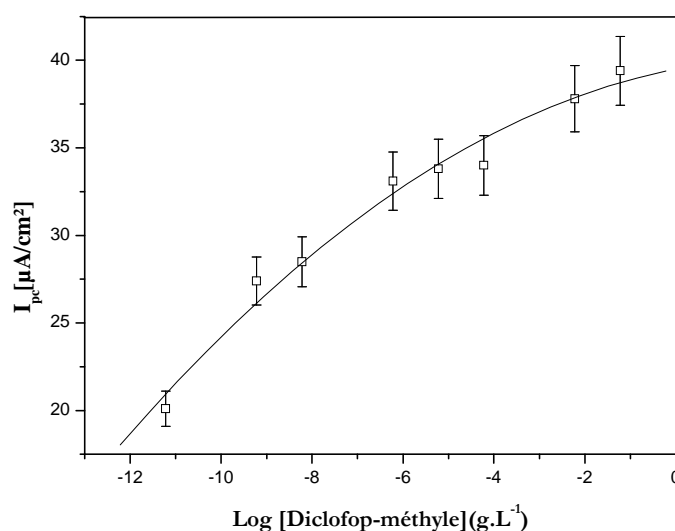


Figure V.35 : Variation de la densité du courant cathodique suite à l'injection de différentes concentrations du diclofop-méthyle pour le Pt dans du tampon PBS (10mM, pH 8) entre -0.7 et 0.7 V. Vitesse de balayage de 100 mV/s.

La figure V.35 montre la courbe d'étalonnage résultant des injections successives de diclofop-méthyle ; cette courbe a l'allure typique des courbes obtenues pour des biocapteurs enzymatiques.

Aux faibles concentrations en diclofop-méthyle, on observe une droite correspondant à la sensibilité de l'électrode modifiée avec une pente de $0,974\mu\text{A}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ tandis qu'une saturation de l'enzyme en substrat est obtenu pour les fortes concentrations en diclofop-méthyle avec un courant de saturation $J_{\text{max}} = 37,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Le seuil de détection obtenu pour ce biocapteur est de $5,99\cdot 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et la gamme de linéarité s'étend jusqu'à $5,90\cdot 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

V.3. Caractérisation par mesure d'impédance

La réponse de biocapteur consécutive aux injections de diclofop-méthyle, a été étudiée. En fait, après avoir préparé le biocapteur, l'électrode modifiée a été incubée successivement dans différentes concentrations de diclofop-méthyle, diluées dans la solution de PBS (10mM, pH 8).

La caractérisation électrique de l'électrode avant et après la fonctionnalisation par le dépôt de la couche enzymatique de BSA et de LPP sur la surface de celle-ci a été suivie par la spectroscopie d'impédance.

Résultats & discussions

Les figures V.36 et V.37 présentent successivement le diagramme de Nyquist et le diagramme de Bode d'une électrode de platine nue et modifiée. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence 100mHz-100kHz dans la solution PBS (10mM, pH 8) avec une polarisation de -200 mV.

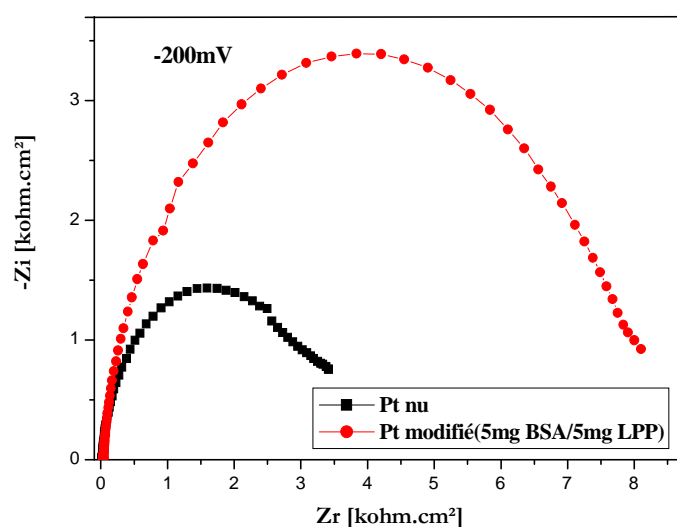


Figure V.36 : Diagrammes de Nyquist pour une électrode du platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus à -200mV vs. SCE. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 8) avec une amplitude de 10mV.

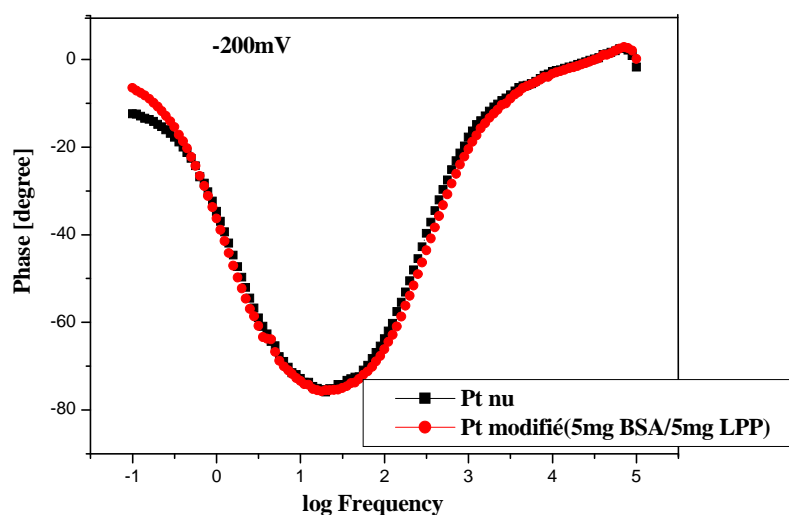


Figure V.37: Diagramme d'impédance correspond au platine nue et modifiée par la couche enzymatique obtenus (a) Bode : Module v.s. fréquence, (b) Bode : Phase v.s. fréquence. Mesures effectuées à -200mV dans le PBS (10 mM, pH 8) avec une amplitude de 10mV.

En effet, les résultats montrent un changement de spectre lors de la modification de l'électrode de platine par la couche enzymatique de la lipase de Pancréas de Porc (LPP) et d'Albumine Bovine Sérique (BSA). Sur le diagramme de Nyquist nous remarquons que le

Résultats & discussions

diamètre du demi-cercle de Nyquist augmente nettement après la formation de la couche enzymatique. Ceci est vérifié par l'augmentation de la phase qui est présentée sur le diagramme de Bode (figure V.37).

Cependant, la forme du demi-cercle de la couche enzymatique n'est pas idéale à cause de la différence de longueur entre les molécules de l'enzyme l'albumine de sérum bovin (BSA) et celles de la lipase de Pancréas de Porc.

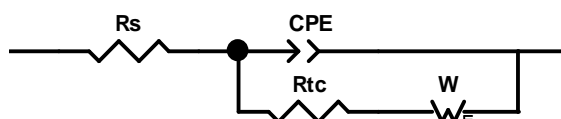


Figure V.38 : Circuit électrique permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant à une couche enzymatique.

Les propriétés électriques de l'électrode nue et modifiée ont été modélisées par l'utilisation de circuit électrique équivalent de la figure V.38, où R_s , CPE , R_{tc} et W représentent respectivement: la résistance de l'électrolyte, élément de phase constant, résistance de la membrane et impédance de Warburg. Les paramètres électriques obtenus sont présentée dans le tableau V.6.

Tableau V.6 : Paramètres de simulation d'une électrode du Platine nue et modifiée par la couche enzymatique, à -200mV. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.38.

Electrode	R_s (Ω)	$CPE-T$ (μF)	n	R_{tc} (Ω)	W_0-R (Ω)	W_0-T	W_0-P	$\chi^2(\times 10^{-3})$
Electrode en platine nue	20,32	41,2	0,93	3136	73025	6518	0,57	2,8
5mgBSA+5mgLPP/Pt	34,8	19,8	0,93	8305	81,86	1,587	0,76	3,5

Sur la figure V.39 sont reportés les diagrammes de Nyquist d'une électrode de platine modifiée par la couche enzymatique suite à l'injection des différentes concentrations de diclofop-méthyle. Les mesures d'impédance ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100 mHz-100kHz dans la solution PBS (10mM, pH 8) et avec une polarisation de -200 mV.

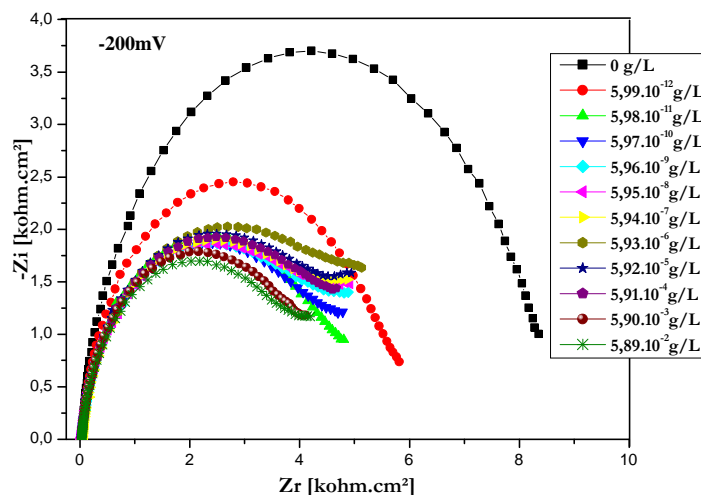


Figure V.39 : Spectres d'impédance pour une électrode de platine modifiée avec la membrane enzymatique suivie de l'injection de différentes concentrations de diclofop-méthyle obtenus à -200mV vs. SCE. Les mesures d'impédances ont été réalisées dans une gamme de fréquence de 100mHz-100kHz dans la solution de PBS (10mM, pH 8) avec une amplitude de 10mV.

Comme le montre les résultats de figure V.39, les spectres d'impédance diminuent clairement avec l'augmentation de la concentration de diclofop-méthyle. Par ailleurs, tous ces diagrammes ont été modélisés en utilisant le circuit équivalent présenté sur la figure V.38. Les paramètres électriques obtenus sont présentées dans le tableau V.7.

La température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40°C. En général, les lipases d'origine végétale ou animale sont peu thermostables contrairement aux lipases microbiennes [62]. En effet, nos résultats sont confirmés par des études qui ont été réalisés par Keller et Layer, 2003 [4].

Le pH optimum de l'activité lipasique est généralement autour de 7. Le pH agit non seulement sur l'activité enzymatique mais aussi sur la solubilité des réactifs dans le milieu, ainsi que sur le partage de l'enzyme entre la phase aqueuse et l'interface. Les lipases bactériennes ont généralement un pH optimum légèrement basique (8–8,5), alors que les lipases d'origine fongique ont un pH légèrement acide, tandis que la lipase de pancréas de porc possède une température égale à 37°C, pH 7,00 (pH physiologique d'action de l'enzyme) [11, 43].

Des travaux antérieurs ont montré que les lipases bactériennes notamment font preuve d'une meilleure stabilité que la lipase pancréatique [4]. Pour ces raisons, les diagrammes de

Résultats & discussions

Nyquist pour le biocapteur de la lipase de pancréas de porc sont moins stables contrairement à ceux obtenus par la lipase de *Candida rugosa*.

Tableau V.7: Paramètres de simulation des diagrammes de Nyquist pour la couche constituant le BSA+LPP obtenus à -200mV. Paramètres issus du fittage avec le circuit de la figure V.39.

Potentiel (mV)	Concentration (g/L)	Rs (Ω)	CPE-T (F)	CPE-P	R _{tc} (Ω)	W-R (Ω)	W-T	W-P	X ²
-200	0	34,80	1,98.10 ⁻⁵	0,93	8305	81,86	1,587	0,76	0,0035
	5,99.10 ⁻¹²	33,73	2,77.10 ⁻⁵	0,92	5597	35025	2,17	0,46	0,0050
	5,98.10 ⁻¹¹	33,43	3,32.10 ⁻⁵	0,91	4399	167000	1,57	0,48	0,0051
	5,97.10 ⁻¹⁰	33,17	3,14.10 ⁻⁵	0,92	3564	31810	6125	0,37	0,0011
	5,96.10 ⁻⁹	30,88	3,20.10 ⁻⁵	0,92	3454	18995	871,2	0,37	0,0010
	5,95.10 ⁻⁸	31,30	3,59.10 ⁻⁵	0,90	3995	19805	469,9	0,45	0,0053
	5,94.10 ⁻⁷	32,07	3,68.10 ⁻⁵	0,90	4157	22941	315,8	0,52	0,0057
	5,93.10 ⁻⁶	30,50	3,63.10 ⁻⁵	0,90	4333	8027	45,16	0,48	0,0053
	5,92.10 ⁻⁵	28,98	3,60.10 ⁻⁵	0,90	4331	6302	20,03	0,58	0,0048
	5,91.10 ⁻⁴	33,01	3,59.10 ⁻⁵	0,90	4265	4674	12,70	0,61	0,0047
	5,90.10 ⁻³	29,90	3,51.10 ⁻⁵	0,91	4044	6585	15,67	0,80	0,0055
5,90.10 ⁻²	31,54	3,38.10 ⁻⁵	0,91	3771	8147	43,14	0,61	0,0049	

Les résultats montrent que la résistance de transfert de charge varie avec la variation de la concentration de diclofop-méthyle. La courbe de calibration, représentant la variation de la résistance R_{tc} en fonction de la concentration en diclofop-méthyle dilué dans la solution de PBS (10mM, pH 8), est présentée sur la figure V.40.

La variation de la résistance de la membrane est calculée à partir de l'équation suivante :

$$\Delta R_{tc} = R_{tc}^{C=0} - R_{tc}^C$$

Où $R_{tc}^{C=0}$ et R_{tc}^C représente la résistance de transfert de charge de la membrane (BSA+LPP) obtenue à partir du modèle électrique avant et après l'injection de diclofop-méthyle, respectivement.

Résultats & discussions

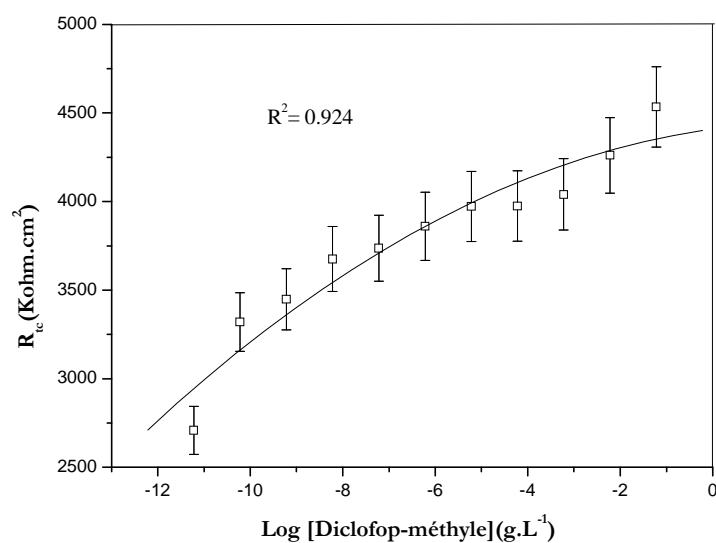


Figure V.40 : Variation de la résistance de transfert suite à l'injection de différentes concentrations du diclofop méthyle pour le Pt dans du tampon PBS (10mM, pH 8).

Les figures V.40 montrent que la réponse de biocapteur présente deux régions : une région linéaire, comprise entre $5,99.10^{-12}$ et $5,90.10^{-3}$ g.L⁻¹ avec une pente de $0,924$ cm²/g.L⁻¹, et une limite de détection de l'ordre de $5,99.10^{-12}$ g.L⁻¹. La seconde région commence à $5,90.10^{-3}$ g.L⁻¹, et représente la zone de saturation de biocapteur. Ces résultats confirment les résultats obtenus par la voltamétrie cyclique.

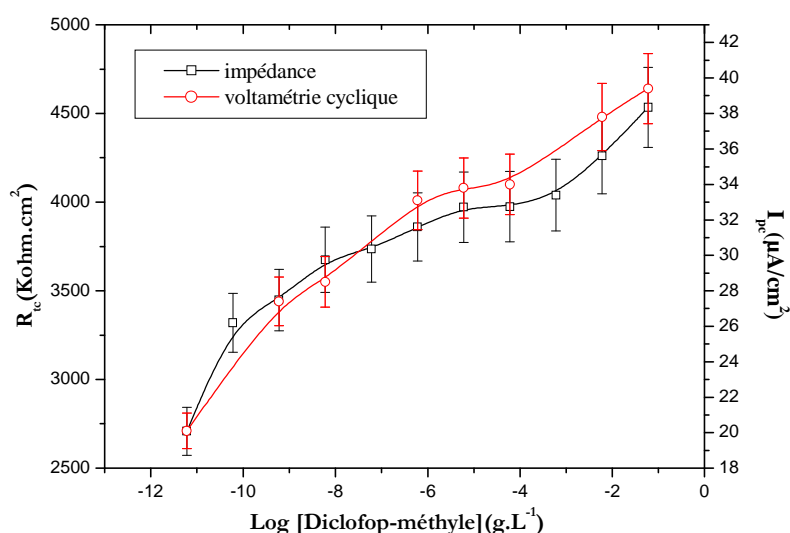


Figure V.41 : Courbes de calibrations du biocapteur obtenus par mesures impédimétrique et par voltamétrie cyclique dans le tampon PBS (10mM, pH 8).

La Figure V.41 présente la réponse des biocapteurs obtenus par voltamétrie cyclique et par mesures d'impédance. La réponse obtenue par mesure d'impédance est caractérisée par une bonne linéarité étendue vers les hautes concentrations avec celle issue des mesures par voltamétrie cyclique.

V.4. Caractérisation par microscope optique

La caractérisation de biocapteur enzymatique à base de la lipase de Pancréas de Porc (LPP) a été faite par la microscopie optique pour une électrode nue (figure V.42.a) et une électrode modifiée par la couche enzymatique de BSA et de LPP (figure V.42 b et c). L'analyse microscopique a été réalisée après incubation de l'électrode modifiée par la couche enzymatique dans une concentration de diclofop-méthyle de $5,90.10^{-3}$ g/L pendant une heure du temps, puis cette électrode a été lavé avec de l'eau ultrapure plusieurs fois pour éliminer les enzymes adsorbées physiquement.

Après ce lavage rigoureux, l'analyse microscopique montre la couche enzymatique immobilisée sur la surface de platine, ce qui laisse supposer que les enzymes sont liées d'une manière covalente. Une électrode nue a été préparée et la figure V.42 montre que dans ce cas les enzymes ne s'adsorbent pas préférentiellement sur le platine.

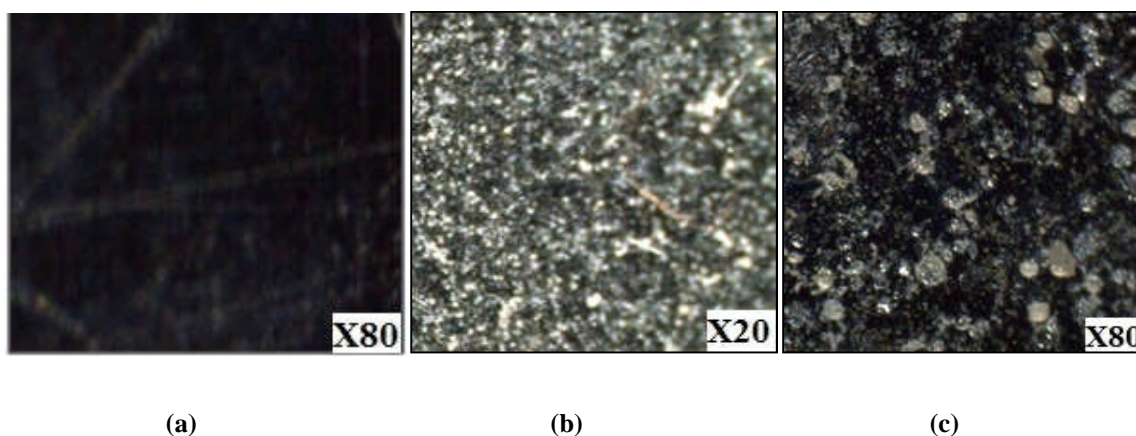


Figure V.42 : Photos (x20 et x80) de l'électrode du platine modifiée par une couche enzymatique immobilisée dans une matrice organique composé de BSA et de GA.

Les observations au microscope ont été réalisées après immobilisation et durant les mesures pour s'assurer de la solidité des membranes constituées par les couches d'enzymes immobilisées. L'observation microscopique montre que la membrane est bien solidaire de l'électrode. Toutefois, les couches d'enzymes ne sont pas réparties de manière homogène

(figure V.42). Avec une épaisseur moyenne des membranes, celle-ci peut contenir par endroit l'épaisseur de la couche d'enzymes. Cette hétérogénéité de répartition conduit à d'importantes variations de réponse du capteur.

V.5. Comparaison de la réponse de biocapteur à base de la lipase de *Candida rugosa* et à base de la lipase de Pancréas de Porc

La faisabilité de la détection de notre biocapteur a été évaluée en comparant les réponses de biocapteur à base de la lipase de *Candida rugosa* et à base de la lipase de Pancréas de Porc dans le PBS. La courbe de calibration de la figure V.43 présente la variation de la résistance de transfert de charge en fonction des concentrations de diclofop-méthyle détectées dans le PBS.

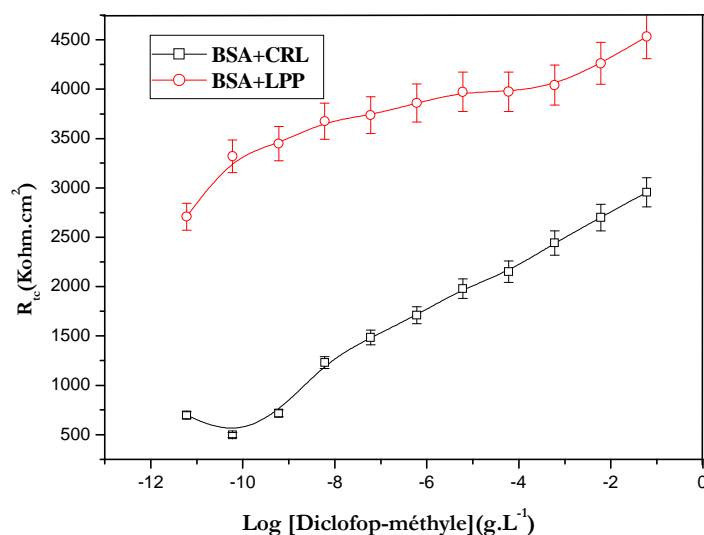


Figure V.43: Comparaison de la variation de la résistance de transfert de charge pour différentes concentration de diclofop-méthyle pour le biocapteur élaboré à base de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et à base de Pancréas de Porc (LPP).

La comparaison entre les valeurs de la résistance de transfert de charge pour différentes concentration de diclofop-méthyle dilué dans le PBS pour le biocapteur élaboré à base de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et à base de pancréas de porc (LPP) montre un écart entre les deux réponses, le biocapteur à base de LPP donne meilleure réponse que celle obtenue par (CRL). Ceci vérifie clairement la faisabilité et la validité de la détection par la lipase de pancréas de porc.

Le biocapteur à base de la lipase de pancréas de porc (LPP) est très sensible que celui de la lipase de *Candida rugosa* malgré que cette dernière est plus stable que la lipase de pancréas de porc.

Conclusion

Dans ce travail, un biocapteur impédimétrique et voltamétrique à base de la lipase de pancréas de porc (LPP) a été développé. La lipase de pancréas de porc a été immobilisée dans de la BSA réticulée par le glutaraldéhyde. Nous avons montré qu'il est possible d'élaborer ce biocapteur enzymatique pour détecter le diclofop-méthyle. Ce biocapteur est relativement fiable et simple d'utilisation. Ce biocapteur permettra de suivre en continu les concentrations de diclofop méthyle dans le milieu PBS. Ce dispositif a une large gamme de détection allant de $5,99.10^{-12}$ à $5,90.10^{-3}$ g.L⁻¹ avec une limite de détection de $5,99.10^{-12}$ g.L⁻¹ de diclofop-méthyle.

La comparaison entre les réponses des biocapteurs élaborés à base de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et à base de pancréas de porc (LPP) montre que ; ce dernier est plus sensible à la présence de diclofop-méthyle que le biocapteur à base de *Candida rugosa*.

Il reste donc à démontrer la potentialité de notre outil dans l'identification de polluant organique le diclofop-méthyle dans le milieu PBS avec des seuils de détection intéressants pour les gestionnaires.

Références bibliographiques

- [1]. Funda Kartal, Ali Kiling and Suna Timur. Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. Intern. J. Environ. Anal. Chem., vol. 87 Nos Taylor and Francis: 715-722, **2007**.
- [2]. Gilham D. & Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. Methods. 36: 139-147, **2005**.
- [3]. Fickers P., Destain J. & Thonart P. Les lipases sont des hydrolases atypiques: Principales caractéristiques et application. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12: 119-130, **2008**.
- [4]. Keller J and Layer P. Pancreatic Enzyme Supplementation Therapy, *Curr Treat Options Gastroenterol*, 6, 369-374, **2003**.
- [5]. Garde V. L. Enzymes en agro-alimentaire. Lavoisier Tec. Doc, **2000**.
- [6]. Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E. & Miller R. Lipases at interfaces: A review Advances in colloid and interface science, **2008**.
- [7]. Pabai F. Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for interesterification of better fat. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179, **1997**.
- [8]. Verger R. Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. & Costes C. Hydrolases et dépolyméras. Enzymes d'intérêt industriel. Paris, Edition : Gauthier Villars. 313-329, **1985**.
- [9]. Xu Gu, Yuele Lu, Peng Wang, Ziheng Dang, Zhiqiang Zhou, Enantioselective degradation of diclofop-methyl in cole (*Brassica chinensis* L.), Food Chemistry, Volume 121, Issue 1, Pages 264–267, 1 July **2010**.
- [10]. Reis P., Holmberg K., Miller R., Leser M. E., Raab T. & Watzke H.J. Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. C. R. Chimie. 1-8, **2008**.
- [11]. Gargouri M., Akacha N.B., Kotti F. & Ben Rajeb I. Voie de la lipoxygénase valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12:185-202, **2008**.
- [12]. Schmidt B. M., Baumann M., Henke E., Konarzycka-Bessler M. & Bornscheuer U. T. Directed evolution of Lipases and Esterases. Methods in enzymology. 388: 199-207, **2004**.
- [13]. M.Kathryn, Koeller, Wong CH., Nature 409, 232, **2001**.
- [14]. Minovska, V., E. Winkelhausen and S. Kuzmanova. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. J. Serb. Chem. Soc., 70: 609-624, **2005**.
- [15]. Benamia F., Bouchagra S., Saihi Y., Djeghaba Z. Rebbani N. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 43:1, 33-47, **2013**.
- [16]. Cheirsilp, B., P. Jeamjounkhwaw and A.H. Kittikun. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. J. Mol. Catal. B. Enz., 59: 206-211, **2009**.
- [17]. Salis, A., M.S. Bhattacharyya, M. Monduzzi and V. Solinas. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. J. Mol. Catal. B. Enz., 57: 262-269, **2009**.
- [18]. Liu, C.H., Y.H. Lin, C.Y. Chen and J.S. Chang. Characterization of Burkholderia lipase immobilized on celite carriers. J. Taiwan Inst. Chem. Eng., 40: 359-363, **2009**.
- [19]. Al-Zuhair, S., A. Dowaidar and H. Kamal. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. Biochem. Eng. J., 44: 256-262, **2009**.
-

Références bibliographiques

- [20]. Furukawa, S., T. Ono, H. Ijima and K. Kawakami. Effect of imprinting sol-gel immobilized lipase with chiral template substrates in esterification of (R)-(+)- and (S)-(-)-glycidol. *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 17: 23-28, **2002**.
- [21]. Kato, K. and S. Seelan. Enhancing activity and stability of Burkholderia cepacia lipase by immobilization on surface-functionalized mesoporous silicates. *J. Biosci. Bioeng.*, 109: 615-617, **2010**.
- [22]. Houcine Barhoumi. Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale. Thèse de l'Université de Co-tutelle, **2006**.
- [23]. N.Bouyahia, M.L.Hamlaoui, M.Hnaïen, F.Lagarde, N.Jaffrezic-Renault; Impedance spectroscopy and conductometric biosensing for probing catalase reaction with cyanide as ligand and inhibitor; *Bioelectrochemistry* 80, 155–161, **2011**.
- [24]. A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, A.A. Shulga, L.I. Netchiporouk, A.M. Nyamsi Hendji, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet., *Anal. Chim. Acta.* 283, 695, **1993**.
- [25]. A. P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault., *Talanta* 58, 351, **2002**.
- [26]. B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys., *Biosensors and Bioelectronics* 19, 1641, **2004**.
- [27]. B. Krajewska, W. Zaborska, M. Chudy., *Journal of Inorganic Biochemistry* 98, 1160, **2004**.
- [28]. The Royal Society of Chemistry. *The agrochemicals handbook*. Nottingham, **1983**.
- [29]. VANESA GUILLÉN-CASLA, LUIS VICENTE PÉREZ-ARRIBAS, MARÍA EUGENIA LEÓN GONZÁLEZ AND LUIS MARÍA POLO-DÍEZ. One- and Two-Dimensional Direct Chiral Liquid Chromatographic Determination of Mixtures of Diclofop-Acid and Diclofop-Methyl Herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2303–2309, **2008**.
- [30]. Banu ÖZTÜRK, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, MASTER OF SCIENCE, İzmir, Turkey, **2001**.
- [31]. Fadöloğlu, S., Kinetics of olive oil hydrolysis by free and immobilised *Candida rugosa* lipase. Ph.D. Thesis, University of Gaziantep, **1996**.
- [32]. A.B.Maidina, A.B.Belova, A.V.Levashov, and N.L.Klyachko ; Choice of temperature for safflower oil hydrolysis catalyzed by *Candida Rugosa* Lipase. *Moscow University Chemistry Bulltin*, Vol.63, No.2,pp 108-110, **2008**.
- [33]. Yun-Long Zeng, Hao-Wen Huang, Jian-Hui Jiang, Mei-Na Tian, Chun-Xiang Li, Chun-Ran Tang, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu. Novel looped enzyme-polyamidoamine dendrimer nanohybrids used as biosensor matrix. *Analytica Chimica Acta* 604, 170-176, **2007**.
- [34]. Chouteau C., Dzyadevych S., Durrieu C., Chovelon J.M., « A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples », *Biosensors and Bioelectronics*, 21 :273{281. **2005**.
- [35]. Anh T.M., Dzyadevych S., Prieur N., Duc C.N., Pham T.D., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.M., «Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor », *Materials Science and Engineering C*, 26 :453{456. **2006**.
- [36]. Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Chovelon J.M., « Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors », *Analytica Chimica Acta*, 459 :33{41. **2002**.
- [37]. Dzyadevich S.V., Shul'ga A.A., Soldatkin A.P., Hendji A.M.N., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., « Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides », *Electroanalysis*, 6:752{758. **1994**.

Références bibliographiques

- [38]. Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Jdanova A.A.S.A.S., Dzyadevich S.V., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Clechet P., « Glucose sensitive conductometric biosensor with additional Nafion membrane : reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range », *Analytica Chimica Acta*, 288 :197{203. **1994**.
- [39]. Dzyadevich S.V., Arkhipova V.N., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Shul'ga A.A., « Glucose conductometric biosensor with potassium hexacyanoferrate(III) as an oxidizing agent », *Analytica Chimica Acta*, 374 :11{18. **1998**.
- [40]. Lee W.Y., Kim S.R., Kim T.H., Lee K.S., Shin M.C., Park J.K., « Sol-gel-derived thick film conductometric biosensor for urea determination in serum », *Analytica Chimica Acta*, 404 :195{203. **2000**.
- [41]. Dzyadevych S.V., Arkhipova V.N., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., « Conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis », *Current Topics in Analytical Chemistry*, 2 :179{186. **2001**.
- [42]. 69. R. Aravindan, P. Anbumathi, and T. Viruthagiri, *Indian Journal of Biotechnology* 6, 141, **2007**.
- [43]. Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C. Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances*. 19: 627-662, **2001**.
- [44]. Davranov K. & Khalameiser V. B. Current state of the study of microbial lipases. *Chemistry of natural compounds*. 33: 113-126, **1997**.
- [45]. Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in biotechnology*. 20: 433-437, **2002**.
- [46]. P. K. Ghosh, R. K. Saxena, R. Gupta, R. P. Yadav, and S. Davidson, *Sci. Prog.* 79, 119, **1996**.
- [47]. S. E. Godtfredsen, *Microbial Lipases, Microbial Enzymes and Biotechnology*, edited by W. M. Fogarty and E. T. Kelly, Elsevier Applied Sciences, Amsterdam, p. 255, **1990**.
- [48]. S. Cosnier, C. Gondran, J. C. Watelet, W. De Giovani, R. P. M. Furriel, and F. A. Leone, *Anal. Chem.* 70, 3952 **1998**.
- [49]. L. M. Moretto, P. Ugo, M. Zanata, P. Guerriero, and C. R. Martin, *Anal. Chem.* 70, 2163, **1998**.
- [50]. Godtfredsen SE, *Microbial lipases*, in *Microbial enzymes and biotechnology*, edited by WM Fogarty & ET Kelly (Elsevier Applied Sciences, Amsterdam), 255-273, **1990**.
- [51]. Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP & Davidson S. *Microbial lipases: Production and applications*, *Sci Prog*, 79, 119-157, **1996**.
- [52]. R Aravindan, P Anbumathi and T Viruthagiri, *Lipase applications in food industry*, *Indian Journal of Biotechnology*. Vol 6, pp 141-158, April **2007**.
- [53]. F. Kuralay, H. Özyörök, A. Yildiz., *Sensors and Actuators B* 109, 194, **2005**.
- [54]. B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys, *Biosensors and Bioelectronics*. 19, 1641, **2004**.
- [55]. Gilham D. & Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 36: 139-147, **2005**.
- [56]. Pabai F. *Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for inter esterification of better fat*. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179, **1997**.

Références bibliographiques

- [57]. Gargouri M., Akacha N.B., Kotti F. & Ben Rajeb I. Voie de la lipoxygénase valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de saveurs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12:185-202, **2008**.
- [58]. Gargouri Y., Julien R., Pieroni G., Verger R. & Sarda L. Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of lipid research.* 25: 1214-1221, **1984**.
- [59]. Heravi K. M., Eftekhari F., Yakhchali B. & Tabandeh F. Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus sp.* from soil. *Pakistan Journal of Biological Science.* 11: 740-745, **2008**.
- [60]. Petersen M. & Daniel R. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *World journal of microbiology & Biotechnology.* 22: 431-435, **2006**.
- [61]. Bagi K., Simon L.M. & Szajani B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 531-535, **1997**.
- [62]. Tina Rita Celli Zezza, Michelle de Souza Castilho, Nelson Ramos Stradiotto. Determination of phosphorus in biodiesel using 1:12 phosphomolybdic modified electrode by cyclic voltammetry. *Fuel* 95, 15-18, **2012**.

*Conclusion générale et
perspectives*

Conclusion générale et perspectives

La détermination des concentrations des pesticides dans les milieux aqueux reste encore aujourd'hui très difficile. Les scientifiques en charge de la métrologie devront garder sans cesse un œil critique sur toutes les étapes nécessaires à la détermination de ces concentrations des pesticides car il n'existe pas de méthode universelle infaillible. Les choses sont cependant en constante amélioration avec l'évolution de la technologie et le développement des méthodes d'analyse *in situ*.

L'analyse chimique moderne utilise des instruments de plus en plus sensibles, plus de la moitié des analyses concernent des analystes à des concentrations très faibles dites à l'état de trace ou ultra trace.

Les biocapteurs suppriment les opérations de prélèvement, d'analyse et réduisent l'intervention humaine et le coût du personnel. Ils interviennent dans le contrôle de processus, permettent l'automatisation. Ils améliorent également la fiabilité des procédés et conduisent donc à un produit de meilleure qualité.

Les techniques d'analyse *in situ*, capables de donner directement un résultat analytique en laboratoire, présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux méthodes classiques. Les méthodes *in situ* permettent de multiplier le nombre d'analyses conduites et donc d'obtenir des données fiables, simples et rapides pour évaluer le degré de pollution des milieux donnés. Une de leurs caractéristiques est de fournir des réponses rapides, ce qui les rend particulièrement adaptées pour sélectionner les échantillons que l'on soumettra au laboratoire pour des analyses complètes.

De manière générale, la conception d'un biocapteur se base sur l'association d'une macromolécule biologique faisant office de récepteur à un transducteur physique ; le couplage de la matrice enzymatique organique CRL-BSA-GA à l'interface de l'électrode en platine. Les propriétés de reconnaissance moléculaire de la biomolécule choisie (CRL-BSA) confèrent une sélectivité à l'interaction biomolécule-analyte cible (CRL-BSA-diclofop méthyle). Cette interaction est, grâce au transducteur, à l'origine d'un signal électrique impédimétrique, facilement mesurable, qui après traitement peut être directement corrélé à la concentration de l'analyte cible constitue en effet la chaîne analytique complète pour une mesure qualitative et quantitative fiable du diclofop-méthyle cible à l'état de traces dans le PBS.

Conclusion générale et perspectives

La réalisation des biocapteurs enzymatiques et l'optimisation de ses performances analytiques ont nécessité des considérations techniques approfondies. La validation du dispositif a demandé une maîtrise parfaite des paramètres intervenant dans l'obtention du résultat quantitatif. La somme des connaissances acquises au cours du développement de l'appareillage a ainsi permis la rédaction de deux publications internationales.

Le bon fonctionnement de biocapteur est validé en laboratoire. Celui-ci assure l'identification et la mesure des diclofop-méthyle dans le PBS à des concentrations allant jusqu'à $5,99.10^{-12}$ g.L⁻¹. Les paramètres sensibles concernant l'étude des biocapteurs du diclofop-méthyle entre le pH du milieu, la température, l'effet des interférents des métaux lourds et des pesticides, ainsi que la caractérisation de ce biocapteurs par la voltamétrie cyclique et la conductimétrie ont également été identifiés

Les biocapteurs enzymatiques élaborés présentent néanmoins quelques inconvénients et notamment la nécessité d'étudier la sélectivité de ces biocapteurs et de valider les résultats en les comparant à ceux obtenus en laboratoire avec l'élément de référence (le diclofop-méthyle).

L'étude de l'interférence des biocapteurs élaborés par les pesticides montre que le biocapteur à base de la lipase de *Candida rugosa* a une large gamme d'applications et la possibilité désormais d'obtenir des résultats aussi bons voir meilleurs que ceux obtenus vis-à-vis le diclofop-méthyle. Ces résultats rendent ce biocapteur enzymatique aussi sélectif au chlorpyrifos-éthyle puisqu'il contient une fonction ester.

Avec une large gamme d'applications et la possibilité désormais d'obtenir des résultats aussi bons voir meilleurs que ceux obtenus en laboratoire, les analyseurs transportables ont certainement un avenir prometteur en milieu environnemental.

La dernière étape du développement consiste donc à conduire à l'élaboration du biocapteur du diclofop-méthyle en se basant sur une autre enzyme d'origine animale qui est la lipase de pancréas de porc (*LPP*). L'étude permettra de confirmer les performances du système et d'illustrer l'intérêt de la technique dans le domaine de l'analyse des milieux aqueux. Les résultats des deux biocapteurs enzymatiques montrent que la détection du diclofop-méthyle par les deux enzymes (la *CRL* et la *LPP*) se fait par hydrolyse de celui-ci.

Conclusion générale et perspectives

L'étude de l'activité de la *lipase de Candida rugosa* vis-à-vis le diclofop-méthyle confirme et peut valider ces conclusions.

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche sont :

- ✓ la composition de la membrane : 5%(w/w) lipase de *Candida rugosa* (CRL) 5% (w/w) Albumine de bovine sérique (BSA) solubilisé dans 90 μ L d'un tampon à 20 mM de KH_2PO_4 de pH 7,4 et 10% de glycérol en masse.
- ✓ Les mesures électrochimiques sont effectuées dans le tampon phosphate salin (PBS de 10 mM)) contenant 140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,1 mM de Na_2HPO_4 et 1,8 mM de KH_2PO_4 .
- ✓ la valeur optimale de pH est égale à 8.
- ✓ la température optimale est égale à 30°C.
- ✓ le domaine de linéarité est de $5,99.10^{-12}$ à $5,90.10^{-2}\text{g.L}^{-1}$.
- ✓ La limite de détection est de $5,99.10^{-12}\text{g.L}^{-1}$.
- ✓ les éléments gênants pour la détection de diclofop-méthyle sont : le cuivre, le magnésium, le cadmium et le chlorpyriphos-éthyle.
- ✓ le biocapteur donne de bons résultats pendant presque trois mois (la durée de vie).

Comme perspectives, nous proposons l'immobilisation de l'enzyme dans d'autres matrices telles que la célite, la bentonite, le calix ; etc, Cela nous permettra de l'immobiliser par d'autres techniques comme l'adsorption. L'étude de la détection de polluant organique (le diclofop-méthyle) dans d'autres milieux comme les eaux de rivières peut être envisagé.

D'autres paramètres influençant la détection sont à étudier, le pH-stat peut être utilisé aussi pour connaître l'effet des paramètres influençant l'hydrolyse du diclofop-méthyle par la lipase de *Candida rugosa* (CRL). Ainsi l'étude des paramètres influençant la réponse du biocapteur de la CRL par la méthode des plants d'expériences et de comparer ces résultats avec ceux obtenus par les techniques analytiques (la spectroscopie d'impédance électrochimiques et la voltamétrie cyclique).

Enfin, pour améliorer le biocapteur élaboré, nous proposons d'étudier la membrane enzymatique par MEB, AFM et par la voltamétrie à vague carrée que nous n'avons pas pu réaliser au laboratoire par manque de matériels.