

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
BADJI MOKHTAR UNIVERSITY



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des Sciences de l'Ingéniorat Année 2019
Département de Génie des Procèdes

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Développement et modélisation de (bio)capteurs électrochimiques pour la détection de l'Amlodipine et de la Pénicilline en phase aqueuse

Option : Génie Chimique

par

DJAALAB ELBAHI

Directeur de Thèse : SAMAR Mohamed elhadi

Co-Directrice de Thèse : ZOUGAR Saida

Devant le Jury

Président	: DERRADJI Ahmed	Professeur	Université Annaba
Examineurs:	BENOUNIS Messaoud	Professeur	Université Khanchela
	MESSIKH Nabil	M.C.A	Université Skikda
	BOURENANE Saliha	M.C.A	Université Souk Ahras

A ma mère et à mon père

A mes frères et mes soeurs et tous qui me sont chers

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche de génie de l' environnement (LGE), département de Génie des Procédés, Université Badji Mokhtar Annaba.

En premier lieu, je remercie Dieu le Tout Puissant de m' avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Mr SAMAR Mohamed El-Hadi, Professeur à l' université de Badji Mokhtar-Annaba, pour avoir dirigé ce travail, pour son aide tout au long de ces années de travail en commun. Merci pour ses conseils, orientations et ses encouragements qui m' ont permis de progresser, et d' élargir mon champ de vision du travail de recherche. J' ai plus particulièrement apprécié le dévouement, l' enthousiasme et la rigueur scientifique avec lesquels il a su diriger mon travail. Toujours à l' écoute, Pr. Samar m' a accordé une très grande liberté d' action.

Je remercie infiniment Mme ZOUGAR Saida, Maître de conférences à l' Université de Annaba, de m' avoir fait découvrir le monde merveilleux des capteurs et de m' avoir accueillie au sein de son équipe, 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-directrice de thèse.

Mes remerciements vont également à tous l' équipe du laboratoire de recherche LGE, particulièrement Monsieur KHERRAT Rochdi, professeur au Laboratoire LGE - équipe capteur, biopile et corrosion. Sans oublier Mme LAMARI Rime docteur et chercheur au Laboratoire LGE, C' est grâce à Dr LAMARI que j' ai pu découvrir la préparation et l' immobilisation des enzymes.

Je remercie DERRADJI Ahmed, Professeur à l' Université de Badji Mokhtar Annaba, pour avoir présidé mon jury.

Je remercie BENOUNIS Messaoud, Professeur à l' Université Khanchela ; MESSIKH Nabil, MCA à l' Université de Skikda et BOURENANE Saliha, MCA à l' Université de Souk-Ahras pour avoir accepté d' examiner ce travail et d' en être les rapporteurs.

Pour finir, je remercie toute les personnes de département : enseignants, secrétaires, techniciens, thésards, permanents, pour leur contribution à une ambiance de travail agréable. Je remercie enfin ma famille pour son soutien sans faille durant toutes ces années.

ملخص

يركز العمل الرئيسي على تصميم ونمذجة أجهزة الاستشعار الكهروكيميائية (الحيوية). الهدف من الجزء التجريبي هو تصميم مستشعر كهروكيميائي (حيوي) قائم على أغشية بوليمرية تشتمل على مستقبلين مختلفين ، هما الليباز كإنزيم و β -cyclodextrin.

تم تطوير جهاز استشعار حيوي جديد للأملوديبين (AMD) يعتمد على الليباز من *Candida rugosa* (CRL) باستخدام مزيج من أكسيد الحديد والبولي انيلين والجيلاتين. تم قياس السلوك الكاثودي لـ AMD على إشارة الاختزال غير العكسية عند 0.185 فولت مقابل $Ag / AgCl$ عند درجة الحموضة 7.4 و 30 درجة مئوية في المحلول الفوسفاتي القلوي.

تم تطوير تحليل كهروكيميائي جديد للبنسلين V (Peni-V) يعتمد على β -cyclodextrin (β -CD) باستخدام البولي انيلين. تم تحضير بولي انيلين الذي يتضمن β -CD بواسطة طريقة البلمرة الكهروكيميائية. تمت دراسة ظاهرة احتواء β -CD وتطبيقها للكشف عن Penicillin V (Peni-V). تم قياس السلوك الكهروكيميائي لـ Peni-V بتركيزات تتراوح بين 10^{-8} M و 10^{-2} M مقابل $Ag / AgCl$ عند درجة الحموضة 7.4 وعند 30 درجة مئوية في محلول الفوسفات القلوي. تم الحصول على العلاقة بين تركيز Peni-V في شكل لوغاريتمي مع التيار ومع المقاومة.

تقدم النمذجة العددية تنفيذ الحلول العددية لاستجابة جهاز الاستشعار البيولوجي باستخدام Excel عبر الفروق المحدودة. توضح النتائج صحة وقوة طريقة التحسين هذه باستخدام جدول بيانات Excel في الحل الرياضي انتشار-تفاعل حركي في عملية الاستشعار البيولوجي الأنزيمي.

في النمذجة التحليلية، تمت مناقشة النمذجة الرياضية لحركية المستشعرات الحيوية الأنزيمية الحساسة للغاية. يتم تطبيق الطريقة القياسية لتحويل لابلاس العكسي وفقاً لنظرية Heaviside على حل معادلات انتشار-تفاعل. تم الإبلاغ عن محاكاة رقمية أيضاً باستخدام برنامج MATLAB.

الكلمات المفتاحية:

الليباز , أملوديبين , β - cyclodextrine , بنسلين V , بولي انيلين , النمذجة العددية , النمذجة التحليلية

Résumé

Les principaux travaux portent sur la conception et la modélisation de (bio)capteurs électrochimiques. L'objectif de la partie expérimentale est la conception de (bio) capteur électrochimique basé sur des membranes polymériques comprenant deux récepteurs différents, à savoir la lipase comme enzyme et la β -cyclodextrine.

Un nouveau biocapteur à base de lipase de *Candida rugosa* (CRL) a été développé pour l'amlodipine (AMD) utilisant un mélange d'oxyde de fer polyaniline et de gélatine). Le comportement cathodique de l'AMD a été mesuré sur le signal de réduction irréversible à 0,185 V par rapport à Ag /AgCl à pH 7,4 et 30 ° C dans un tampon phosphate alcalin.

Une nouvelle analyse électrochimique basée sur la β -cyclodextrine (β -CD) a été développée pour la pénicilline V (Peni-V) à l'aide de la polyaniline. Cette dernière incorporant la β -CD a été préparée par un procédé de polymérisation électrochimique. Le phénomène d'inclusion des β -CD a été étudié et appliqué pour détecter la pénicilline V (Peni-V). Le comportement électrochimique de Peni-V à des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-2} M a été mesuré par rapport à Ag / AgCl, à pH 7,4 et à 30 ° C dans un tampon phosphate alcalin. La relation entre la concentration de Peni-V sous forme logarithmique avec le courant en méthode potentiométrique et avec la résistance en impédimétrie a été obtenue.

La modélisation numérique présente la mise en œuvre de solutions numériques pour la réponse du biocapteur à l'aide d'Excel via les différences finies. Les résultats montrent la validité et la robustesse de cette méthode d'optimisation avec l'Excel dans la résolution d'un système mathématique de réaction cinétique-diffusion dans un processus de biocapteur enzymatique.

Dans la modélisation analytique, la modélisation mathématique de la cinétique hautement sensible du biocapteur enzymatique est discutée. La méthode standard d'inversion d'une transformée de Laplace selon le théorème d'expansion de Heaviside est appliquée pour résoudre les équations de réaction – diffusion couplées. Une simulation numérique est également rapportée à l'aide du logiciel MATLAB.

Mot clés : Lipase ; amlodipine ; β - cyclodextrine ; pénicilline V ; polyaniline ; modélisation numérique ; modélisation analytique.

Abstract

The main of this work is the design and modeling of electrochemical (bio) sensors. The objective of the experimental part is the design of (bio) electrochemical sensors based on polymer membranes including two different receptors namely lipase as enzyme and the β -cyclodextrin.

A new biosensor based on lipase from *Candida rugosa* (CRL) was developed for amlodipine (AMD) using a mixture of polyaniline iron oxide and gelatin. The cathodic behavior of AMD was measured on the irreversible reduction signal at 0.185 V versus Ag/AgCl at pH 7.4 and 30 °C in a phosphate alkaline buffer.

A new electrochemical analysis based on β -cyclodextrin (β -CD) was developed for penicillin V (Peni-V) using polyaniline. Polyaniline incorporating β -CD was prepared by electrochemical polymerization method. The inclusion phenomenon of β -CDs has been studied and applied to detect penicillin V (Peni-V). The electrochemical behavior of Peni-V at concentrations between 10^{-8} and 10^{-2} M was measured versus Ag/AgCl at pH 7.4 and 30 °C in a phosphate alkaline buffer. Relationship of Peni-V concentration in logarithmic mathematical form with current in potentiometric method and with resistance in impedimetric were obtained.

Numerical modeling presents the implementation of numerical solutions for the response of biosensor using Excel via finite differences. The results show the validity and robustness of this optimization method with Excel Spreadsheet in solving mathematical system of kinetic reaction-diffusion in enzyme biosensor process.

In the analytical modeling, the mathematical modeling of highly sensitive enzyme biosensor kinetics is discussed. The standard method of inverting a Laplace transform according to the Heaviside expansion theorem is applied to solve the coupled reaction–diffusion equations. A numerical simulation is also reported using the MATLAB software program.

Keywords: Lipase; amlodipine; β -cyclodextrin; penicillin V; polyaniline; numerical modeling; analytical modeling

Table des matières

Dédicace	I
Remerciements	II
ملخص	III
Résumé	IV
Abstract	V
Table des matières	VI
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XV
Introduction générale	1
I. Etude bibliographique	4
<i>I.1 Introduction</i>	<i>4</i>
<i>I.2 Généralités sur les capteurs</i>	<i>4</i>
I.2.1. Définition	5
I.2.2. Structure général d'un capteur	5
I.2.3. Différents types d'un capteur	6
I.2.3.1. Capteurs actifs	6
I.2.3.2. Capteurs passifs	7
I.2.4. Caractéristiques métrologiques d'un capteur	8
I.2.4.1. Etalonnage	8
I.2.4.2. Étendue de mesure	8
I.2.4.3. Domaine de linéarité	9
I.2.4.4. Sensibilité	9
I.2.4.5. Temps de réponse	9
I.2.4.6. Résolution - Précision	9
I.2.4.7. Reproductibilité ou répétabilité	9
<i>I.3. Les biocapteurs</i>	<i>10</i>
I.3.1. Historique	10
I.3.2. Définition	10
I.3.3. Différents types de biocapteur	11
I.3.3.1. (bio) capteur optique	11
I.3.3.2. (bio) Capteur à effet piézoélectrique	11
I.3.3.3. (bio) Capteur thermique	12
I.3.3.4. (bio) Capteurs électrochimiques	12
I.3.3.4.1. (bio) Capteurs potentiométrique	13

I.3.3.4.2. (bio) Capteurs conductimétriques	14
I.3.3.4.3. (bio) Capteurs ampérométriques	15
I.3.3.4.4. (bio) Capteurs impédancemétrique	16
I.3.4. Les méthodes d'immobilisation	17
I.3.4.1. L'adsorption	17
I.3.4.2. La réticulation	18
I.3.4.3. L'encapsulation	19
I.3.4.4. Les assemblages moléculaires	20
I.3.4.5. Le greffage chimique	22
I.3.5. Biorecepteur enzymatique	23
I.3.5.1. Généralités sur les enzymes	23
I.3.5.2. Classification	24
I.3.5.3. Site actif	25
I.3.5.4. Mécanismes de catalyse	25
I.3.5.5. Cinétique enzymatique	26
a. Modèle de Michaelis-Menten	26
b. Représentations de l'équation de Michaelis-Menten	29
b. Paramètres cinétiques	30
<i>I.4. Conclusion</i>	31
<i>Références</i>	31
II. Méthodes d'analyse et modélisation	36
<i>II.1. Introduction</i>	36
<i>II.2. Méthodes expérimentales utilisées</i>	36
II.2.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).....	37
II.2.1.1. Principe de la spectroscopie d'impédance	37
II.2.1.2. Théorie du calcul de l'impédance	39
a. Définition de l'impédance	39
b. Représentation graphique de l'impédance	40
c. Les principaux composants électriques d'impédance	41
II.2.1.3. Impédance de différents phénomènes électrochimiques	42
a. Résistance de la solution	42
b. Capacité double couche	42
c. Résistance de transfert de charge	43
d. Impédance de Warburg	44
II.2.1.4. Etude de l'impédance pour un système électrochimique	44
II.2.1.5. Méthode utilisée pour le fitting	46
II.2.2. La Voltamétrie cyclique	47
II.2.2.1. Principe	48
II.2.2.2. Différents types de voltammograms	48
<i>II.3. Méthodes théoriques utilisées</i>	51
II.3.1. Principe de modélisation mathématique	51
II.3.2. Etude cinétique et modélisation d'un (bio) capteur	52
II.3.3. Equations de bilan matière	53
II.3.4. Biocapteurs mono-enzymatiques	54

II.3.5. Méthode mathématique de résolution	55
II.3.5.1. Méthode analytique	55
II.3.5.2. Méthode numérique	55
II.3.5.2.1 Schéma d'Euler explicite	56
II.3.5.2.2 Schéma d'Euler implicite	56
II.3.5.2.3 Schéma de Crank-Nicholson (1947)	56
II.3.6. Logiciel pour modélisation biocapteur	57
II.3.6.1. COMSOL Multiphysics	57
II.3.6.1.1 Historique	57
II.3.6.1.2 Introduction	57
II.3.6.1.3. Conception numérique du modèle biosensor	58
II.3.6.1.4. Avantages de conception avec COMSOL Multiphysics	60
II.3.6.2. Matlab	61
II.3.6.3. Feuille de calcul Excel	61
<i>II.4. Conclusion</i>	62
<i>Références</i>	62
III. Biocapteur électrochimique pour la détection d'Amlodipine	66
<i>III.1. Introduction</i>	66
<i>III.2. Expérimental</i>	69
III.2.1. Appareillages	69
III.2.2. Produits chimiques et réactifs	69
III.2.3. Préparation de PANI / Oxyde de Fer	69
III.2.4. Modification d'électrode et immobilisation de l'enzyme Candida Rugosa Lipase	71
<i>III.3. Résultats et discussions</i>	72
III.3.1. Caractérisation de l'oxyde de fer - polyaniline	72
III.3.1.1. Caractérisation avec micrographie au MEB	72
III.3.1.2. Caractérisation spectrale FTIR	72
III.3.1.3. Spectroscopie UV	73
III.3.2. Caractéristiques électrochimiques sur la surface de l'électrode	74
III.3.3. Etude de voltampérométrie cyclique du biocapteur	76
III.3.3.1. Effet de concentration	76
III.3.3.2. Mécanisme de réaction proposé pour l'amlodipine	77
III.3.3.3. Effet de la vitesse de balayage	79
III.3.4. Optimisation des conditions de travail	81
III.3.4.1. Effet du pH sur la réponse du biocapteur	81
III.3.4.2. Effet de la température sur la réponse du biocapteur	82
<i>III.4. Conclusion</i>	83
<i>Références</i>	83
IV. Elaboration de l'électrode modifiée à base de β-Cyclodextrine- polyaniline pour la détection de la pénicilline V	87
<i>IV.1. Introduction</i>	87

<i>IV.2. Expérimental</i>	90
IV.2.1. Réactifs et solutions	90
IV.2.2. Appareillages.....	90
IV.2.3. Préparation de films PANI et β -Cyclodextrine / PANI	91
<i>IV.3. Résultats et discussions</i>	92
IV.3.1. Electrodeposition de polyaniline et de polyaniline avec la β -Cyclodextrine	92
IV.3.2. Etude du mécanisme d'électrodeposition	93
IV.3.3. Caractérisation électrochimique	97
IV.3.3.1. Par voltammétrie cyclique	97
IV.3.3.2. Par spectroscopie d'impédance électrochimique	98
IV.3.4. Application d'un capteur de polyaniline dopé à la β -Cyclodextrine	100
IV.3.4.1. Détection électrochimique de Peni-V avec CV	100
IV.3.4.2. Détection par l'impédance électrochimique	101
IV.3.4.3. Mécanisme proposé pour la détection de Peni-V	103
<i>IV.4. Conclusion</i>	105
<i>Références</i>	105
V. Modélisation numérique de la réaction -diffusion dans le processus de biocapteur enzymatique avec Excel Spreadsheet	110
<i>V.1. Introduction</i>	110
<i>V.2 Cinétique et modèle mathématique</i>	111
V.2.1 Modèle cinétique	111
V.2.2 Modèle mathématique	111
V.2.3 Forme sans dimension du problème	112
<i>V.3 Solution numérique de l'équation de la réaction -diffusion</i>	113
V.3.1 Méthode de différence finie	113
V.3.2 Discrétisation	114
V.3.3 Application Excel	115
<i>V.4 Résultats et discussions</i>	116
V.4.1 Validation du modèle	116
V.4.2 Réaction - effet de diffusion	117
<i>V.5. Conclusion</i>	118
<i>Références</i>	118
VI. Cinétique de modélisation mathématique du biocapteur enzymatique hautement sensible	120
<i>VI.1. Introduction</i>	120
<i>VI.2. Modèle cinétique et mathématique</i>	121
VI.2.1 Modèle cinétique	121
VI.2.2 Modèle mathématique du biocapteur hautement sensible	122
VI.2.3 Forme sans dimension du problème	122

Table des matières

<i>VI.3 Solution analytique de biocapteur hautement sensible</i>	123
VI.3.1 Solution analytique de cinétique de concentration du substrat	123
VI.3.2 Solution analytique de concentration en produit cinétique	125
<i>VI.4 Résultats et discussions</i>	127
VI.4.1 Validation de la solution analytique	127
VI.4.2 Effet de la réaction - diffusion	128
<i>VI.5. Conclusion</i>	129
<i>Références</i>	130
Conclusion Générale	132
Annexes	133

Liste des figures

Figure I.1 : La chaine d’acquisition d’un capteur 4

Figure I.2 : Principe d’un capteur 5

Figure I.3 : Structure d’un capteur 5

Figure I.4 : Courbe d’étalonnage d’un capteur 8

Figure I.5 : Les biocapteurs 10

Figure I.6 : Schémas d’un biocapteur optique 11

Figure I.7 : Schémas d’un biocapteur piézoélectrique 12

Figure I.8 : Représentation schématique d'un ISFET 14

Figure I.9 : Représentation schématique d’un (bio) capteur conductimétrique 14

Figure I.10 : Représentation schématique d’un (bio) capteur Impédancemétrique 15

Figure I.11 : Représentation schématique d’un (bio) capteur Impédancemétrique 16

Figure I.12 : Adsorption des enzymes sur un support 18

Figure I.13 : Immobilisation des biocapteurs sur un support avec réticulation méthode 19

Figure I.14 : Immobilisation des biocapteurs sur un support avec encapsulation méthode 19

Figure I.15 : Structure de la β -Cyclodextrine 20

Figure I.16 : Représentation formation d’un complexe d’inclusion avec β -cyclodextrine 21

Figure I.17 : Représentation schématique de la formation du complexe avidine-biotine 21

Figure I.18 : Représentation schématique de la formation du complexe de cuivre avec la fonction NTA et deux fonctions biotines 21

Figure I.19. Greffage chimique 22

Figure I.20 : Evolution de la concentration des espèces réagis 27

Figure I.21 : Représentation graphique d’une cinétique enzymatique michaélienne. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat 29

Figure I.22 : Représentation graphique de la linéarisation de l’équation de Michaelis-Menten, A : représentation de Lineweaver-Burk et B : représentation d’Eadie-Hofstee 30

Figure II.1 : Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé 37

Figure II.2 : Schéma d’une fonction de transfert 38

Figure II. 3 : Principe de l’analyse en petits signaux d’un système électrochimique nonlinéaire soumis à une perturbation sinusoïdale 39

Figure II.4 : Schéma représentatif de l'impédance en coordonnées cartésiennes et polaires ...	40
Figure II.5 : Circuit équivalent de Randles	44
Figure II.6 : Diagramme de Nyquist pour un système faradique	46
Figure II.7 : Voltampérométrie cyclique. (a) : forme du potentiel imposé ($E f(t)$), (b) : réponse en courant $I = f(E)$	47
Figure II.8 : Variation du courant en fonction du temps en régime de diffusion pure	49
Figure II.9 : Allure du voltampérogramme cyclique d'un système rapide en régime de diffusion pure (Red seul présent en solution)	49
Figure II-10 : Différentes allures des voltampérogrammes cycliques selon la rapidité du système	49
Figure II.11. Représentation schématique de la configuration du biocapteur avec l'enzyme immobilisée dans une membrane d'épaisseur L	54
Figure II.12. L'architecture et la représentation des modules « COMSOL ».....	59
Figure II.13. Conception numérique du modèle biocapteur enzymatique	60
Schéma III.1. Représentation schématique de la synthèse du composite PANI / Fe_2O_3 par polymérisation chimique	65
Schéma III.2. Schéma de l'élaboration du biocapteur à l'aide de PANI/ Fe_2O_3	71
Figure III.1. Structures chimiques de l'amlodipine.....	68
Figure III.2. Micrographies MEB a) $10 \mu m$ et b) $5 \mu m$ de la surface des composites conducteurs PANI/ Fe_2O_3	72
Figure III.3. Spectres FT-IR de composites PANI / Fe_2O_3	73
Figure III.4. Spectres UV-vis des composites PANI / Fe_2O_3	74
Figure III. 5. Caractérisation de l'électrode de Pt nue et modifiée (1) par voltamétrie cyclique à $50 mV/s$ (2) par impédance à un potentiel $-200 mV$	75
Figure III.6. Voltammogrammes CV pour différentes concentrations d'AMD dans le PBS (à pH 7,4, 10 mM)	76
Figure III.7. Variation de l'intensité du pic cathodique suite à l'injection de différentes concentrations de l'amlodipine.	77
Schéma III.3. Cinétique enzymatique de la réaction d'hydrolyse des 1,4-DHP racémiques	78
Schéma III.4. Cinétique enzymatique de la réaction d'hydrolyse des 1,4-DHP avec deux étapes	78
Schéma III. 5. Mécanisme proposé de la cinétique enzymatique d'hydrolyse CRL de l'AMD	79

Figure III.8. a) Voltammogrammes d'amlodipine (1.0×10^{-6} M dans PBS, pH 7.4 avec Pt modifié) avec b). Représentation graphique de la fonction : $I_p = f(v^{1/2})$	80
Figure III.9. Effet du pH sur la réponse du biocapteur. [Les conditions de travail ; tampon phosphate, 50 mM et $T = 35^\circ \text{C}$. 5 mg / ml de solution d'amlodipine]	81
Figure III.10. Effet de la température sur la réponse du biocapteur [Les conditions de travail; tampon phosphate, 50 mM et pH = 7,4. 5 mg / ml de solution d'amlodipine]	82
Schéma IV.1. Structures chimiques de la pénicilline V	88
Figure. IV.1. Représentation de la synthèse du composite β -Cyclodextrine-polyaniline par polymérisation électrochimique.	91
Figure. IV.2. Electrode de travail avant et après l'électropolymérisation.	91
Figure. IV.3. Réponses de la CV enregistrées lors de la polymérisation électrochimique d'un film de PANI à Pt dans une solution de 0,1 M d'aniline, b) film de β -Cyclodextrine / PANI dans une solution de 0,1 M d'aniline et HCl 1 M, une vitesse de balayage de 50 mV s^{-1}	92
Figure. IV.4. Voltammogrammes indicatifs de l'électrodéposition de monomère d'aniline en présence de β -cyclodextrine.....	94
Schéma IV.2. Cinétique de transformation de la leucoéméraldine / éméraldine	94
Schéma IV.3. Cinétique de transformation de l'éméraldine / pernigraniline.	95
Figure. IV. 5 Relation entre le nombre de cycles et a) le courant de pic d'oxydation à PANI-Pt b) le courant de pic d'oxydation à la β -Cyclodextrine/PANI -Pt, c) le courant de pic de réduction à β -Cyclodextrine/PANI -Pt b) le courant de pic de réduction à la PANI-Pt	96
Figure. IV.6. Voltamétrie cyclique a) électrode nue de Pt et (b) électrode de Pt modifiée par de la β -cyclodextrine / polyaniline dans PBS (pH 7,4) + solution 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$	97
Figure. IV.7. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), a) électrode nue de Pt et (b) électrode de Pt modifiée par de la β -cyclodextrine / polyaniline dans PBS (pH 7,4) + solution 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$	97
Figure. IV.8 Circuit électrique équivalent permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant a) l'électrode nue, b) l'électrode modifiée	99
Figure. IV.9 a) Voltammogrammes cycliques de Peni-V avec différentes concentrations à une électrode à film PANI- β -CD en solution électrolytique tampon phosphate à pH 7,4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, b) tracé du courant de pointe, I_{pa} , en tant que fonction du logarithme de la concentration en Peni-V	99
Figure. IV.10.a) 3D b) Représentation 2D EIS d'une électrode en platine modifiée avec de la β -Cyclodextrine-polyaniline avec différentes concentrations de Peni-V (entre 10^{-8} et 10^{-2} M); dans du PBS (pH = 7,4) contenant 5 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$. La plage de fréquence est comprise entre 100 MHz et 100 kHz	101
Figure.IV.11. Tracé de la variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration en Peni-V	103
Schéma IV.4. Mécanisme proposé pour la détection de Peni-V	104

Liste des figures

Figure.V.1. Système diffusion - réaction dans le processus du biocapteur	111
Figure.V.2. La méthode de la différence finie	113
Figure.V.3. Modélisation de la cinétique par Excel de la concentration du substrat	115
Figure. V.4. Modélisation de la cinétique par Excel de la concentration du produit	115
Figure. V.5. Réponse de la modélisation par Excel du biocapteur enzymatique a) substrat avec $\alpha=0.5$. b) substrat avec $\alpha=1$ c), produit avec $\alpha=0.5$, d) produit avec $\alpha=1$	116
Figure. V.6. Cinétique de modélisation par Excel de la concentration de substrat (application au biocapteur).....	117
Figure.V.7. Cinétique de modélisation par Excel de la concentration de produit (application au biocapteur).....	117
Figure. VI.1. Cinétique de la diffusion avec la réaction dans le processus du biocapteur	121
Figure .VI.2. Réponse de modélisation mathématique du biocapteur enzymatique A) substrat avec $a = 1$. B) Substrat avec $a = 0,1$ C), produit avec $a = 1$, D) produit avec $a = 0,1$	127
Figure. VI.3. Modélisation mathématique de la concentration du substrat dans le biocapteur hautement enzymatique.....	128
Figure. VI.4. Modélisation mathématique de la concentration du produit dans le biocapteur hautement enzymatique	129

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Grandeurs d'entrée et de sortie et effet utilisé pour les capteurs actifs 6

Tableau I.2 : Exemples de capteurs passifs 7

Table I.3. (Bio) Capteur thermique avec réactions enzymatique 12

Tableau I. 4. Nomenclature des enzymes et réactions correspondantes 24

Table II.1 : Tableau récapitulatif de l'impédance des composants électriques élémentaires ... 41

Tableau .IV.1: Paramètres de simulation des diagrammes de Nyquist 102

Introduction générale

Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce chimique ou biochimique ainsi que l'évaluation de sa quantité ou de sa concentration sont généralement complexes, volumineux, coûteux et souvent difficiles à mettre en œuvre avec temps de réponse souvent très longs (préparation des échantillons, étalonnage, durée de l'analyse proprement dite, sortie des données...). Depuis une trentaine d'années, ils font face à l'avènement des capteurs (bio) chimiques appelés plus couramment biocapteurs. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio) chimique en un signal électrique facilement exploitable. Les biocapteurs sont devenus aujourd'hui primordiaux du fait de leurs nombreuses applications dans des domaines de recherche scientifique (fondamentale et appliquée) très divers. Des besoins très importants sont apparus récemment dans l'ensemble des sciences de la vie (biologie, biochimie, médecine et agroalimentaire) et de l'environnement (pollution).

Ces dernières années, les données scientifiques mettent en évidence ***la présence de médicaments dans l'environnement*** et essaient d'appréhender cette problématique depuis les sources jusqu'aux risques sanitaires et environnementaux.

La présence et l'impact des résidus de médicaments dans l'environnement constituent un sujet de préoccupation récent et qui a pris une ampleur notable ces dernières années en Algérie comme dans les pays voisins.

L'Algérie possède un grand stock de médicaments périmés qui gisent sur des milliers de mètres carrés... Les responsables principaux de ces déchets sont les grands laboratoires pharmaceutiques qui génèrent et stockent des quantités énormes de résidus toxiques, il faut savoir que tous les types de médicaments périmés doivent être incinérés. Malheureusement, cette opération ne se fait pas en Algérie par manque d'établissements spécialisés. Les quatre établissements (existants) ne peuvent pas incinérer 150 t de déchet annuellement. Le traitement des produits pharmaceutiques périmés et des déchets accumulés depuis des années a un coût important.

L'État en tant que force publique et régulateur du secteur économique doit intervenir pour assainir le problème de la pollution chimique nuisible à la santé de la population.

Au plan réglementaire, cette catégorie de déchets (déchets pharmaceutique et médicaux) est régie par le décret exécutif n°03-477 du 9 décembre 2003 fixant les modalités et les procédures d'élaboration, de publication et de révision du plan national de gestion des déchets spéciaux (section 3 pour les déchets toxiques).

En effet, les biocapteurs apparaissent aujourd'hui comme des outils très 'élégants dans différents domaines : biotechnologies, technologies biomédicales, environnement, agro- alimentaires... En particulier, des besoins réels existent pour la détermination de divers métabolites et/ou toxiques dans différents milieux complexes.

De plus, les biocapteurs profitent de la sélectivité inhérente aux systèmes biologiques, à savoir la reconnaissance entre une enzyme et son substrat ou encore la reconnaissance spécifique entre un anticorps et un antigène. Ces différentes affinités peuvent être utilisées pour mettre en place des capteurs très spécifiques à la reconnaissance d'une molécule ciblée. C'est pourquoi la classe des biocapteurs est actuellement très étudiée, la spécificité et la sensibilité étant deux des problématiques à prendre en compte lors de la conception d'un système de détection. Par exemple, si l'on prend le cas du capteur le plus couramment décrit dans la littérature, à savoir le capteur à glucose, la modification de la surface, la cible et son environnement jouent un rôle essentiel dans la conception du capteur. L'intérêt d'un tel système repose sur la faculté du capteur à doser le glucose directement dans le sang. Or, le sang est un milieu très complexe au sein duquel il existe une très grande variété d'espèces chimiques, rendant la détection d'une molécule ciblée d'autant plus difficile. C'est ici qu'interviennent les biocapteurs de par leur spécificité.

Le but de ce travail est de développer deux types de (bio)capteurs électrochimiques pour détecter deux principes actifs : l'Amlodipine comme cardiovasculaire avec une enzyme (lipase) et la pénicilline comme antibiotique avec la β -Cyclodextrine, suivi par des études de modélisation, analytique et numérique sur la cinétique des réactions durant la préparation de biocapteur afin de mieux comprendre le développement et le design de ces nouveaux (bio)capteurs.

La première partie de ce manuscrit comporte deux chapitres théoriques. Le premier chapitre a été consacré sur des rappels sur les capteurs chimiques et biologiques ainsi que les différents types existants, le développement des méthodes d'immobilisation de biomolécules sur une surface et s'attarde sur le développement des biocapteurs électrochimiques. Nous avons présenté également quelques notions sur les enzymes utilisées pour la détection des espèces chimiques. Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit les différentes méthodologies utilisées pour la réalisation de différents types de plateformes de détection électrochimique, en associant quelques éléments visant à la compréhension des notions de base sur la modélisation.

La seconde partie met en évidence le contexte dans lequel se situe le sujet de thèse ainsi que les différents choix technologiques associés à la conception et la réalisation de deux différents (bio) capteurs électrochimiques. Le premier biocapteur a été utilisé comme modèle pour la suite des travaux de modélisation et portera sur la détection de l'Amlodipine par une méthode électrochimique que la voltammétrie cyclique. De même qu'une technique d'immobilisation de la lipase du *Candida rugosa* mettant en jeu un film polyaniline dopé par Fe_2O_3 a été adoptée. Le second (bio)capteur traitera la détection de la Pénicilline, une cible de grand intérêt, par l'inclusion de la β -Cyclodextrine dans une matrice à base de polyaniline.

La troisième partie est consacrée au développement du modèle mathématique et à la caractérisation cinétique du biocapteur durant la détection. La conception du biocapteur est discutée au cours de l'étude ainsi que la modélisation analytique et numérique

Afin de faciliter la lisibilité du document tout en maintenant la présentation des résultats complets, des éléments plus détaillés ont été placés en annexes :

- l'annexe A contient des informations bibliographiques détaillées, complémentaires du chapitre V et VI ; **Code Matlab**.
- l'annexe B comporte des éléments détaillés de la présentation et l'utilisation des feuilles d'Excel pour la modélisation numérique moyennant la méthode des éléments finis.



**PARTIE -1-
GENERALITE SUR LES
(BIO)CAPTEURS ET LES
METHODES D'ANALYSES**





Chapitre I :
Généralité sur les (bio)capteurs

I.1 Introduction

Les recherches sur les (bio)capteurs contribuent à la révolution de la détection dans le domaine de la santé. Ils améliorent l'efficacité et diminuent les coûts des diagnostics et des traitements médicaux. Différentes stratégies ont été suivies pour le développement de ces (bio)capteurs afin d'obtenir un dispositif fiable et performant spécifique à la cible. Dans ce contexte, ce chapitre est une synthèse des nombreuses informations sur les biocapteurs que l'on peut trouver dans la littérature. Il aura pour but de présenter le contexte et les enjeux des (bio)capteurs afin de positionner le travail qui a été réalisé au cours de cette thèse.

Dans un premier temps, des généralités sur le (bio)capteur seront présentées. Dans un second temps, nous présenterons les principes de fonctionnement et les applications de quelques biocapteurs qui sont étudiés. Enfin, nous terminons avec une description des matériaux utilisés récemment pour le développement des biocapteurs dans le domaine de la nanotechnologie tout en précisant leur intérêt pour l'amélioration de tels dispositifs.

I.2 Généralités sur les capteurs

La chaîne d'acquisition permet de transformer une grandeur à mesurer en un signal électrique exploitable. Les capteurs sont les premiers des quatre éléments d'un système d'acquisition de données. Ils permettent de transformer une *grandeur physico-chimique* à mesurer G_m (température, concentration d'un gaz ...) en un *signal électrique* de sortie S_e (tension, intensité ...). Les capteurs donnent la relation $S_e = f(G_m)$, également appelée courbe d'étalonnage

La chaîne d'acquisition est intégrée dans des systèmes qui nécessitent le pilotage d'une grandeur. On obtient le schéma classique suivant :

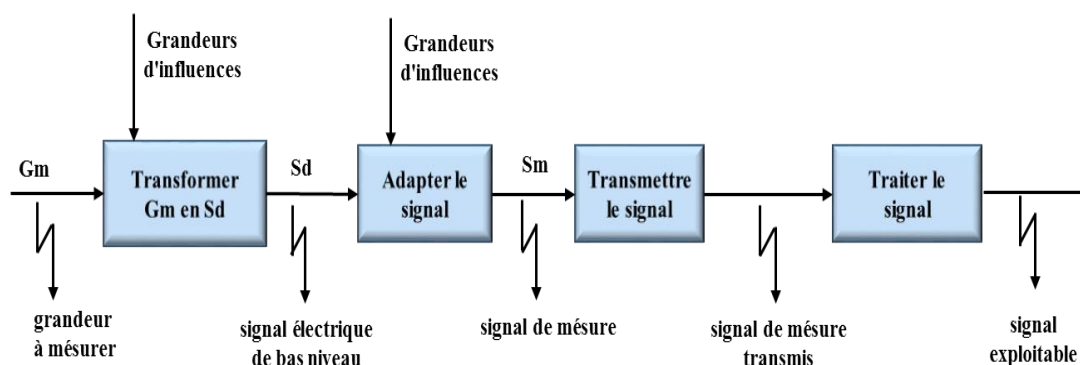


Figure I.1 : La chaîne d'acquisition d'un capteur.

I.2.1. Définition

Par définition, un capteur est un dispositif électronique capable de transformer une grandeur physique, chimique, biologique... (mesurande) en une grandeur électrique, généralement une tension ou un courant (la figure I.2 présente le principe d'un capteur) [1].

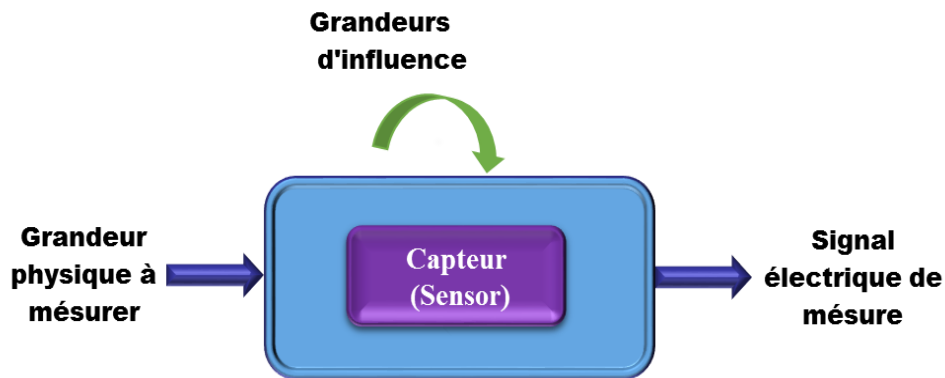


Figure I.2 : Principe d'un capteur [2].

Dans l'analyse chimique, Un capteur chimique est un système simple constitué d'une **couche sensible** permettant la reconnaissance de l'espèce à mesurer et d'un système transducteur transformant l'interaction chimique en un signal électrique de sortie. Ses fonctions sont soit de mesurer la concentration d'une entité particulière dans le cas des analyses quantitatives, soit de caractériser l'existence d'une entité dans un mélange dans le cas de l'analyse qualitative. Il existe plusieurs familles de capteurs chimiques qui se distinguent par le type de couche sensible et le principe de transduction. Les capteurs chimiques peuvent fonctionner en phase aqueuse comme en phase gazeuse. Plus précisément, un capteur de gaz est un élément donnant une information représentative de la concentration d'un composant chimique dans un mélange gazeux dont les conditions environnementales physiques doivent être connues (température, humidité relative ...).

I.2.2. Structure générale d'un capteur

Les différentes parties constitutives d'un capteur sont : Le corps d'épreuve, le transducteur, le boîtier et l'électronique de conditionnement [3] (figure I.3) :

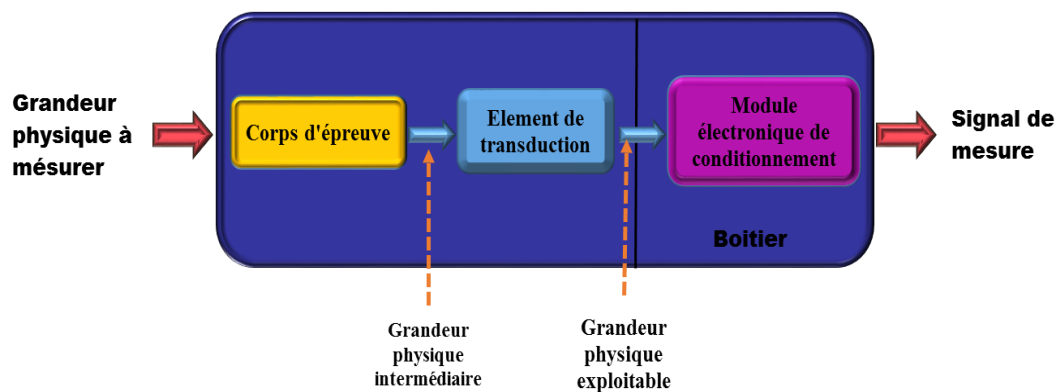


Figure I.3 : Structure d'un capteur [3].

A. Le corps d'épreuve

Le corps d'épreuve est un élément sensible qui réagit avec la grandeur à mesurer. Il a pour rôle de transformer la grandeur à mesurer en une autre grandeur physique dite mesurable.

B. Transducteur

Le transducteur est un élément sensible lié au corps d'épreuve. Il traduit les réactions du corps d'épreuve en une grandeur électrique constituant le signal de sortie.

C. Le boîtier

Le boîtier est un élément mécanique de protection, de maintien et de fixation du capteur.

D. L'électronique de conditionnement

C'est un dispositif qui convertit le signal de sortie du capteur en un signal de mesure standard. Il fait le lien entre le capteur et le système de contrôle commande. Il a pour rôle d'amplifier et de traiter le signal électrique.

I.2.3. Différents types de capteurs

Suivant l'origine du signal électrique de sortie, les capteurs peuvent être classés dans diverses catégories selon :

- ❖ Leur mode de fonctionnement (fonctionnement actif ou fonctionnement passif)
 - Les capteurs actifs sont des capteurs modélisables par des générateurs. Ils transforment directement la grandeur physique à mesurer en énergie électrique.
 - Les capteurs passifs sont des capteurs modélisables par une impédance (Z). Ils ont besoin d'un apport d'énergie extérieure pour fonctionner et fournir un signal électrique.

a. Capteurs actifs

Ce type de capteurs fonctionne en générateur, dont une partie de l'énergie physique prélevée sur la mesurande est transformée directement en énergie électrique qui constitue le signal de sortie (tension ou courant) [4]. Les principes physiques mis en jeu sont présentés ci-dessous (Tableau I.1).

Tableau I.1 : *Grandeurs d'entrée et de sortie et effet utilisé pour les capteurs actifs*

Grandeur physique à mesurer	Effet utilisé	Grandeur de sortie
Température	Thermoélectricité	Tension
Flux de rayonnement Optique	Photoémission	Courant
	Effet photovoltaïque	Tension
	Effet photo-électrique	Tension
Force	Piézo-électricité	Charge électrique
Pression		
Accélération	Induction électromagnétique	Tension
Vitesse		
Position	Effet Hall	Tension
Courant		

b. Capteurs passifs

Ils sont constitués d'un matériau spécifique dont l'impédance (résistance, capacité ou inductance) est sensible au mesurande. Le tableau I.2 résume, en fonction du mesurande, les matériaux et les effets utilisés pour réaliser la mesure [4].

Tableau I.2 : Exemples de capteurs passifs.

Grandeur physique à mesurer	Effet utilisé	Matériaux utilisés
Température	Résistivité	Platine, Nickel, Cuivre ...
Position déplacement	Résistivité	Matériaux magnétorésistants
	Réductance/Inductance	Cuivre
	Capacitif	Aluminium
Flux de rayonnement optique	Résistivité	Semi-Conducteurs
Niveau	Constante diélectrique	Liquides isolants
Déformation	Résistivité	Alliages nickel/silicium dopé
	Perméabilité magnétique	Alliages ferromagnétiques
Humidité	Résistivité	Chlorure de lithium
	Constante diélectrique	Alumine, polymères

❖ Leur mode d'échantillonnage (échantillonnage actif ou échantillonnage passif). Le mode de mesure des capteurs est précisé lors de la détermination de la concentration des polluants gazeux dans l'air.

- En échantillonnage actif, un système d'aspiration permet de faire passer un flux de polluants à travers ou sur la surface sensible du capteur. L'air contenant le polluant est aspiré au moyen d'une pompe et d'un régulateur de débit massique.
- En échantillonnage passif, l'air contenant le polluant est transporté vers le capteur par diffusion moléculaire jusqu'à la surface sensible.

Le capteur se distingue du détecteur par le fait qu'il ne s'agit que d'une simple interface entre un processus physico-chimique et une information manipulable. Le détecteur est un appareil autonome se suffisant à lui-même, disposant d'un affichage ou d'un système de stockage des données et qui permet d'informer directement de manière qualitative et/ou quantitative de la présence d'un composé. Le capteur se compose uniquement d'éléments physico-chimiques qui réagissent sélectivement avec la grandeur à mesurer (Gm). Il est l'élément de base de la chaîne de mesure et ne peut pas fonctionner seul.

I.2.4. Caractéristiques métrologiques d'un capteur

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

I.2.4.1. Etalonnage

L'étalonnage permet d'ajuster et de déterminer, sous forme graphique, la relation entre la mesurande (m) et la grandeur électrique de sortie (figure I.4). Très souvent l'étalonnage n'est valable que pour une seule situation d'utilisation du capteur.

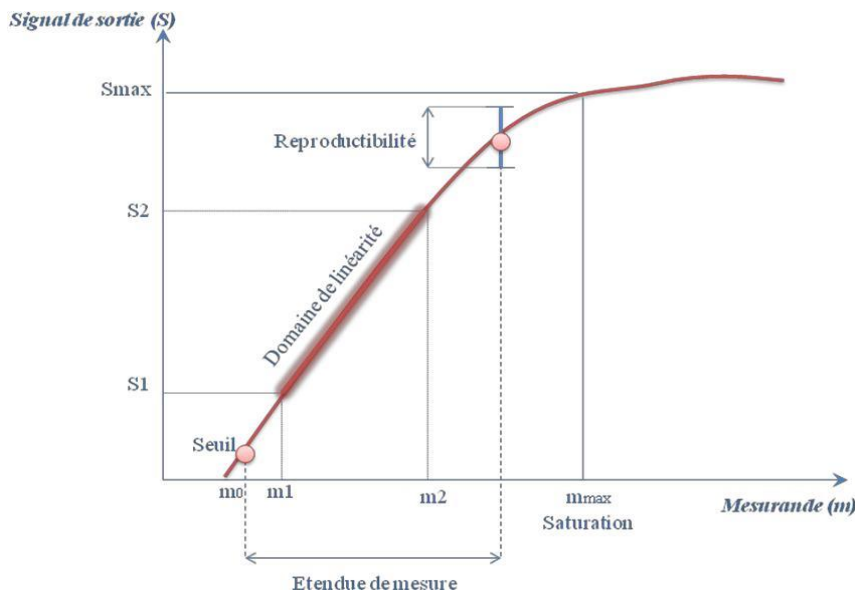


Figure I.4 : Courbe d'étalonnage d'un capteur.

I.2.4.2. Étendue de mesure

L'étendue de mesure est définie sur la courbe d'étalonnage du capteur (figure I.4). A l'extérieur de cette zone se trouvent deux valeurs particulières : le seuil et la saturation.

Le phénomène de saturation est fréquemment rencontré en physique. Même si la valeur du mesurande (m) augmente, la grandeur de sortie ne peut dépasser une valeur maximale S_{max} : pour $m > m_{max}$, $S = S_{max}$. On ne peut donc pas effectuer de mesurage pour des valeurs au-dessus de m_{max} .

Le seuil ou limite de détection correspond à la valeur minimale du mesurande nécessaire pour obtenir une grandeur de sortie non nulle : pour $m = m_0$, S correspond au bruit de fond de la mesure [5].

$$S = LOD = 3.3 * SD / s \quad Eq.I.1$$

Avec SD : l'écart type de la réponse.

S : la pente

En résumé, on ne peut mesurer que des mesurandes compris entre m_0 et m_{max} .

I.2.4.3. Domaine de linéarité

Dans ce domaine de linéarité, la variation de la grandeur de sortie est proportionnelle à la variation du mesurande.

I.2.4.4. Sensibilité

La sensibilité (s) est une caractéristique importante pour l'exploitation et l'interprétation des mesures. Elle est définie comme étant la variation du signal de sortie (S) par rapport à la variation du mesurande (m) (pente de la portion linéaire de la courbe d'étalonnage) et s'écrit :

$$S = \frac{\Delta S}{\Delta m} \quad \text{Eq. I. 2}$$

I.2.4.5. Temps de réponse

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

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

I.2.4.6. Résolution - Précision

C'est la plus petite variation de mesurande que peut détecter le capteur.

I.2.4.7. Reproductibilité ou répétabilité

Ce paramètre est probablement le plus important, tant pour les capteurs physiques que chimiques. C'est l'aptitude d'un capteur à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines lors de la mesure répétée d'une même valeur du mesurande.

I.3. Les biocapteurs

I.3.1. Historique

Vers 1950, Leland Clark a commencé le développement du premier capteur pour la mesure de la concentration d'oxygène dissout dans le sang. Sa collaboration avec Champ Lyons en 1962, a permit la mise au point de ce biocapteur associant une membrane enzymatique et 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 [6]. Cinq années plus tard, Updike et Hickson ont élaboré une électrode enzymatique permettant de doser le glucose dans des solutions biologiques [7]. A la fin des années 70 (1969), George Guilbault a créé un dispositif pour doser l'urée dans le sang et l'urine [8].

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 et l'agriculture.

I.3.2. Définition

Un biocapteur est un outil ou système analytique conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique [9]. Ce dispositif est basé sur l'accouplement spatial direct d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé "Biorecepteur" ou "élément de reconnaissance biologique", avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique [10-13]. 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 [14].

La figure I.5 représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans l'échantillon, toute information utile à son évaluation.

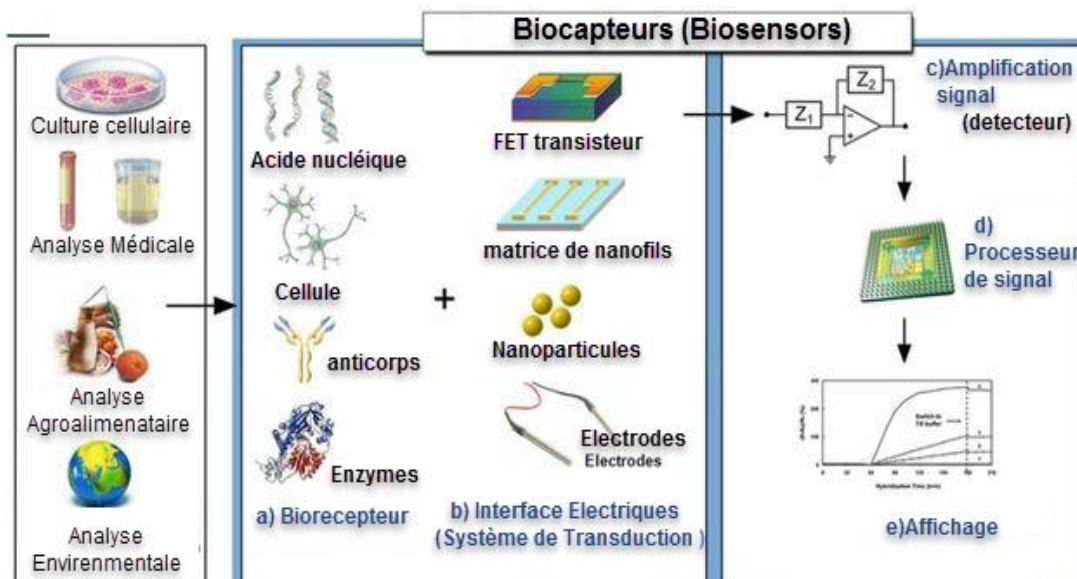


Figure I.5 : Les biocapteurs.

I.3.3. Différents types de biocapteur

I.3.3.1. (bio) capteur optique

Le (bio) capteur optique est un dispositif qui transforme la modification biochimique en information sous forme d'une grandeur optique. Ces informations, transportées par la lumière, sont la base du (bio) capteur optique qui forme le plus large groupe de transducteurs qui sont liés à la mesure de la lumière absorbée ou émise [15-17]. Les principaux atouts de ces capteurs sont généralement leur caractère non destructif qui autorise des mesures in situ et en temps réel, une insensibilité aux interférences électromagnétiques et une sensibilité de détection élevée (Figure 1.6).

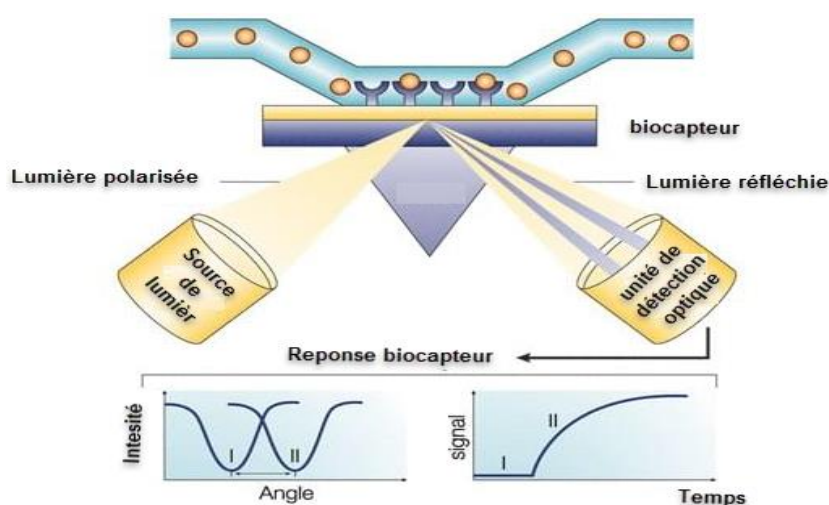


Figure 1.6 : Schémas d'un biocapteur optique

La majorité de ces capteurs utilise les techniques d'absorption et de fluorescence ou fait appel à des phénomènes d'interférence de la lumière.

I.3.3.2. (bio) Capteur à effet piézoélectrique

Les (bio)capteurs piézoélectriques mesurent des variations de masse à leur surface (Figure 1.7). Le principe de ces transducteurs repose sur les propriétés piézoélectriques des matériaux utilisés. L'effet piézo direct correspond au phénomène qui a lieu lorsqu'un solide cristallin est soumis à une contrainte mécanique appliquée sur ses faces : la déformation du cristal s'accompagne d'une polarisation électrique dont l'amplitude est proportionnelle à la contrainte appliquée [18-20].

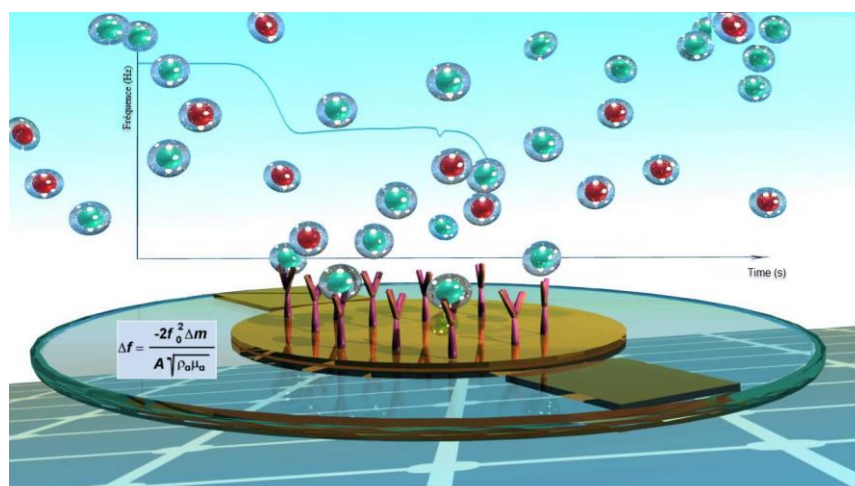


Figure 1.7 : Schémas d'un biocapteur piézoélectrique

I.3.3.3. (bio) Capteur thermique

Les (bio) capteurs thermométriques appelés aussi (bio) capteurs enthalpimétriques sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à la réaction enzymatique [23-24]. Les plus utilisés sont enzymatiques mais il existe des biocapteurs thermiques immunochimiques, appelés « Thermometric Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (TELISA). Cette méthode fait essentiellement appel aux réactions exo ou endothermiques. Le changement de température, ΔT , est déterminé par un microcalorimètre et est relié aux variations d'enthalpie, ΔH , et la capacité de chaleur du réacteur, C_p par la relation suivante :

$$\Delta T = n\Delta H/C_p \quad \text{Eq. I. 4}$$

Avec n étant le nombre de moles de substrat ayant réagit.

Table I.3 : (Bio) Capteur thermique avec réactions enzymatique.

Analyses	Enzyme	Chaleur échangée $-\Delta H$ (kJ \times mol ⁻¹)
Cholesterol	Cholesterol oxidase	53
Esters	Chymotrypsin	4 - 16
Glucose	Glucose oxidase	80
Hydrogen peroxide	Catalase	100
Penicillin G	Penicillinase	67

I.3.3.4. (bio) Capteurs électrochimiques

Les méthodes de transduction électrochimique sont très populaires dans le domaine des biocapteurs [25-28], non seulement pour des raisons historiques, le premier biocapteur mis au point en 1962 est électrochimique [29], mais aussi pour leur simplicité. Le principe des biocapteurs électrochimiques repose sur une réaction d'oxydoréduction ou une modification de conductivité électrique au niveau de l'interface, qui modifie un signal électrique suite à la fixation de l'élément à analyser. La détection électrochimique est fiable

avec une limite de détection basse et un coût de revient très faible. De plus, ces transducteurs sont facilement miniaturisables. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité.

Un capteur électrochimique est généralement un système composé de deux ou trois électrodes, une de travail, une de référence et une auxiliaire. Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques. Ils sont classés selon leur mode de transduction :

- potentiométrique, mesurant un changement de potentiel entre les électrodes,
- ampérométrique, mesurant un changement de courant à un potentiel donné,
- conductimétrique, mesurant un changement de conductivité ou de transport,
- impédancemétrique, mesurant un changement d'impédance.

Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus. Toutefois, depuis les années 1980, les capteurs conductimétriques et impédancimétriques sont de plus en plus utilisés compte tenu de leur facilité d'élaboration et de la simplicité du circuit de mesure.

a. (bio) Capteurs potentiométrique

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser.

Les mesures potentiométriques sont basées sur l'équation de Nernst qui relie le potentiel d'équilibre de la réaction d'un couple redox aux activités de ces espèces, de manière logarithmique.

$$E_p = E_{Ox/Red}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \right) \quad Eq. I.5$$

où E_p représente le potentiel du couple redox ; $E_{Ox/Red}^0$ le potentiel normal standard du couple redox; R la constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$); a_{Ox}/a_{Red} le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état réduit; T la température absolue.

Les transducteurs potentiométriques sont nombreux et varient suivant l'application visée et le dosage que l'on veut effectuer. On peut malgré tout les classer en deux catégories. Le premier se base sur le potentiel d'électrode. Cette technique se sert d'une électrode de référence. Sur la surface de l'électrode de mesure est fixé le ligand. Quand l'analyte réagit avec le ligand, cela fait varier le potentiel de l'électrode de mesure. Notons qu'une membrane imprégnée du ligand peut être insérée entre l'électrode et la solution afin de la rendre spécifique à un type d'ion (ISE Ion Specific Electrode), par exemple le proton H^+ .

Les transistors à effet de champ constituent le deuxième volet des capteurs potentiométriques [30]. Ils dérivent directement des MOSFETs (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) dont le principe est de pouvoir contrôler le courant entre deux électrodes semi-conductrices (la source et le drain) par l'application d'un potentiel sur la grille (Figure I.8).

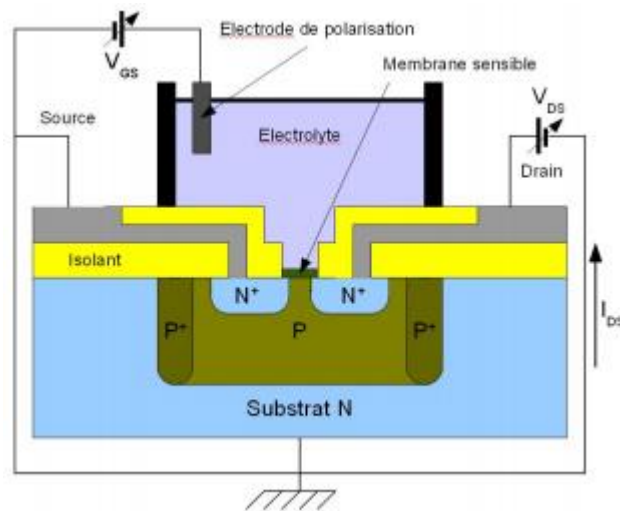


Figure I.8 : Représentation schématique d'un ISFET

b. (bio) Capteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique de mesure électrochimique alternative aux techniques potentiométriques et ampérométriques (Figure I.9). Les biocapteurs conductimétriques mesurent les changements de conductance d'une solution électrolytique ou d'un composé biologique situé entre deux électrodes.

La conductance d'un corps est donnée par l'équation Eq.I.6 ;

$$G = \gamma \frac{A}{\lambda} \quad \text{Eq. I. 6}$$

La constante γ (en S.cm^{-1}) est la constante caractéristique d'un produit connu, elle est aussi la conductance ou conductivité spécifique ; A/λ (en cm) la constante géométrique de la cellule.

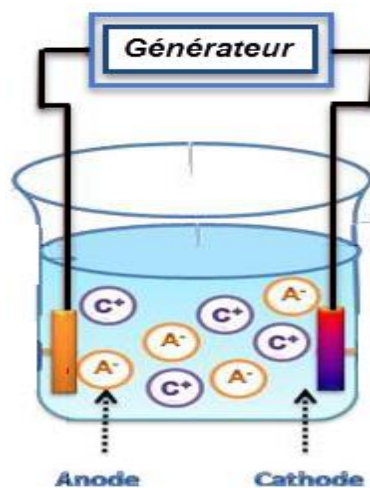


Figure I.9 : Représentation schématique d'un (bio) capteur conductimétrique.

A la différence des autres méthodes électrochimiques, la conductimétrie ne peut s'effectuer qu'en courant alternatif pour éviter une électrolyse qui viendrait perturber la mesure du signal. De plus, elle ne nécessite pas de réactions électrochimiques à la surface de l'électrode. Il est possible de mesurer la conductivité de surface entre deux électrodes après immobilisation de biorécepteurs à sa surface et de suivre la modification de la conductivité due à la formation du complexe.

Cette technique est de plus en plus utilisée pour la mise au point de biocapteurs car ils sont très sensibles pour les analytes à fortes concentrations, simples d'utilisation et faciles à miniaturiser. Cependant, leur sélectivité est très faible, c'est pourquoi les transducteurs conductimétriques sont souvent associés à des biorécepteurs catalytiques.

c. (bio) Capteurs ampérométriques [33-34]

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé. Elle est fonction de la concentration des corps électroactifs qui seront oxydés ou réduits à une électrode indicatrice, la seconde étant en général une électrode de référence (Figure I.10). Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents, par la mesure de l'intensité [33-34].



Figure I.10 : Représentation schématique d'un (bio) capteur ampérométrique.

Les biocapteurs ampérométriques utilisent généralement des biorécepteurs catalytiques. Il existe trois générations de capteurs catalytiques ampérométriques [35] :

- Les biocapteurs de première génération où l'espèce produite est directement oxydée ou réduite à l'électrode. Ils sont basés sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène et/ou de l'oxygène.
- Les biocapteurs de seconde génération qui emploient un médiateur redox, tel que le ferrocène, des quinones ou des sels organiques, permettant le transfert d'électrons. L'élimination de la dépendance à l'oxygène a permis de mieux contrôler la réaction enzymatique et les performances par rapport à celui de première génération.

- Les biocapteurs ampérométriques de troisième génération permettent un transfert d'électrons direct des électrons de l'enzyme jusqu'à la surface de l'électrode et offrent tous les avantages des capteurs de seconde génération, avec une nouvelle autonomie et une meilleure répétabilité des mesures

Cette technique de mesure a l'avantage d'être rapide, plus sensible que la potentiométrie, avec une limite de détection faible, et peu coûteuse. Il n'est pas nécessaire que l'équilibre thermodynamique soit atteint et la réponse est linéaire en fonction de la concentration de l'analyte sous certaines conditions. Cependant, la sélectivité est faible car des substances électroactives interférentes peuvent être oxydées ou réduites dans les conditions de travail et le courant mesuré peut donc inclure plusieurs espèces différentes.

La miniaturisation des transducteurs ampérométriques a permis d'améliorer la sensibilité et les temps de réponse.

d. (bio) Capteurs impédancemétrique

La méthode impédancemétrique est surtout basée sur la mesure de la conductivité ou de la capacité entre des électrodes interdigitées. La conductivité peut être mesurée en solution à tension constante. Elle dépend alors de la concentration des ions. Il est aussi possible de mesurer une conductivité de surface entre électrodes en ayant immobilisé les ligands à la surface des électrodes. Enfin, avec une tension alternative, il est possible de mesurer l'épaisseur diélectrique formée par une monocouche auto-assemblée sur laquelle est greffé le ligand [36-38]. Lorsque le complexe est formé, l'impédance électrique de cette couche s'en trouve modifiée (Figure I.11). Cette méthode capacitive permet deux applications : la mesure de la qualité de la couche de ligand fixée au-dessus des électrodes, et la mesure d'épaisseur effective du diélectrique due à la fixation de l'analyte.

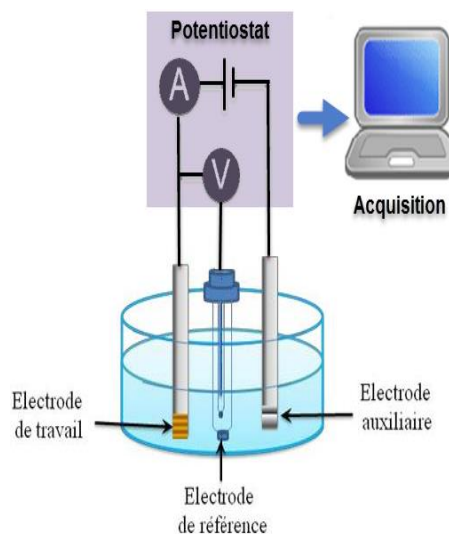


Figure I.11 : Représentation schématique d'un (bio) capteur impédancemétrique.

I.3.4. Méthodes d'immobilisation

L'immobilisation du biorécepteur à la surface du transducteur joue un rôle clé lors de l'élaboration d'un biocapteur puisqu'elle impacte directement les performances de ce dernier, à savoir son temps de réponse, sa spécificité, sa sélectivité ou encore sa durée de vie. De plus, lors de l'immobilisation de matériel biologique, il faut que celui-ci conserve ses propriétés de reconnaissance, dans le cas de protéines ou d'anticorps notamment, mais aussi son activité catalytique dans le cas des enzymes. Enfin, il faut s'assurer que la méthode d'immobilisation choisie permet la réalisation de dépôt reproductible et homogène [39-42].

L'immobilisation des biorécepteurs représente aussi un intérêt financier. Elle permet, notamment dans le cas des capteurs enzymatiques, de conserver le matériel biologique entre différentes mesures et donc d'assurer la réutilisation du biocapteur, ce qui diminue drastiquement le coût de production.

C'est pourquoi de nombreuses méthodes d'immobilisation ont été développées au cours des différentes études menées sur la réalisation de biocapteurs et seront présentées pour les plus courantes d'entre elles dans ce chapitre.

I.3.4.1. Immobilisation par adsorption

L'immobilisation par adsorption ne fait intervenir aucun élément chimique externe. L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface [45-49] (Figure I.12). L'adsorption s'effectue grâce aux forces ioniques de Van Der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges (liaisons ioniques), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). La fixation de l'espèce chimique à détecter se fait directement sur le transducteur par l'intermédiaire d'un matériau actif. Les matériaux actifs peuvent être des résines échangeuses d'ions anionique ou cationique, du charbon actif, des gels de silice, de l'argile, de l'oxyde d'aluminium, du verre poreux ou des céramiques.

Inconvénients :

De par sa nature, cette méthode d'immobilisation souffre principalement d'un manque de sélectivité mais aussi d'un manque de stabilité dans le temps dû au phénomène de désorption. Cette technique offre une simplicité de mise en œuvre et un faible coût, ce qui justifie son utilisation très répandue dans les tests cliniques.

Toutefois, elle présente quelques inconvénients tels que :

- Les risques de désorption spécialement en milieux aqueux.
- La distribution aléatoire et irrégulière de la couche biologique
- L'impossibilité de contrôler la qualité et la quantité des biorécepteurs immobilisés.

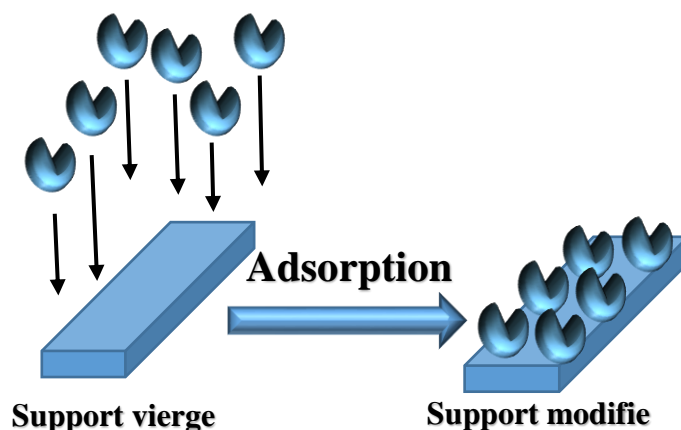


Figure I.12 : Adsorption des enzymes sur un support.

Avantages :

Cette technique d'immobilisation présente plusieurs avantages. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données. De plus elle est facilement réversible, économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme. Cependant, elle présente un inconvénient majeur à cause des interactions faibles liant l'enzyme au support. Ces systèmes sont peu stables, l'enzyme se désorbe au cours du temps. De plus, il peut être nécessaire de procéder à des modifications de la surface du support afin de permettre l'adsorption du biorécepteur [50-51].

I.3.4. 2. La réticulation

La réticulation de biomolécules, et plus particulièrement d'enzymes, est une technique qui consiste, à créer des liaisons chimiques à l'aide d'un agent réticulant pour renforcer la cohésion de la membrane [52-53]. Quant à la co-réticulation, elle est basée sur le même principe. L'utilisation de cet agent permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. Cependant, à cause de la réaction chimique, une perte d'activité enzymatique de la membrane co-réticulée peut être observée pendant les mesures [54-55].

Deux méthodes de réticulation peuvent être utilisées. La première est la méthode classique, utilisant simplement un agent réticulant et la protéine a immobilisé. La seconde est appelée co-réticulation et fait intervenir une seconde protéine, ne présentant pas d'activité catalytique, permettant de stabiliser la structure tridimensionnelle.

La figure I.13 présente les structures chimiques de certains agents de couplage utilisés.

Le plus connu des agents de couplage est le glutaraldéhyde qui a été abondamment utilisé pour la réticulation d'enzyme. D'autres agents de couplage sont aussi fréquemment utilisés tels que ceux portant des fonctions époxydes ou esters activés.

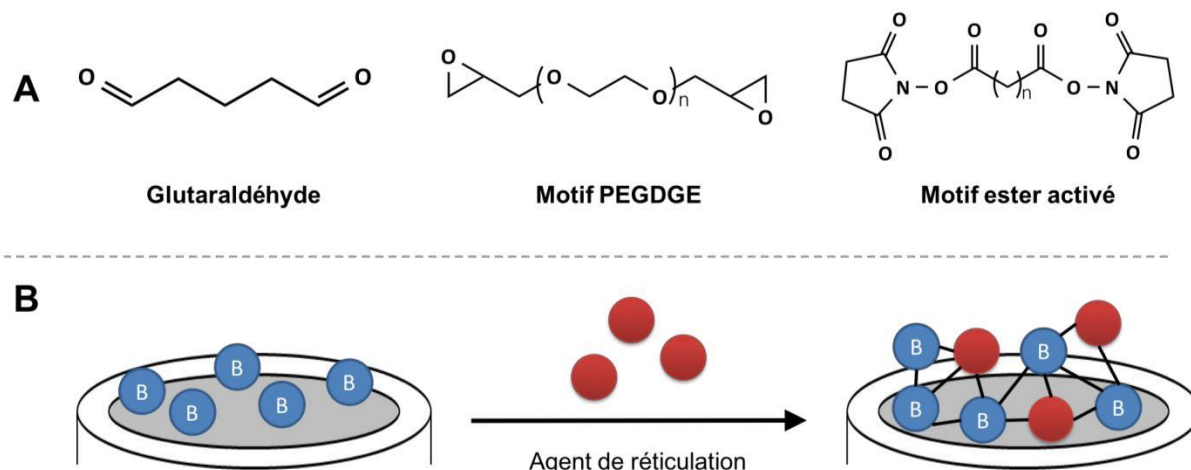


Figure I.13. Immobilisation des biocapteurs sur un support par la méthode de réticulation.

Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez simple à mettre en œuvre et de plus de par les liaisons chimiques, elle offre une bonne stabilité au système. Par contre, une baisse de l'activité catalytique est observée avec cette méthode d'immobilisation car la formation de liaison avec l'agent de réticulation peut dénaturer les protéines ou diminuer l'activité et la spécificité des biomolécules. De plus, cette technique ne permet pas une immobilisation reproductible des biomolécules.

I.3.4.3. L'encapsulation

L'immobilisation se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent. Il faut s'assurer que la taille des mailles de la matrice est suffisante pour permettre la diffusion du substrat tout en assurant la rétention de la biomolécule (figure I.14). Ces matrices peuvent être inorganiques, organiques ou composites [56-59].

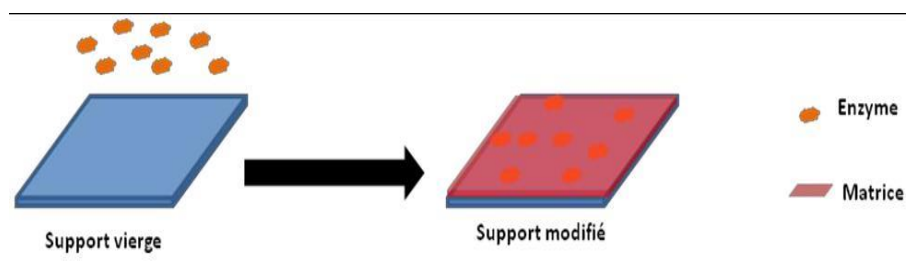


Figure I.14 : Immobilisation des biocapteurs sur un support par la méthode d'encapsulation.

Les principaux avantages de cette méthode d'immobilisation sont les suivants : 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.

I.3.4.4. Les assemblages moléculaires

L'assemblage moléculaire repose sur l'utilisation des différentes affinités existant entre molécules pour assurer l'immobilisation de la biomolécule d'intérêt. Ces affinités peuvent être de natures variées avec par exemple la complexation métallique, la reconnaissance anticorps-antigène ou encore la reconnaissance entre une enzyme et son substrat.

Un exemple courant d'architectures utilisant ce type d'assemblage moléculaire est le couplage avec β -Cyclodextrine (Figure I.15).

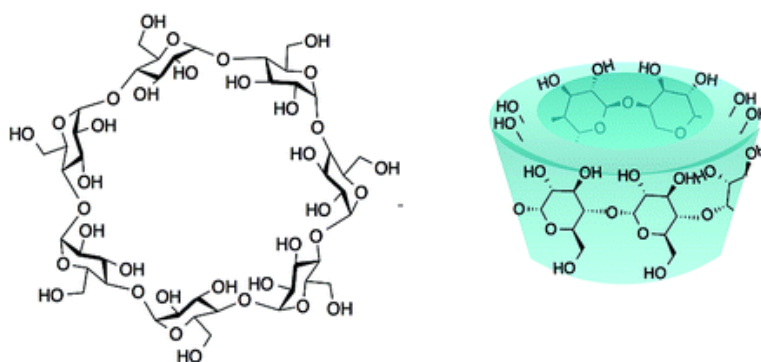


Figure I.15 : Structure de la β -Cyclodextrine

L'exemple d'architecture moléculaire d'intérêt est celui de l'association entre l'adamantane et la β -Cyclodextrine [60-61]. Dans ce type de complexe, *un des composants*, l'hôte (la β -cyclodextrine dans ce cas), forme une **cavité** au sein de laquelle la seconde partie du complexe, l'invité (l'adamantane), va venir se loger. Cet assemblage peut ainsi être utilisé pour immobiliser différentes molécules marquées par une cyclodextrine sur des surfaces préalablement modifiées par des groupements adamantanes (représenté par S) tel que présenté sur la figure I.16.

Le système adamantane/cyclodextrine est également utilisé pour réaliser des assemblages supramoléculaires et possède une constante d'association de l'ordre de $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les cyclodextrines permettent une forte reconnaissance avec certains types de substrats en s'insérant à l'intérieur de leur cavité hydrophobe. De nombreuses publications décrivent notamment l'interaction entre des dérivés ferrocène et d'adamantane avec les cyclodextrines [62-63].

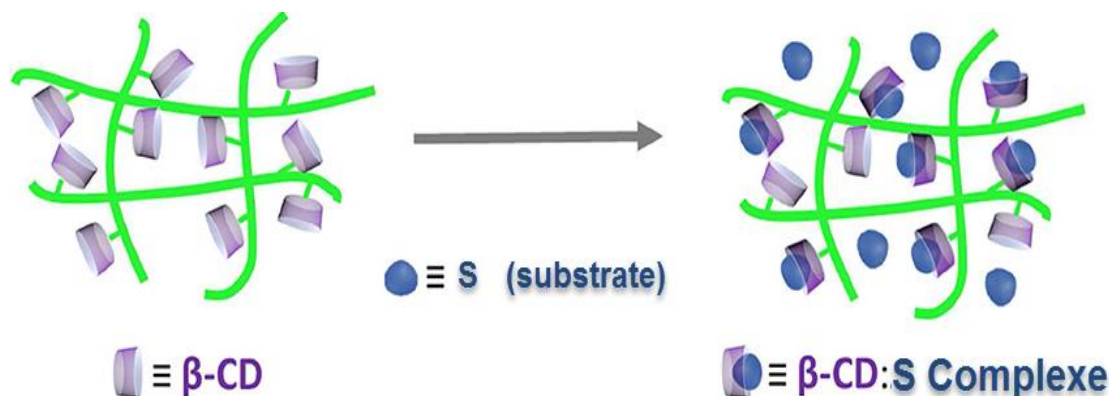


Figure I.16 : Formation d'un complexe d'inclusion avec β -cyclodextrine.

Un autre exemple courant d'architectures utilisant ce type d'assemblage moléculaire est le couplage **avidine-biotine**. ce qui rend le complexe résultant de l'association de ces deux molécules très stable et résistant à différents solvants [64-69].

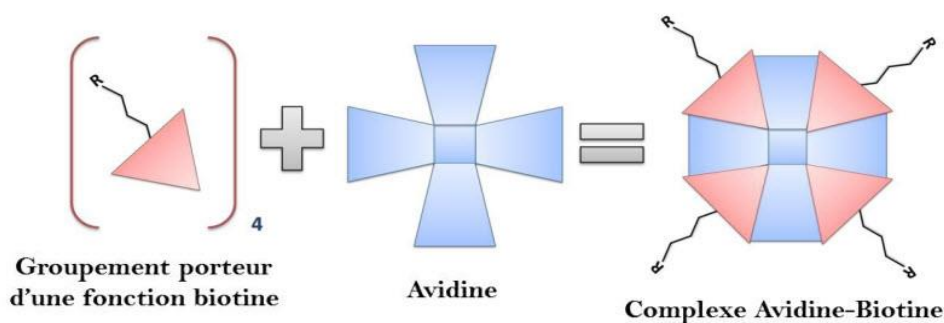


Figure I.17 : Représentation schématique de la formation du complexe avidine-biotine.

Une autre approche, peut également être citée. Elle met en jeu la formation d'un complexe de cuivre, coordonné à la fois par la fonction acide nitrilo-triacétique (NTA) et la fonction biotine(Figure I.18). Afin de pouvoir réaliser ce type d'assemblage, la fonction NTA est souvent couplé à un monomère de type pyrrole ou pyrène. Ceci va permettre la formation d'un polymère, notamment par électropolymérisation sur une électrode, porteur de la fonction NTA à la surface du transducteur pour ensuite procéder à l'assemblage

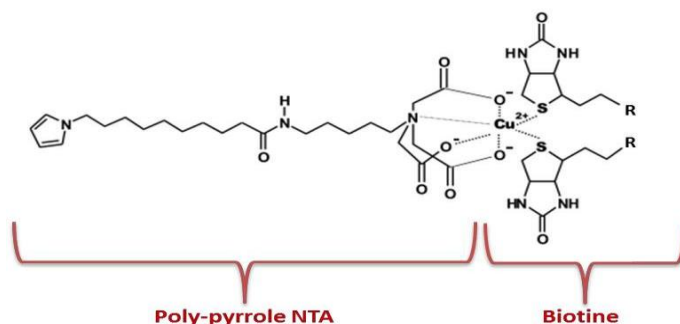


Figure I.18 : représentation schématique de la formation du complexe de cuivre avec la fonction NTA et deux fonctions biotines.

I.3.4.5. Le greffage chimique

L'immobilisation par greffage chimique met en jeu des liaisons covalentes entre la surface du transducteur et la biomolécule à immobiliser. Cette technique est une alternative de technique par adsorption directe (liaisons physiques). Pour mettre en place ce type d'immobilisation, il faut préalablement modifier la surface du transducteur par des groupements fonctionnels capable, après activation, d'initier une réaction chimique avec la biomolécule à immobiliser donnant lieu à la création d'une liaison covalente (Figure I.19).

Le choix de la fonctionnalisation est déterminé par l'espèce à détecter mais aussi la nature de la couche sensible, cette couche pouvant être : du nitrure de silicium, un oxyde métallique, un métal noble (généralement de l'or). Ces groupements sont en général

- Les fonctions amines, $-NH_2$
- hydroxyles, $-OH$
- carboxyliques $-COOH$
- thiol $-SH$
- ou encore esters

Ils sont peu réactifs chimiquement et il convient de les activer pour qu'ils réagissent dans des conditions douces avec des groupements fonctionnels de l'entité biologique. *Ils n'interviennent pas dans le processus de reconnaissance moléculaire.*

Cette technique d'immobilisation (greffage chimique) présente principalement comme avantage de *fixer l'enzyme de façon permanente et augmente la stabilité de celle-ci, lui conférant une durée de vie plus longue.* Cependant, les réactifs indispensables au greffage risquent de dénaturer l'enzyme et donc de provoquer une perte d'activité.

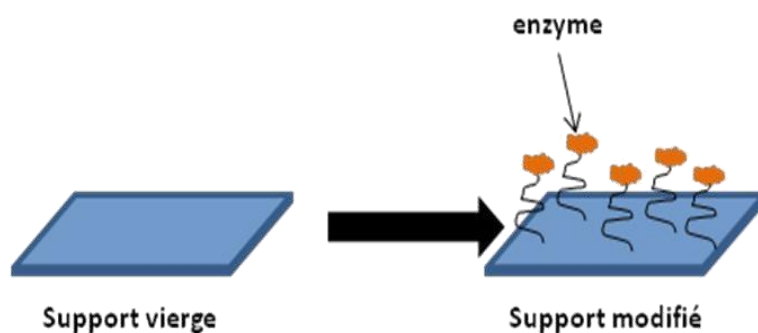


Figure I.19. Greffage chimique.

I.3.5. Biorecepteur enzymatique

I.3.5.1. Généralités sur les enzymes

Comme présenté brièvement dans le paragraphe traitant la classification des biorécepteurs, les enzymes sont définies comme des catalyseurs biologiques spécifiques à plusieurs points de vue :

- o Une enzyme agit comme catalyseur en se liant au substrat ou plusieurs substrats de structures voisines (stéréospécificité).
- o En général, chaque enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction chimique (spécificité réactionnelle).
- o Une enzyme peut être capable de catalyser la transformation de son substrat à une position précise de sa molécule (régiospécificité).

Il existe deux grandes catégories d'enzymes. Les enzymes purement protéiques qui ne sont constituées que d'acides aminés. Les autres, appelées holoenzymes, sont constituées d'une partie protéique, l'apoenzyme, qui n'est pas fonctionnelle seule et d'une partie non protéique appelée cofacteur. Le cofacteur peut être un ion métallique comme le cuivre, le zinc, le manganèse ou une molécule organique appelée coenzyme (ex. : NAD) ou groupement prosthétique (ex. : hème), ce dernier étant fermement lié à la protéine.

Les enzymes présentent des points communs aussi bien que des différences avec les catalyseurs chimiques. En effet, comme les catalyseurs chimiques, les enzymes n'influencent pas la variation d'énergie libre de la réaction, elles ne catalysent donc que les réactions thermodynamiquement possibles. Elles augmentent la vitesse de la réaction en abaissant l'énergie d'activation des réactifs (appelés substrats dans le cas des enzymes). La vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme est multipliée par un facteur 10^6 à 10^{12} par rapport à la même réaction réalisée en absence de catalyseur et elle est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle obtenue avec un catalyseur chimique. Elles possèdent une plus grande spécificité vis-à-vis de leurs substrats que les catalyseurs chimiques. Ainsi, les réactions enzymatiques ne donnent que rarement des produits secondaires. Alors que les catalyseurs chimiques nécessitent souvent des températures et des pressions élevées ainsi que des pH extrêmes, les enzymes fonctionnent dans des conditions plus douces. Cependant elles sont plus sensibles à la dénaturation à cause de leur structure protéique.

I.3.5.2. Classification

Il existe deux types de nomenclature :

- Une nomenclature fonctionnelle qui fait apparaître dans le nom de l'enzyme le nom du substrat et le type de réaction catalysée

Exemple : le glucose oxydase

- Chaque enzyme est identifiée à l'aide d'un code commençant par EC (pour Enzyme Commission) et suivie de quatre nombres X₁ X₂ X₃ X₄.

X₁ indique la classe de l'enzyme. Il en existe 6, suivant le type de réaction catalysée (Tableau I.4)

Tableau I. 4. Nomenclature des enzymes et réactions correspondantes

EC 1	<i>oxydoréductases</i>	Transfert de protons et d'électrons
EC 2	<i>transférases</i>	Transfert d'un groupement fonctionnel
EC 3	<i>hydrolases</i>	Hydrolyse de liaisons esters, osidiques, peptidiques, ...
EC 4	<i>lyases</i>	Rupture d'une liaison par fixation ou départ d'un groupement chimique avec création d'une double liaison
EC 5	<i>isomérases</i>	Modification interne de la molécule
EC 6	<i>ligases</i>	Formation de liaisons C-O, C-S, C-N ou C-C nécessitant de l'énergie (ATP)

X₂, et X₃ apportent en général une précision sur le type de réaction catalysée et sur le(s) substrat(s) de la réaction, X₄ c'est le numéro d'ordre de l'enzyme.

Exemple :

EC 3	Hydrolases
EC 3.4.	Peptidases (hydrolyse des liaisons peptidiques)
EC 3.4.24	Métalloendopeptidases (hydrolyse de liaisons peptidiques internes et présence d'un ion métallique dans le site catalytique)
EC 3.4.24.27	Thermolysine

I.3.5.3.Site actif

Dans les enzymes, se trouve une région particulière appelée site actif. Il s'agit d'une région bien déterminée qui joue un rôle direct dans l'activité enzymatique. Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui le plus souvent ne se suivent pas dans la séquence polypeptidique. Cependant, le repliement de la protéine rapproche les chaînes latérales de ces acides aminés pour former une cavité qui renferme d'une part, le site de reconnaissance du substrat et d'autre part, le site catalytique où le substrat est transformé en produit(s) par réaction chimique. La spécificité de reconnaissance entre l'enzyme et le substrat et la réaction enzymatique est basée sur des interactions entre les groupements chimiques des deux partenaires. Il s'établit principalement des liaisons non covalentes de types hydrogènes, électrostatiques ou hydrophobes, mais parfois aussi des liaisons covalentes.

I.3.5.4. Mécanismes de catalyse

Il existe plusieurs mécanismes de catalyse enzymatique. On distingue essentiellement :

Catalyse acide/base : L'enzyme fournit les groupes accepteurs et donateurs de protons. S'il s'agit d'un transfert partiel d'un proton à partir d'un groupe acide provoquant une baisse de l'énergie libre de la réaction, on parle d'une catalyse acide générale. Dans le cas contraire, où la vitesse de la réaction est augmentée par l'abstraction partielle d'un proton par une base on parle d'une catalyse basique générale. La réaction devient acide - base générale concertée lorsque les deux réactions sont simultanées.

Catalyse covalente : L'enzyme se combine de façon covalente avec le substrat pour former un intermédiaire permettant une réaction plus rapide

Catalyse métallo-dépendante : L'enzyme utilise des ions métalliques comme cofacteurs pour stabiliser différentes charges négatives qui peuvent apparaître en cours de réaction et pour ioniser les molécules d'eau afin de les rendre plus nucléophiles. Un très grand nombre d'enzymes sont dépendantes des ions métalliques pour leur catalyse. Elles se divisent en deux classes qui se distinguent par la force des interactions protéine - ion :

➤ Métalloenzymes possédant des ions métalliques fortement liés comme Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} .

➤ Des enzymes activées par des ions métalliques faiblement liés comme Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ou Ca^{2+} .

Les ions métalliques participent à la catalyse principalement de trois façons : soit par orientation du substrat, soit par stabilisation électrostatique des charges négatives, soit par des changements réversibles de l'état d'oxydation de l'ion métallique dans le cas des réactions d'oxydo-réduction.

I.3.5.5. Cinétique enzymatique

Par définition, l'activité d'une enzyme est la quantité nécessaire pour convertir une quantité donnée de substrat en produit, en un temps donné, et dans des conditions de température et de pH spécifiées (ex. pH 7.0 et 25°C), le substrat étant en excès par rapport à l'enzyme.

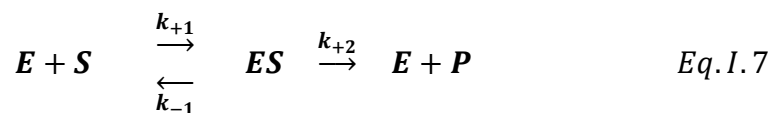
La cinétique des réactions enzymatiques obéit dans bien des cas au modèle proposé par Michaelis-Menten dont il est possible de déduire les valeurs de la constante de Michaelis K_M et de la vitesse maximale de réaction V_M .

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

a. Modèle de Michaelis-Menten

Description

Dans le modèle de Michaelis-Menten, la réaction enzymatique peut être représentée sous la forme simplifiée suivante [70-71] :



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

La vitesse de formation du produit est :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2} [ES] \quad \text{Eq. I. 8}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1} [E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad \text{Eq. I. 9}$$

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

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad \text{Eq. I. 10}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1} \{[E]_0 - [ES]\}[S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad \text{Eq. I. 11}$$

D'autre part,

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[E][S] - k_{-1}[ES] \quad \text{Eq. I. 12}$$

Avec les conditions initiales :

$$[S]_{t=0} = S_0 \text{ et } [ES]_{t=0} = 0 \quad \text{Eq. I. 13}$$

La résolution de ces équations permet de connaître l'évolution de la concentration des différentes espèces participant à la réaction.

On peut voir sur la figure I.20 que la concentration de ES se stabilise au bout d'un temps très court, ce qui permet de supposer l'établissement rapide d'un état quasi stationnaire. Cette hypothèse est valable seulement si $[E_0] \ll [S_0]$.

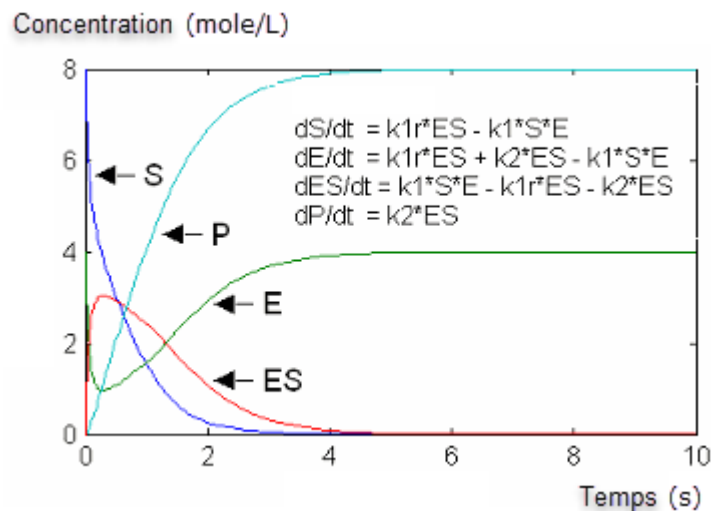


Figure I.20 : Evolution de la concentration des espèces réagi

Avec l'approximation de l'état pré-stationnaire (délai pour que la concentration du complexe enzyme-substrat soit constante) proposé par deux chercheurs britanniques Briggs et Haldane en 1925, on a :

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

On en déduit :

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2}} \quad \text{Eq. I. 14}$$

Si on suppose que :

$$V_M = k_{+2}[E]_0 \text{ et } [ES] = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2}} \quad \text{Eq. I. 15}$$

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

$$v = \frac{d[P]}{dt} = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. I. 16}$$

Deux cas limites peuvent être envisagés :

Cinétique première ordre

✚ Si $[S] \ll K_M$, l'expression devient

$$v = V_M \frac{k_{+2}[E]_0}{K_M} [S] \quad \text{Eq. I. 17}$$

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

$$\frac{k_{+2}}{K_M} = \frac{k_{+2}k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}} \quad \text{Eq. I. 18}$$

Cinétique d'ordre zéro

✚ Si $[S] \gg K_M$:

$$v = k_{+2} [E]_0 \quad \text{Eq. I. 19}$$

La cinétique de réaction est d'ordre 0 par rapport à S. On atteint la vitesse maximale V_M . La représentation graphique de l'équation I.17 permet de décrire le comportement

cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (Figure I.21).

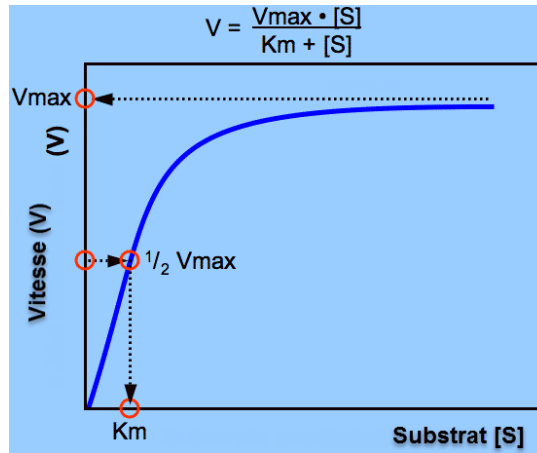


Figure I.21 : Représentation graphique d'une cinétique enzymatique michaelienne. Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

b. Représentations linéaires de l'équation de Michaelis-Menten

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

$$\frac{1}{\vartheta} = \left(\frac{K_M}{V_M} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M} \quad \text{Eq. I. 20}$$

Cette écriture est appelée représentation de Lineweaver-Burk.

La représentation graphique :

$$\frac{1}{\vartheta} = f\left(\frac{1}{[S]}\right) \quad \text{Eq. I. 21}$$

Est une droite de pente K_M/V_M (Fig.I.22)

Une autre représentation a été proposée par Eadie-Hofstee. En écrivant l'équation I.49

sous la forme suivante :

$$\vartheta K_M + \vartheta [S] = V_M [S] \quad \text{Eq. I. 22}$$

On obtient :

$$\frac{\vartheta}{[S]} = \frac{V_M}{K_M} - \frac{\vartheta}{K_M} \quad \text{Eq. I. 23}$$

La représentation graphique :

$$\frac{\vartheta}{[S]} = f(\vartheta)$$

est une droite de pente $-1/K_M$ (Figure I.23)

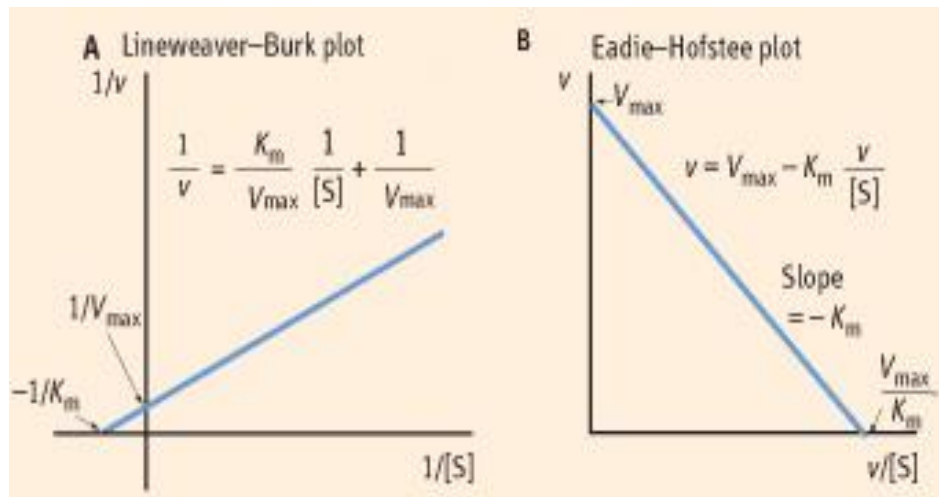


Figure I.22 : Représentation graphique de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten, A : représentation de Lineweaver-Burk et B : représentation d'Eadie-Hofstee

c. Paramètres cinétiques

Parmi les paramètres qui servent à caractériser les enzymes, évaluer leur spécificité et définir leur efficacité, on distingue :

- La constante de Michaelis-Menten (K_M) : est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Cette valeur est la concentration de substrat capable de saturer la moitié des sites catalytiques de l'enzyme, c'est-à-dire lorsque la valeur de la vitesse initiale est égale à la moitié de celle de la vitesse maximale, $[S] = K_M$ quand $v_i = V_{max}/2$. Plus K_M est élevé, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible.
- La vitesse maximale (V_{max}) : est la vitesse maximale atteinte par l'enzyme lorsque la concentration de substrat est suffisamment élevée pour saturer la totalité des sites catalytiques. $v_i = V_{max}$ quand $[ES] = [E]_0$
- La constante catalytique (k_{cat}) : est une constante de vitesse du premier ordre. Elle représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique. Plus cette valeur est grande, plus la catalyse est rapide.

VI.4. Conclusion

Cette étude bibliographique montre la très large gamme de recherches effectuées sur le développement de (bio) capteurs. Ce chapitre nous a permis de définir les différents types de biocapteurs ainsi que les techniques convenables avec lesquels nous avons choisi de travailler pour développer de nouveaux biocapteurs.

Nous avons mis en avant les nouvelles approches qui mènent à l'amélioration des caractéristiques et des performances des biocapteurs.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons les principes physiques des différentes techniques utilisées au long de ce travail. Ainsi que la modélisation et le développement des (bio)capteurs.

Références

- [1].THEVENOT, Daniel R., TOTH, Klara, DURST, Richard A., *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and applied chemistry*, 1999, vol. 71, no 12, p. 2333-2348.
- [2].HAFID, Imen. *Etudes physico-chimique de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales*. 2009. Thèse de doctorat. Lyon, INSA.
- [3].SALIMA, Z. *Modélisation de la réponse d'un biocapteur ampérométrique à base de la pâte de carbone*. 2007. Mémoire de magister, Université de Béjaia.
- [4].GROUT, Michel et SALAUN, Patrick. *Instrumentation industrielle-4e éd.: Spécification et installation des capteurs et vannes de régulation*. Dunod, 2015.
- [5].SBARTAI, Amel. Conception et développement de nouveaux microcapteurs chimiques pour la détection des métaux lourds dans les eaux. 2014.
- [6].CLARK JR, Leland C. et LYONS, Champ. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 1962, vol. 102, no 1, p. 29-45.
- [7].UPDIKE, S. J. et HICKS, G. P. The enzyme electrode. *Nature*, 1967, vol. 214, no 5092, p. 986.
- [8].GUILBAULT, George G. et MONTALVO JR, Joseph G. Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 1969, vol. 91, no 8, p. 2164-2165.
- [9].DUPLAN, Valérie, DUBOWSKI, Jan J., FROST, Eric H., *et al.* *Conception d'un biocapteur basé sur la photoluminescence du GAAS (001) pour la détection de micro-organismes*. Université de Sherbrooke, 2011.
- [10].BIENAIMÉ, Alex. *Microcapteur en arséniure de gallium pour la détection de molécules dans un fluide*. 2012. Thèse de doctorat. Besançon.
- [11].GIANG, Thi Phuong Ly. *Support immunologique pour biocapteur: caractérisations physico-chimiques et biologiques*. 2013. Thèse de doctorat. Université Paris Sud-Paris XI.
- [12].GUIRARDEL, Matthieu. *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré: détection*

de l'adsorption de nanoparticules d'or. 2003. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier-Toulouse III.

[13].MARRAKCHI, Mouna. *Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et de micro-organismes sur microélectrodes interdigitées*. 2006. Thèse de doctorat. Ecully, Ecole centrale de Lyon.

[14].AZZOUZ, Mériam. *Etude du procédé de fabrication et de fonctionnalisation en vue de la réalisation d'un microdispositif vibrant pour de la détection spécifique en biologie*. 2012. Thèse de doctorat. Université Paris Sud-Paris XI.

[15].HAFAID, Imen. *Etudes physico-chimique de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales*. 2009. Thèse de doctorat. Lyon, INSA.

[16].BENDOULA, Ryad. *Biocapteur optique: Sonde fibrée à cavité Fabry-Pérot intrinsèque et à couplage évanescent*. 2005. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté.

[17].GUILBAULT, G. G. et MASCINI, M. Optical biosensors in clinical and biochemical analysis. *Giornale italiano di chimica clinica*, 1992, vol. 17, no 6, p. 415-426.

[18].GUIRARDEL, Matthieu. *Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonants en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré: détection de l'adsorption de nanoparticules d'or*. 2003. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier-Toulouse III.

[19].AYELA, Cédric. *Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel*. 2007. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier-Toulouse III.

[20].YONG, Julien. *Contribution à l'étude d'un capteur de force piézoélectrique résonant à forte raideur pour interfaces haptiques aéronautiques*. 2013. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

[21].MARESCHAL, Olivier. *Étude d'un résonateur piézoélectrique à ondes acoustiques de volume en technologie film mince*. 2011. Thèse de doctorat. Université Paris-Est.

[22].MARESCHAL, Olivier. *Étude d'un résonateur piézoélectrique à ondes acoustiques de volume en technologie film mince*. 2011. Thèse de doctorat. Université Paris-Est.

[23].RAMANATHAN, Kumaran et DANIELSSON, Bengt. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, vol. 16, no 6, p. 417-423.

[24].MAI, Anh Tuan. *Développement de biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection de polluants organiques en phase aqueuse*. 2004. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I.

[25].POHANKA, Miroslav et SKLÁDAL, Petr. Electrochemical biosensors--principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)*, 2008, vol. 6, no 2.

[26].GRIESHABER, Dorothee, MACKENZIE, Robert, VOEROES, Janos, et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 2008, vol. 8, no 3, p. 1400-1458.

[27].RONKAINEN, Niina J., HALSALL, H. Brian, et HEINEMAN, William R. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 2010, vol. 39, no 5, p. 1747-1763.

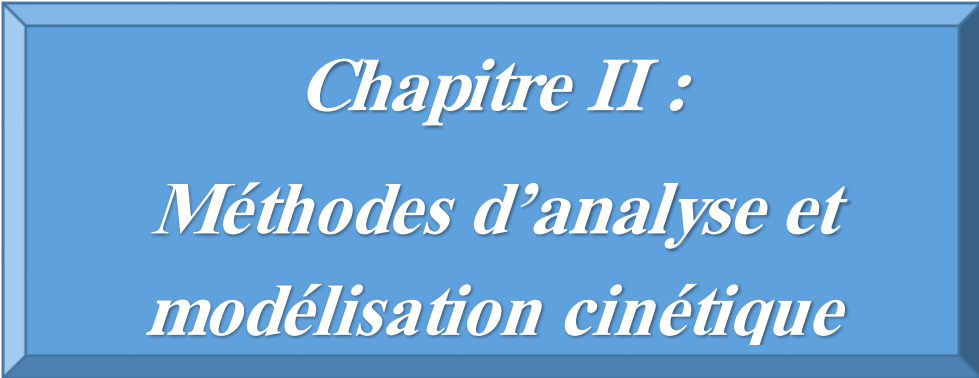

[28].MONTROSE, Armelle. *Développement d'un immunocapteur impédimétrique pour la détection et la quantification d'une sous-population cellulaire: application au diagnostic précoce des infections*. 2013. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

[29].CLARK JR, Leland C. et LYONS, Champ. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 1962, vol. 102, no 1, p. 29-45.

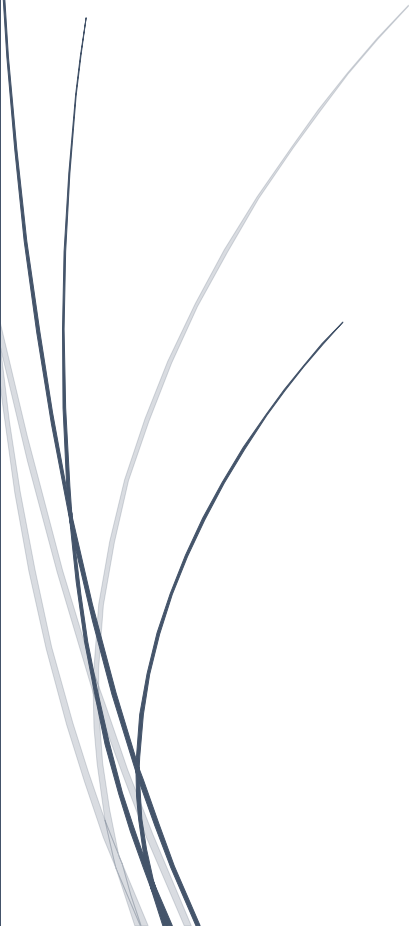
- [30].LEE, Chang-Soo, KIM, Sang, et KIM, Moonil. Ion-sensitive field-effect transistor for biological sensing. *Sensors*, 2009, vol. 9, no 9, p. 7111-7131.
- [31].WAGNER, Torsten, YOSHINOBU, T., et SCHÖNING, Michael J. Light-addressable potentiometric sensor as semiconductor-based sensor platform for (bio-) chemical sensing. *Armenian Journal of Physics*, 2008, vol. 1, no 1, p. 99-103.
- [32].YOSHINOBU, Tatsuo, IWASAKI, Hiroshi, UI, Y., *et al.* The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging. *Methods*, 2005, vol. 37, no 1, p. 94-102.
- [33].HELLER, Adam. Amperometric biosensors. *Current opinion in biotechnology*, 1996, vol. 7, no 1, p. 50-54.
- [34].WARD, W. Kenneth, JANSEN, Lawrence B., ANDERSON, Ellen, *et al.* A new amperometric glucose microsensor: in vitro and short-term in vivo evaluation. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, vol. 17, no 3, p. 181-189.
- [35].MARINESCO, S. Pernot P. Biocapteurs implantables in vivo. *Techniques de l'Ingénieur. RE-108*, 2008, p. 1-13.
- [36].PRODRONIDIS, Mamas I. Impedimetric biosensors and immunosensors. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 2007, vol. 8, no 2, p. 3.
- [37].LUONG, John HT, MALE, Keith B., et GLENNON, Jeremy D. Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology advances*, 2008, vol. 26, no 5, p. 492-500.
- [38].NGO, Thanh Tuan. Contribution à la mesure de bioimpédance électrique de cellules biologiques par micro-capteurs interdigités: optimisation, conception et validation de capteurs. 2015. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
- [39].KUMARAN, Satish. Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs: Analyse par injection en flux continu (FIA): Applications au dosage des composés polluants. 1991. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; Université Claude Bernard-Lyon I.
- [40].VIAL, Stéphanie. Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques. 2005. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- [41].AKZIZ, Hakim. Immobilisation d'enzyme dans une matrice de silice. 2017. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira.
- [42].BAALI, Souad. Immobilisation d'enzymes dans des membranes polymériques en vue d'élaborer des capteurs biologiques pour la détection des polluants organiques. 2015. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba.
- [43].CHARCOSSET, C. Procédés membranaires à application pharmaceutique et biotechnologique. *Itbm-Rbm*, 2006, vol. 27, no 1, p. 1-7.
- [44].VINCKE, B. J., KAUFMANN, J. M., DEVLEESCHOUWER, M. J., *et al.* Nouveau modèle d'électrode enzymatique pour la détermination du glucose. *Analisis*, 1984, vol. 12, no 3, p. 141-147.
- [45].SPOHN, U., NARASIAH, D., GORTON, L., *et al.* A bienzyme modified carbon paste electrode for the amperometric detection of L-lactate at low potentials. *Analytica chimica acta*, 1996, vol. 319, no 1-2, p. 79-90.
- [46].PALLESCHI, G. et TURNER, Anthony PF. Amperometric tetrathiafulvalene-mediated lactate electrode using lactate oxidase absorbed on carbon foil. *Analytica Chimica Acta*, 1990, vol. 234, p. 459-463.

- [47].BOUTELLE, Martyn G., STANFORD, Clare, FILLENZ, Marianne, et al. An amperometric enzyme electrode for monitoring brain glucose in the freely moving rat. *Neuroscience letters*, 1986, vol. 72, no 3, p. 283-288.
- [48].Alloue, W. A. M, Aguedo.M, Destain. J, Ghalfi. H, Blecker.C, Wathelet. J.P, Thonart.P, Biotechnol, Agon, Soc,Environ, 12 (1), 2008, 57-68
- [49].BROWN, Erich et JOYEAU, Roger. Enzymes immobilisées, 6. Préparation d'invertase et de glucose oxydase immobilisées sur les vanacryls. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 1974, vol. 175, no 7, p. 1961-1978.
- [50].SASSOLAS, Audrey, BLUM, Loïc J., et LECA-BOUVIER, Béatrice D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, 2012, vol. 30, no 3, p. 489-511.
- [51].ZUO, Guomin, LI, Xinxin, ZHANG, Zhixiang, et al. Dual-SAM functionalization on integrated cantilevers for specific trace-explosive sensing and non-specific adsorption suppression. *Nanotechnology*, 2007, vol. 18, no 25, p. 255501.
- [52].KUMARAN, Satish et TRAN-MINH, C. Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques. *Electroanalysis*, 1992, vol. 4, no 10, p. 949-954.
- [53].MIGNEAULT, Isabelle, DARTIGUENAVE, Catherine, BERTRAND, Michel J., et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 2004, vol. 37, no 5, p. 790-802.
- [54].HUANG, Rongfu, ZHENG, Xingwang, et QU, Yingjuan. Highly selective electrogenerated chemiluminescence (ECL) for sulfide ion determination at multi-wall carbon nanotubes-modified graphite electrode. *Analytica chimica acta*, 2007, vol. 582, no 2, p. 267-274.
- [55].COLOOWICK. S -P, KAPLAN. N.O, *Methods in enzymologie*, vol-44: immobilized enzymes and cells (parts), 584.p.bibl, Academic press, 1987.
- [56].BETANCOR, Lorena et LUCKARIFT, Heather R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in biotechnology*, 2008, vol. 26, no 10, p. 566-572.
- [57].GILL, Iqbal et BALLESTEROS, Antonio. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in biotechnology*, 2000, vol. 18, no 7, p. 282-296.
- [58].SUTTER, Markus, BOEHRINGER, Daniel, GUTMANN, Sascha, et al. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nature structural & molecular biology*, 2008, vol. 15, no 9, p. 939.
- [59].CARUSO, Frank, TRAU, Dieter, MÖHWALD, Helmuth, et al. Enzyme encapsulation in layer-by-layer engineered polymer multilayer capsules. *Langmuir*, 2000, vol. 16, no 4, p. 1485-1488.
- [60].PARK, In-Kyu, VON RECUM, Horst A., JIANG, Shaoyi, et al. Supramolecular assembly of cyclodextrin-based nanoparticles on solid surfaces for gene delivery. *Langmuir*, 2006, vol. 22, no 20, p. 8478-8484.
- [61].GRANADERO, Daniel, BORDELLO, Jorge, PÉREZ-ALVITE, Maria Jesus, et al. Host-guest complexation studied by fluorescence correlation spectroscopy: adamantane-cyclodextrin inclusion. *International journal of molecular sciences*, 2010, vol. 11, no 1, p. 173-188.
- [62].ZHANG, Jianxiang et MA, Peter X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 2013, vol. 65, no 9, p. 1215-1233.

- [63].GRANADERO, Daniel, BORDELLO, Jorge, PÉREZ-ALVITE, Maria Jesus, et al. Host-guest complexation studied by fluorescence correlation spectroscopy: adamantane-cyclodextrin inclusion. *International journal of molecular sciences*, 2010, vol. 11, no 1, p. 173-188.
- [64].LEE, Gil U., KIDWELL, David A., et COLTON, Richard J. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir*, 1994, vol. 10, no 2, p. 354-357.
- [65].GRUBMÜLLER, Helmut, HEYMANN, Berthold, et TAVAN, Paul. Ligand binding: molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. *Science*, 1996, vol. 271, no 5251, p. 997-999.
- [66].DUNDAS, Christopher M., DEMONTE, Daniel, et PARK, Sheldon. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013, vol. 97, no 21, p. 9343-9353.
- [67].ZHU, Min, GONG, Xue, HU, Yonghong, et al. Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *Journal of translational medicine*, 2014, vol. 12, no 1, p. 352.
- [68].WANG, Libing, MA, Wenwei, CHEN, Wei, et al. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, vol. 26, no 6, p. 3059-3062.
- [69].HYSTER, Todd K., KNÖRR, Livia, WARD, Thomas R., et al. Biotinylated Rh (III) complexes in engineered streptavidin for accelerated asymmetric C–H activation. *Science*, 2012, vol. 338, no 6106, p. 500-503.
- [70].PALOMAR, Quentin. *Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt*. 2017. Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes.
- [71].VOET, Donald et VOET, Judith G. *Biochimie*. De Boeck Supérieur, 2016.



Chapitre II :
Méthodes d'analyse et
modélisation cinétique



II.1. Introduction

Ce chapitre a pour but de présenter les principes physiques des différentes techniques expérimentales utilisées pour le développement des différents (bio)capteurs étudiés dans le cadre de cette thèse. Dans un premier temps, nous présentons les techniques électrochimiques telles que la spectroscopie d'impédance et la voltammétrie cyclique de manière à souligner leur intérêt dans le développement de biocapteurs. Nous présentons également les techniques électrochimiques qui dans le cadre de développement des nouveau (bio)capteur nécessités en plus, des techniques d'analyse chimique de surface utilisées tels que la spectroscopie infrarouge et la microscopie électronique à balayage afin de permettre l'obtention d'informations souvent complémentaires nécessaires pour l'interprétation des résultats obtenus par les techniques de caractérisations électrochimiques.

Dans un deuxième temps, nous décrivons la modélisation mathématique de la cinétique relie avec système de (bio)capteur.

II.2. Méthodes expérimentales utilisées

En général, on utilise des solutions contenant outre les espèces électroactives, un sel électrolyte support totalement dissocié permettant de saturer la solution et de la placer en régime de diffusion pure. Dans la pluparts des cas, quand il est nécessaire, l'oxygène dissous, le mode opératoire généralement utilisé est de faire barboter un gaz inerte pendant quelques minutes.

Figure II.1 donne le schéma de base d'un montage expérimentale couramment utilisé dans toutes expériences électrochimiques.

Il est composé 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 constante*** 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 mesurer le courant circulant dans la cellule électrochimique.

Le potentiostat permet de réguler la tension entre l'électrode de travail et la contre-électrode de manière à maintenir constante la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (tension de consigne).

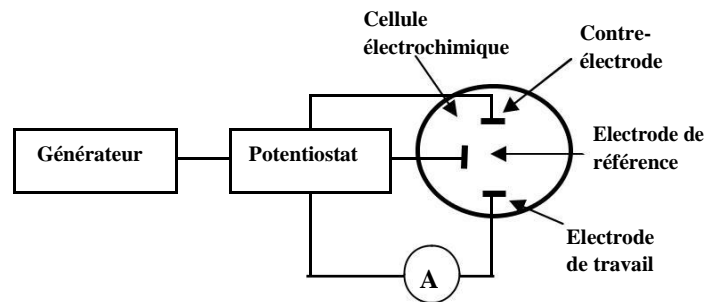


Figure II.1 : Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé

II.2.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

La spectroscopie électrochimique d'impédance (EIS) est une technique **fiable** et **puissante** pour étudier les propriétés électriques des systèmes électrochimiques. 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]. Dans la dernière décennie, l'EIS a pris une importance croissante dans les domaines des technologies liées à la biophysique et aux biocapteurs [3-4]. 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 décrivons la théorie du calcul de l'impédance en présentant l'impédance des différents éléments déduits des phénomènes produits à l'interface électrode/électrolyte.

II.2.1.1. Principe de la spectroscopie d'impédance

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode non stationnaire qui permet d'avoir des informations sur les étapes élémentaires qui constituent le processus électrochimique global.

En général, cette technique repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du système électrochimique étudié. Ce système peut être considéré comme étant une « boîte noire » qui réagit en émettant un signal $y(t)$ quand il est soumis à une perturbation $x(t)$ (Figure II.2). Les deux signaux $x(t)$ et $y(t)$ sont alors reliés par une fonction de transfert $H(\omega)$ telle que $Y(\omega) = H(\omega) * X(\omega)$, $X(\omega)$ et $Y(\omega)$ étant respectivement les transformées de Fourier de $x(t)$ et $y(t)$. Avec ω , la pulsation.

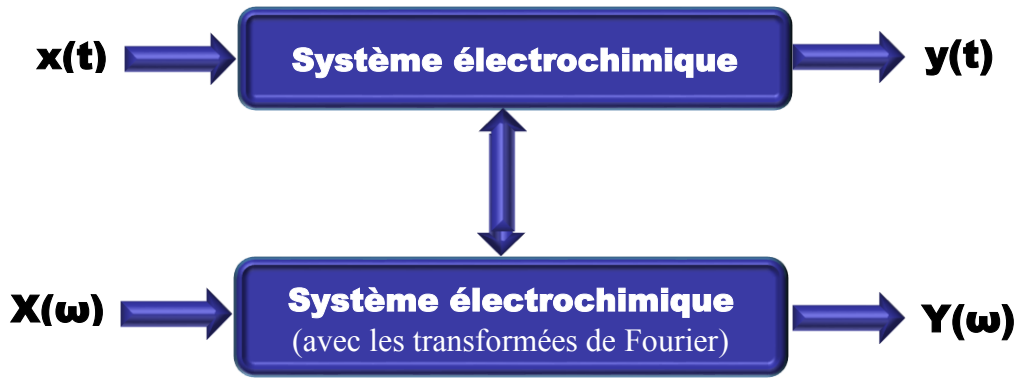


Figure II.2 : Schéma d'une fonction de transfert.

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

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

$$E(t) = E_0 + |\Delta E| \sin(\omega t) \quad \text{Eq. II. 1}$$

Comme on peut l'écrire en notation complexe :

$$E(t) = E_0 + |\Delta E| e^{j\omega t} \quad \text{Eq. II. 2}$$

$$j = \sqrt{-1}$$

E : L'amplitude de tension de la composante alternative et la pulsation du signal.

Dans un système linéaire ou pseudo-linéaire la perturbation sinusoïdale du potentiel induit un courant sinusoïdal superposé au courant stationnaire avec angle φ :

$$I(t) = I_0 + |\Delta I| \sin(\omega t + \varphi) \quad \text{Eq. II. 3}$$

En notation complexe l'expression de courant est donnée par :

$$I(t) = I_0 + |\Delta I| e^{j(\omega t + \varphi)} \quad \text{Eq. II. 4}$$

Les systèmes électrochimiques étudiés n'étant généralement ni linéaires, ni stables dans le temps, un certain nombre de précautions s'imposent. Il faut s'assurer que le système reste « quasi stable » sur toute la durée de la mesure, et que l'amplitude de la sinusoïde soit suffisamment faible pour que la fonction $I = f(E)$ soit linéaire dans le domaine perturbé (Figure II. 3).

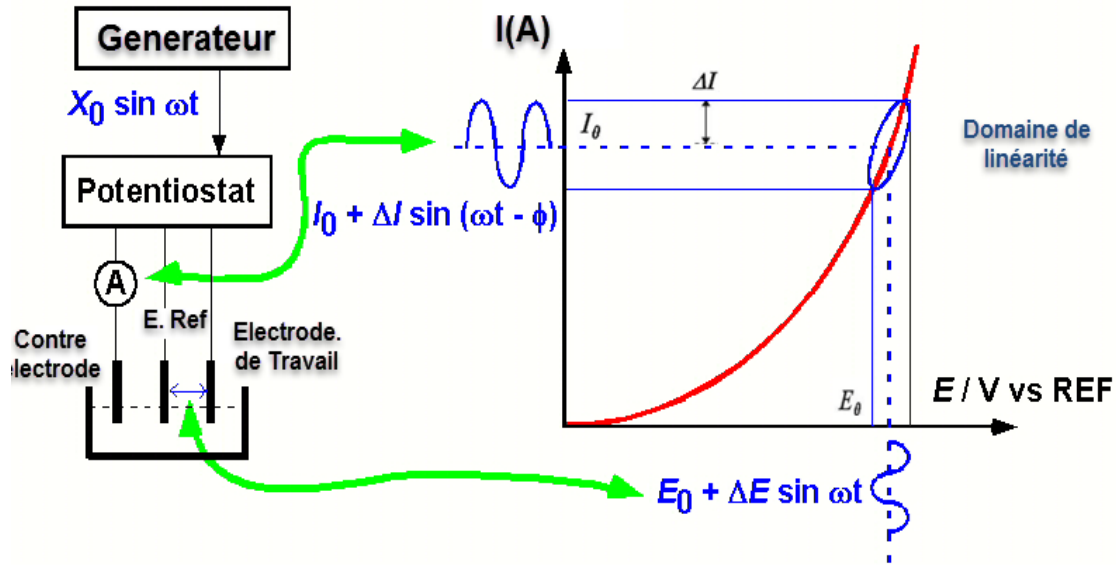


Figure II. 3 : Principe de l'analyse en petits signaux d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation sinusoïdale.

II.2.1.2. Théorie du calcul de l'impédance

a. Définition de l'impédance

Dans le cas général, l'impédance d'un circuit constitué de résistances, de capacités et d'inductances, est définie comme étant le rapport de la tension appliquée à l'intensité du courant qui le traverse. Elle est calculée à partir des impédances des éléments constitutifs du circuit.

Cette impédance est une grandeur complexe que l'on exprime en Ohms (Ω), et que l'on peut écrire, pour une fréquence donnée, sous la forme d'une fonction de transfert :

$$Z_{\omega} = \frac{E_{\omega}}{I_{\omega}} \quad \text{Eq. II. 5}$$

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

Après réarrangement mathématique cette fonction devient :

$$Z_{\omega} = \frac{\Delta |E|}{\Delta |I|} (\cos \varphi + j \sin \varphi) = |\overline{Z_w}| e^{j\varphi\omega} \quad \text{Eq. II. 6}$$

Dans le plan complexe l'impédance représente un vecteur, caractérisé par le module $|Z|$ et l'angle de déphasage φ (Figure II.4). On peut aussi l'écrire comme une somme vectorielle d'une partie réelle et d'une partie imaginaire :

$$Z_w = Z_{Re}\omega + jZ_{Im}\omega \quad \text{Eq. II. 7}$$

Le module de l'impédance $|\overline{Z_w}|$, peut être exprimé comme suit :

$$|\overline{Z_{\omega}}| = \sqrt{Z_{Re}\omega^2 + Z_{Im}\omega^2} \quad \text{Eq. II. 8}$$

La phase de l'impédance est définie par :

$$\varphi_{\omega} = \arctg\left(\frac{Z_{Im \omega}}{Z_{Re \omega}}\right)$$

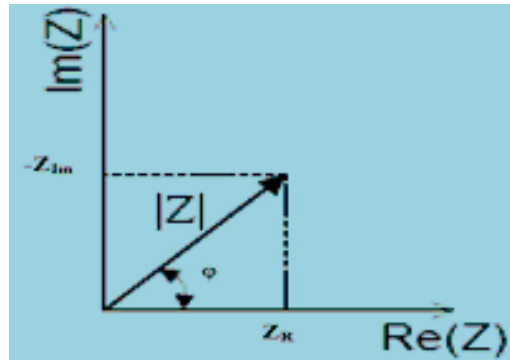


Figure II.4 : Schéma représentatif de l'impédance en coordonnées cartésiennes et polaires.

b. Représentation graphique de l'impédance

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

b.1. Diagramme de Bode

Dans le diagramme de Bode, le logarithme du module $|Z_{\omega}|$ et le déphasage φ_{ω} de l'impédance sont tracés en fonction du logarithme de la fréquence

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

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

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

c. Principaux composants électriques et électrochimiques d'impédance

Elément résistif R

Pour une résistance R l'impédance Z est un réel. Elle est indépendante de la fréquence. Ceci est traduit par une proportionnalité entre $E(t)$ et $I(t)$ à chaque instant, donc, dans le diagramme de Fresnel (tableau II.1) $E(t)$ et $I(t)$ sont en phase, c'est-à-dire que $\varphi = 0$. L'impédance d'une résistance est donnée par l'équation suivante [5] : $Z_R = R$. Sa représentation graphique dans le plan de Nyquist est un point sur l'axe des réels (Tableau II.1).

Elément capacitif C

Pour un élément capacitif, l'impédance est donnée par l'expression suivante :

$$Z_R = -\frac{j}{C \omega} \quad \text{Eq. II. 11}$$

La représentation du courant et de la tension dans l'espace de Fresnel montre que ces signaux sont en quadrature de phase ($\varphi = -\frac{\pi}{2}$).

Elément inductif L

L'impédance d'une inductance est :

$$Z(\omega) = jL\omega \quad \text{Eq. II. 12}$$

Le graphe d'impédance dans le plan de Nyquist est une droite verticale coupant l'axe des réels à une valeur nulle aux basses fréquences et tend vers l'infini aux hautes fréquences.

Elément de phase constante (CPE)

Pour représenter certains phénomènes électrochimiques, l'impédance est nommée élément à phase constante (en anglais : CPE : Constant Phase Element).

L'expression de cette impédance est donnée sous la forme suivante [6] :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n} \quad \text{Eq. II. 13}$$

La signification physique de Q et de n n'est pas toujours claire, mais l'analyse de cette impédance dans le plan de Nyquist montre que lorsque n passe de 0 à 1, l'impédance passe d'une résistance pure ($n=0$) à une capacité pure ($n=1$) et dans le cas particulier où n est égal à 0,5, nous avons une impédance particulière appelée impédance de Warburg.

Table II.1 : Tableau récapitulatif de l'impédance des composants électriques élémentaires

Dipôle	Schéma	Impédance	Diagramme de Fresnel	Diagramme de Nyquist
Resistance		R		
Capacité		$-\frac{j}{C\omega}$		
inductance		$jL\omega$		

II.2.1.3. Impédance de différents phénomènes électrochimiques

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

a. Résistance de la solution

Du côté de l'électrode, le potentiel est constant en tout point de la surface. Par contre, dans la solution, il se crée une variation de potentiel et de courant dans l'électrolyte, qui conduit au concept de chute ohmique. En SIE (à définir), l'électrode de référence et la contre-électrode sont placées relativement loin de la surface de l'électrode de travail. A haute fréquence, la répartition des courants secondaires peut donc être négligée. La chute ohmique est alors classiquement décrite comme étant la résistance de la solution et des contacts électriques R_s [7]. L'impédance de la chute ohmique est :

$$Z_{R_s}(\omega) = R_s$$

b. Capacité de la double couche

Un phénomène observé à l'interface électrode/électrolyte est la formation d'une double couche d'ions [8]. L'application d'une perturbation sinusoïdale lors de la mesure d'impédance entraîne la charge et la décharge de cette couche qui se comporte, selon le modèle de Stern [9], comme un condensateur électrique. La réponse de cette double couche génère un courant I_{dc} qui dépend de la fréquence de perturbation et de

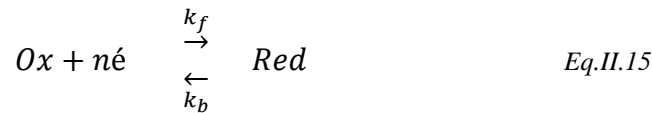
la variation de charge interfaciale. Ce type de processus peut être généralisé à tous les phénomènes qui entraînent la charge et la décharge de deux zones séparées par un diélectrique. L'impédance d'un condensateur de capacité C est donnée par l'équation :

$$Z_{C_{dl}}(\omega) = \frac{1}{jC_{dl}\omega} \quad \text{avec} \quad C_{dl} = \varepsilon \varepsilon_0 \frac{A}{e} \quad \text{Eq.II.14}$$

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

c. Résistance de transfert de charge

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



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

$$Z_{R_{ch}}(\omega) = R_{ct} = \frac{\partial I_F}{\partial E} = \frac{RT}{nFI_0} \quad \text{Eq. II. 16}$$

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

$$I_0 = nFAC_0k^0 \quad \text{Eq.II.17}$$

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

d. Impédance de Warburg

L'impédance de Warburg est l'impédance résultant de la diffusion d'une espèce de la solution à l'électrode. C'est le premier élément électrochimique qui a été présenté dans la description de l'impédance de la diffusion semi-infinie. Cette impédance dépend de la fréquence de la perturbation, du potentiel appliqué et de la concentration des espèces qui diffusent. L'expression de l'impédance de Warburg est donnée par l'expression suivante [10] :

$$Z_w = \sigma(1 - j)\omega^{-0.5} \quad \text{Eq.II.18}$$

Avec σ coefficient de Warburg.

II.2.1.4. 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).

Prenons comme exemple le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé pour les systèmes électrochimiques, le circuit de Randles [11]. 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_w , représentant le phénomène de diffusion des espèces redox. La forme générale du circuit équivalent est présentée sur la figure II.5.

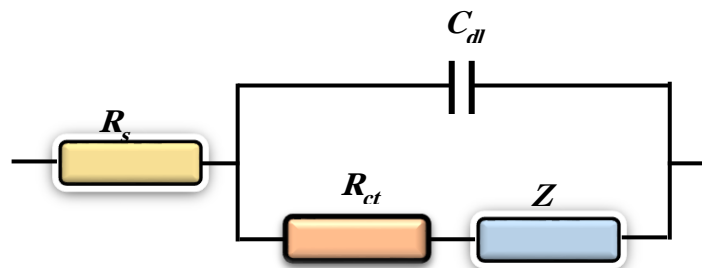


Figure II.5 : Circuit équivalent de Randles

L'impédance totale Z de ce circuit a pour expression générale :

$$Z(\omega) = R_s + \frac{Z_F}{1+j\omega C_{dl}RZ_F} = R_s + Z_F \frac{1-j\omega C_{dl}Z_F}{1+j\omega C_{dl}Z_F} - \frac{j\omega R_{ct}^2 C_{dl}}{1+\omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} \quad Eq.II.19$$

$$avec \quad Z_F = R_{ct} + \frac{Z_F}{1+j\omega C_{dl}RZ_F}$$

Aux hautes fréquences, l'impédance de Warburg est négligeable. 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 . Avec un simple calcul l'impédance équivalente est donnée par l'expression suivante :

$$Z(\omega) = R_s + \frac{R_{ct}}{1+\omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} - \frac{j\omega R_{ct}^2 C_{dl}}{1+\omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} \quad Eq. II. 20$$

Aux basses fréquences, le système est commandé par des processus de diffusion, ce qui signifie que l'impédance de Warburg est prédominante. Les expressions correspondantes de l'impédance sont montrées dans les équations suivantes :

$$Z_{Re}(\omega) = R_s + R_{ct} + \sigma \omega^{-0.5} \quad Eq.II. 21$$

Et

$$Z_{Im}(\omega) = \sigma \omega^{-0.5} - 2 \sigma^2 C_{dl} \quad Eq.II. 22$$

Présentation du diagramme de Nyquist (le plus utilisé)

Aux hautes fréquences nous écrivons l'expression de l'équation Eq II.19 sous la forme Suivante :

$$\left[Z_{Re}(\omega) - \left(R_s + \frac{R_{ct}}{2} \right) \right]^2 + Z_{Im}(\omega)^2 = \left(\frac{R_{ct}}{2} \right)^2 \quad Eq.II. 23$$

C'est l'équation d'un arc de cercle avec un rayon et les intersection de cette équation sur l'axe des abscisses sont à R_{ct} , 0 et R_s , suivant les indications de la figure II.6

Cette équation est l'équation d'une droite de pente -1. Nous pouvons dire que c'est une droite inclinée à 45° par rapport à l'axe des abscisses et l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses est R.

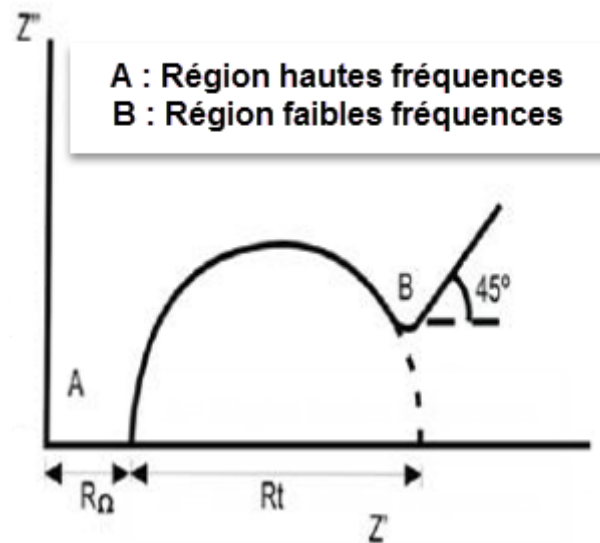


Figure II.6 : Diagramme de Nyquist pour un système faradique

II.2.1.5. Méthode utilisée pour le fitting

Il existe différents algorithmes de simulation disponibles dans le logiciel EC-Lab utilisé pour la correction des données. La méthode choisie est appelée « **Randomisation + Levenberg–Marquardt** ». Elle se produit en deux étapes consécutives : tout d'abord une randomisation, suivie d'une minimisation réelle utilisant le minimiseur Levenberg–Marquardt. L'option « randomiser » signifie que le logiciel va choisir des valeurs aléatoires pour tous les paramètres constituant le circuit équivalent à trouver (R , C , W ...), calculer le χ^2 à chaque mesure et garder pour chaque paramètre la valeur qui a donné le χ^2 le plus faible. La randomisation est donc utilisée pour fournir des valeurs initiales aussi près que possible des valeurs expérimentales réelles, afin d'avoir un bon point de départ pour poursuivre avec la minimisation Levenberg–Marquardt, en utilisant un algorithme mathématique [12].

Afin de montrer l'influence de chaque paramètre sur le diagramme de Nyquist, différentes simulations sont effectuées à partir de données expérimentales. Le logiciel EC-Lab permet de tracer des points simulés à partir de valeurs de paramètres que nous avons choisies.

II.2.2. Voltamétrie cyclique

La voltammétrie est une technique électrochimique stationnaire couramment employée pour le contrôle des processus qui se produisent sur une surface d'un métal utilisé en tant qu'électrode de travail. Cette technique est souvent utilisée pour étudier le comportement des espèces en solution (système rapide, réversible, nombre d'électrons échangés...) et pour avoir des renseignements quant aux processus qui ont lieu à la surface de l'électrode (adsorption, passivation...) [13-15].

II.2.2.1. Principe

La voltampérométrie consiste à appliquer une différence de potentiel variable, deux balayages linéaires (« aller »/« retour ») du potentiel en fonction du temps, entre une électrode de référence et une électrode indicatrice, au contact de laquelle va se produire une réaction d'oxydo réduction ($Ox + ne \leftrightarrow Red$). La réponse du système est l'enregistrement du courant, en fonction de la tension appliquée. Cette réponse se présente sous la forme de la courbe $I = f(E)$, appelé *voltammogramme*, qui est une caractéristique de l'espèce électroactive (figure II.7).

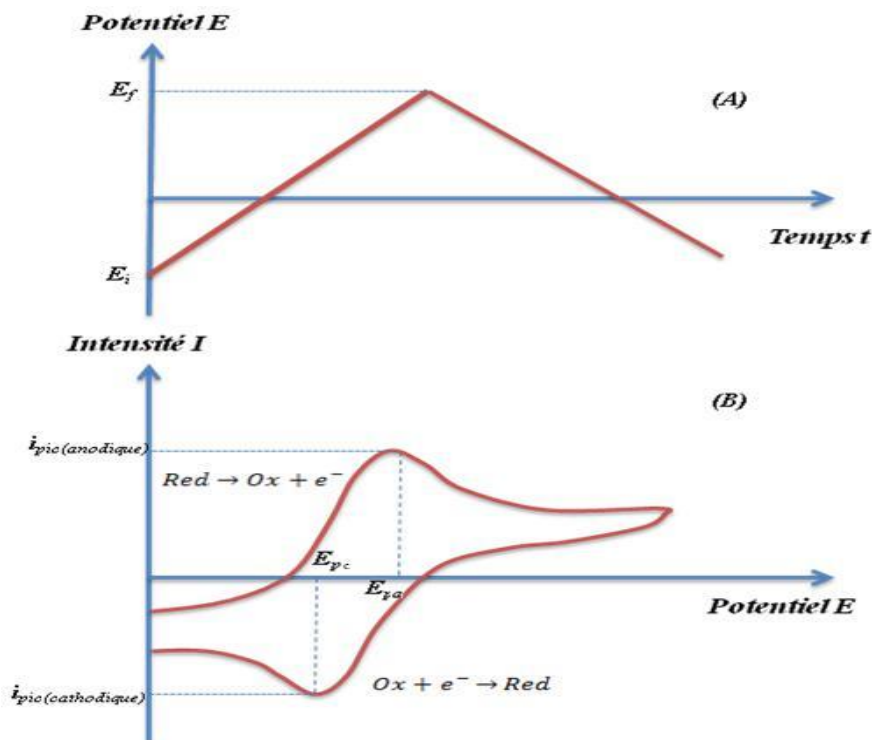


Figure II.7 : Voltampérométrie cyclique. (a) : forme du potentiel imposé ($E f(t)$), (b) : réponse en courant $I = f(E)$.

Pour un système réversible, lors du balayage « aller », on observe sur le voltampérogramme une croissance du courant situé entre le nanoampère et le microampère. Pendant cette période, une réaction de réduction ($\text{Red} \rightarrow \text{Ox} + ne$) commence à se produire, correspondant à l'accélération du processus par accroissement du potentiel. Suite à cette croissance, le maximum du pic d'oxydation (E_{pa}) indique l'intensité du courant anodique pour l'espèce étudiée sur une électrode donnée. Puis une décroissance lorsque le ralentissement dû au phénomène de diffusion l'emporte.

Le balayage retour apporte des informations quant à la réversibilité de la réaction électrochimique par la position et l'intensité des courants faradiques enregistrés. Le tracé présentera un second pic (de réduction) indiquant l'intensité du courant cathodique issu de la réduction de l'espèce oxydée produite à l'aller et encore présente dans la couche de diffusion. Ces systèmes, qualifiés de réversibles, répondent en tout point du voltampérogramme à la relation de Nernst (Eq. II.32)

$$E = E_0 - \frac{2.3 RT}{nF} \log \frac{C_{red}(0, t)}{C_{ox}(0, t)} \quad \text{Eq. II. 24}$$

E_0 étant le potentiel standard du couple redox, R constante des gaz ($8.314 \text{ J.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T la température exprimée en Kelvin, n le nombre d'électrons échangés, et F la constante de Faraday (96487 coulombs).

II.2.2.2. Différents types de voltammograms

La voltampérométrie cyclique consiste à effectuer un balayage aller-retour complet du potentiel appliqué. Dans le cas qui nous intéresse, la caractéristique de $I(E)$ aller est différente de la caractéristique retour car entre l'aller et le retour, la couche de diffusion a été modifiée dans sa composition. L'allure de la variation du courant au cours du temps et celle du voltampérogramme cyclique sont données par les figure II.8 et II.9.

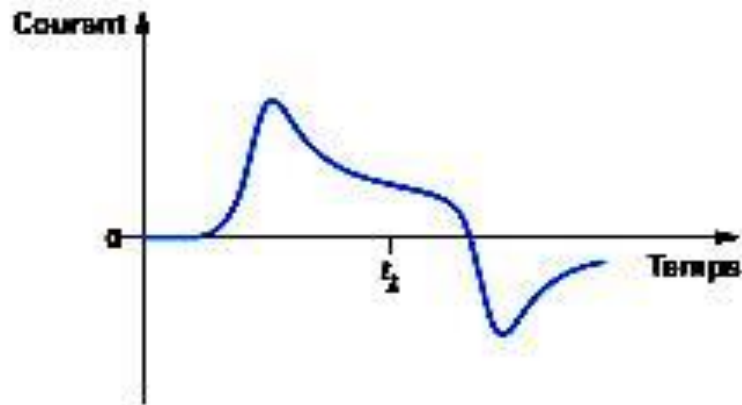


Figure II.8 : Variation du courant en fonction du temps en régime de diffusion pure [16]

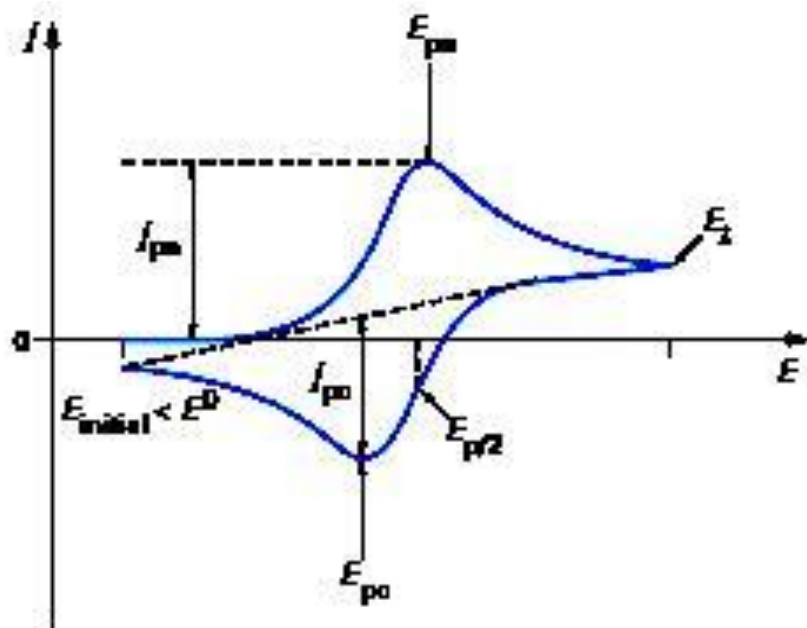


Figure II.9 : Allure du voltampérogramme cyclique d'un système rapide en régime de diffusion pure (Red seul présent en solution) [16]

Compte tenu de ces modifications de composition, il est évident que la forme du voltampérogramme retour dépend du temps d'inversion et du potentiel d'inversion. L'analyse de ces voltampérogrammes en fonction des potentiels de pics (hauteurs et espacements), des courants en fonction du temps et de la vitesse de balayage, nous permet de distinguer les différents systèmes (*lent*, *rapide*, *quasi-rapide*) (figure II.10).

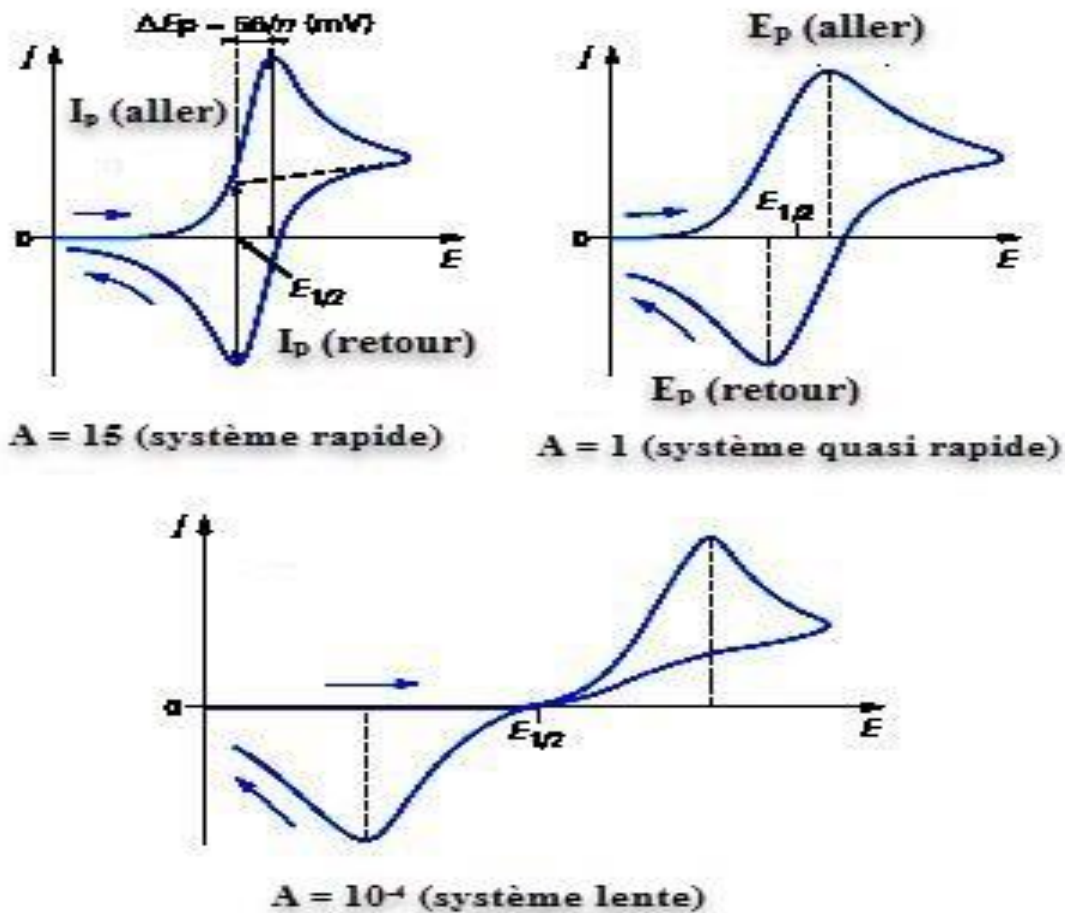


Figure II-10 : Différentes allures des voltampérogrammes cycliques selon la rapidité du système [16]

- ❖ Dans notre travail, cette méthode a été utilisée pour l'électropolymerization du polyaniline de même que pour le contrôle de la quantité de charge échangée lors de la formation du film de polymère. Elle a également permis de suivre l'évolution du film de polymère déposé sur une électrode de travail en fonction du temps.

II.3. Méthodes théoriques utilisées

Cette section contient le cœur du deuxième axe de notre thèse. On a décrit dans la troisième partie la modélisation et la résolution théorique de notre problème à savoir « la Modélisation mathématique de la cinétique appliquée aux biocapteurs »

II.3.1. Principe de la modélisation mathématique

Un modèle mathématique d'une loi physique **est** une description de cette loi par un langage mathématique. De tels modèles permettent d'utiliser des méthodes mathématiques pour déduire des résultats sur le monde physique qui ne sont pas évidents ou qui n'ont jamais été observés.

La modélisation mathématique est une technique qui repose sur une solide compréhension de la terminologie, de la notation et de la méthodologie de base des mathématiques. Cela implique les étapes suivantes. **Premièrement**, le problème ou l'objectif de l'étude doit être formulé de manière à refléter avec précision les besoins de l'organisation. **La deuxième étape** comprend la recherche de données pertinentes au problème pouvant être appliquées au modèle, et inclut souvent la mise à l'échelle de ces mesures. Ce processus donne souvent un modèle plus réaliste, dont les résultats sont plus facilement compris. **La troisième étape** du processus de modélisation consiste à développer un modèle mathématique qui répond aux préoccupations de l'organisation. Lors de l'élaboration du modèle mathématique, l'objectif principal est de fournir une structure quantitative permettant d'analyser un grand groupe de situations possibles. La formulation du modèle comprend souvent la sélection des fonctions mathématiques appropriées pour expliquer le phénomène. **Dans la quatrième étape**, les données collectées lors de la deuxième étape sont appliquées au modèle mathématique pour obtenir des résultats quantitatifs. **La cinquième étape** consiste à interpréter l'analyse effectuée à l'étape précédente. Il est très important que les résultats soient interprétés de manière claire et compréhensible. Ensuite, les résultats de l'analyse sont vérifiés quant à leur applicabilité à un large éventail de possibilités pour l'organisation. La capacité d'un modèle à prédire avec précision est fondamentale pour la vérification. Si le modèle est jugé utile pour l'organisation, il sera implémenté. Après la mise en œuvre, l'utilisation du modèle peut conduire à des applications supplémentaires pour des modèles similaires, à des ajustements et à des améliorations du modèle, ou le rejet éventuel s'il est jugé inapplicable à la fonction. Les modèles mathématiques et le

processus de modélisation servent de supports d'apprentissage en mettant l'accent sur les aspects appliqués de l'analyse mathématique [17].

II.3.2. Etude cinétique et modélisation d'un (bio) capteur

Le modèle mathématique peut être considéré comme un outil (le plus souvent numérique) simple et utile pour l'analyse de la réponse des biocapteurs [18]. Quelques modèles mathématiques ont été développés pour la simulation des capteurs enzymatiques [19-27] et aussi pour l'étude de différentes configurations composées de mono ou multicouches [28-31]. Divers modèles sont consacrés à la simulation numérique de la réponse ampérométrique des biocapteurs pour le dosage du glucose [32-36], mais seulement quelques approches théoriques concernent la cinétique d'inhibition enzymatique des biocapteurs [37-41]. Les rares modèles basés sur l'inhibition sont le plus souvent limités à l'étude de l'effet de l'inhibition par excès de substrat ou de produit [24, 42,43].

Ce chapitre débute par l'énumération des hypothèses sur lesquelles sont basées les modèles mathématiques qui ont été élaborés et la définition des grandeurs adimensionnelles qui ont permis de réduire les différentes variables dépendantes et indépendantes. Deux méthodes sont développées :

- La première méthode est analytique : relative aux biocapteurs à enzyme immobilisée dans une membrane fixée directement sur la surface de l'électrode.
- La seconde méthode est numérique : relative aussi aux biocapteurs à enzyme immobilisée dans une membrane fixée directement sur la surface de l'électrode.

Les deux méthodes traitent successivement des biocapteurs utilisés pour le dosage de substrat et ceux pour le dosage de composés cibles (polluants). Dans ce dernier cas, la cinétique de la réaction enzymatique de Michaelis-Menten contrôle le processus.

Ces modèles ont pour objectif d'optimiser la réponse dynamique du biocapteur et de quantifier l'effet de plusieurs facteurs sur l'amplitude et le temps de sa réponse. Ils sont basés sur l'écriture des équations de bilan matière pour les divers constituants du mélange et des conditions aux limites et initiales particulières à chaque configuration du biocapteur.

La discrétisation des équations différentielles aux dérivées partielles des modèles a été réalisée grâce à la méthode des différences finies implicites. Le modèle a été traduit en langage informatique.

II.3.3. Equations de bilan matière

Le principe de conservation de l'espèce j dans la direction x , perpendiculaire à la surface de l'électrode s'écrit dans la zone réactive (matrice d'immobilisation) :

$$\text{Vitesse} = V = \text{Diffusion} \frac{\partial J(X, T)}{\partial X} + \text{Réaction} \frac{\partial C_{\text{Rex}}(X, T)}{\partial T} \quad \text{Eq. II. 25}$$

Avec C_{Rex} = concentration de l'espèce, T = temps.

Hypothèses simplificatrices

Les hypothèses nécessaires pour l'élaboration des modèles sont rassemblées ci-dessous :

- la concentration du complexe enzyme-substrat ($E.S$) est supposée à l'état stationnaire.
- la géométrie de l'électrode est symétrique.
- la distribution de l'enzyme dans la membrane est homogène.
- la concentration au sein de la solution est uniforme.
- l'épaisseur de la couche enzymatique est régulière.
- la diffusion de toutes les espèces est unidirectionnelle.
- les coefficients de partage membrane/film liquide sont supposés égaux à l'unité.
- le volume de la solution à doser est suffisamment grand par rapport à la surface de l'électrode et au temps de dosage pour que la consommation du substrat due au dosage ne fasse pas varier les concentrations en solution.
- le potentiel choisi est suffisamment élevé de façon à garder la concentration de l'espèce électroactive égale à zéro à la surface de l'électrode.

Dans le but de généraliser ce modèle et pour introduire les nombres adimensionnels caractéristiques, de nouvelles équations sont écrites sur la base de variables réduites. Les grandeurs de références sont le coefficient de diffusion du substrat dans la membrane, l'épaisseur de la membrane et la concentration du substrat en solution. Les variables dépendantes (concentration, densité de courant) sont définies en fonction des variables indépendantes : temps de dosage et distance depuis la surface de l'électrode.

II.3.4. Biocapteurs mono-enzymatiques

Pour chaque modèle, on décrit les équations de bilan matière et les conditions aux limites appropriées en fonction du lieu de la fixation de l'enzyme et des différentes zones constituant le biocapteur.

Le système physique choisi dans ce modèle est constitué d'une électrode sur laquelle a été déposée une membrane contenant l'enzyme immobilisée. Une couche de diffusion sépare la membrane du sein de la solution (figure II.11).

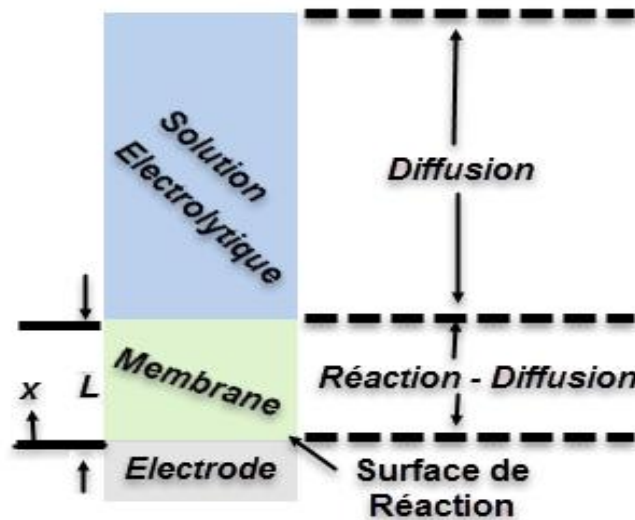


Figure II.11. Représentation schématique de la configuration du biocapteur avec l'enzyme immobilisée dans une membrane d'épaisseur L .

Dosage du substrat

- ❖ Equations du modèle dans la membrane où est immobilisée l'enzyme :

$$\begin{cases} \frac{\partial S(X,T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 S(X,T)}{\partial X^2} - \text{Rex.} & \text{Eq. II. 26} \\ \frac{\partial P(X,T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 P(X,T)}{\partial X^2} + \text{Rex.} & \text{Eq. II. 27} \end{cases}$$

La vitesse **Rex** de la réaction s'exprime en fonction de la vitesse maximale enzymatique adimensionnelle. Avec : S = substrat, P= produit, X= distance.

- ❖ Equations des conditions aux limites

- À la surface de l'électrode, la densité de flux du substrat est nulle :

$$\left. \frac{\partial S(X, T)}{\partial X} \right|_{X=0} = 0 \quad \text{Eq. II. 28}$$

Et la réaction électrochimique est supposée très rapide :

$$P(X = 0, T) = 0 \quad \text{Eq. II. 29}$$

La densité de courant à la surface de l'électrode est proportionnelle au flux de masse du produit :

$$\bar{i}(T) = \bar{D} \left. \frac{\partial P(X, T)}{\partial X} \right|_{X=0} \quad \text{Eq. II. 30}$$

II.3.5. Méthode mathématique de résolution

II.3.5.1. Méthode Analytique

- a. transformation de Laplace
- b. transformation de Fourier
- c. Changement de variable

II.3.5.2. Méthode numérique

Cette partie traite la modélisation numérique des biocapteurs. Les biocapteurs basés sur des transducteurs ampérométriques et potentiométriques sont pris en compte selon : systèmes d'équations aux dérivées partielles (EDP) non-linéaires. L'action des biocapteurs contenant des enzymes simples peut être modélisée selon la technique des différences finies à l'état stationnaire et à l'état non stationnaire. Un accent particulier a été mis sur la modélisation des biocapteurs en utilisant une conversion biocatalytique complexe et des biocapteurs avec une géométrie de transducteurs 1D [44].

Ces modèles utilisent très souvent des systèmes d'équations aux dérivées partielles (EDP) non-linéaires (on ne connaît pas de solutions analytiques en général). Il faut alors résoudre le problème numériquement en transformant les équations continues de la physique en un problème discret sur un certain domaine de calcul (le maillage).

Les différentes étapes pour modéliser un système complexe sont les suivantes :

- Recherche d'un modèle mathématique représentant la physique. Mise en équation.
- Elaboration d'un maillage. Discrétisation des équations de la physique.
- Résolution des équations discrètes (souvent systèmes linéaires à résoudre).
- Transcription informatique et programmation des relations discrètes.
- Simulation numérique et exploitation des résultats. L'ingénieur peut être amené à intervenir sur l'une ou plusieurs de ces différentes étapes.

II.3.5.2.1 Schéma d'Euler explicite

Pour deux entiers M et N donnés, on discrétise de façon uniforme les intervalles d'espace $\Omega = [0, 1]$ et de temps $[0, T]$ en introduisant les points

$$x_j = jh, . j = 0 \dots M + 1 \quad \text{Eq. II. 31}$$

$$t^n = n\Delta t, . n = 0 \dots N \quad \text{Eq. II. 32}$$

où h est le pas de discrétisation en espace donné par $h = 1/(M + 1)$ et Δt est le pas de discrétisation en temps avec $\Delta t = T / N$. On introduit enfin les points

$$P_j^n = (x_j, t^n) \quad \text{Eq. II. 33}$$

On cherche alors une approximation $f_j^n = f(x_j, t^n)$ de la solution exacte aux nœuds P_j^n , en discrétisant la dérivée en espace par un schéma centré au temps t^n et la dérivée en temps par un schéma décentré progressif.

Nous utilisons un schéma arrière d'ordre 1 pour évaluer la dérivée temporelle et un schéma centré d'ordre 2 pour la dérivée seconde en espace :

$$\left(\frac{\partial f}{\partial t}\right)_j^n = \frac{f_j^{n+1} - f_j^n}{\Delta t} \quad \text{Eq. II. 34}$$

$$\left(\frac{\partial^2 f}{\partial x^2}\right)_j^n = \frac{f_{j+1}^n - 2f_j^n + f_{j-1}^n}{\Delta x^2} \quad \text{Eq. II. 35}$$

Le schéma est *explicite* dans la mesure où l'on calcule f_j^{n+1} directement à partir de f_j^n

II.3.5.2.2 Schéma d'Euler implicite

Ce schéma s'écrit

$$\left(\frac{\partial f}{\partial t}\right)_j^{n+1} = \frac{f_j^{n+1} - f_j^n}{\Delta t} \quad \text{Eq. II. 36}$$

$$\left(\frac{\partial^2 f}{\partial x^2}\right)_j^{n+1} = \frac{f_{j+1}^{n+1} - 2f_j^{n+1} + f_{j-1}^{n+1}}{\Delta x^2} \quad \text{Eq. II. 37}$$

II.3.5.2.3 Schéma de Crank-Nicholson (1947)

Le schéma de Crank-Nicolson est une combinaison des schémas implicite et explicite, le résultat de moitié pour le premier et de moitié pour le second est un schéma implicite intéressant pour certaines applications.

II.3.6. Logiciel pour la modélisation des (bio)capteurs

L'action catalytique des biocapteurs est associée à la diffusion du substrat dans la membrane biocatalytique et à sa conversion en un produit. La modélisation des biocapteurs implique la résolution des équations de diffusion pour substrat et produit avec un terme contenant une vitesse de transformation biocatalytique du substrat. Les complications de la modélisation résultent de la résolution d'équations partiellement différentielles avec un terme biocatalytique non linéaire et avec des conditions limites et initiales complexes.

Nous nous sommes intéressé à la manière de résoudre numériquement ce nouveau problème relie avec système de biocapteur, par la programmation et spécialement avec MATLAB et COMSOL multiphasique

II.3.6.1. COMSOL Multiphasics

II.3.6.1.1 Historique

Le groupe COMSOL a été fondé en 1986 par M. Svante Littmarck et M. Farhad en Suède. Il s'est développé au Royaume-Uni, aux États-Unis, en Finlande, etc. De nos jours, le logiciel COMSOL Multiphysics est largement utilisé dans divers domaines de la recherche scientifique et du calcul, par exemple, il a été utilisé dans la simulation numérique globale. [45-52].

COMSOL Multiphysics est un logiciel d'analyse par éléments finis, de résolution et de simulation permettant de résoudre diverses applications de la physique et de l'ingénierie. La première version du logiciel COMSOL Multiphysics a été publiée en 1998 par le groupe COMSOL et s'appelait 33 Toolbox. Au début, ce logiciel n'est utilisé que dans le domaine de la mécanique des structures. L'environnement de simulation COMSOL Multiphysics facilite toutes les étapes du processus de modélisation : définition de la géométrie, spécification de la physique, maillage, résolution puis post-traitement des résultats.

II.3.6.1.2 Introduction

COMSOL Multiphysics est un environnement intégré destiné à la résolution d'équations aux dérivées partielles spatiales du second ordre temporelles ou stationnaires dans l'espace, en une, deux et trois dimensions. De plus, ces équations peuvent être couplées de manière presque arbitraire. COMSOL Multiphysics fournit

des outils sophistiqués (et pratiques) pour la modélisation géométrique. Par conséquent, pour de nombreux problèmes standard, il existe des modes d'application prédéfinis qui agissent comme des modèles afin de masquer une grande partie des détails complexes de la modélisation par équations. Les modes d'application utilisent le langage utilisé dans la discipline d'ingénierie concernée [53].

COMSOL (anciennement FEMLAB) est un progiciel d'analyse par éléments finis et de résolution des problèmes pour diverses applications de la physique et de l'ingénierie, en particulier les phénomènes couplés, ou multiphysiques. Il comprend un environnement complet pour la modélisation de tout phénomène physique pouvant être décrit à l'aide d'EDP ou ordinaires [54-56]. Il est devenu le standard de l'industrie en matière de modélisation, de recherche, de conception et de développement multiphysiques (COMSOL 2008b). Le progiciel prend en charge presque toutes les plates-formes (Windows, Mac, Linux et UNIX, par exemple). COMSOL permet de construire des systèmes couplés d'EDP. Les EDP peuvent être saisis directement ou en utilisant la forme dite faible. COMSOL offre également une interface complète et bien gérée à Math Works MATLAB et à ses boîtes à outils pour une grande variété de possibilités de programmation, de prétraitement et de post-traitement.

COMSOL Multiphysics est un environnement interactif puissant pour la modélisation et la résolution de tous types de problèmes scientifiques et d'ingénierie basés sur des équations aux dérivées partielles (EDP). Avec ce produit, vous pouvez facilement étendre des modèles conventionnels pour un type de physique aux modèles multiphysiques qui résolvent des phénomènes de physique couplés, et ce simultanément. L'accès à ce pouvoir n'exige pas une connaissance approfondie des mathématiques ou de l'analyse numérique. Grâce aux modes physiques intégrés, il est possible de créer des modèles en définissant les grandeurs physiques pertinentes (telles que les propriétés des matériaux, les charges, les contraintes, les sources et les flux) plutôt qu'en définissant les équations sous-jacentes.

II.3.6.1.3. Conception numérique du modèle

Pour la conception de modèle théorique j'ai utilisé le logiciel COMSOL Multiphysics. C'est un logiciel conçu par l'entreprise «Comsol » qui est fondée en 1986. Elle se spécialise dans le domaine de développement de logiciels servant de support technique et de formation spécialisé et de conseil. Le logiciel est utilisé par plusieurs grandes entreprises à travers le monde .On peut modéliser et simuler tout système basé

sur la physique en utilisant un logiciel de COMSOL®. COMSOL Multiphysics® comprend l'interface COMSOL Desktop®, un utilisateur graphique (GUI) et un ensemble d'interfaces d'utilisateur prédéfinis avec des outils de modélisation associés, appelés interfaces de physique, pour la modélisation des applications courantes. Une suite de produits add-on élargit cette plate-forme de simulation multiphysique pour la modélisation des domaines d'application spécifiques ainsi que d'interface avec des logiciels tiers et de leurs capacités. COMSOL Multiphysics est nécessaire pour exécuter l'un des produits add-on [57-58].

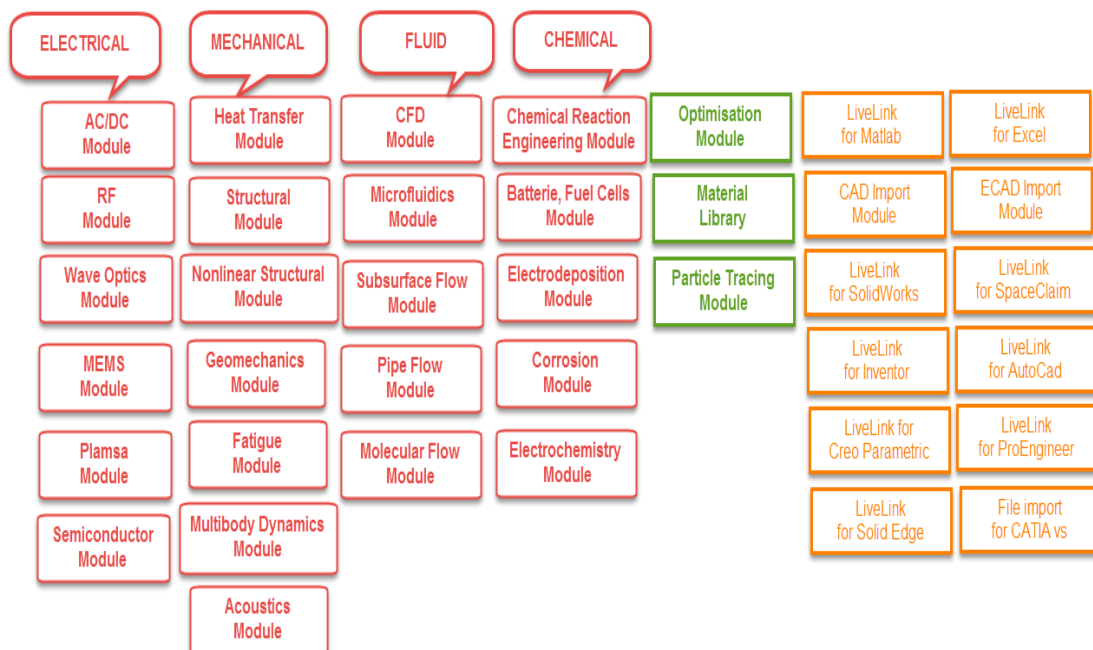


Figure II.12. L'architecture et la représentation des modules « COMSOL ».

La notion de multi-physique est représentée dans la combinaison de plusieurs phénomènes physiques lors de la description d'un processus. On peut décrire mathématiquement des phénomènes physiques très différents par les mêmes équations générales. Alors que des géométries et des phénomènes complexes nécessitent la modélisation avec des équations complexes et des conditions aux limites, COMSOL Multiphysics offre un couplage des différentes formulations physiques (multiphysiques) simples. Le résultat de ses systèmes sont des équations qui peuvent être résolues de façon séquentielle ou dans une formulation entièrement couplée. Multiphysiques étendues : Physique dans différentes géométries peuvent être facilement combinés. Ces variables de couplage peuvent également être utilisées pour lier des physiques ou des géométries différentes comme dans notre cas. Lors de la modélisation et les simulations, ces descriptions sont basées sur les lois de la physique.

II.3.6.1.4. Avantages de la conception avec COMSOL Multiphysics

Le principal but de la création de COMSOL Multiphysics est d'avoir un logiciel où les scientifiques et les ingénieurs peuvent formuler, à l'aide de l'interface utilisateur, n'importe quel système d'équations aux dérivées partielles (EDP) sur la base des lois de la physique et surtout de se baser sur les zones les plus communes dans la physique et en génie chimique (Figure II.13). Cette interface est basée sur un interpréteur d'équation qui formule une discrétisation par éléments finis, à la volée, par le système entièrement couplé. Des interfaces de modélisation prédéfinies pour les différents domaines de la physique appliquée, y compris des couplages multiphysiques. Grâce à la technologie sous-jacente, les propriétés, les sources, les puits et les conditions aux limites peuvent être des fonctions de variables modélisées et leurs dérivées partielles. Les équations complètes sont également disponibles dans l'interface utilisateur pour une manipulation [59].

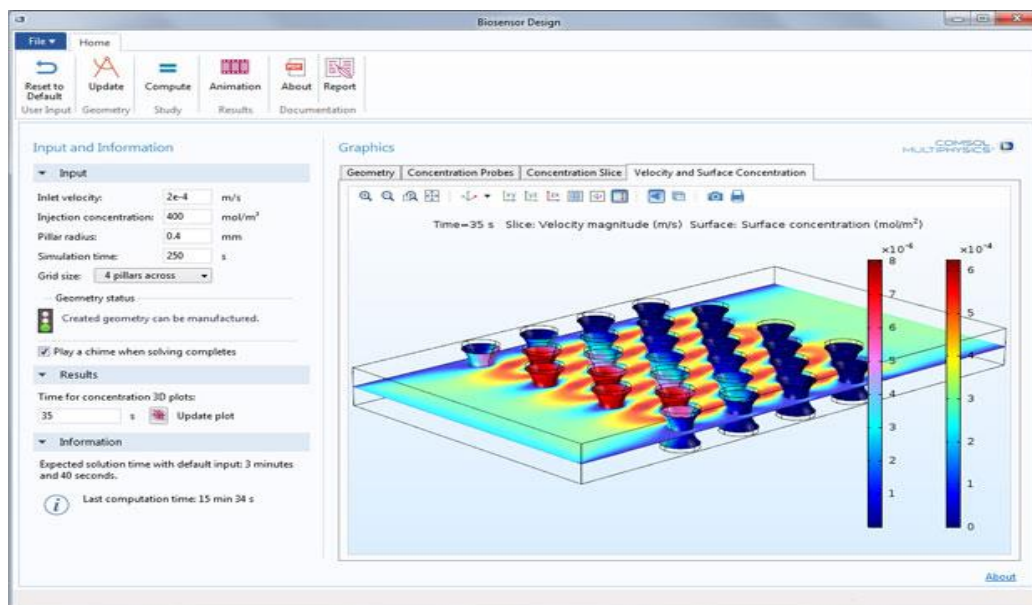


Figure II.13. Conception numérique du modèle biocapteur enzymatique

II.3.6.2. Matlab

Matlab est un système interactif et convivial de calcul numérique et de visualisation graphique destiné aux ingénieurs et scientifiques. Il possède un langage de programmation puissant et simple à utiliser avec lequel l'utilisateur peut effectuer des calculs en ligne ou par l'intermédiaire d'un fichier de commandes [60-61].

Le logiciel Matlab (Matrix Laboratory) est basé sur le calcul matriciel numérique. Tous les objets utilisés dans Matlab sont donc définis au travers de matrices ou vecteurs dont les valeurs sont, par définition, des grandeurs complexes. Il existe un très grand nombre d'opérateurs et fonctions distribués dans le logiciel de base et dans des boîtes à outils spécialisées. A ceci peut s'ajouter un outil de programmation graphique, Simulink, essentiel pour la simulation de systèmes dynamiques non linéaires.

L'environnement Matlab se présente sous la forme d'un espace de travail dans lequel un interpréteur de commandes exécute les opérations demandées.

MATLAB est un logiciel interactif basé sur le calcul matriciel (MATrix LABoratory). Il est utilisé dans les calculs scientifiques et les problèmes d'ingénierie parce qu'il permet de résoudre des problèmes numériques complexes en moins de temps requis par les langages de programmation courant, et ce grâce à une multitude de fonctions intégrées et à plusieurs programmes outils testés et regroupés selon l'usage dans des dossiers appelés boîtes à outils ou "toolbox".

MATLAB est un langage de programmation de haut-niveau qui fournit des fonctions mathématiques utilisées pour résoudre des problématiques scientifiques et d'ingénierie. Son mode interactif nous permet d'obtenir des résultats immédiats en exécutant l'une après l'autre les commandes afin d'explorer rapidement plusieurs options et d'itérer pour arriver à une solution optimale. En outre, MATLAB fournit également les fonctionnalités des langages de programmation traditionnels, telles que le contrôle de flux, la gestion d'exceptions et la programmation orientée objet.

II.3.6.3. Feuille de calcul Excel

Concernant l'utilisation d'Excel pour modéliser les équations aux dérivées partielles (EDP), dans le cas des biocapteurs enzymatiques (voir chapitre V)

II.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté, d'abord, le principe physique des différentes techniques expérimentales qui seront exploitées pour l'étude des biocapteurs développés dans ce travail. Par la suite, nous avons discrétisé les équations des modèles mathématiques développés par la méthode analytique et la méthode numérique en utilisant des différences finies. Nous avons présenté la méthode de résolution et les algorithmes de calcul pour la simulation de la réponse du biocapteur.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons et dériverons, d'une part, les dispositifs expérimentaux utilisés. D'autre part, nous détaillerons les différentes méthodes utilisées pour la fabrication de l'élément sensible des biocapteurs.

Références

- [1].DONG, C. F., XUE, H. B., LI, X. G., et al. Electrochemical corrosion behavior of hot-rolled steel under oxide scale in chloride solution. *Electrochimica Acta*, 2009, vol. 54, no 17, p. 4223-4228.
- [2].Hong, S. et Tai-Chin, L. *Electrochemical Impedance Spectroscopy for Battery Research and Development*. Rapport technique 31, Solartron, 1996.
- [3].PEJCIC, Bobby et DE MARCO, Roland. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochimica acta*, 2006, vol. 51, no 28, p. 6217-6229.
- [4].HELALI, Saloua. Conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impédimétriques. 2005. Thèse de doctorat. Ecully, Ecole centrale de Lyon.
- [5].NEWMAN, John. Frequency dispersion in capacity measurements at a disk electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, 1970, vol. 117, no 2, p. 198-203.
- [6].MACDONALD, J. R. et JOHNSON, W. B. *Impedance Spectroscopy* ed JR Macdonald. 1987.
- [7].NEWMAN, John. Frequency dispersion in capacity measurements at a disk electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, 1970, vol. 117, no 2, p. 198-203.
- [8].AMOKRANE, S. et BADIALI, J. P. Analysis of the Capacitance of the Metal—Solution Interface: Role of the Metal and the Metal—Solvent Coupling. In : *Modern aspects of electrochemistry*. Springer, Boston, MA, 1992. p. 1-95.
- [9].BOUSSE, Luc, DE ROOIJ, Nico F., et BERGVELD, Piet. Operation of chemically sensitive field-effect sensors as a function of the insulator-electrolyte interface. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1983, vol. 30, no 10, p. 1263-1270.
- [10].GABRIELLI, C. Identification of electrochemical processes by frequency response analysis, Solar-tron Analytical Technical Report 004/83. Solartron, March, 1998.
- [11].RANDLES, John Edward Brough. Kinetics of rapid electrode reactions. *Discussions of the faraday society*, 1947, vol. 1, p. 11-19.
- [12].DEVILLERS, Marion. Conception, évaluation et modélisation de biocapteurs pour la détection électrochimique du facteur de motilité autocrine: biomarqueur potentiel de cancers métastatiques. 2016. Thèse de doctorat. Université Paris-Saclay.
- [13].COMPTON, Richard G. et BANKS, Craig E. *Understanding voltammetry*. World Scientific, 2011.

- [14].GUY, Compton Richard, EDUARDO, Laborda, et al. Understanding voltammetry: simulation of electrode processes. World Scientific, 2013.
- [15].GOSSER, David K. Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms. New York : VCH, 1993.
- [16].LAMACHE, Myriam et BAUER, Denise. Étude, par chronoampérométrie, de l'électrode à pâte de carbone à liant électrolytique et solide électroactif incorporé. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1977, vol. 79, no 2, p. 359-364.
- [17]. GHEBRID, Nassima. Etude des problèmes de conduction thermique dans un matériau composite à matrice polymère pigmenté de dioxyde de Tit. 2018. Thèse de doctorat
- [18].CAMBIASO, A., DELFINO, L., GRATTAROLA, M., et al. Modelling and simulation of a diffusion limited glucose biosensor. Sensors and actuators b: chemical, 1996, vol. 33, no 1-3, p. 203-207.
- [19].KULYS, J. J. The development of new analytical systems based on biocatalysts. Analytical Letters, 1981, vol. 14, no 6, p. 377-397.
- [20].KULYS, J. J. Development of new analytical systems based on biocatalysers. Enzyme and microbial technology, 1981, vol. 3, no 4, p. 344-352.
- [21].KULYS, J. J., SOROCHINSKII, V. V., et VIDZIUNAITE, R. A. Transient response of bienzyme electrodes. Biosensors, 1986, vol. 2, no 3, p. 135-146.
- [22].MIZUTANI, Fumio, YAMANAKA, Tadae, TANABE, Yoshikazu, et al. An enzyme electrode for lactate with a chemically-amplified response. Analytica chimica acta, 1985, vol. 177, p. 153-166.
- [23].SCHULMEISTER, Thomas et SCHELLER, Frieder. Mathematical description of concentration profiles and anodic currents for amperometric two-enzyme electrodes. Analytica Chimica Acta, 1985, vol. 171, p. 111-118.
- [24].KULYS, Juozas et BARONAS, Romas. Modelling of amperometric biosensors in the case of substrate inhibition. Sensors, 2006, vol. 6, no 11, p. 1513-1522.
- [25].BACHA, Saliha, BERGEL, Alain, et COMTAT, Maurice. Transient response of multilayer electroenzymic biosensors. Analytical Chemistry, 1995, vol. 67, no 10, p. 1669-1678.
- [26].BERGEL, Alain et COMTAT, Maurice. Theoretical evaluation of transient responses of an amperometric enzyme electrode. Analytical Chemistry, 1984, vol. 56, no 14, p. 2904-2909.
- [27].BOUROUINA, Mustapha, OURARI, Ali, et BOUROUINA-BACHA, Saliha. The effect of membrane permeability on the response of a catechol biosensor. Microchimica Acta, 2008, vol. 163, no 3-4, p. 171-178.
- [28].BARONAS, Romas, IVANAUSKAS, Feliksas, et KULYS, Juozas. The influence of the enzyme membrane thickness on the response of amperometric biosensors. Sensors, 2003, vol. 3, no 7, p. 248-262.
- [29].ROMERO, Marcelo Ricardo, BARUZZI, Ana M., et GARAY, Fernando. Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, vol. 162, no 1, p. 284-291.
- [30].AZIZ, Azila Abd. Mathematical modeling of an amperometric glucose sensor: the effect of membrane permeability and selectivity on performance. Jurnal teknologi, 2012, vol. 51, no 1, p. 77-94.
- [31].PETRAUSKAS, Karolis et BARONAS, Romas. Computational modelling of biosensors with an outer perforated membrane. Nonlinear analysis: modelling and control, 2009, vol. 14, no 1, p. 85-102.
- [32].KULYS, J. J. et ČÉNAS, N. K. Oxidation of glucose oxidase from *Penicillium vitale* by one- and two-electron acceptors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1983, vol. 744, no 1, p. 57-63.


- [33].LEMKE, K. Mathematical simulation of an amperometric enzyme-substrate electrode with apO 2 basic sensor. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 1988, vol. 26, no 5, p. 523.
- [34].MELL, Leroy D. et MALOY, JTF. Model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system. *Analytical Chemistry*, 1975, vol. 47, no 2, p. 299-307.
- [35].CROCE, Robert A., VADDIRAJU, Santhisagar, PAPADIMITRAKOPOULOS, Fotios, et al. Theoretical analysis of the performance of glucose sensors with layer-by-layer assembled outer membranes. *Sensors*, 2012, vol. 12, no 10, p. 13402-13416.
- [36].PARKER, J. W. et SCHWARTZ, C. S. Modeling the kinetics of immobilized glucose oxidase. *Biotechnology and bioengineering*, 1987, vol. 30, no 6, p. 724-735.
- [37].GRAY, Peter J. et DUGGLEBY, Ronald G. Analysis of kinetic data for irreversible enzyme inhibition. *Biochemical Journal*, 1989, vol. 257, no 2, p. 419-424.
- [38].RAKITZIS, Emmanuel T. Kinetics of irreversible enzyme inhibition by an unstable inhibitor. *Biochemical Journal*, 1974, vol. 141, no 2, p. 601-603.
- [39].VALERO, Edelmira, VARÓN, Ramon, et GARCIA-CARMONA, F. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. The inhibition of polyphenol oxidase by L-cysteine. *Biochemical Journal*, 1991, vol. 277, no 3, p. 869-874.
- [40].YANG, Jiansong, JAMEI, Masoud, YEO, Karen Rowland, et al. Kinetic values for mechanism-based enzyme inhibition: assessing the bias introduced by the conventional experimental protocol. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2005, vol. 26, no 3-4, p. 334-340.
- [41].ZHANG, S., ZHAO, H., et JOHN, R. Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for inhibition biosensors—theoretical and practical considerations. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, vol. 16, no 9-12, p. 1119-1126.
- [42].ŠIMELEVIČIUS, Dainius et BARONAS, Romas. Computational modelling of amperometric biosensors in the case of substrate and product inhibition. *Journal of mathematical chemistry*, 2010, vol. 47, no 1, p. 430.
- [43].KULYS, Juozas et BARONAS, Romas. Modelling of amperometric biosensors in the case of substrate inhibition. *Sensors*, 2006, vol. 6, no 11, p. 1513-1522.
- [44].FETHI, Achi. Modélisation de la réponse dynamique de biocapteurs électroenzymatiques. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira de Béjaia.
- [45].MULTIPHYSICS, COMSOL. Introduction to COMSOL Multiphysics®. COMSOL Multiphysics, Burlington, MA, accessed Feb, 1998, vol. 9, p. 2018.
- [46].ZIMMERMAN, William BJ. Multiphysics modeling with finite element methods. World Scientific Publishing Company, 2006.
- [47].DICKINSON, Edmund JF, EKSTRÖM, Henrik, et FONTES, Ed. COMSOL Multiphysics®: Finite element software for electrochemical analysis. A mini-review. *Electrochemistry communications*, 2014, vol. 40, p. 71-74.
- [48].PRYOR, Roger W. Multiphysics modeling using COMSOL®: a first principles approach. Jones & Bartlett Publishers, 2009.
- [49].LAVACCHI, Alessandro, BARDI, Ugo, BORRI, Claudia, et al. Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics®. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2009, vol. 39, no 11, p. 2159.
- [50].COMSOL, A. B. COMSOL Multiphysics Handbook. Hatfield, United Kingdom: Publisher, 2009.
- [51].COMSOL, A. B. COMSOL Multiphysics VERSION 3.5 a Reference Guide. Stockholm: COMSOL AB, 2008, p. 316-317.

- [52].GERLAUD, Antoine. Simulation multiphysique pour la conception busbars laminés. In : Symposium de Génie Électrique 2014. 2014.
- [53].BEN HAMOUDA, Mariem. Étude, conception et modélisation de la diffusion de la chaleur dans les tissus biologiques. 2015. Thèse de doctorat. Université du Québec à Trois-Rivières.
- [54].ELAGGOUNE, A., SEGHIER, T., et MAHI, D. Etude par Simulation d'un Dispositif Expérimental de Détection des Décharges Partielles dans un Câble Electrique.
- [55].BOUGRESSI, Ali. Application du concept des réseaux acoustiques à bondes interdites pour l'isolation sismique d'un site. 2013. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri.
- [56].ELAGGOUNE, A., SEGHIER, T., et MAHI, D. Etude par Simulation d'un Dispositif Expérimental de Détection des Décharges Partielles dans un Câble Electrique.
- [57].GHEBRID, Nassima. Etude des problèmes de conduction thermique dans un matériau composite à matrice polymère pigmenté de dioxyde de Tit. 2018. Thèse de doctorat.
- [58].GHEBRID, Nassima. Etude des problèmes de conduction thermique dans un matériau composite à matrice polymère pigmenté de dioxyde de Tit. 2018. Thèse de doctorat.
- [59].MOHAMMED, Israa Isahge Gadora, IBRAHIEM, Kholod Hajo Hassan, ALI, Nosiba Khider Alrofai, et al. Design of Biosensor using COMSOL Multiphysics. 2016. Thèse de doctorat. Sudan University of Science and Technology.
- [60].MARTAJ, Nadia et MOKHTARI, Mohand. MATLAB R2009, SIMULINK et STATEFLOW pour Ingénieurs, Chercheurs et Etudiants. Springer Science & Business Media, 2010.
- [61].DOUMBIA, Mamadou Lamine et TRAORÉ, Abdoulaye. Modélisation et simulation d'une machine asynchrone à cage à l'aide du logiciel Matlab/simulink. MSAS, Bamako, July, 2002, p. 8-12.



**PARTIE -2-
CONCEPTION ET
REALISATION DE
(BIO)CAPTEURS**





CHAPITRE III
Biocapteur électrochimique
pour la détection d'Amlodipine



III.1. Introduction

Au cours des dernières décennies, les biocapteurs ont émergé des laboratoires et font maintenant une partie intégrante de la vie quotidienne de millions de personnes à travers le monde. Comme certains autres capteurs, ils ont d'abord été développés pour la détection de certaines espèces à faible poids moléculaire, à savoir des métabolites ou des biomarqueurs de maladies, qui présentaient une importance prédominante pour les diagnostics cliniques, pharmaceutiques et dans le secteur des soins de santé [1]. Des biocapteurs ont été développés et utilisés dans de nombreux domaines analytiques, notamment la surveillance de l'environnement, la recherche en chimie, en physique et en biotechnologie, etc.

Les polymères conducteurs ont beaucoup attiré l'attention dans le développement de biocapteurs. Leurs propriétés électro-actives permettent d'agir comme d'excellents substrats pour l'immobilisation de biomolécules et le transfert rapide d'électrons [2–6]. Parmi les divers polymères conducteurs, la polyaniline (PANI) a été largement étudiée en tant que matériau conducteur important possédant des propriétés électriques, électrochimiques et optiques intéressantes. Les applications potentielles de PANI incluent la protection contre la corrosion, les batteries secondaires, les dispositifs électrochromiques et les biocapteurs. Ces dernières années, la préparation de nanocomposites hybrides à propriétés à la fois magnétiques et électriques a fait l'objet d'une grande attention dans les domaines industriels et académiques. Les nanoparticules magnétiques ont été considérées comme des matériaux intéressants pour l'immobilisation de biomolécules, en raison de leur biocompatibilité, de leur forte propriété superparamagnétique, de leur faible toxicité, etc. [7,8]. Par exemple, les nanocomposites à base de polymères conducteurs et de nanoparticules magnétiques figurent parmi les biocapteurs enzymatiques à base de films polymérisés et constituent un domaine important dans la recherche pharmaceutique [9,10]. Les enzymes interagissent spécifiquement avec certains substrats et peuvent donc être utilisées pour la détection de ces substrats. La lipase produite par *Candida rugosa* est l'une des enzymes la plus utilisée dans les solvants organiques en raison de sa forte activité en hydrolyse, estérification, transestérification, aminolyse et sa biodétection [11–13].

Les médicaments cardiovasculaires font partie des médicaments les plus prescrits de nos jours puisque diverses maladies cardiovasculaires prédominent dans les pays développés. Dans ce groupe, les médicaments les plus importants sont les

antihypertenseurs, les cardiotoniques, les anti-arythmiques, les anticoagulants, les vasodilatateurs coronaires et les hypolipémies. Depuis que la nifédipine a été introduite en Allemagne en 1975 par Bayer AG [14], de nombreux autres produits sont apparus sur le marché [15], tels que la nicardipine, la nilvadipine, la nitrendipine, la foridone, la nimodipine, la benidipine. L'Amlodipine, chimiquement, acide 2 - [(2-aminoéthoxy) méthyl] -4- (2-chlorophényl) -1,4-dihydro-6-méthyl-3,5-pyridinedicarboxylique, 3-éthyl, 5-méthylester, bésylate (Figure III.1) [15] est un inhibiteur calcique de type dihydropyridine, qui agit uniquement sur le canal de type L pour produire son effet pharmacologique [16]. Comme la plupart des dérivés de dihydropyridine, elle présente une plus grande sélectivité pour le muscle lisse vasculaire que le tissu myocardique. Son effet principal est la vasodilatation. L'amlodipine est utilisée seule ou en association avec d'autres médicaments pour le traitement de l'angine chronique stable de certains types d'angor vasospastique et pour la prise en charge de l'hypertension essentielle légère à modérée.

Plusieurs méthodes, basées sur diverses techniques analytiques, ont été décrites dans la littérature pour la détermination du bésylate d'amlodipine sous forme pure ainsi que dans des formulations de laboratoire de chimie, des formulations pharmaceutiques et des fluides biologiques. Ils comprennent les méthodes spectrophotométriques [17,18], les méthodes spectrofluorométriques [19], la chromatographie sur couche mince à haute performance [20], la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [20,22], la chromatographie liquide (LC) [23] GC) [24], électrophorèse capillaire [25], analyse par injection de flux [26] et dosage immuno-enzymatique [27].

Bien que ces méthodes aient une sensibilité élevée, il s'agit malheureusement de processus à plusieurs étapes, qui prennent du temps, nécessitant un prétraitement approfondi de l'échantillon et une qualification pour une détection rapide. Ces dernières années, le développement de méthodes électroanalytiques pour l'analyse de l'amlodipine utilisant des électrodes en or [28], du graphite pyrolytique (PG) [29], du carbone vitreux (GC) ou de la pâte de carbone [30,31] a suscité un intérêt croissant. Une attention considérable a été portée sur la modification chimique des microélectrodes afin d'améliorer les performances électroanalytiques. Des nanocomposites de graphène-chitosane / GC [32] et des pâtes de carbone modifiées à l'aide de nanotubes de carbone à parois multiples [33] ont été récemment développés. De plus, des électrodes en diamant dopé au bore (BDD) ont été fabriquées [34,35].

Dans le présent travail, nous avons décrit la synthèse par voie chimique de la polyaniline avec des composites d'oxyde de fer pour la fabrication d'un support en présence d'un substrat de gélatine pour l'immobilisation de la lipase CRL, et nous avons ensuite utilisé cette électrode de platine modifiée pour la détection d'Amlodipine. La polyaniline synthétisée a été caractérisée par micrographie au MEB, la spectroscopie FTIR et l'UV-visible. Il s'agit de la première fabrication et utilisation de la polyaniline et de la gélatine pour un biocapteur à base de lipase de *Candida rugosa* en vue de détecter l'Amlodipine. De plus, les conditions expérimentales pour la fabrication et les performances analytiques du biocapteur ont été optimisées avec des méthodes électrochimiques. Enfin, nous avons étudié les performances du biocapteur d'Amlodipine, en fonction du pH et de la température du milieu avec effet de la concentration et du balayage.

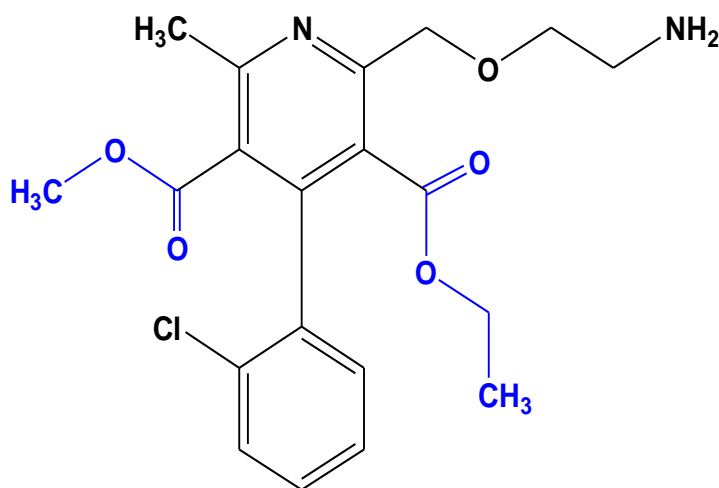


Figure III.1. Structures chimiques de l'amlodipine.

III.2. Expérimentales

III.2.1. Appareillages

Les expériences électrochimiques ont été réalisées à l'aide d'un potentiomètre / Galvanostat de qualité de recherche modulaire EC-Lab SP, et du logiciel EC-Lab pour le traitement des données et le contrôle des expériences. Une cellule à trois électrodes a été utilisée pour étudier le comportement électrochimique de la molécule cible par voltampérométrie cyclique et par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). L'électrode de référence était une électrode au calomel saturé (SCE), un fil de platine d'un diamètre de 1 mm était utilisé comme électrode auxiliaire et l'électrode de travail était une plaque de platine d'une surface de 0,5 cm². Dans les mesures dynamiques, les données d'impédance ont été obtenues à une amplitude 10 mV et une plage de fréquences variant de 100 Hz à 100 kHz. Les expériences ont été effectuées dans une cage de Faraday sombre pour éliminer les interférences électriques.

III.2.2. Produits chimiques et réactifs

Tous les produits chimiques étaient disponibles dans l'état commercial et utilisés tels que reçus. La lipase de *Candida rugosa*, achetée auprès de Sigma Chemical Co., a été utilisée pour des expériences sans aucune purification. Des solutions aqueuses (25% p/v) de glutaraldéhyde (GA) chez Sigma-Aldrich, chlorure d'hydrogène (HCl), monomère aniline, persulfate d'ammonium ((NH₄)₂S₂O₄, APS), oxyde de fer (Fe₂O₃) et gélatine. Le bésylate d'amlodipine a été obtenu auprès de MM LABORATOIRES (Annaba, Algérie). La solution tampon utilisée pour toutes les expériences était une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) contenant du NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HP0₄ 0,1 mM et KH₂P0₄ 1,8 mM, avec un pH de 7,4. Les réactifs de qualité analytique sont utilisés comme achetés sans aucun prétraitement.

III.2.3. Préparation de PANI / Oxyde de Fer

La synthèse de PANI/oxyde de fer a été réalisée par une méthode de polymérisation chimique. Pour l'activation de la molécule d'aniline, le monomère d'aniline (0,1 M) a été mélangé dans 1M d'acide HCl et agité pendant 15 min pour former du chlorhydrate d'aniline (solution A). Ensuite, 0,2 g de microsphères de Fe₂O₃ ont été ajoutées sous la forme d'une fraction massique à la solution ci-dessus sous agitation vigoureuse afin de maintenir l'oxyde de fer en suspension de manière

homogène dans la solution et ensuite traité par ultrason pendant 30 min, conduisant ainsi un mélange homogène. A cette solution, du persulfate d'ammonium 0,1 M activé par HCl 1 M (solution B), qui agit comme un oxydant, a été lentement ajouté goutte à goutte sous agitation continue a une température de 4 à 5 ° C pendant 5 h pour polymériser complètement le mélange (Schéma III.1). Le précipité a été filtré, lavé avec de l'eau déionisée et de l'acétone et finalement séché dans un four pendant 24 h pour atteindre une masse constante du mélange [36,37].

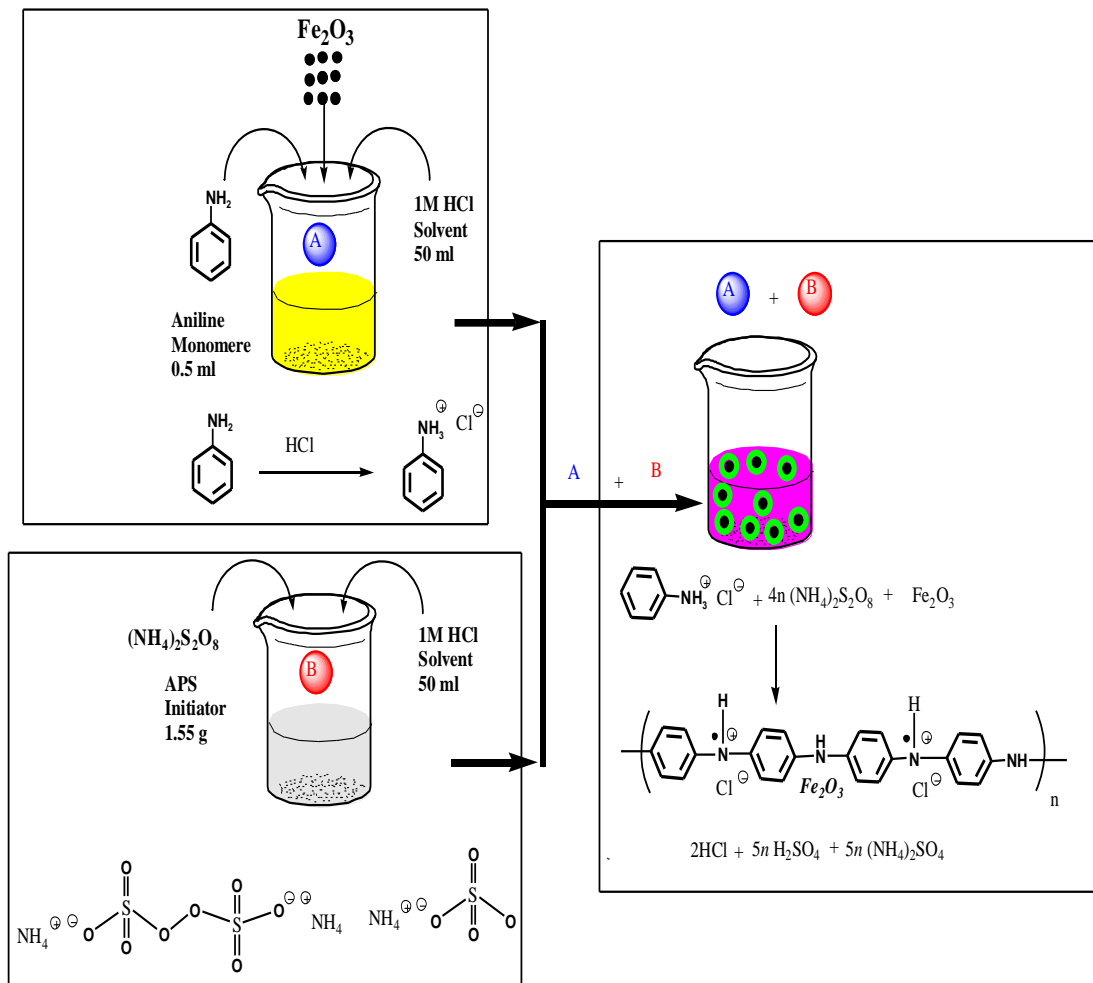


Schéma III.1. Représentation schématique de la synthèse du composite PANI/Fe₂O₃ par polymérisation chimique.

III.2.4. Modification d'électrode et immobilisation de l'enzyme *Candida Rugosa Lipase*

Pour la construction de la couche bioactive, les électrodes de Pt ont été polies avec une suspension d'alumine, lavées soigneusement avec de l'eau distillée, puis soniquées pendant 5 min dans de l'éthanol et de l'eau distillée, respectivement. Deux milligrammes de PANI/ Fe₂O₃ et 3 mg de gélatine ont été dissous dans 100 µL (pH 7,4) dans du tampon phosphate 50 mM à 40 ° C. Ensuite, 80 µl de la solution ont été dispersés sur la surface de l'électrode en Pt et laissés sécher pendant 30 min à 4° C. Pour la réticulation, la surface de l'électrode a été immergée dans une solution de glutaraldéhyde (5% v / v) pendant 5 min. 5 % (w/w) de *Candida rugosa* lipase solubilisé dans 90 µL d'un tampon à 20mM de KH₂PO₄, ont été immobilisés sur la surface de l'électrode. Finalement, l'électrode a été rincée avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de glutaraldéhyde (Schéma III. 2).

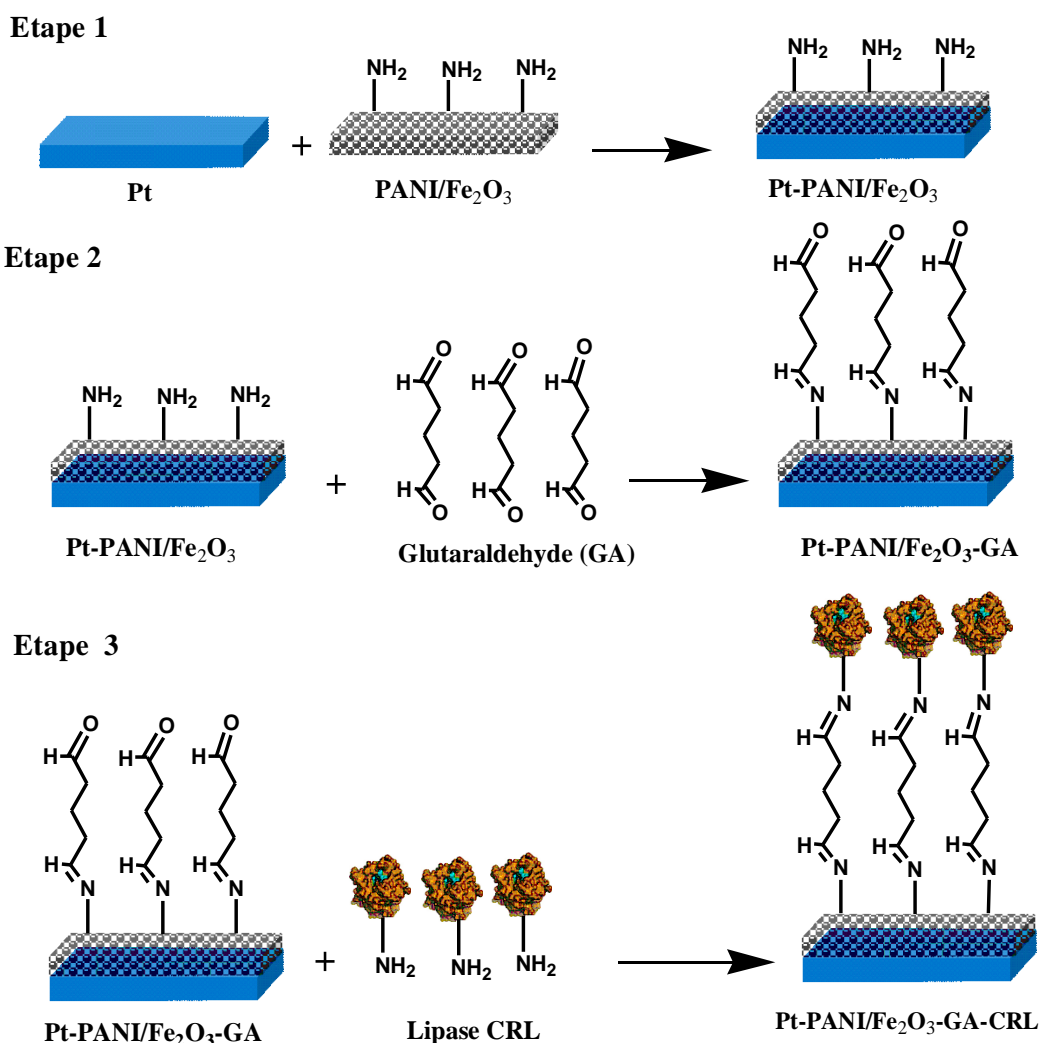


Schéma III. 2 : Schéma de l'élaboration du biocapteur à l'aide de PANI/Fe₂O₃

III.3. Résultats et discussions

III.3.1. Caractérisation de l'oxyde de fer - polyaniline

III.3.1.1. Caractérisation avec micrographie au MEB

Les figure III.2.a et b représente les micrographies au MEB montrant la morphologie de surface de composites conducteurs à base de PANI/ Fe_2O_3 synthétisés par la méthode d'oxydation chimique, dans laquelle une surface uniforme de polyaniline a été observée. La distribution uniforme de Fe_2O_3 contenait des particules uniformes qui indiquaient la bonne dispersion des nanoparticules sur la surface. De plus, la présence de nanoparticules d'oxyde de fer avec une bonne dispersion de Fe_2O_3 à la surface de la polyaniline a une forte influence sur divers paramètres électriques de ces nanocomposites.

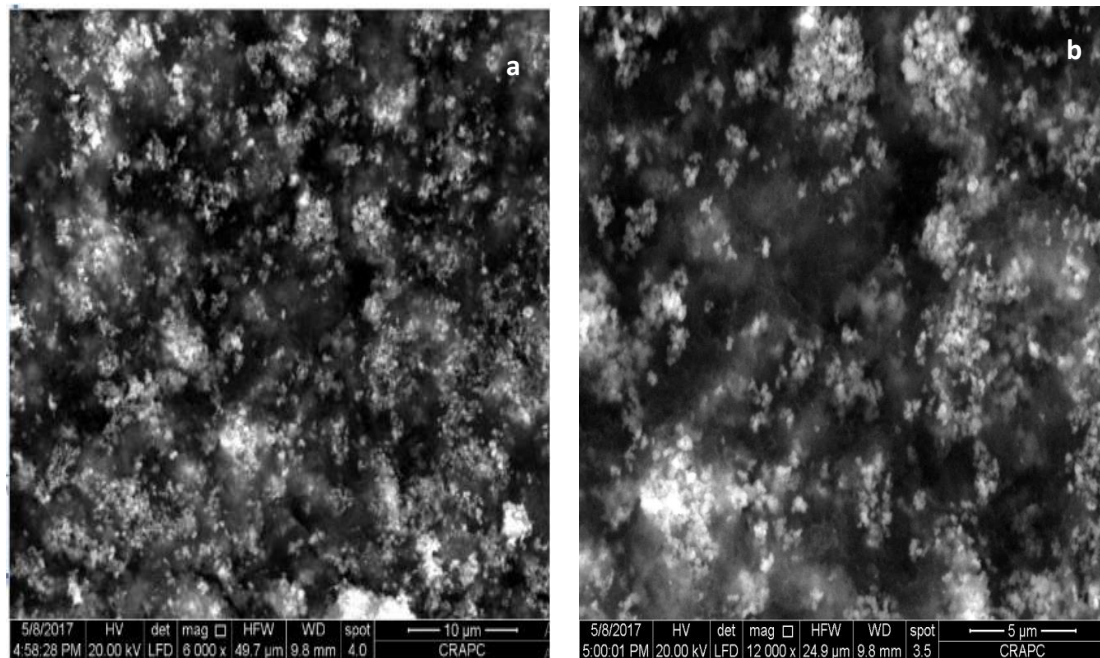


Figure III.2. Micrographies MEB a) 10 µm et b) 5 µm de la surface des composites conducteurs PANI/ Fe_2O_3

III.3.1.2. Caractérisation par FTIR

La spectroscopie à transmission infrarouge (FTIR) a été largement utilisée pour examiner les polymères conducteurs. La figure III.3.a montre les spectres FTIR de PANI/ Fe_2O_3 . Les bandes à 1599 et 1498 cm^{-1} de PANI (courbe a) correspondent au déplacement chimique des bandes C-N et C-C des cycles quinoïde et benzénique. Les bandes à 1298 et 1242 cm^{-1} sont attribuées au mode d'étirement C-N de l'anneau benzénoïde et le signal à 1168 cm^{-1} est attribué au PANI protoné (N-H). La présence d'une bande nette et forte à 592-588 cm^{-1} indique la présence de vibrations d'étirement

Fe-O. Ceci indique la formation de composites de polymères [38]. FTIR de Fe_2O_3 est représenté sur la figure III.3.b, avec des pics caractéristiques provenant de la vibration Fe-O dans la plage de 400 à 600 cm^{-1} . Les spectres FTIR des composites PANI/ Fe_2O_3 ont montré des bandes à 831 et 881 cm^{-1} , qui sont des pics caractéristiques de PANI. Le pic à 684 cm^{-1} est généralement attribué au C-H en dehors de la flexion dans le PANI.

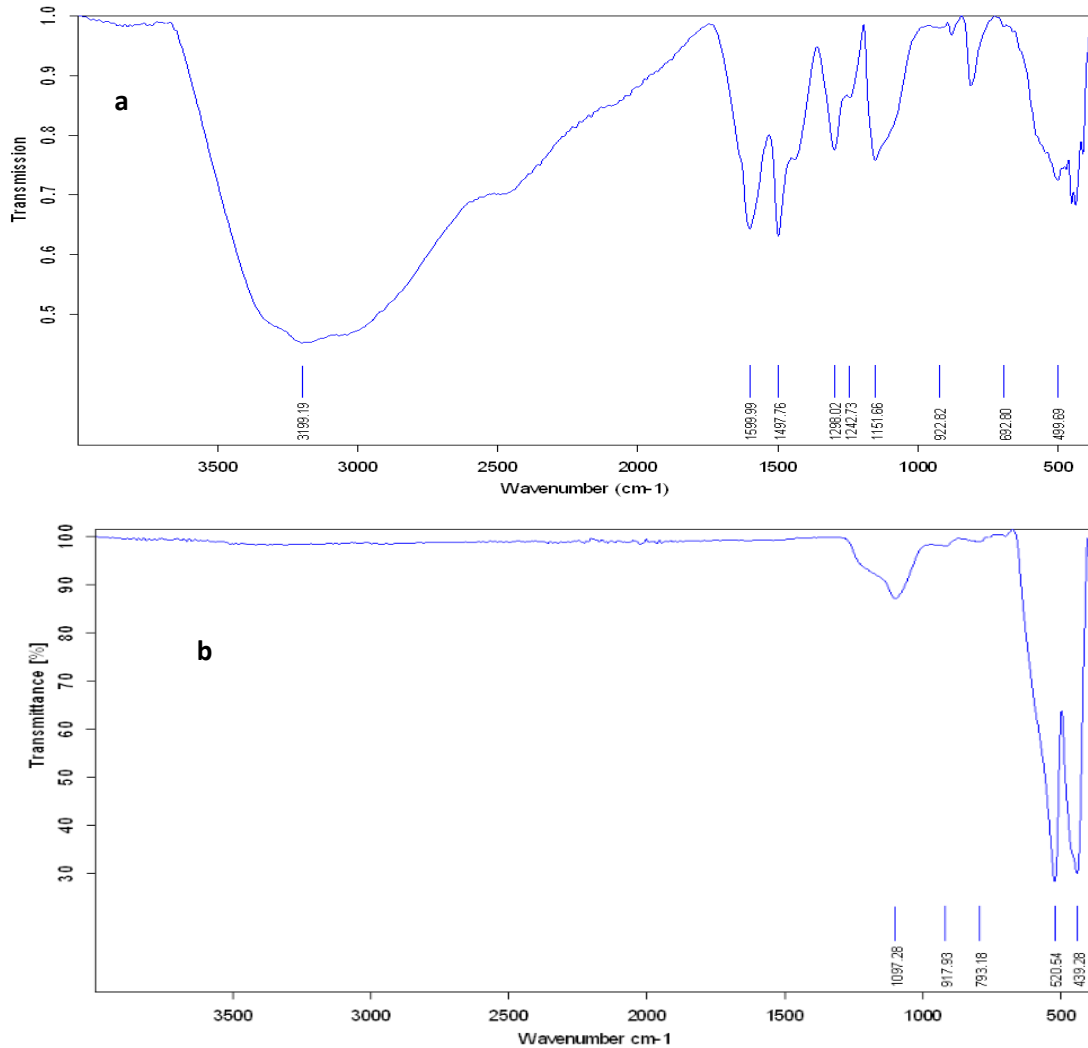


Figure III.3. Spectres FTIR de composites PANI / Fe_2O_3

III.3.1.3. Caractérisation par UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des composites PANI / Fe_2O_3 sont présentés sur la figure III.3. Le spectre d'absorption typique des PANI présente deux pics d'absorption distincte à 343 et 683 nm après ajustement. Le pic à 343 nm provient de

la transition électronique $\pi - \pi^*$ dans les segments benzénoïdes et le large pic à 683 nm est lié au niveau de dopage de la polyaniline avec l'oxyde de fer.

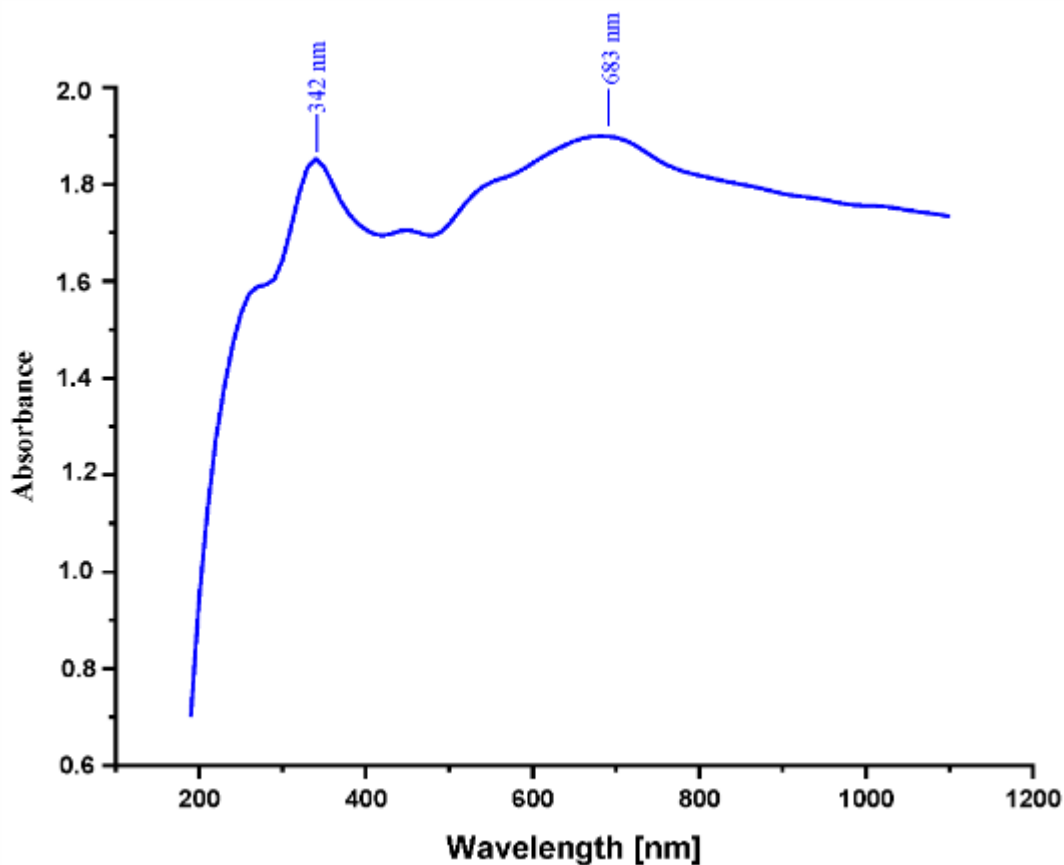


Figure III.4. Spectres UV-visible des composites PANI/Fe₂O₃

III.3.2. Caractéristiques électrochimiques sur la surface de l'électrode

L'étude voltammétrique d'espèces électroactives solubles constitue un outil pratique pour surveiller les différentes étapes de préparation du biocapteur sur l'électrode de Pt. La figure III.5 (1) présente les voltammogrammes de l'électrode de Pt nue et l'électrode de platine modifiée avec une membrane de polyaniline (PANI/Fe₂O₃-Ge-GA-CRL). Les mesures ont été réalisées dans une solution de cyanure de fer Fe(CN)₆^{3-/4-} (avec concentration de 5 mM) préparée dans du tampon phosphaté salin connu sous le nom de PBS (à pH =7,2 ; 10mM). Le potentiel imposé varie entre -0,7 V à + 0,7 V pour une vitesse de balayage égale à 50 mV/s. On peut voir que pour l'électrode de platine nue, l'apparition d'un pic anodique et d'un pic cathodique correspondre aux réactions du couple redox (cyanure de fer). Lorsque la surface de Pt a été fonctionnalisée avec PANI/ Fe₂O₃ et une lipase, le transfert d'électrons a été modifié.

En conséquence, une diminution évidente des pics anodiques et cathodiques a été observée, indiquant la formation de la couche bioactive.

La spectroscopie d'impédance électrochimique peut également fournir des informations détaillées sur la constante diélectrique et les propriétés de barrière de la couche de dépôt après les modifications. La figure III.5 (2) montre les spectres d'impédance de l'électrode de platine nue et modifiée. L'électrode Pt nue révèle un très petit demi-cercle, impliquant une très faible résistance au transfert d'électrons (R_{ct}). Lorsque l'électrode est modifiée avec un film PANI/Fe₂O₃-Ge-GA-CRL, la R_{ct} augmente de manière significative.

Le film de dépôt a été défini avec une charge négative (COO-) de l'enzyme (acides aminés contenant des groupes fonctionnels carboxyle (-COOH)), qui agit comme une barrière électrostatique résistant à la couple redox $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ et empêche sa capacité à diffuser dans la couche. Ce phénomène résulte probablement de l'inhibition de la cinétique de transfert d'électrons entre le couple redox et la surface de l'électrode modifiée.

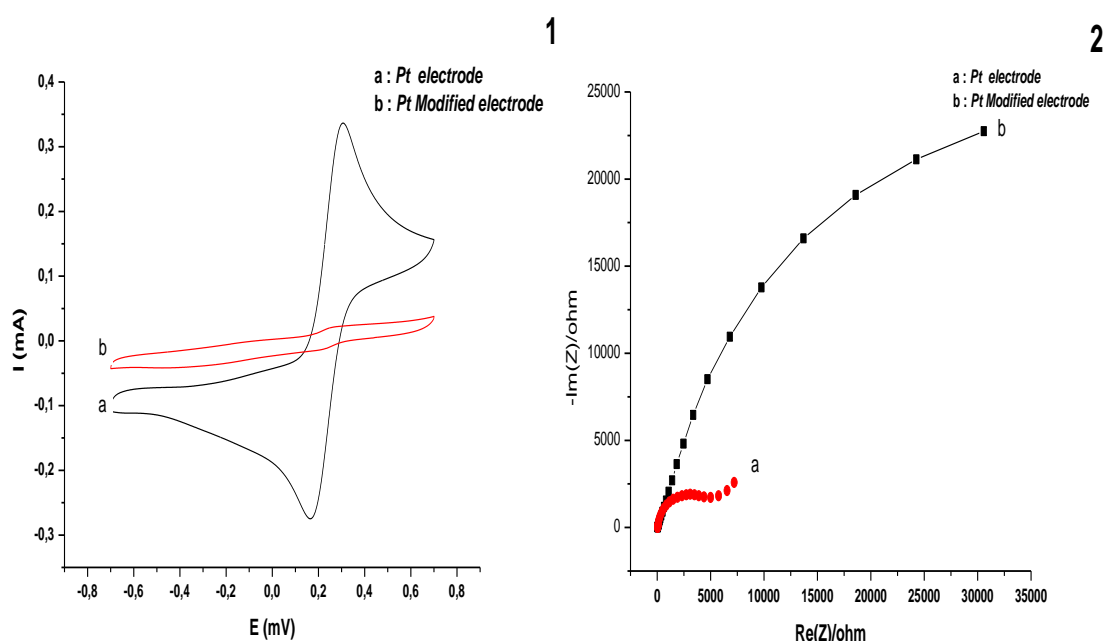


Figure III.5. Caractérisation de l'électrode de Pt nue et modifiée (1) par voltamétrie cyclique à 50 mV/s (2) par impédance à un potentiel -200 mV.

III.3.3. Etude par voltampérométrie cyclique du biocapteur

III.3.3.1. Effet de la concentration

La réponse électrochimique de biocapteur élaborée (PANI/Fe₂O₃-Ge-GA-CRL) a été étudiée en variant la concentration de l'amlodipine de 10⁻¹² M à 10⁻⁵ M. Les voltammogrammes obtenus sont présentés sur la figure III.6. Les courbes de voltamétrie cyclique d'AMD montrent un pic cathodique important à -0,18 V, alors qu'aucun pic anodique n'est observé dans le balayage inverse, indiquant la réduction irréversible d'AMD à la surface d'électrode.

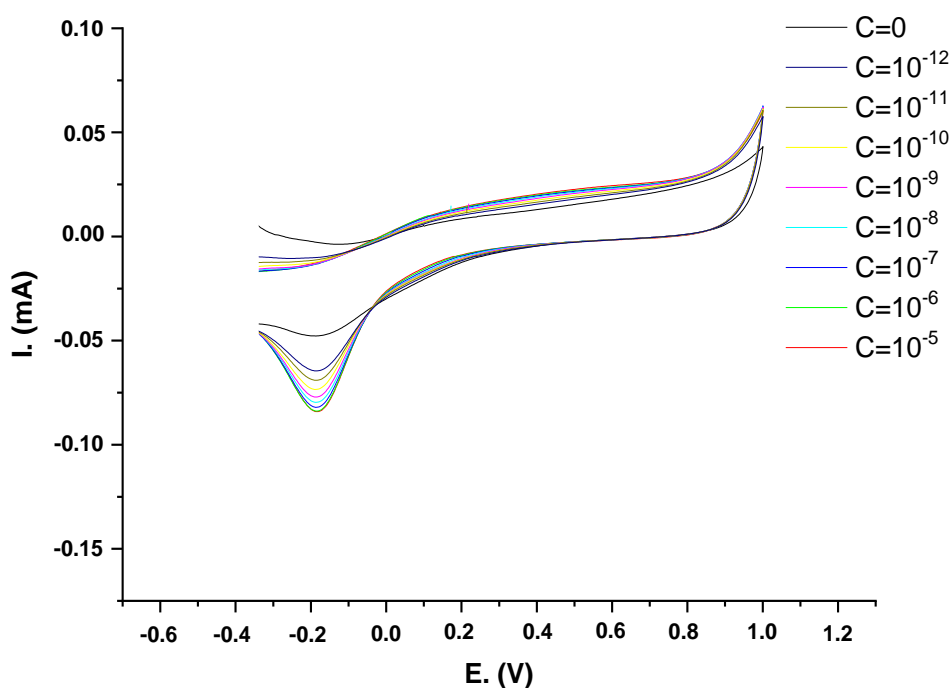


Figure III.6. Voltammogrammes de différentes concentrations d'AMD dans le PBS (à pH 7,4, 10 mM)

Une courbe d'étalonnage a été tracée entre l'intensité du pic cathodique et le logarithme de la concentration en Amlodipine (C_{AMD}) (Figure III.7). L'équation de la régression linéaire et le coefficient de corrélation sont la suivante :

$$\Delta I_{pc} = I_{pc}^c - I_{pc}^{c=0} = 6,4 \times 10^{-2} + 3,5 \times 10^{-3} \cdot \log [C_{AMD}] ; \text{ avec } R = 0,993 \quad \text{Eq.III.1}$$

Au cours de cette étude, on peut voir d'après la courbe d'étalonnage que le biocapteur élaboré a une réponse linéaire dans une gamme de concentration en l'amlodipine entre

10^{-12} M et 10^{-5} M, avec un coefficient de corrélation d'environ 0.993 et une sensibilité égale à $3.5 \mu\text{A}/\text{mole L}^{-1}$. La limite de détection obtenue est de l'ordre 10^{-12} M.

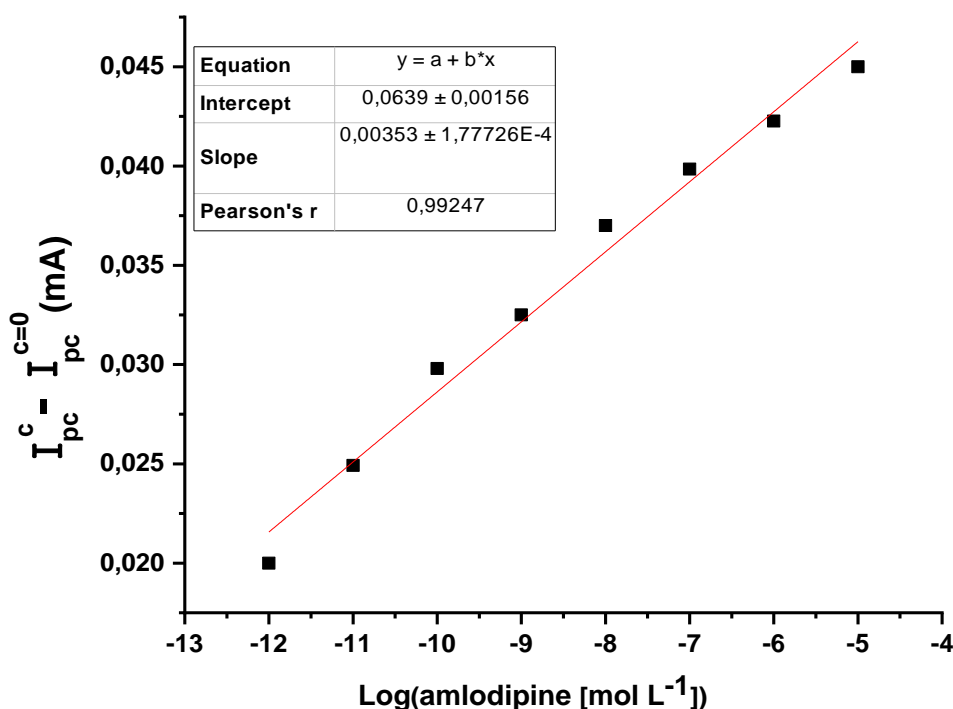
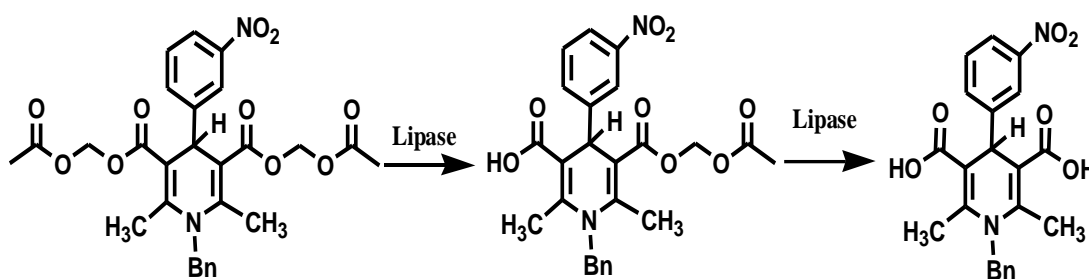


Figure III.7. Variation de l'intensité du pic cathodique suite à l'injection de différentes concentrations de l'amlodipine.

III.3.3.2. Mécanisme proposée pour la réaction de l'amlodipine

La cinétique de la réaction catalytique de l'enzyme est l'une des parties les plus importantes dans le développement d'un biocapteur. Dans ce but, la cinétique a été étudiée afin de fournir des informations détaillées sur les étapes réactionnelles élémentaires de l'hydrolyse de la classe des 1,4-dihydropyridines (y compris le substrat d'Amlodipine utilisé dans notre étude) par la lipase. Ces 1,4-dihydropyridines (1,4-DHP), y compris la nifédipine et l'amlodipine, ont été soumis à une résolution cinétique enzymatique par hydrolyse en présence de lipases dans de l'eau saturée en solvant organique [39,40]. En 1992, la lipase a été observée dans l'hydrolyse de dérivés de 1,4-dihydropyridine par Hirose et al. Une nouvelle série de 4-aryl-1,4-dihydropyridines est utilisée comme substrat pour de nombreuses enzymes afin d'obtenir des composés énantiomères. L'hydrolyse enzymatique de *Candida rugosa* par la lipase purifiée a été étudiée en utilisant un diester de 1,4-dihydropyridine comme substrat [41]. La lipase de *Pseudomonas sp* a catalysé l'hydrolyse des esters éthoxycarbonylméthyliques du 1,4-

DHP par la division des groupes esters «externe» et «interne» pour donner l'acide carboxylique ou l'ester méthylique correspondant [42]. En outre, Holdgrun et Sih (1991) ont réalisé l'hydrolyse du 4- (3-nitrophényl) -1,4-DHP et Sih et al. (1992) dans un tampon phosphate à pH 7,0 avec différentes lipases. Lorsque le milieu réactionnel était du n-butanol-eau (10: 1), l'hydrolyse catalysée par une lipase s'est poursuivie avec une bonne énantiosélectivité. La dégradation des diesters a été réalisée par une réaction en deux étapes (Schéma III.3); la première étape a produit des monoacides, et la prolongation du temps de réaction a offert un outil de traitement des diacides achiraux à la fin [43,44].



1,4-Dihydropyridines (1,4-DHPs)

Schéma III.3. Cinétique enzymatique de la réaction d'hydrolyse des 1,4-DHP racémiques [43,44]

En utilisant le t-butylméthyléther comme solvant en plus du méthanol comme nucléophile pour la lipase de *Pseudomonas* et de l'eau comme nucléophile pour la lipase de *Candida rugosa* (CRL), les transformations des 1,4-DHP ont été étudiées (Schéma III.4) [45].

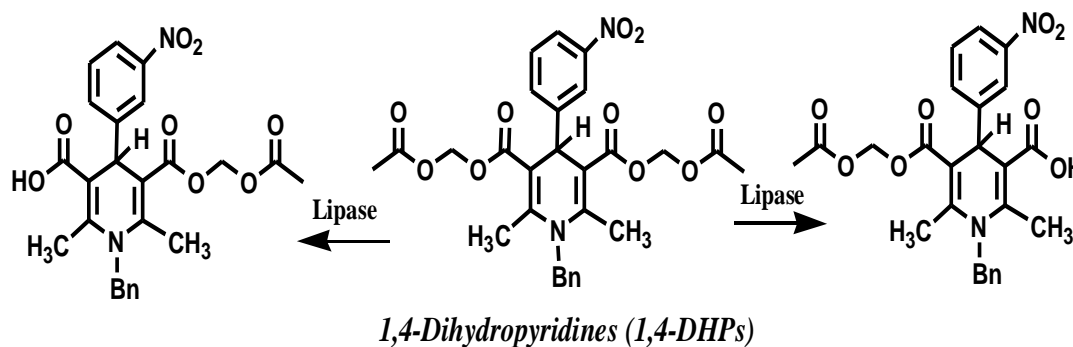


Schéma III.4. Cinétique enzymatique de la réaction d'hydrolyse des 1,4-DHP avec deux étapes [45]

Dans notre étude, nous avons utilisé l'amlodipine comme substrat de la lipase de *candida rugosa*. La cinétique enzymatique de la réaction d'hydrolyse a été étudiée à l'aide de la voltamétrie cyclique avec des concentrations de substrat variées.

Nous avons observé un seul pic sur le premier balayage négatif à un potentiel d'environ $-0,18$ V (SCE) et sans pic d'inversion dans le balayage positif. Le pic irréversible montré dans cette étude indiquait qu'une seule réaction dominante se produisait.

Nous sommes en mesure de proposer le mécanisme des transformations enzymatiques (schéma III.5).

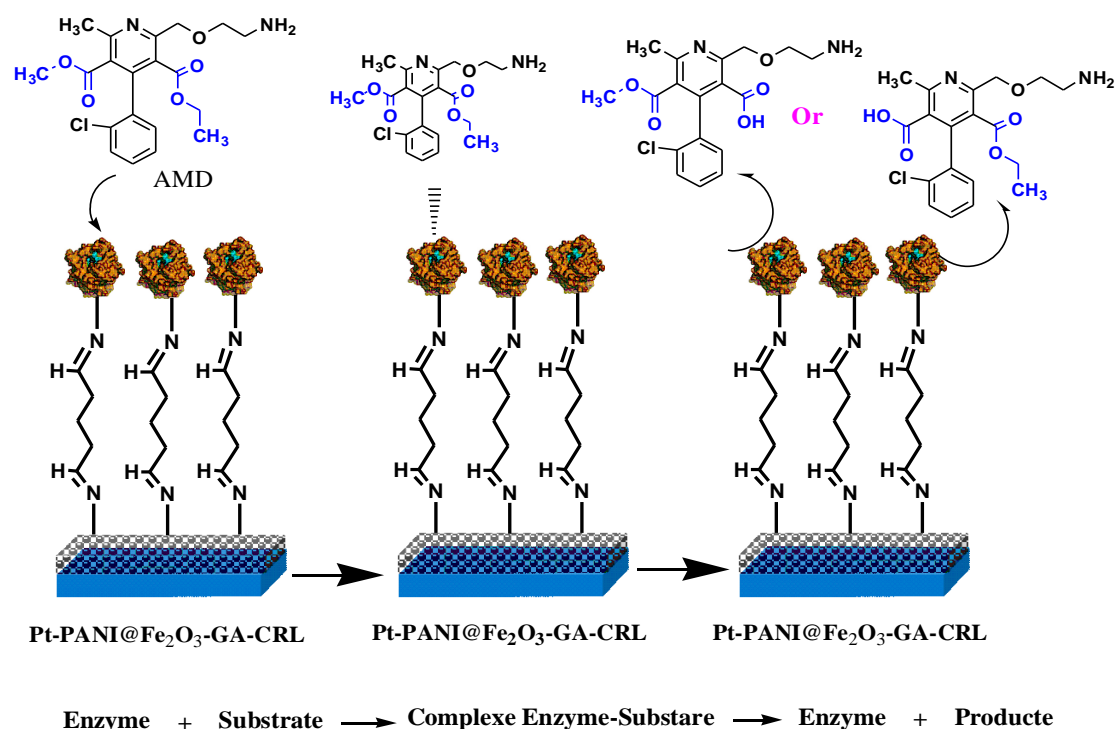


Schéma III. 5. Mécanisme proposé de la cinétique enzymatique d'hydrolyse CRL de l'AMD

(Notre travail)

III.3.3.3. Effet de la vitesse de balayage

Pour la détermination du mécanisme réactionnel au niveau de l'électrode modifiée, nous avons procédé à l'enregistrement des voltammogrammes à différentes vitesses de balayage variant de 50 à 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les voltammogrammes cycliques obtenus sont présentés sur la figure III.8(a).

On remarque une évolution de la position des pics de courant de réduction avec la vitesse de balayage. Lorsque la vitesse augmente, l'intensité de courant de pic

cathodique se déplace vers des valeurs plus électro-négatives du potentiel, ce qui montre un comportement chimique irréversible à la surface de la couche bioactive. Nous avons par la suite étudié la variation de l'intensité de courant de pic cathodique en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage. La figure III.8(b) montre que l'intensité du courant est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage conformément à un système dont la cinétique est sous contrôle de la diffusion. L'équation de régression linéaire est la suivante :

$$I_p = -0.03 + 0.01161 \cdot v^{1/2}, \text{ avec } R^2 = 0.998. \quad \text{Eq.III.2}$$

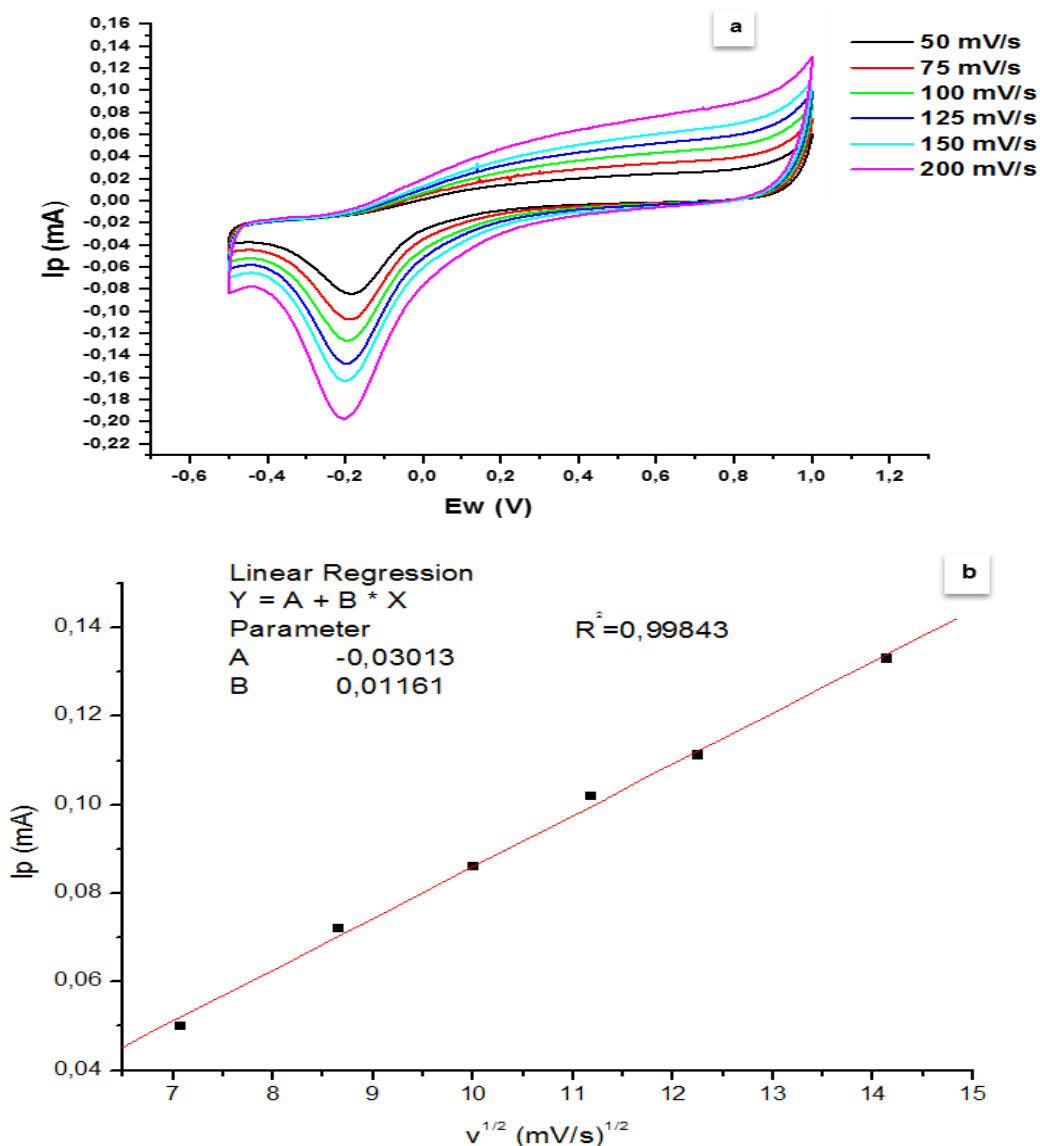


Figure III.8. a) Voltammograms d'amlodipine (1.0×10^{-6} M dans PBS, pH 7.4 avec Pt modifiée) avec b). Représentation graphique de la fonction : $I_p = f(v^{1/2})$

III.3.4. Optimisation des conditions opératoires

III.3.4.1. Effet du pH sur la réponse du biocapteur

En général, l'effet du pH de l'électrolyte support sur la réponse actuelle de l'analyte surveillé joue un rôle important dans sa détection et sa quantification [37]. Le pH du milieu joue un rôle important dans les études des biocapteurs pour obtenir la meilleure réponse. Afin de déterminer l'effet de la valeur du pH sur la réponse du biocapteur, différents systèmes tampons ont été étudiés. Des tampons de phosphate contenant 10^{-6} M d'AMD ont été utilisés dans les expériences et tous les tampons avaient une concentration de 50 mM.

Les expériences ont montré que le pH optimal était de 7,4 (Figure III.9). La réponse à pH 7,4 a été fixée à 100%. Au-delà de pH 7,4, la valeur de la réponse du biocapteur commence à diminuer.

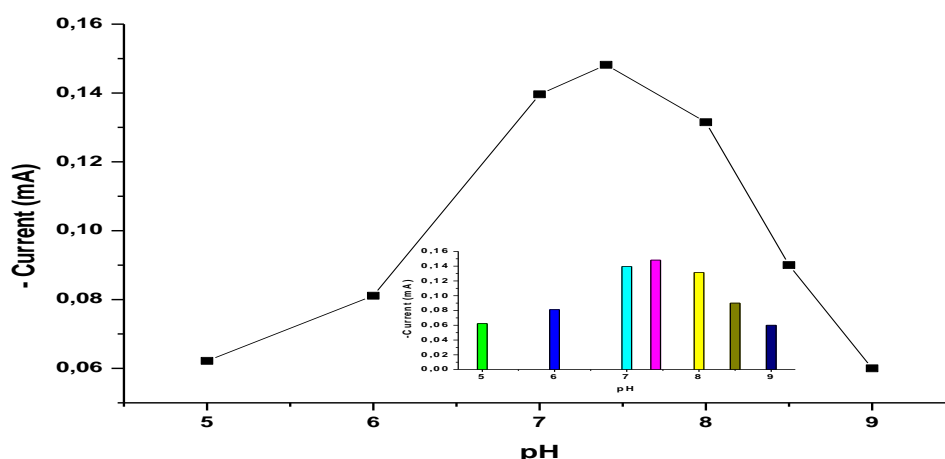


Figure III.9. Effet du pH sur la réponse du biocapteur. [Conditions opératoires : tampon phosphate, 50 mM et $T = 35^{\circ} C$. 5 mg / ml de solution d'amlodipine].

Les enzymes sont des macromolécules amphotères qui contiennent un grand nombre de groupements ionisables (acides ou basiques). La variation des charges des acides aminés affecte évidemment la charge nette globale des enzymes et la distribution des charges à leur surface. En conséquence, la variation du pH affecte la stabilité des enzymes. Pour la grande majorité des enzymes, des valeurs de pH acides ou basiques induisent une perte totale, irréversible, de l'activité enzymatique.

III.3.4.2. Effet de la température sur la réponse du biocapteur

Pour déterminer l'influence de la température sur la réponse du biocapteur, des expériences ont été effectuées entre 25 et 50 °C dans des conditions opératoires déjà optimisées auparavant. Les résultats sont présentés à la figure III.10.

Les résultats ont montré que la meilleure réponse du biocapteur était obtenue pour température optimale de 35 °C. au-dessus de cette température, la valeur de la réponse du biocapteur a diminué.

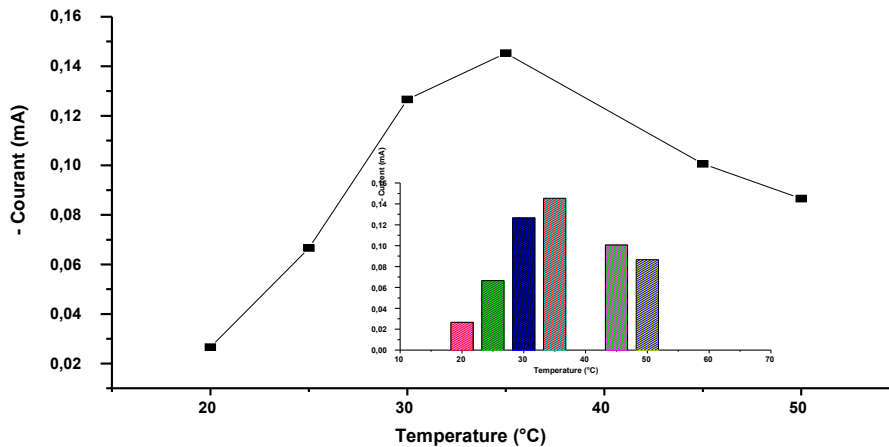


Figure III.10. Effet de la température sur la réponse du biocapteur [Conditions opératoires : tampon phosphate, 50 mM et pH = 7,4. 5 mg / ml de solution d'amlodipine].

Les biocapteurs utilisent des réactions enzymatiques et, par conséquent, une augmentation de la température augmentera également l'activité catalytique et donc la vitesse de réaction. Cela peut toutefois être accompagné d'une dénaturation. La température augmente également le taux de diffusion des différentes espèces chimiques dans la couche active et améliore le temps de réponse.

III.4. Conclusion

Les composites conducteurs de polyaniline/Fe₂O₃ ont été synthétisés avec succès par une simple procédure chimique. L'analyse FTIR confirme la structure chimique de PANI/Fe₂O₃. Les spectres UV-visible confirment la formation de polymères. La présente étude a montré que l'électrode de Pt modifiée par PANI/Fe₂O₃-Ge-CRL était un très bon candidat pour la réalisation d'un biocapteur pour l'analyse de l'amlodipine. Le comportement cathodique de l'amlodipine a été mesuré sur un pic de réduction irréversible à -0,185 V. Il serait intéressant d'étudier d'autres biocapteurs basés sur la lipase pour l'analyse des médicaments à base de 1,4-dihydropyridine.

Références

- [1].EVTUGIN, G. *Biosensors: Essentials*, Lecture Notes in Chemistry; Springer: Heidelberg, Germany, 2014; Volume 84
- [2].KARYAKIN, Arkady A., VUKI, Maika, LUKACHOVA, Lylia V., *et al.* Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to biosensors. *Analytical chemistry*, 1999, vol. 71, no 13, p. 2534-2540.
- [3].CHO, Joong-Hoon, SHIN, Min-Chol, *et al.* KIM, Hak-Sung. Electrochemical adsorption of glucose oxidase onto polypyrrole film for the construction of a glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1996, vol. 30, no 2, p. 137-141.
- [4].DHAND, Chetna, DAS, Maumita, DATTA, Monika, *et al.* Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 2011, vol. 26, no 6, p. 2811-2821.
- [5].POPOVIĆ, Nataša, JUGOVIĆ, Branimir, JOKIĆ, Bojan, *et al.* Electrochemical template-free synthesis of nanofibrous polyaniline modified electrode for ascorbic acid determination. 2015.
- [6].GERARD, Manju, CHAUBEY, Asha, *et al.* MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 2002, vol. 17, no 5, p. 345-359.
- [7].MARTINA, V., DE RICCARDIS, M. F., CARBONE, D., *et al.* Electrodeposition of polyaniline-carbon nanotubes composite films and investigation on their role in corrosion protection of austenitic stainless steel by SNIFTIR analysis. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, vol. 13, no 11, p. 6035-6047.
- [8].LIN, Meng Shan *et al.* LEU, Hoang Jyh. A Fe₃O₄-based chemical sensor for cathodic determination of hydrogen peroxide. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2005, vol. 17, no 22, p. 2068-2073.
- [9].SUNGUR, Sibel *et al.* NUMANOĞLU, Yasemin. Development of glucose biosensor by using gelatin and gelatin-polyacrylamide supporting systems. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, 2006, vol. 34, no 1, p. 41-54.
- [10].ARKHYPOVA, V. N., DZYADEVYCH, S. V., SOLDATKIN, A. P., *et al.* Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. *Talanta*, 2001, vol. 55, no 5, p. 919-927.

- [11].EMREGUL, Emel, SUNGUR, Sibel, et AKBULUT, Ural. Immobilization of glucose oxidase onto gelatin for biosensor construction. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2005, vol. 16, no 4, p. 505-519.
- [12].BAALI, Souad, KHERRAT, R., ZOUGAR, S., *et al.* Comparative study of responses of two enzymatic biosensors based on lipase from *Candida rugosa* and Porcine pancreas for detection of diclofop-methyl. *Sensor letters*, 2013, vol. 11, no 11, p. 2021-2029.
- [13].ZEHANI, Nedjla, KHERRAT, Rochdi, DZYADEVYCH, Sergei V., *et al.* A microconductometric biosensor based on lipase extracted from *Candida rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2015, vol. 95, no 5, p. 466-479.
- [14].ZEHANI, Nedjla, DZYADEVYCH, Sergei V., KHERRAT, Rochdi, *et al.* Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases. *Frontiers in chemistry*, 2014, vol. 2, p. 44.
- [15].VILLENEUVE, Pierre, MUDERHWA, Jean M., GRAILLE, Jean, *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 2000, vol. 9, no 4-6, p. 113-148.
- [16].HOU, CHING T. Industrial uses of lipase. *Lipid biotechnology*, 2002, vol. 18, p. 432-442.
- [17].BOSSERT, F. et VATER, W. Dihydropyridines, a new group of strongly effective coronary therapeutic agents. *Die Naturwissenschaften*, 1971, vol. 58, no 11, p. 578-578.
- [18].GOLDMANN, Siegfried et STOLTEFUSS, Jürgen. 1, 4-Dihydropyridines: effects of chirality and conformation on the calcium antagonist and calcium agonist activities. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1991, vol. 30, no 12, p. 1559-1578.
- [19].MARTINDALE, S.S.C. *The Complete Drug Reference*, 37th ed.; The Pharmaceutical Press: London, UK, 2011.
- [20].RAHMAN, Nafisur et HODA, Md Nasrul. Validated spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate in drug formulations using 2, 3-dichloro 5, 6-dicyano 1, 4-benzoquinone and ascorbic acid. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2003, vol. 31, no 2, p. 381-392.
- [21].RAHMAN, Nafisur, SINGH, Manisha, et HODA, Md Nasrul. Application of oxidants to the spectrophotometric determination of amlodipine besylate in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, 2004, vol. 59, no 11, p. 913-919.
- [22].ABDEL-WADOOD, Hanaa M., MOHAMED, Niveen A., et MAHMOUD, Ashraf M. Validated spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2008, vol. 70, no 3, p. 564-570.
- [23].MEYYANATHAN, S. N. et SURESH, B. HPTLC method for the simultaneous determination of amlodipine and benazepril in their formulations. *Journal of chromatographic science*, 2005, vol. 43, no 2, p. 73-75.
- [24].BAHRAMI, G. H. et MIRZAEI, S. H. Simple and rapid HPLC method for determination of amlodipine in human serum with fluorescence detection and its use in pharmacokinetic studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2004, vol. 36, no 1, p. 163-168.
- [25].ZARGHI, A., FOROUTAN, S. M., SHAFATI, A., *et al.* Validated HPLC method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Il Farmaco*, 2005, vol. 60, no 9, p. 789-792.
- [26].KLINKENBERG, R., STREEL, B., et CECCATO, A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing

equipment surfaces. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2003, vol. 32, no 2, p. 345-352.

[27].MONKMAN, S. C., ELLIS, J. S., CHOLERTON, S., *et al.* Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1996, vol. 678, no 2, p. 360-364.

[28].QUAGLIA, M. G., BARBATO, F., FANALI, S., *et al.* Direct determination by capillary electrophoresis of cardiovascular drugs, previously included in liposomes. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2005, vol. 37, no 1, p. 73-79.

[29].ALTIOKKA, G. *et al.* Flow injection analysis of amlodipine using UV-detection. *Die Pharmazie*, 2002, vol. 57, no 7, p. 500.

[30].Matalka, K.; El-Thaher, T.; Saleem, M.; Arafat, T.; Jehanli, A.; Badwan, A. Enzyme linked immunosorbent assay for determination of amlodipine in plasma. *J. Clin. Lab. Anal.* **2001**, *15*, 47-53.

[31].STOILJKOVIĆ, Z. Ž., AVRAMOV IVIĆ, M. L., PETROVIĆ, S. D., *et al.* Voltammetric and square-wave anodic stripping determination of amlodipine besylate on gold electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2012, vol. 7, p. 2288-2303.

[32].GOYAL, Rajendra N. *et al.* Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, 2010, vol. 79, no 2, p. 234-240.

[33].ERDEN, Pınar Esra, TAŞDEMİR, İbrahim Hüdai, KAÇAR, Ceren, *et al.* Simultaneous determination of valsartan and amlodipine besylate in human serum and pharmaceutical dosage forms by voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2014, vol. 9, p. 2208-2220.

[34].ALTIOKKA, Göksel, DOGRUKOL-AK, Dilek, TUNÇEL, Muzaffer, *et al.* Determination of Amlodipine in Pharmaceutical Formulations by Differential-Pulse Voltammetry with a Glassy Carbon Electrode. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 335, no 2-3, p. 104-108.

[35].ARKAN, Elham, KARIMI, Ziba, SHAMSIPUR, Mojtaba, *et al.* An electrochemical sensor for determination of amlodipine besylate based on graphene-chitosan nanocomposite film modified glassy carbon electrode and application in biological and pharmaceutical samples. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 3, no 1, p. 99.

[36].VALEZI, Camila Farinha, DUARTE, Eduardo Henrique, MANSANO, Guilherme Roberto, *et al.* An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, vol. 205, p. 234-243.

[37].ŠVORC, L. 'ubomír, CINKOVÁ, Kristína, SOCHR, Jozef, *et al.* Sensitive electrochemical determination of amlodipine in pharmaceutical tablets and human urine using a boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2014, vol. 728, p. 86-93.

[38].MANSANO, Guilherme Roberto, EISELE, Ana Paula Pires, DALL'ANTONIA, Luiz Henrique, *et al.* Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode: Improving the simultaneous voltammetric determination of amlodipine and valsartan in urine and combined dosage forms. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2015, vol. 738, p. 188-194.

[39].BANDGAR, D. K., NAVALE, S. T., NAUSHAD, M., *et al.* Ultra-sensitive polyaniline-iron oxide nanocomposite room temperature flexible ammonia sensor. *RSC Advances*, 2015, vol. 5, no 84, p. 68964-68971.

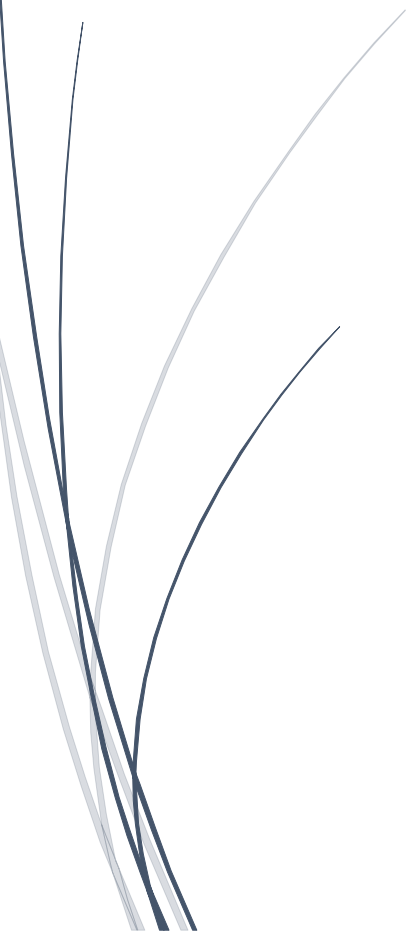
[40].ABU-THABIT, Nedal Y. Chemical oxidative polymerization of polyaniline: A practical approach for preparation of smart conductive textiles. *Journal of Chemical Education*, 2016, vol. 93, no 9, p. 1606-1611.

- [41].SATHIYANARAYANAN, S., AZIM, S. Syed, et VENKATACHARI, G. Preparation of polyaniline-Fe₂O₃ composite and its anticorrosion performance. *Synthetic Metals*, 2007, vol. 157, no 18-20, p. 751-757.
- [42].HIROSE, Yoshihiko, KARIYA, Kinya, SASAKI, Ikuharu, *et al.* Drastic solvent effect on lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of prochiral 1, 4-dihydropyridines. *Tetrahedron Letters*, 1992, vol. 33, no 47, p. 7157-7160.
- [43].SOBOLEV, A., FRANSSEN, M. C. R., JONGEJAN, H., *et al.* The effect of acyl chain length and branching on the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in kinetic resolutions of alcohols and esters. In : *BioTrans 2001: The 5th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, TU Darmstadt, Germany, 2-7 september 2001/Wolf-Dieter Fessner.-Darmstadt:[sn], 2001.* 2001. p. 298-298.
- [44].HOLDGRÜN, Xenia K. et SIH, Charles J. A chemoenzymatic synthesis of optically-active dihydropyridines. *Tetrahedron letters*, 1991, vol. 32, no 29, p. 3465-3468.
- [45].SALAZAR, Loreto et SIH, Charles J. Optically-active dihydropyridines via lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, vol. 6, no 12, p. 2917-2920.



CHAPITRE IV

*Elaboration de l'électrode modifiée à base de
 β -Cyclodextrine- polyaniline pour la détection
de la pénicilline V*



IV.1. Introduction

L'analyse pharmaceutique fait partie intégrante de la détermination de la qualité, y compris l'identité et la pureté. L'utilisation croissante des médicaments devient un nouveau problème environnemental, à la fois par le biais de l'excrétion urinaire ou fécale humaine et animale et des rejets de fabrication pharmaceutique. Dans l'industrie pharmaceutique moderne, les méthodes d'analyse sélectives, sensibles et entièrement validées pour l'analyse des médicaments sont des outils majeurs appliqués à tous les stades de la découverte, du développement et de la production de médicaments. Le développement rapide et efficace des méthodes analytiques est efficacement entrepris avec une compréhension approfondie de leurs principes, de leur théorie et de leur instrumentation [1-5].

Les antibiotiques, l'un des médicaments les plus prescrits, sont des substances ou une substance semi-synthétique dérivée d'un microorganisme, qui, à faible concentration, est utilisée pour tuer, inhiber ou éliminer un autre microorganisme. La présence d'antibiotiques dans l'environnement, même à de très faibles concentrations, peut favoriser le processus de bactéries ou de pathogènes résistants aux antibiotiques [6-8]. L'antibiorésistance est un phénomène naturel présent dans les bactéries présentes dans l'environnement. L'accumulation et la bioaccumulation d'antibiotiques dans l'environnement créent les conditions propices à la prolifération de bactéries résistantes [9-11].

Les pénicillines (Schéma IV.1) constituent l'un des groupes d'antibiotiques les plus importants produits par *Penicillium notatum*. Tous les types de pénicilline ont la même structure chimique de base, mais en substituant des radicaux différents sur la chaîne amino de la molécule. La structure de base de la pénicilline consiste en un cycle thiazolidine, un cycle β -lactame fixé et une chaîne latérale. Depuis que la première pénicilline est devenue disponible, de nombreux autres agents antimicrobiens ont été produits, mais les pénicillines sont encore largement utilisées. Les antibiotiques majeurs sont actuellement les médicaments utilisés pour un certain nombre de maladies infectieuses.

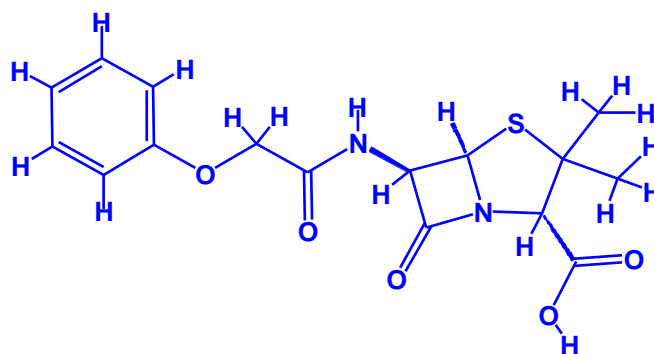


Schéma IV.1. Structures chimiques de la pénicilline V.

De nombreuses méthodes sont disponibles pour la détermination des pénicillines. La chromatographie en phase liquide est la technique la plus utilisée pour la détermination de ce groupe de médicaments [12–16]. La recherche polarographique des pénicillines repose généralement sur la réduction des composés chimiquement oxydés ou des produits de dégradation formés par hydrolyse acide ou alcaline ou leurs dérivés [17-19]. Bien que la spectrophotométrie a été étudiée en détail [20-22]. En outre, un transistor à effet de champ sensible à la pénicilline avec une β -lactamase (pénicillinase) immobilisée a été développé. Une couche de Ta₂O₅ a agi comme couche sensible au pH en surveillant la variation de la concentration en H⁺ résultant de l'hydrolyse de la pénicilline en acide pénicilloïque [23]. Une approche similaire basée sur la détection de H⁺ a été développée en utilisant la pénicilline G acylase (benzylpénicillinamido hydrolase) pour détecter la pénicilline [24].

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques qui ont à la fois une surface hydrophile externe et une cavité polaire. Les CD sont classées en trois catégories : α , β et γ en fonction du nombre d'unités de D-glucopyranoside six (6), sept (7) et huit (8), respectivement. Les CD sont capables de renfermer des molécules plus petites pour former des complexes hôte-invité [25-28] en raison de leur forme unique, qui forme un intérieur hydrophobe où la molécule est encapsulée et un extérieur hydrophile qui solubilise le complexe dans l'eau. Ce phénomène d'inclusion entraîne des modifications significatives des propriétés de la solution et de la réactivité de la molécule invitée, qui peuvent être manipulées dans différentes réactions.

Le phénomène d'inclusion des CD a été largement étudié et appliqué à de nombreux domaines, y compris les industries pharmaceutiques, l'administration de médicaments, les sciences alimentaires, les cosmétiques, la catalyse et le système bio (détection) [29-38]. De plus, les CD ont été utilisés comme modèles potentiels pour la synthèse de nouveaux matériaux nanostructurés. Les bio-applications des polymères contenant des CD ont été principalement axées sur la délivrance de complexes d'inclusion de différents types de médicaments. La polyaniline (PANI), quant à elle, est un polymère conducteur qui a été largement étudié en raison de sa préparation simple, de sa bonne stabilité thermique et environnementale, de la polyvalence de sa structure et de ses applications potentielles comme matériaux électriques et optiques [39-47].

Les techniques d'analyse électrochimique [48-51] utilisant pour caractérisation de la surface modifiée des électrodes telles que la voltampérométrie à onde carrée (SWV), la voltamétrie à impulsion différentielle (DPV), la polarographie différentielle par impulsion (DPP) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), ont été largement utilisés pour la détermination de composés pharmaceutiques, biologiques et environnementaux en tant que solides alternatives à la méthode instrumentale. Les électrodes à surface modifiées chimiquement [52-53] sont des outils puissants pour l'analyse de nombreux substrats. Elles permettent de gagner du temps, d'effectuer des analyses rentables et de fournir des informations quantitatives et qualitatives.

L'effet de l'électrodéposition par la méthode de voltamétrie cyclique sur la formation de films de PANI- β -CD à partir d'une solution acide contenant de la β -CD / aniline sur une électrode de platine a été étudié. Les propriétés électrochimiques des films préparés à base de PANI sont examinées par les méthodes de voltampérométrie cyclique (CV) et de spectroscopie d'impédance. La nouvelle méthodologie électrochimique mise au point a été utilisée pour la reconnaissance chimique de la pénicilline V (phénoxyéthylpénicilline) (Peni-V). Par β -CD en raison du complexe formé entre la CD et les molécules de médicament dispersées dans une matrice PANI conductrice.

IV.2. Expérimentale

IV.2.1. Réactifs et solutions

Le monomère d'aniline a été acheté de Biochem chemopharma et la β -cyclodextrine (β -CD) a été achetée chez Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Allemagne) ; tous ces composés sont utilisés tel que reçus. La pénicilline V (Peni-V) a été aimablement fournie par le groupe Sidal-Algérie utilisé tel que reçue et sa solution mère (10^{-1} M) a été préparée en dissolvant la quantité appropriée de pénicilline V dans de l'eau. La solution tampon utilisée pour toutes les expériences était une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) contenant du NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 0,1 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, le tout à pH 7,4. Les réactifs étaient de qualité analytique et utilisés comme achetés sans aucun prétraitement. Toutes les solutions ont été préparées en utilisant de l'eau déminéralisée.

IV.2.2. Appareillages

Toutes les mesures potentiométriques ont été effectuées avec un potentiomètre SP-300 modulaire de qualité de recherche / Galvanostat / FRA (instruments de sciences biologiques SAS). Le logiciel EC-Lab a été utilisé pour l'acquisition des données et le contrôle des expériences. Le logiciel EC-Lab® fournit un outil puissant et convivial pour adapter les mesures EIS successives appelées Z Fit. Ce dernier détermine automatiquement (et trace) les valeurs successives des composants EC pour une série de diagrammes d'impédance. Une cellule à trois électrodes a été utilisée pour effectuer les mesures d'impédance. L'électrode de référence était Ag / AgCl. Un fil de platine a été utilisé comme électrode auxiliaire et l'électrode de travail était une plaque de platine ayant une surface de $0,5 \text{ cm}^2$. Dans les mesures dynamiques, toutes les données ont été obtenues avec une amplitude alternative de 10 mV et une plage de fréquences variant de 100 kHz à 100 mHz. Les expériences ont été effectuées dans une cage de Faraday sombre pour éliminer les interférences électriques (Figure. IV.1).

L'électrode de platine a été nettoyée avec de l'acétone pendant 10 min et avec une solution de piranha ($1/3 \text{ H}_2\text{O}_2$, $2/3 \text{ H}_2\text{SO}_4$) pendant 1 min, après quoi elle a été lavée avec de l'eau et séchée à l'air [34], puis immergée ou bien rincée dans l'éthanol absolu et finalement séchée à l'air ambiant.



Figure. IV.1. Représentation de la synthèse du composite β -Cyclodextrine-polyaniline par polymérisation électrochimique.

IV.2.3. Préparation des films de PANI et de β -cyclodextrine / PANI

Une cellule électrochimique à trois électrodes a été utilisée pour préparer des films PANI sur une électrode de Pt. L'électrode de platine a été utilisée comme électrode de travail. Un fil de Pt a été utilisé comme contre-électrode et une électrode Ag / AgCl a été utilisée comme électrode de référence pour le dépôt de films PANI.

Le film de β -cyclodextrine / PANI a été électropolymérisé sur une électrode de Pt en utilisant la voltamétrie cyclique (CV) dans les limites du potentiel de balayage compris entre -0,2 à +1,2 V (vs. Ag / AgCl) dans un mélange de solution fraîche contenant 0,1 M d'aniline et d' HCl 1 M avec 0,1% (% massique) en β -cyclodextrine (figureIV.2)



Figure. IV.2. Electrode de travail avant et après l'électro-polymérisation

IV.3. Résultats et discussions

IV.3.1. Electrodeposition de la polyaniline et de la polyaniline avec la β -cyclodextrine

Les synthèses électrochimiques des polymères conducteurs offrent plus d'avantages que les synthèses chimiques incluant la déposition du polymère sur la surface de l'électrode in situ, et le contrôle de l'épaisseur. Les polymères conducteurs sont synthétisés directement sous leur forme conductrice, dopée à partir de leur monomère, par une réaction anodique ou cathodique. Toutefois, la polymérisation anodique reste la plus utilisée.

Ce dernier type de polymérisation consiste en une oxydation électrochimique d'une solution contenant le monomère. Elle permet d'avoir le polymère directement à l'électrode sous forme dopée ou à l'état neutre.

La synthèse de la polyaniline au cours de ce travail est conduite par voltampérométrie cyclique (20 cycles) avec un balayage de potentiel entre -200 et 1200 mV. La vitesse de balayage est de 50 mV/s.

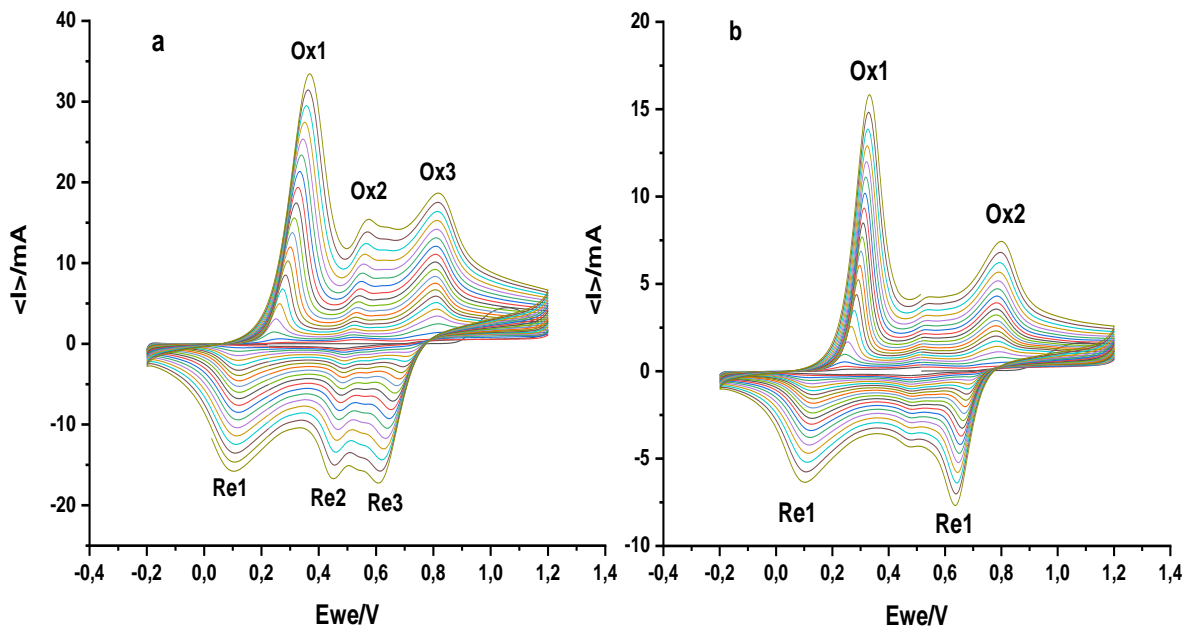


Figure. IV.3. Réponses de la CV enregistrées lors de la polymérisation électrochimique d'un film de PANI à Pt dans une solution de 0,1 M d'aniline, b) film de β -Cyclodextrine / PANI dans une solution de 0,1 M d'aniline et HCl 1 M, une vitesse de balayage de 50 mV s⁻¹.

Les voltammogrammes obtenus lors de l'électrodéposition du monomère d'aniline seul a été électropolymérisé sur une électrode en Pt (Figure. IV.3.a). L'apparition de trois pics, les deux pics Ox_1 / Re_1 à 0,207 / 0,069 V et Ox_3 / Re_3 à 0,777 / 0,754 V ont été attribuées aux transformations respectives de la leucoéméraldine / éméraldine et de l'éméraldine / pernigraniline et le troisième pic Ox_2 / Re_2 qui situé au centre 0,489 / 0,455 V a été attribué aux défauts de la structure linéaire de PANI.

Le monomère d'aniline en présence de β -cyclodextrine a également été électropolymérisé sur une électrode de Pt dans une solution de HCl 1 M (Figure. IV.3.b). Deux pics ont été observés par voltamétrie cyclique. Les deux pics Ox_1 / Re_1 à 0,207 / 0,069 V et Ox_2 / Re_2 à 0,777 / 0,754 V ont été attribués respectivement aux transformations de la leucoéméraldine / éméraldine, de l'éméraldine / pernigraniline, avec l'absence de la troisième pic (au milieu 0,489 / 0,455 V) et aux défauts de la structure linéaire de PANI. La comparaison des courants de pic pour le même nombre de cycles sur la figure. IV.3 révèle certaines différences dans la vitesse de dépôt du film.

IV.3.2. Etude du mécanisme d'électrodéposition

Les voltammogrammes cycliques de la polyaniline contiennent des transitions redox, obtenues lors de la polymérisation : oxydation de la forme isolante totalement réduite (leucoemeraldine) en son cation radical (éméraldine), suivie de l'oxydation des produits de dégradation et / ou des espèces intermédiaires et enfin de la transition de l'état polaronique délocalisé à une forme bipolaire ou quinoïde localisée (pernigraniline) [54].

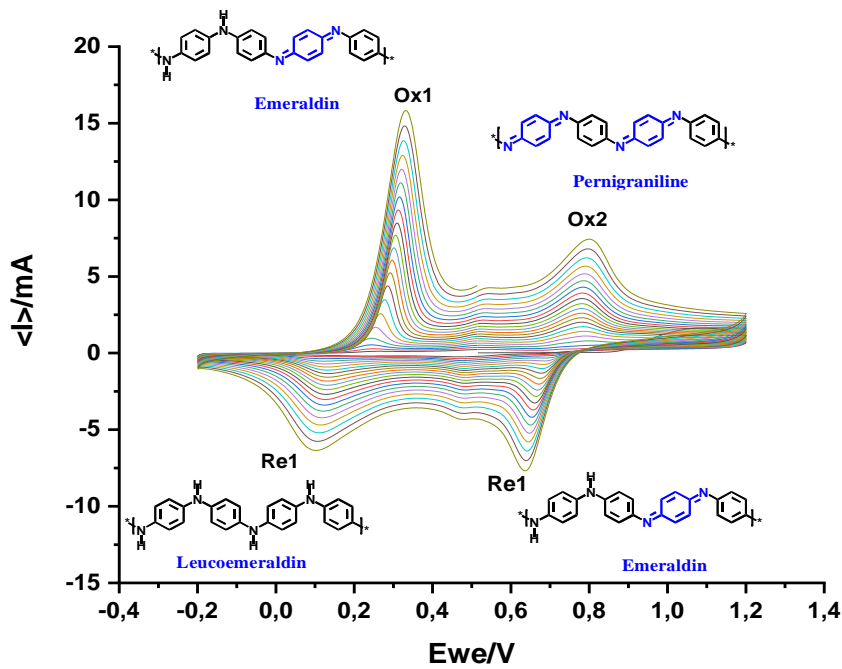


Figure. IV.4. Voltammogrammes indicatifs de l'électrodéposition de monomère d'aniline en présence de β -cyclodextrine

Les voltammogrammes cycliques enregistrés au cours de l'électropolymérisation de monomère d'aniline en présence de β -cyclodextrine figure. IV.4 montrent l'apparition d'une série de transition se résume comme suit : Les pics marqués Ox1 et Re1 correspondent à l'oxydation du polymère de la leucoéméraldine aux états redox d'éméraldine et de l'éméraldine aux états de pernigraniline. Les pics étiquetés Ox2 et Re2 correspondent à la réduction de la forme de la pernigraniline en polymère provenant de l'éméraldine et à la suite des états de leuco-éméraldine, respectivement (Schéma IV.2, 3).

Résumé du processus chimique de l'électrodéposition :

- Pics à 0,207 / 0,069 V : Transformations de leucoemeraldine / emeraldine

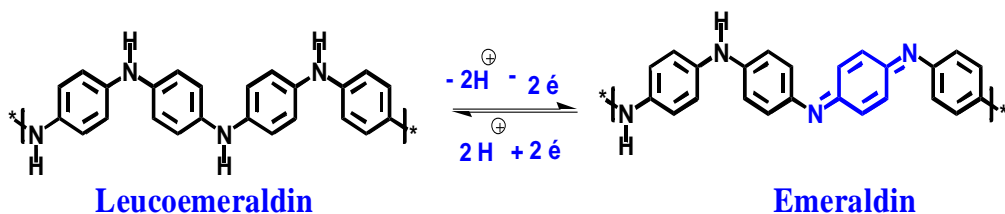


Schéma IV.2. Cinétique de transformation de la leucoéméraldine / éméraldine.

- Pics à 0.777 / 0.754 V : Correspond aux transformations de l'émeraldine / pernigraniline:

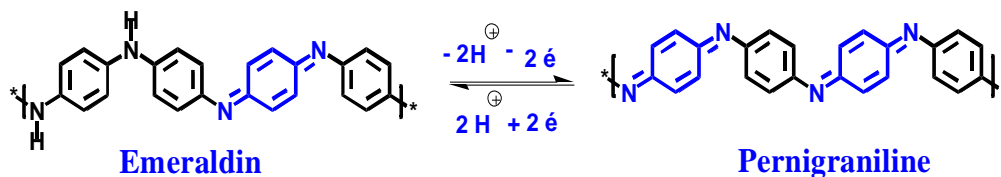


Schéma IV.3. Cinétique de transformation de l'émeraldine / pernigraniline.

Lors de l'électrodéposition, l'addition de β -cyclodextrine (β -CD) dans la solution de polymérisation affecte la croissance globale de la couche de PANI. Les propriétés électrochimiques et les caractéristiques morphologiques constatées des couches obtenues démontrent l'influence de l'addition de β -cyclodextrine (β -CD) sur la vitesse (taux) de polymérisation de la couche de PANI. Par définition, la vitesse de polymérisation (liée à la quantité de polymère) est mesurée et tracé en fonction du nombre de cycle de balayage (figure.IV.5). En utilisant l'équation :

$$V = -k_{app} [\text{monomère}] (\text{pic cathodique}),$$

Où V est la vitesse de polymérisation et k_{app} est la constante de vitesse qui correspond à la pente de la courbe [55].

La constante de vitesse apparente (k_{app}) pour l'étape de polymérisation a été estimée en traçant les intensités des pics des courants cathodique et anodique pendant l'électropolymérisation en fonction du nombre de cycles de polymérisation. Ce paramètre détermine la cinétique de l'électropolymérisation. Les voltammogrammes cycliques montrent que le courant augmente à chaque cycle successif, ce qui confirme le dépôt électrochimique de films de PANI.

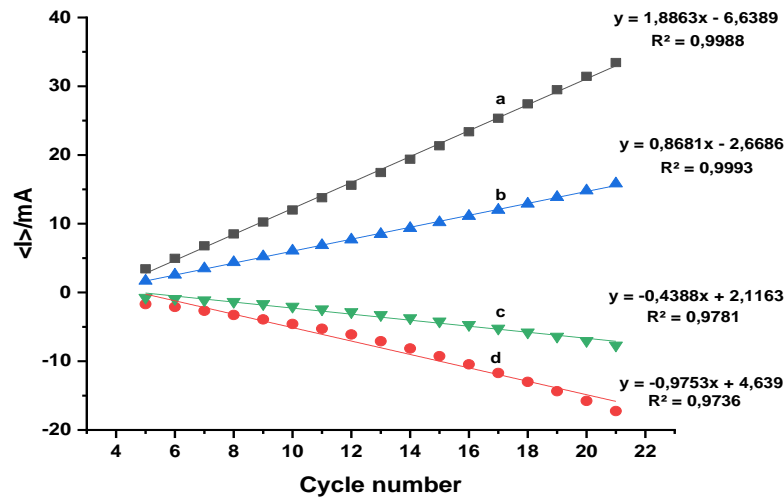


Figure. IV. 5. Relation entre le nombre de cycles et a) le courant de pic d'oxydation à PANI-Pt b) le courant de pic d'oxydation à la β -Cyclodextrine/PANI -Pt, c) le courant de pic de réduction à β -Cyclodextrine/PANI -Pt b) le courant de pic de réduction à la PANI-Pt

La figure IV.5 illustre la variation de la hauteur de pic du courant cathodique et anodique, I_p (mA), en fonction du nombre de cycles de l'électropolymérisation. Dans la zone d'oxydation (Ox1), la pente de la courbe est de 1,8863 et 0,8681 correspond l'électrodéposition de la PANI et CD-PANI respectivement. Dans la zone de réduction (Re1), la pente de la courbe est égale à -0,9753 et -0,4388 correspond l'électrodéposition de la PANI et CD-PANI respectivement. Cette dépendance représente le taux d'électropolymérisation de la couche de polymère. Il est évident que les additions de β -cyclodextrine ralentissent (inhibe) le taux de croissance de PANI. Ces résultats indiquent clairement que les β -cyclodextrines interfèrent avec le mécanisme de polymérisation.

Les β -cyclodextrines inhibent la vitesse de la croissance et influe sur les différentes propriétés électriques des films de polymères de celles d'aniline pure. La vitesse de dépôt diminue également dans l'ordre : PANI > PANI- β -CD. Ces résultats décrivent que nous avons réussi l'électrodéposition de polyaniline incorporant la β -cyclodextrine.

IV.3.3. Caractérisations électrochimiques

IV.3.3.1. Par voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique d'une espèce électroactive est un excellent outil pour évaluer la cinétique électronique à l'interface électrode / électrolyte, en particulier lorsque la surface d'une électrode est modifiée. Les changements de comportement de l'électrode de travail peuvent être examinés en observant les changements qui peuvent avoir lieu sur les formes des voltammogrammes, en utilisant le ferrocyanure comme espèce électroactive.

La voltamétrie cyclique a été utilisée pour caractériser chaque étape d'électrodéposition pour l'élaboration du film de β -cyclodextrine / PANI, en utilisant un mélange de $K_3(Fe(CN)_6)$ / $K_4(Fe(CN)_6)$ [5 mM] dans du tampon PBS à pH 7,4. Une diminution importante de l'intensité maximale des cycles CV a été observée par rapport à l'électrode de platine nue comparativement à l'électrode en platine modifiée (Figure IV. 6). Cela indique que la couche modifiée par la β -cyclodextrine / PANI a un effet d'inhibition.

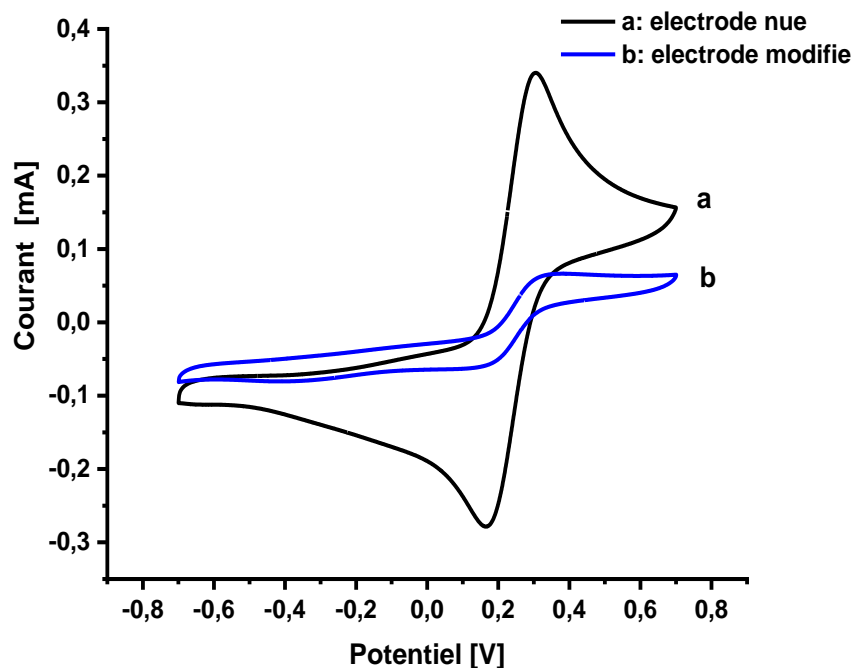


Figure. IV.6 Voltamétrie cyclique a) électrode nue de Pt et (b) électrode de Pt modifiée par de la β -cyclodextrine/ polyaniline dans PBS (pH 7,4) + solution 5 mM $Fe(CN)_6^{-3/-4}$

IV.3.3.2. Par spectroscopie d'impédance électrochimique

Depuis le travail de Moss et al [56], la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été largement utilisée pour caractériser les propriétés des interfaces des électrodes modifiées avec des membranes polymères de PANI (Polyaniline).

Les diagrammes d'impédance de l'électrode de Pt nue et modifiée ont été analysés en employant plusieurs modèles de circuits électriques équivalents, qui sont appropriés pour les films de polymère conducteur. Cette modélisation a été effectuée en utilisant le circuit équivalent représenté inclus dans la figure. IV.7, Où R_1 (R_{solution}), Q_1 (Q_{Film}), R_2 (R_{Film}), Q_2 ($Q_{\text{double couche}}$), R_3 (R_{tc}) et W représentent respectivement : la résistance de l'électrolyte, la capacité du film de copolymère, la résistance du film de copolymère, la capacité de double couche, la résistance de transfert de charge et l'impédance de Warburg.

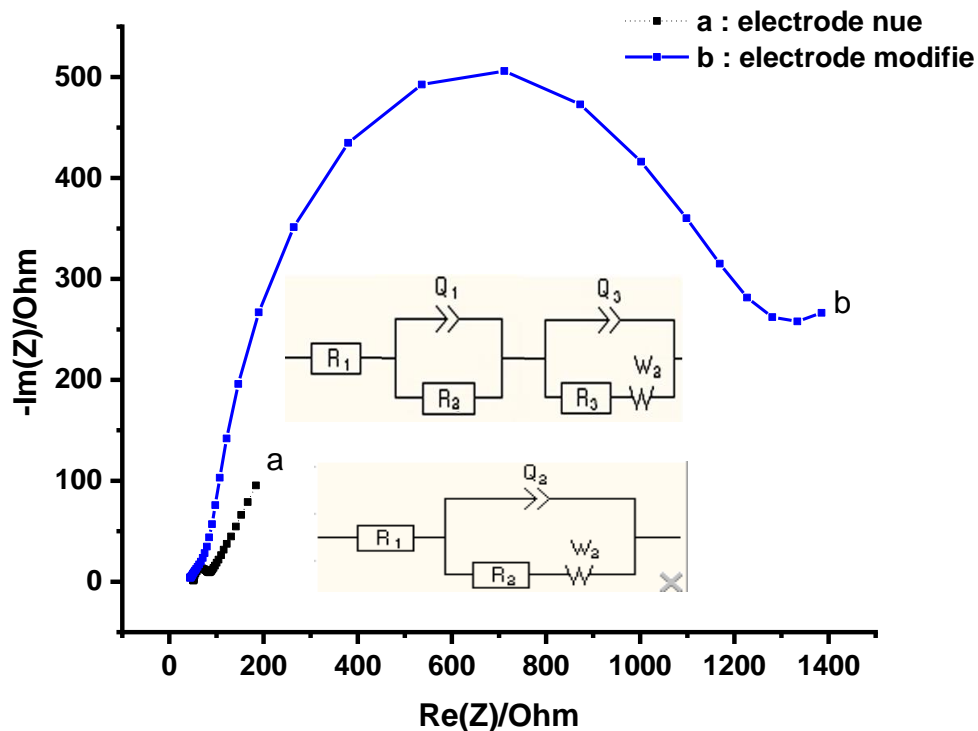


Figure. IV.7 Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), a) électrode nue de Pt et (b) électrode de Pt modifiée par de la β -cyclodextrine / polyaniline dans PBS (pH 7,4) + solution 5 mM $Fe(CN)_6^{-3/-4}$

La caractérisation a été réalisée dans un électrolyte de PBS à 10 mM avec une gamme de fréquence variant entre 100 kHz à 100 mHz. La tension de polarisation a été fixé 0 mV. Les diagrammes de Nyquist obtenue des électrodes nue et modifiée par un film β -cyclodextrine/PANI sont représentés dans la figure IV.7.

A partir de cette figure, on constate que le diamètre de demi-cercle de l'électrode modifiée est plus grand que le diamètre de l'électrode nue. Ce qui nous a permet de dire que la résistance de transfert de charge du l'électrode modifie est importante comparés à la résistance de transfert de charge de l'électrode nue. Ceci peut être expliqué par la formation d'un film à la surface de l'électrode de travail (Figure. IV.8). Cette couche ralentie le transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte (couche bloquante).

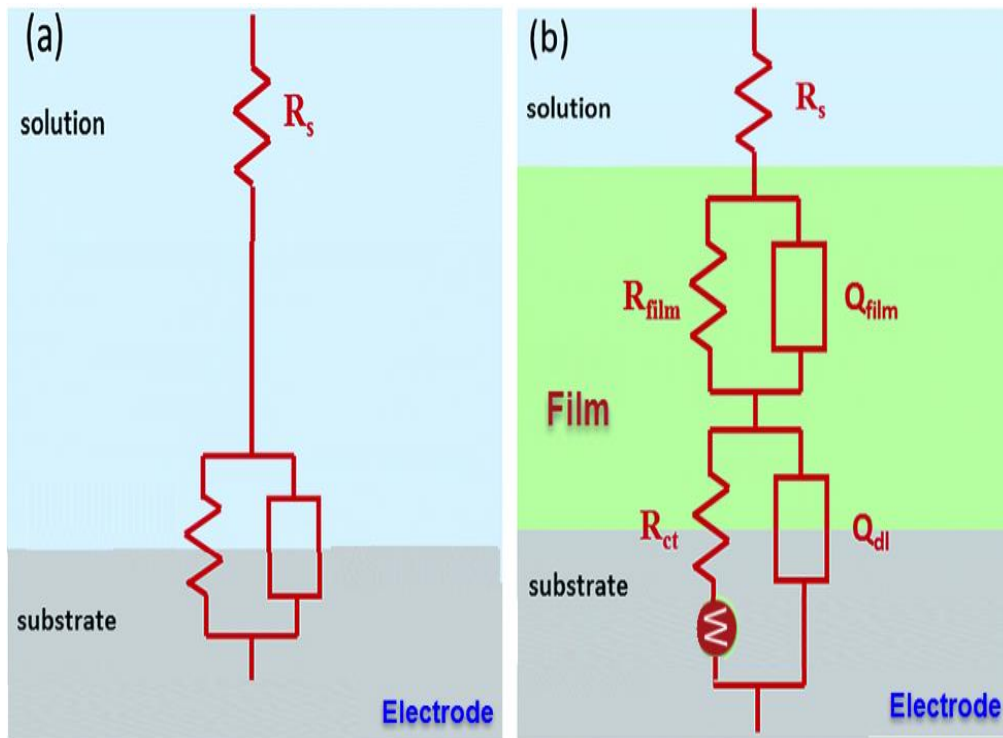


Figure. IV.8 Circuit électrique équivalent permettant la modélisation des spectres d'impédance correspondant a) l'électrode nue, b) l'électrode modifiée.

IV.3.4. Application d'un capteur de polyaniline dopé à la β -Cyclodextrine

IV.3.4.1. Détection électrochimique de Peni-V avec CV

L'effet de la concentration de Peni-V a été évalué par injections successives de Peni-V à différentes concentrations allant de 10^{-8} à 10^{-2} mol / L dans l'électrolyte [PBS à (10 mM, pH = 7,2), $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ à 5Mm]. Comme le montre la figure. IV.9.a, l'injection de Peni-V dans la cellule électrochimique a provoqué une modification de l'aspect des voltammogrammes de l'électrode fonctionnalisée par la membrane de la polyaniline avec la cyclodextrine. Cela révèle la possibilité d'une relation linéaire entre le courant des pics d'oxydation ou de réduction et la concentration du Peni-V.

Les voltammogrammes cycliques montrent deux pics, un pic anodique pour l'oxydation et un autre pic pour la réduction. Le pic anodique est centré à environ 0,33 V tandis que le pic cathodique est centré à environ 0,12 V. Afin de trouver une relation linéaire entre le courant des pics et la concentration en Peni-V, nous avons suivi l'évolution de l'intensité des pics cathodiques I (mA) en fonction du logarithme de la concentration en Peni-V (-Log [Peni-V (mol/L)]). Le tracé représentatif de cette variation est présenté à la figure. IV.9.b.

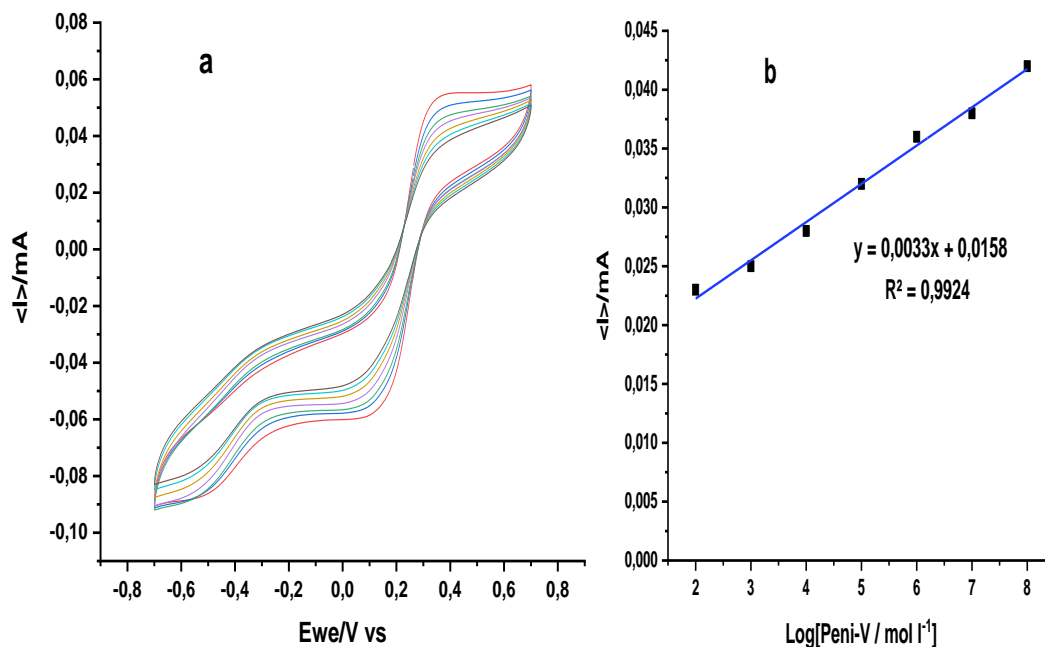


Figure. IV.9 a) Voltammogrammes cycliques de Peni-V avec différentes concentrations à une électrode à film PANI- β -CD en solution électrolytique tampon phosphate à pH 7,4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, b) tracé du courant de pointe, I_{pa} , en tant que fonction du logarithme de la concentration en Peni-V.

Une relation linéaire a été observée et qui a suivi l'équation :

$$I(mA) = 0.0158 + 0.033 \times \text{Log} [Peni-V(M)] \quad \text{Eq. IV. 1}$$

Avec un bon coefficient de corrélation d'environ 0,9924. Le capteur élaboré présente une limite de détection est de l'ordre $1,15 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.3.4.2. Détection par l'impédance électrochimique

Pour évaluer la réaction chimique entre la β -cyclodextrine et le Peni-V, nous avons exposé l'électrode de Pt modifiée à la β -cyclodextrine/polyaniline à diverses concentrations de Peni-V. Les diagrammes d'impédance de Nyquist sont tracés dans le plan de Nyquist après l'injection de différentes concentrations de Peni-V. Il a été constaté que le diamètre du cercle de Nyquist augmentait avec l'ajout de Peni-V, ce qui indique l'augmentation de la résistance au transfert de charge ($R_{ct}=R_3$) (Figure. IV.10b).

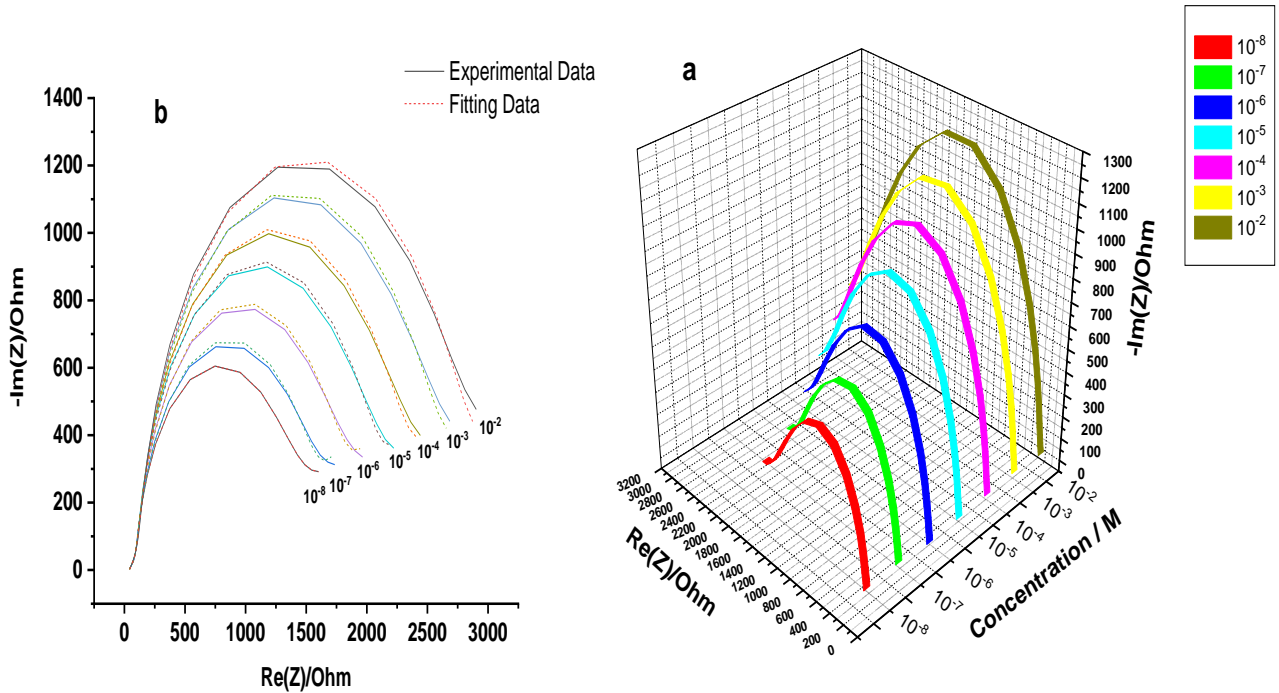


Figure. IV.10. Représentation a) 3D b) 2D EIS d'une électrode en platine modifiée avec de la β -Cyclodextrine-polyaniline pour différentes concentrations de Peni-V (entre 10^{-8} et 10^{-2} M); dans du PBS (pH = 7,4) contenant 5 mM de $Fe(CN)_6^{-3/-4}$. La plage de fréquence est comprise entre 100 MHz et 100 kHz.

En utilisant le logiciel EC-Lab® avec un outil puissant d'analyse de données EIS appelé Zfit, la valeur de ΔR_{ct} (ΔR_3) a été calculée pour chaque concentration de Peni-V en ajustant les données expérimentales. L'augmentation de la variation de la résistance du film R_{ct} est directement proportionnelle au logarithme de la concentration de Peni-V. Ceci est expliqué par la liaison ou l'inclusion de Peni-V à la surface de la β -cyclodextrine (Tableau .IV.1).

Tableau .IV.1 : Paramètres de simulation des diagrammes de Nyquist

R1+Q1/R2 +Q2/(R3+W2)		Concentration [mole/l]							
Variable	Unité	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
R1	Ohm	41,98	42,83	42,97	42,76	42,35	42,63	42,84	42,47
Q1	F.s^(a-1) 10⁴	2,744	1,987	1,949	2,048	2,200	2,412	2,775	3,211
a1		0,537	0,5724	0,577	0,5727	0,5626	0,5585	0,542	0,5225
R2	Ohm	57,55	59,66	60,89	66,83	75,48	80,87	92,39	106,4
Q2	F.s^(a-1) 10⁵	6,289	6,078	6,044	5,569	5,070	5,195	5,053	4,925
a2		0,9327	0,9342	0,9353	0,9426	0,9499	0,9457	0,9471	0,9495
R3	Ohm	1084	1297	1431	1653	1897	2114	2347	2547
s2	Ohm.s^{-1/2}	173,5	180,4	182,8	187	191,5	196	203,7	209,7
χ^2	10³	0,8240	0,6316	0,5902	0,5873	0,5928	0,7037	0,7231	0,9982

L'ajustement et l'analyse des spectres EIS ont été effectués à l'aide du modèle de circuit équivalent de Randles et de l'ajustement en Z (logiciel EC-Lab). La figure. IV.11 montre la courbe d'étalonnage à partir de la variation de la résistance de polarisation en fonction de la concentration de log de Peni-V :

$$\Delta R = 1893 + 215,82 * \log \left[Peni - V \left(\frac{mol}{L} \right) \right], R^2 = 0.9965 \quad Eq. IV.2$$

Où ΔR (Ohm) = $R_3^{c=c} - R_3^{c=0}$. Le domaine de linéarité de la droite obtenue s'étend de 10⁻⁸ à 10⁻² mol /L avec une sensibilisation égale à 0,9965 Ohm L mole⁻¹.

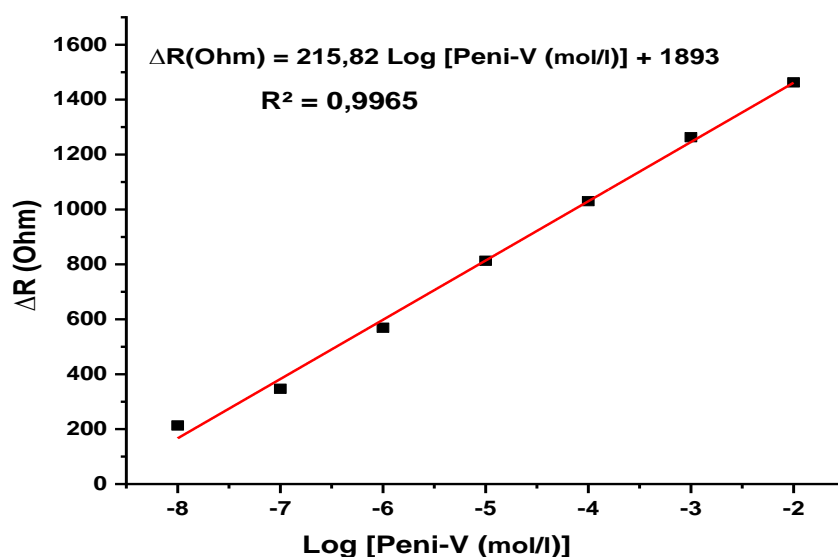


Figure.IV.11 Tracé de la variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration en Peni-V.

Les résultats de la variation de la résistance de transfert de charge au cours de l'étude impédimétrique est en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude potentiométrique. Ceci est confirmé par une relation obtenue entre le courant et la résistance en fonction du logarithme de la concentration en Peni-V.

IV.3.4.3. Mécanisme proposé pour la détection de la Peni-V

L'étude du processus détaillé du mécanisme de détection est importante pour de nombreuses raisons, notamment la compréhension et la conception d'un capteur électrochimique. D'après la littérature, le principal intérêt des CD réside dans leur capacité à former des complexes d'inclusion avec plusieurs composés. La complexation est un phénomène moléculaire où une molécule d'invité (G) et une molécule de CD (hôte) entrent en contact pour s'associer et former un complexe avec une stœchiométrie 1: 1 (CD-G) [11, 25-26]. Le type de lien établi entre l'invité et l'hôte est non covalent. Une variété de forces non covalentes telles que les forces de van der Waals, les liaisons hydrogène, l'interaction dipôle-dipôle, les forces de dispersion de London et d'autres interactions hydrophobes sont responsables de la formation d'un complexe stable.

Dans notre étude, nous avons utilisé la Peni-V comme invité et la β -

cyclodextrine comme hôte. Nous avons observé une augmentation de la résistance de la membrane avec l'évolution de la concentration en Peni-V par la méthode d'impédance. Ce résultat est confirmé par la méthode CV. Ce résultat peut être expliqué par les complexes d'inclusion de la Peni-V avec la β -cyclodextrine. Nous sommes en mesure de proposer un mécanisme capable d'élucider la formation du complexe d'inclusion (Schéma IV.4).

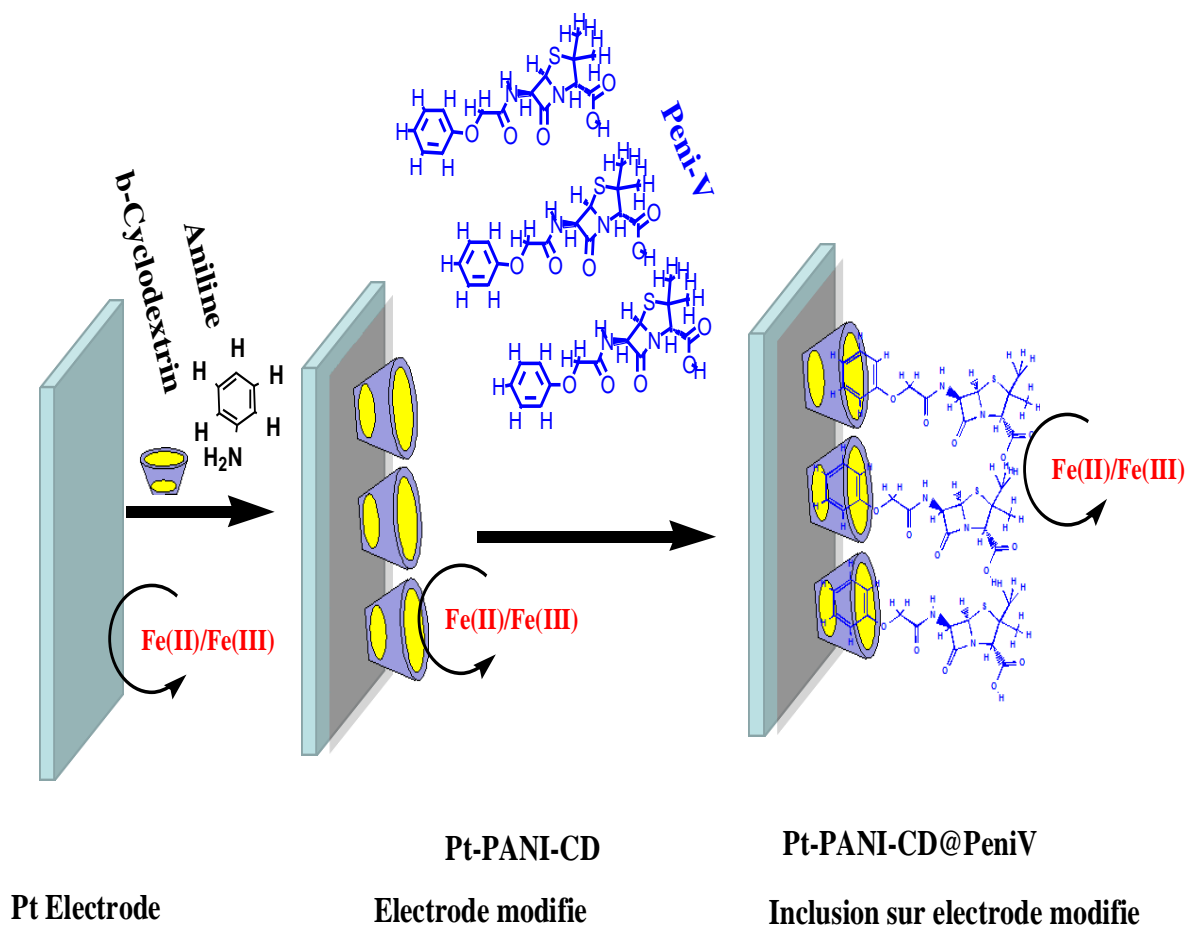


Schéma IV.4. Mécanisme proposé pour la détection de Peni-V

IV.4. Conclusion

Nous avons appliqué avec succès une méthode de voltampérométrie cyclique dans l'élaboration de l'électrode de platine modifiée avec le PANI- β -CD par polymérisation électrochimique de β -CD / aniline. Les β -cyclodextrines inhibent la vitesse de polymérisation du film de polyaniline. Cette réussite de polymérisation a été confirmée par une évaluation de la cinétique électronique à l'interface électrode / électrolyte en utilisant une méthode de voltamétrie cyclique et un modèle de circuit équivalent par la méthode d'impédance. La présente étude a montré que l'électrode de Pt modifiée par PANI- β -CD était un très bon candidat pour la fabrication d'une électrode modifiée pour la détection de la pénicilline V. Le comportement électrochimique de la Peni-V mise en évidence par les méthodes d'analyse potentiométrique cyclique et d'impédimétrie a abouti à des conclusions identiques et similaires. Nous avons réussi à trouver une relation linéaire entre le courant de pics, la résistance et le logarithme de la concentration de la Peni-V. Ce résultat peut être expliqué par les complexes d'inclusion de Peni-V avec la β -cyclodextrine incorporée dans un film de polyaniline. La technique électroanalytiques proposée est rapide, simple et peu coûteuse.

Références

- [1].HEBERER, Thomas. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 2002, vol. 131, no 1-2, p. 5-17.
- [2].MOMPELAT, S., LE BOT, B., et THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment international*, 2009, vol. 35, no 5, p. 803-814.
- [3].BARANOWSKA, Irena, MARKOWSKI, Piotr, GERLE, Anna, *et al.* Determination of selected drugs in human urine by differential pulse voltammetry technique. *Bioelectrochemistry*, 2008, vol. 73, no 1, p. 5-10.
- [4].GOYAL, Rajendra N., BISHNOI, Sunita, et AGRAWAL, Bharati. Electrochemical sensor for the simultaneous determination of caffeine and aspirin in human urine samples. *Journal of electroanalytical chemistry*, 2011, vol. 655, no 2, p. 97-102.
- [5].BECKER, Matthias, ZITTLAU, Erhard, et PETZ, Michael. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 520, no 1-2, p. 19-32.
- [6].ANON, The Richard & HINDA Rosenthal Symposium: Antimicrobial Resistance: A Problem Without Borders, National Academies Press, Washington, 2014.
- [7].GUARDABASSI, Luca, PETERSEN, Andreas, OLSEN, John E., *et al.* Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, no 9, p. 3499-3502.

- [8].KÜMMERER, Klaus. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by life cycle engineering as an important approach for green pharmacy and green chemistry. *Green Chemistry*, 2007, vol. 9, no 8, p. 899-907.
- [9].DRISSI, M., AHMED, Z. Baba, DEHECQ, B., *et al.* Antibiotic susceptibility and mechanisms of β -lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Medecine et maladies infectieuses*, 2008, vol. 38, no 4, p. 187-191.
- [10].MANDSBERG, Lotte F., CIOFU, Oana, KIRKBY, N., *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, vol. 53, no 6, p. 2483-2491.
- [11].ATHANASSIOU, G., MICHALEAS, S., LADA-CHITIROGLOU, E., *et al.* Antimicrobial activity of β -lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2003, vol. 55, no 3, p. 291-300.
- [12].LIU, Chuangji, WANG, Hai, JIANG, Yanbin, *et al.* Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2011, vol. 879, no 7-8, p. 533-540.
- [13].KRAUWINKEL, W. J. J. et VOLKERS-KAMERMANS, N. J. Determination of penicillin-V in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1996, vol. 679, no 1-2, p. 129-135.
- [14].BENITO-PENÑA, E., URRACA, J. L., et MORENO-BONDI, M. C. Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2009, vol. 49, no 2, p. 289-294.
- [15].HSIEH, Shih-Huan, HUANG, Hsi-Ya, et LEE, Szetsen. Determination of eight penicillin antibiotics in pharmaceuticals, milk and porcine tissues by nano-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no 43, p. 7186-7194.
- [16].ZHANG, Xiaopan, CHEN, Ligang, XU, Yang, *et al.* Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2010, vol. 878, no 32, p. 3421-3426.
- [17].SQUELLA, J. A. et NUNEZ-VERGARA, Luis J. Electrochemical study of some penicillin antibiotics by rapid ac polarography. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1981, vol. 130, p. 361-366.
- [18].SAYED, GO El, AMIN, A. S., et ISSA, Y. M. DC polarographic determination of ampicillin in pharmaceutical dosage forms. *Analytical letters*, 1994, vol. 27, no 13, p. 2515-2521.
- [19].RODRIGUES, L. N. C., ZANONI, Maria Valnice Boldrin, et FOGG, A. G. Indirect polarographic and cathodic stripping voltammetric determination of cefaclor as an alkaline degradation product. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1999, vol. 21, no 3, p. 497-505.
- [20].AL-ABACHI, Mouayed Q., HADDI, Hind, et AL-ABACHI, Anas M. Spectrophotometric determination of amoxicillin by reaction with N, N-dimethyl-p-phenylenediamine and potassium hexacyanoferrate (III). *Analytica chimica acta*, 2005, vol. 554, no 1-2, p. 184-189.

- [21].GARCÍA-REIRIZ, Alejandro, DAMIANI, Patricia C., et OLIVIERI, Alejandro C. Different strategies for the direct determination of amoxicillin in human urine by second-order multivariate analysis of kinetic–spectrophotometric data. *Talanta*, 2007, vol. 71, no 2, p. 806-815.
- [22].FOGG, Arnold G. et ABDALLA, Mohamed A. Visible spectrophotometric determination of cephalosporins and penicillins by indophenol derivatization with and without alkaline degradation to ammonia. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1985, vol. 3, no 4, p. 315-321.
- [23].POGHOSSIAN, Arshak, SCHÖNING, Michael J., SCHROTH, P., *et al.* An ISFET-based penicillin sensor with high sensitivity, low detection limit and long lifetime. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001, vol. 76, no 1-3, p. 519-526.
- [24].LIU, Jianguo, LIANG, Li, LI, Gaoxiang, *et al.* H⁺ ISFET-based biosensor for determination of penicillin G. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, vol. 13, no 9, p. 1023-1028.
- [25].ZHU, Jie, HE, Jiang, DU, Xiaoyan, *et al.* A facile and flexible process of β -cyclodextrin grafted on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and host–guest inclusion studies. *Applied Surface Science*, 2011, vol. 257, no 21, p. 9056-9062.
- [26].GRANADERO, Daniel, BORDELLO, Jorge, PÉREZ-ALVITE, Maria Jesus, *et al.* Host-guest complexation studied by fluorescence correlation spectroscopy: adamantane–cyclodextrin inclusion. *International journal of molecular sciences*, 2010, vol. 11, no 1, p. 173-188.
- [27].HADDAD, Raoudha, HOLZINGER, Michael, VILLALONGA, Reynaldo, *et al.* Pyrene-adamantane- β -cyclodextrin: An efficient host–guest system for the biofunctionalization of SWCNT electrodes. *Carbon*, 2011, vol. 49, no 7, p. 2571-2578.
- [28].KIESER, Birgit, FIETZEK, Christopher, SCHMIDT, Roswitha, *et al.* Use of a modified cyclodextrin host for the enantioselective detection of a halogenated diether as chiral guest via optical and electrical transducers. *Analytical chemistry*, 2002, vol. 74, no 13, p. 3005-3012.
- [29].LI, Wei, JIN, Guiying, CHEN, Hui, *et al.* Highly sensitive and reproducible cyclodextrin-modified gold electrodes for probing trace lead in blood. *Talanta*, 2009, vol. 78, no 3, p. 717-722.
- [30].VILLALONGA, Reynaldo, FUJII, Akira, SHINOHARA, Hiroaki, *et al.* Supramolecular-mediated immobilization of L-phenylalanine dehydrogenase on cyclodextrin-coated Au electrodes for biosensor applications. *Biotechnology letters*, 2007, vol. 29, no 3, p. 447-452.
- [31].ALARCÓN-ÁNGELES, G., GUIX, M., SILVA, W. C., *et al.* Enzyme entrapment by β -cyclodextrin electropolymerization onto a carbon nanotubes-modified screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, vol. 26, no 4, p. 1768-1773.
- [32].EL-HADY, Deia Abd. Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)-catechin in some commercial drinks and biological fluids. *Analytica chimica acta*, 2007, vol. 593, no 2, p. 178-187.
- [33].GAICHORE, Reena R. et SRIVASTAVA, Ashwini K. Voltammetric determination of nifedipine using a β -cyclodextrin modified multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, vol. 188, p. 1328-1337.
- [34].ALGARRA, M., CAMPOS, B. B., AGUIAR, F. R., *et al.* Novel β -cyclodextrin modified CdTe quantum dots as fluorescence nanosensor for acetylsalicylic acid and metabolites. *Materials Science and Engineering: C*, 2012, vol. 32, no 4, p. 799-803.
- [35].CHEN, Ming et DIAO, Guowang. Electrochemical study of mono-6-thio- β -cyclodextrin/ferrocene capped on gold nanoparticles: Characterization and application to the design of glucose amperometric biosensor. *Talanta*, 2009, vol. 80, no 2, p. 815-820.

- [36].CAO, Anping, AI, Huihui, DING, Yonglan, *et al.* Biocompatible hybrid film of β -cyclodextrin and ionic liquids: A novel platform for electrochemical biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, vol. 155, no 2, p. 632-638.
- [37].GARRIDO, J. M. P. J., RAHEMI, V., BORGES, F., *et al.* Carbon nanotube β -cyclodextrin modified electrode as enhanced sensing platform for the determination of fungicide pyrimethanil. *Food control*, 2016, vol. 60, p. 7-11.
- [38].SOUSA, T. F. A., AMORIM, C. G., MONTENEGRO, MCBSM, *et al.* Cyclodextrin based potentiometric sensor for determination of ibuprofen in pharmaceuticals and waters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, vol. 176, p. 660-666.
- [39].SINGH, Renu, PRASAD, Rachna, SUMANA, G., *et al.* STD sensor based on nucleic acid functionalized nanostructured polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, vol. 24, no 7, p. 2232-2238.
- [40].ANSARI, Anees A., SUMANA, G., KHAN, R., *et al.* Polyaniline-cerium oxide nanocomposite for hydrogen peroxide sensor. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2009, vol. 9, no 8, p. 4679-4685.
- [41].DHAND, Chetna, DAS, Maumita, DATTA, Monika, *et al.* Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 2011, vol. 26, no 6, p. 2811-2821.
- [42].BANDGAR, D. K., NAVALE, S. T., NAUSHAD, M., *et al.* Ultra-sensitive polyaniline-iron oxide nanocomposite room temperature flexible ammonia sensor. *RSC Advances*, 2015, vol. 5, no 84, p. 68964-68971.
- [43].BANDGAR, D. K., NAVALE, S. T., NAUSHAD, M., *et al.* Ultra-sensitive polyaniline-iron oxide nanocomposite room temperature flexible ammonia sensor. *RSC Advances*, 2015, vol. 5, no 84, p. 68964-68971.
- [44].SEN, Tanushree, SHIMPI, Navinchandra G., MISHRA, Satyendra, *et al.* Polyaniline/ γ -Fe₂O₃ nanocomposite for room temperature LPG sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, vol. 190, p. 120-126.
- [45].LI, Yang, BAN, Huitao, JIAO, Mingfei, *et al.* In situ growth of SnO₂ nanosheets on a substrate via hydrothermal synthesis assisted by electrospinning and the gas sensing properties of SnO₂/polyaniline nanocomposites. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no 78, p. 74944-74956.
- [46].MONDAL, S. K., BARAI, Keshab, et MUNICHANDRAIAH, N. High capacitance properties of polyaniline by electrochemical deposition on a porous carbon substrate. *Electrochimica Acta*, 2007, vol. 52, no 9, p. 3258-3264.
- [47].HU, Chi-Chang, LI, Wen-Yar, et LIN, Jeng-Yan. The capacitive characteristics of supercapacitors consisting of activated carbon fabric-polyaniline composites in NaNO₃. *Journal of power sources*, 2004, vol. 137, no 1, p. 152-157.
- [48].ELYASI, Mojdeh, KHALILZADEH, Mohammad A., et KARIMI-MALEH, Hassan. High sensitive voltammetric sensor based on Pt/CNTs nanocomposite modified ionic liquid carbon paste electrode for determination of Sudan I in food samples. *Food chemistry*, 2013, vol. 141, no 4, p. 4311-4317.
- [49].ZEHANI, Nedjla, DZYADEVYCH, Sergei V., KHERRAT, Rochdi, *et al.* Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases. *Frontiers in chemistry*, 2014, vol. 2, p. 44.
- [50].SHAHMIRI, Mandana Roodbari, BAHARI, Ali, KARIMI-MALEH, Hassan, *et al.* Ethynylferrocene-NiO/MWCNT nanocomposite modified carbon paste electrode as a novel voltammetric sensor for simultaneous determination of glutathione and acetaminophen. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, vol. 177, p. 70-77.

- [51].ENSAFI, Ali A., KARIMI-MALEH, Hassan, MALLAKPOUR, Shadpour, *et al.* Highly sensitive voltammetric sensor based on catechol-derivative-multiwall carbon nanotubes for the catalytic determination of captopril in patient human urine samples. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, vol. 87, no 2, p. 480-488.
- [52].GUPTA, Vinod K., PRASAD, R., KUMAR, P., *et al.* New nickel (II) selective potentiometric sensor based on 5, 7, 12, 14-tetramethyldibenzotetraazaannulene in a poly (vinyl chloride) matrix. *Analytica Chimica Acta*, 2000, vol. 420, no 1, p. 19-27.
- [53].FERNÁNDEZ, Lenys et CARRERO, Hermes. Electrochemical evaluation of ferrocene carboxylic acids confined on surfactant–clay modified glassy carbon electrodes: oxidation of ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*, 2005, vol. 50, no 5, p. 1233-1240.
- [54].LEÓN-SILVA, U., NICHOLSON, M. E., HU, Hailin, *et al.* Effect of modified ITO substrate on electrochromic properties of polyaniline films. *Solar energy materials and solar cells*, 2007, vol. 91, no 15-16, p. 1444-1448.
- [55].OBAID, A. Y., EL-MOSSALAMY, E. H., AL-THABAITI, S. A., *et al.* Electrodeposition and characterization of polyaniline on stainless steel surface via cyclic, convolutive voltammetry and SEM in aqueous acidic solutions. *Int. J. Electrochem. Sci*, 2014, vol. 9, no 2, p. 1003-1015.
- [56].Moss S. D., Janata J., Johnson. C. C., Potassium ion-sensitive field effect transistor, *Analytical Chemistry*, 47 (1975) 2238 – 2243.



**PARTIE -3-
MODELISATION DE LA
REPONSE DE (BIO)CAPTEURS**





CHAPITRE V

*Modélisation numérique des systèmes de
réaction-diffusion dans le processus du
biocapteur enzymatique avec Excel*



V.1. Introduction

En génie chimique, la modélisation et la simulation sont des outils importants pour les ingénieurs et dans la recherche scientifique afin de mieux comprendre le comportement des processus chimiques. La modélisation et la simulation sont très utiles pour concevoir des équipements, étendre et optimiser les procédés de l'industrie chimiques, pour le contrôle de processus, le dépannage, la détection de défauts opérationnels, la formation d'opérateurs et d'ingénieurs, l'établissement des coûts et la planification opérationnelle, etc. [1-5].

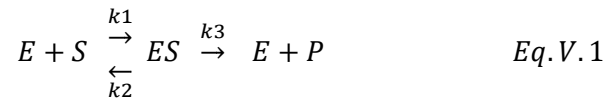
Les biocapteurs électroanalytiques basés sur la catalyse enzymatique sont des appareils analytiques qui utilisent des enzymes biologiques pour détecter la présence de molécules chimiques. Ces instruments ont trouvé de larges applications allant de l'analyse pharmaceutique à l'analyse des aliments et l'environnement [6-9]. La modélisation théorique des biocapteurs implique l'utilisation d'équations différentielles partielles (EDP) avec un terme non linéaire lié au schéma cinétique de Michaelis-Menten pour les réactions catalysées par une enzyme. Les équations différentielles partielles sont extrêmement importantes pour la résolution de problèmes scientifiques et d'ingénierie. Les EDP du système de diffusion des réactions nécessitent l'utilisation d'ordinateurs pour leur solution numérique. [10-11]. Excel est disponible sur presque tous les ordinateurs de bureau ou portables. Il peut être utilisé pour résoudre de problèmes de système EDP, avec un faible coût et une facilité d'application. [12-15]

Dans cet chapitre, une procédure est développée pour utiliser le logiciel Microsoft Excel pour étudier la cinétique des biocapteurs enzymatiques selon un modèle d'équations différentielles non linéaires en les convertissant en équations aux différences finies en utilisant des techniques explicites et implicites. L'utilisation d'Excel à cette fin élimine le besoin d'acheter des logiciels spécialisés pour diverses applications. La configuration du problème est un outil puissant pour l'ingénierie afin de concevoir et d'effectuer des analyses paramétriques en utilisant des techniques simples et rapides.

V.2 Cinétique et modèle mathématique

V.2.1 Modèle cinétique

Le biocapteur enzymatique électrochimique a été construit en utilisant une électrode de travail modifiée (Figure.V.1). Nous considérons un biocapteur mono-enzymatique utilisant la cinétique de Michaelis-Menten. La réaction enzymatique suivante a lieu dans l'électrode de travail (Eq.V.1).



Où : E désigne l'enzyme, S le substrat à déterminer, ES est le complexe de substrat enzymatique, P est le produit de la réaction et k1, k2, k3 sont les constantes de vitesse cinétique.

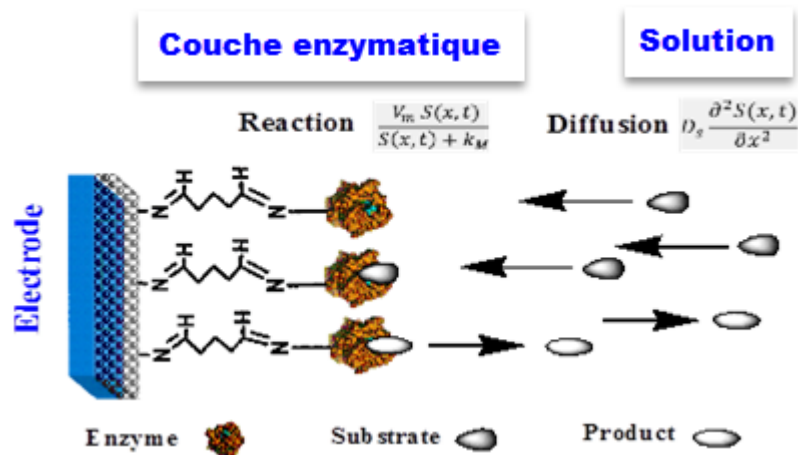


Figure.V.1. Système diffusion - réaction dans le processus du biocapteur.

V.2.2 Modèle mathématique

Le schéma standard des biocapteurs électrochimiques classiques consiste généralement en une diffusion alternée continue sur des couches d'enzymes. L'action de ces biocapteurs peut être décrite en combinant un processus de réaction et de diffusion préalablement introduit. Ensemble, ils forment une équation différentielle non linéaire pour les concentrations du substrat et du produit,

$$\frac{\partial s(x, t)}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 s(x, t)}{\partial x^2} - \frac{V_m s(x, t)}{s(x, t) + k_M} \quad \text{Eq. V. 2}$$

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 p(x, t)}{\partial x^2} + \frac{V_m s(x, t)}{s(x, t) + k_M} \quad \text{Eq. V. 3}$$

Nous avons besoin d'une condition aux limites (BD) et d'une condition initiale (IC) décrivant la distribution de la concentration à $t = 0$:

$$\begin{cases} s = 0, & p = 0, & t = 0; & 0 \leq x \leq d. \\ \frac{\partial s(x, t)}{\partial x} = 0, & p = 0, & t > 0; & x = 0. \\ s = s_0, & p = 0, & t > 0; & x = d. \end{cases} \quad \text{Eq.V.4}$$

où x représente l'espace ; $s(x)$ et $p(x)$ sont les concentrations molaires du substrat s et du produit p dans la couche d'enzyme, V_m est le taux enzymatique maximal ; k_M la constante de Michaelis ; d l'épaisseur de la couche d'enzyme ; D_s ; e et D_p ; e sont les coefficients de diffusion.

V.2.3 Forme sans dimension du problème

Les paramètres suivants sont utilisés pour convertir les équations Eq.V.2 et 3 ci-dessus en une forme sans dimension. Nous faisons les équations aux dérivées partielles non linéaires ci-dessus sous une forme sans dimension en définissant les paramètres suivants :

$$X = \frac{x}{d}, T = \frac{D_s t}{d^2}, S = \frac{s}{s_0}, P = \frac{p}{p_0}, r = \frac{D_s}{D_p} = 1, \mu = \frac{V_m d^2}{D_s s_0}, \beta = \frac{k_M}{s_0}$$

Les équations 2 et 3 réduisent à la forme sans dimension suivante avec le nombre de Damkohler (Da), qui compare le taux de diffusion à travers la couche enzymatique avec la vitesse de réaction enzymatique. Si Damkohler est inférieur à 1, la cinétique enzymatique contrôle la réponse du biocapteur. Ce paramètre (nombre de Damkoehler) compare essentiellement le taux de réactions enzymatiques (V_m / K_M) avec la diffusion à travers la couche enzymatique (d^2 / D_s). Si $r < 1$, alors la cinétique enzymatique est prédominante. Les équations différentielles transformées suivantes sont obtenues comme suit :

$$\frac{\partial S(X, T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 S(X, T)}{\partial X^2} - \frac{\mu S(X, T)}{S(X, T) + \beta} \quad \text{Eq.V.5}$$

$$\frac{\partial P(X, T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 P(X, T)}{\partial X^2} + \frac{\mu S(X, T)}{S(X, T) + \beta} \quad \text{Eq.V.6}$$

Les conditions initiales et limites sans dimension sont les suivantes :

$$\begin{cases} S = 0, & P = 0, & T = 0; & 0 \leq X \leq 1. \\ \frac{\partial S(X, T)}{\partial X} = 0, & P = 0, & T > 0; & X = 0. \\ S = 1, & P = 0, & T > 0; & X = 1. \end{cases} \quad \text{Eq.V.7}$$

V.3 Solution numérique de l'équation de diffusion - réaction

V.3.1 Méthode de différence finie

Les approximations des différences finies pour les dérivées sont l'une des méthodes les plus simples et les plus anciennes pour résoudre les équations différentielles (EDP). Appliquer la méthode des différences finies à une équation différentielle consiste à remplacer tous les dérivés par des formules différentes.

Dans l'équation EDP, il existe des dérivées par rapport au temps et des dérivées par rapport à l'espace (Figure.V.2). La dérivée par rapport au temps et par rapport à l'espace sont déterminées en utilisant la méthode EULER. Nous développons la fonction S en $x + \Delta x$ et $x - \Delta x$ autour du point x :

$$S(x + \Delta x) = S(x) + \frac{\partial S}{\partial x} \Delta x + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \Delta x^2 + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 S}{\partial x^3} \Delta x^3 + \frac{1}{24} \frac{\partial^4 S}{\partial x^4} \Delta x^4 + \dots \quad \text{Eq.V.8}$$

$$S(x - \Delta x) = S(x) - \frac{\partial S}{\partial x} \Delta x + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \Delta x^2 - \frac{1}{6} \frac{\partial^3 S}{\partial x^3} \Delta x^3 + \frac{1}{24} \frac{\partial^4 S}{\partial x^4} \Delta x^4 - \dots \quad \text{Eq.V.9}$$

Nous considérons une approximation par différences finies, approximations de la première dérivée :

$$\frac{\partial S}{\partial x} \approx \frac{S(x + \Delta x) - S(x)}{\Delta x} \quad \text{Eq.V.10}$$

Les approximations de la dérivée seconde :

$$\frac{\partial^2 S}{\partial x^2} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial S}{\partial x} \right) \approx \frac{S(x + \Delta x) - 2S(x) + S(x - \Delta x)}{\Delta x^2} \quad \text{Eq.V.11}$$

En outre, l'approximation de la dérivée dans l'analyse par différences finies :

$$\frac{\partial S}{\partial t} \approx \frac{S(t + \Delta t) - S(t)}{\Delta t} \quad \text{Eq.V.12}$$

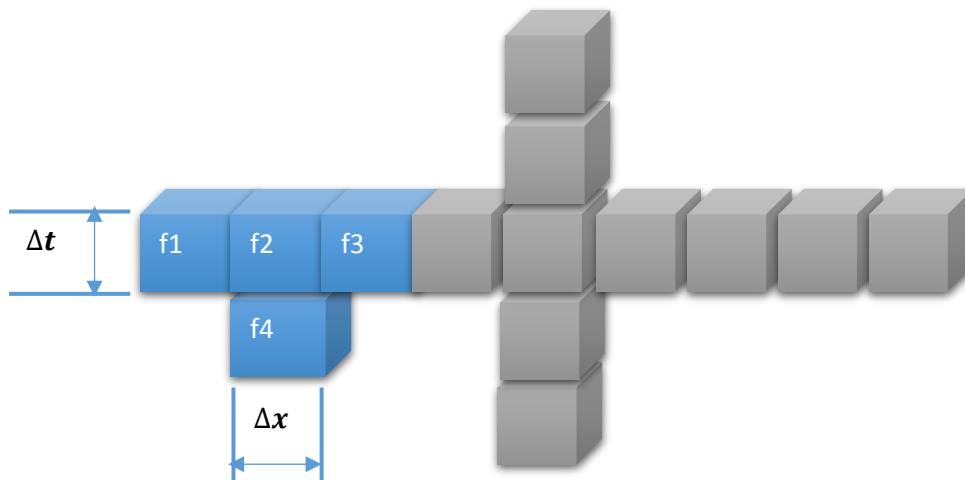


Figure.V.2. La méthode de la différence finie modélise.

V.3.2 Discrétisation

L'idée de base de l'approche numérique de la résolution des équations différentielles est de remplacer les dérivées dans l'équation catalytique par des quotients de différence et de considérer les relations entre S et P à (X, T) et ses voisins distantes de ΔX et à la fois ΔT plus tard. En réarrangeant les termes des équations Eq.V.5 et Eq.V.6 en appliquant une approche numérique. On obtient l'équation cinétique sous forme discrétisée :

$$S(X, T + \Delta T) = S(X, T) + \frac{\Delta T}{\Delta X^2} [S(X + \Delta X, T) - 2 S(X, T) + u(X - \Delta X, T)] - \frac{\alpha \Delta T S(X, T)}{S(X, T) + \beta} \quad \text{Eq.V. 13}$$

$$S(X, T + \Delta T) = S(X, T) + \lambda [S(X + \Delta X, T) - 2 S(X, T) + S(X - \Delta X, T)] - \frac{\alpha \Delta T S(X, T)}{S(X, T) + \beta} \quad \text{Eq.V. 14}$$

$$P(X, T + \Delta T) = P(X, T) + \lambda [P(X + \Delta X, T) - 2 P(X, T) + P(X - \Delta X, T)] + \frac{\alpha \Delta T S(X, T)}{S(X, T) + \beta} \quad \text{Eq.V. 15}$$

Avec : $\lambda = \Delta T / \Delta X^2$

La convergence est une considération importante dans la mise en œuvre de tout algorithme de calcul numérique. Pour assurer la convergence de (Eq.V.5), l'utilisateur doit choisir un ΔX et un ΔT suffisamment petits pour une résolution raisonnable et vérifier que la quantité = ΔT/ΔX² soit bien inférieure à l'unité. Pour proposer un algorithme adapté à une implémentation informatique (feuille de calcul Excel), l'intervalle spatial et l'intervalle de temps sont subdivisés en incréments de taille Δx et Δt, respectivement. C'est-à-dire que chaque point d'échantillonnage dans l'intervalle spatial est obtenu à partir de X_n = X_{n-1} + ΔX pour n=1, 2... N, avec x₀ = 0 et x_N = L, et chaque temps dans l'intervalle [0, T] est obtenu à partir de :

$$T_k = T_{k-1} + \Delta T \text{ pour } n=1, 2 \dots M \text{ avec } T_0 = 0 \text{ et } T_M = T$$

Avec une partition spatiale et temporelle décrite ci-dessus, et en indiquant la valeur de S :

$$S(X_n + \Delta X, T_k) = S_{n+1}^k ; S(X_n - \Delta X, T_k) = S_{n-1}^k \text{ et } S(X_n, T_k + \Delta T) = S_n^{k+1}.$$

L'équation cinétique discrétisée du biocapteur dans (Eq.V.14, Eq.V.15) peut être réécrite :

$$S_n^{k+1} = S_n^k + \lambda [S_{n+1}^k - 2 S_n^k + S_{n-1}^k] - \frac{\alpha \Delta T S_n^k}{S_n^k + \beta} \quad \text{Eq.V. 16}$$

$$P_n^{k+1} = P_n^k + \lambda [P_{n+1}^k - 2 P_n^k + P_{n-1}^k] + \frac{\alpha \Delta T S_n^k}{S_n^k + \beta} \quad \text{Eq.V. 17}$$

V.3.3 Application Excel

Microsoft Excel est un outil utile pour résoudre des problèmes de diffusion de réaction non linéaire pour une variété de configurations d'ailettes. Plusieurs travaux modernes ont démontré l'utilisation du tableur Excel dans la résolution de problèmes unidimensionnels [11] [13]. La fonction d'itération intégrée d'Excel peut être utilisée pour résoudre les équations nodales à différences finies afin d'obtenir l'historique du temps de la concentration du substrat (Figure.V.3) et la concentration du produit (Figure.V.4).

Créez une nouvelle feuille de calcul et un nouveau titre sous forme de «Modélisation numérique de la réaction cinétique-diffusion dans le processus du biocapteur d'enzyme avec Excel». Nous définissons les valeurs des paramètres : pas du temps et de l'espace, les conditions initiales et les conditions aux limites (Annexe A).

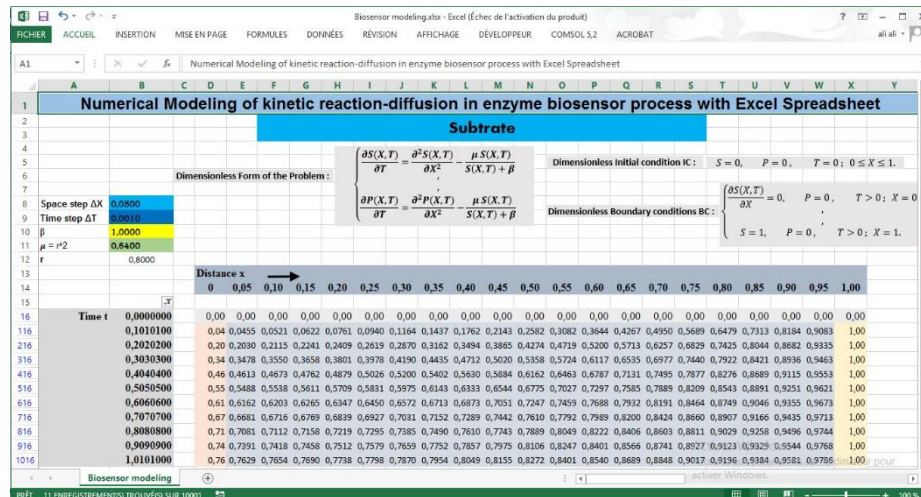


Figure.V.3. Modélisation de la cinétique par Excel de la concentration du substrat.

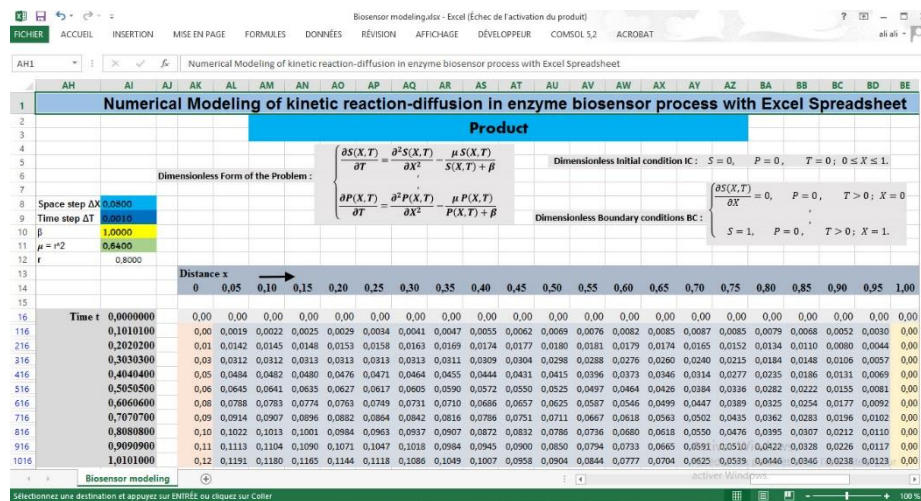


Figure. V.4. Modélisation de la cinétique par Excel de la concentration du produit.

V.4 Résultats et discussions

V.4.1 Validation du modèle

Les solutions des feuilles de calcul d'Excel sont validées pour un ensemble de valeurs spécifiques. Dans ce travail, les données simulées numériquement sont validées par les solutions Matlab. La fonction `pdx4` du logiciel Matlab est une fonction de résolution des problèmes de valeurs limites initiales pour les équations aux dérivées partielles paraboliques-elliptiques [16] (Annexe B), permet de résoudre les équations (Eq.V.5) et (Eq.V.6) dans les conditions aux limites correspondantes (Eq.V.7).

La figure.V.5 montre la réponse du biocapteur d'enzyme pour diverses concentrations du substrat et du produit. Le pourcentage d'écart entre le résultat analytique et le résultat simulé est moins de 2%. Ce qui est bien conforme. Les données modélisées avec Excel sont très similaires aux données modélisées par Matlab.

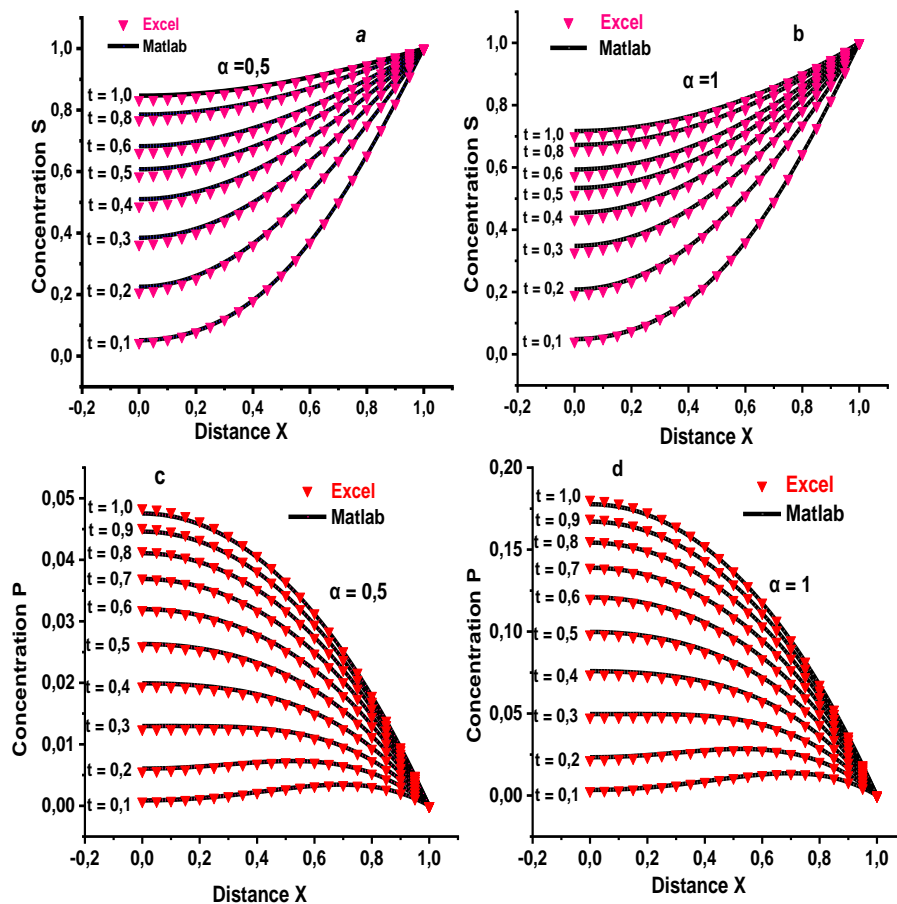


Figure. V.5. Réponse de la modélisation par Excel du biocapteur enzymatique a) substrat avec $\alpha=0.5$. b) substrat avec $\alpha=1$ c), produit avec $\alpha=0.5$, d) produit avec $\alpha=1$.

V.4.2 Réaction - effet de diffusion

Une feuille de calcul Excel a été utilisée pour étudier l'effet du nombre de Damkohler sur la réponse du biocapteur pour savoir s'il s'agit d'un taux de diffusion ou d'un taux de cinétique enzymatique. Les figures V.6 et V.7 montrent le profil de concentration pour différentes valeurs du nombre de Damkohler. De petites valeurs du nombre de Damkohler indiquent effectivement des contrôles de réaction de surface et qu'une quantité significative du réactif à bien diffuse dans la membrane sans réagir.

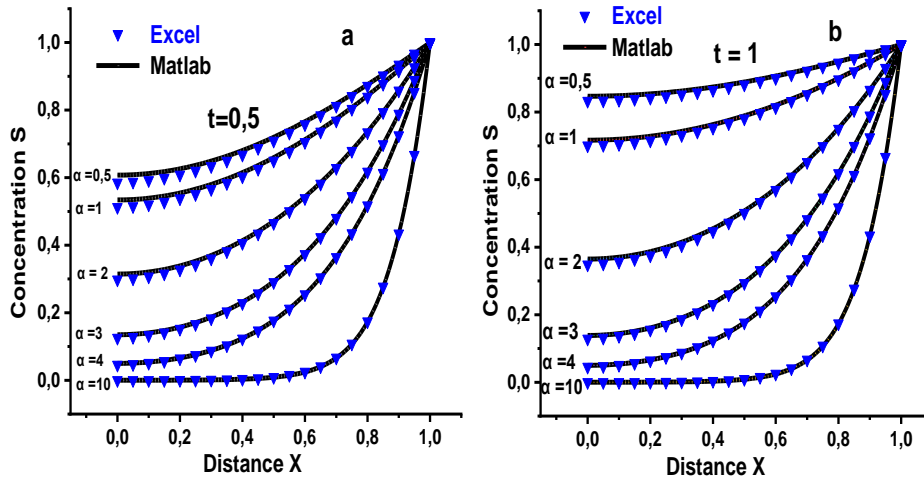


Figure. V.6. Cinétique de modélisation par Excel de la concentration de substrat (application au biocapteur).

On peut facilement trouver à partir de la figure. V.6 qu'avec une diminution du nombre de Damkohler, il y a une augmentation de la dégradation du substrat non dimensionnel. À partir de la figure. V.7, la concentration du produit diminue lorsque le nombre de Damkohler diminue.

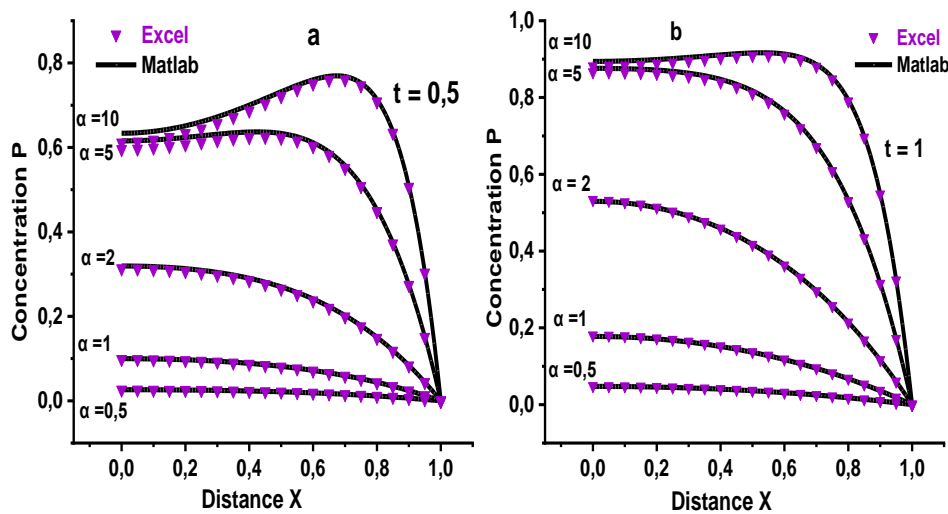


Figure.V.7. Cinétique de modélisation par Excel de la concentration de produit (application au biocapteur).

V.5. Conclusion

Le modèle mathématique non dimensionnel du biocapteur enzymatique biocatalytique peut être utilisé avec succès pour étudier la réponse des biocapteurs. Les résultats montrent qu'Excel est un outil mathématique puissant pour résoudre les problèmes de valeurs initiales des équations différentielles partielles avec des conditions aux limites. Le changement des paramètres de l'équation nous donne des résultats immédiats. Cela nous montre la puissance de la feuille de calcul Excel dans la résolution numérique de la cinétique du biocapteur. Elle est également utilisée pour déterminer la dépendance de la concentration en substrat non dimensionnel et la concentration du produit sur le nombre de Damkohler. Le modèle théorique décrit ici peut être utilisé pour optimiser la conception du biocapteur enzymatique.

Références

- [1].INGHAM, John, DUNN, Irving J., HEINZLE, Elmar, *et al. Chemical engineering dynamics: an introduction to modelling and computer simulation*. John Wiley & Sons, 2008.
- [2].YEO, Yeong Koo. *Chemical Engineering Computation with MATLAB®*. CRC Press, 2017.
- [3].AL-MALAH, Kamal. *MATLAB Numerical Methods with Chemical Engineering Applications*. McGraw-Hill Professional, 2013.
- [4].BUZZI-FERRARIS, Guido et MANENTI, Flavio. *Nonlinear systems and optimization for the chemical engineer: Solving numerical problems*. John Wiley & Sons, 2013.
- [5].ROSS, George. *Computer programming examples for chemical engineers*. Elsevier, 1987.
- [6].DJAALAB, Elbahi, SAMAR, Mohamed El Hadi, et ZOUGAR, Saida. Mathematical modeling of the kinetics of a highly sensitive enzyme biosensor. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 2018, p. 1-11.
- [7].GIL, Eric de Souza et MELO, Giselle Rodrigues de. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, vol. 46, no 3, p. 375-391.
- [8].VISWANATHAN, Subramanian, RADECKA, Hanna, et RADECKI, Jerzy. Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 2009, vol. 140, no 8, p. 891.
- [9].WANEKAYA, Adam K., CHEN, Wilfred, et MULCHANDANI, Ashok. Recent biosensing developments in environmental security. *Journal of Environmental Monitoring*, 2008, vol. 10, no 6, p. 703-712.
- [10].MCKIBBEN, Mark et WEBSTER, Micah D. *Differential equations with Matlab: exploration, applications, and theory*. Chapman and Hall/CRC, 2014.
- [11].KETKAR, Mohan et REDDY, Gopal. Microsoft Excel Based Numerical Solution Of Linear, Homogeneous 1 D Transient Partial Differential Equations. In : *2003 Annual Conference*. 2003. p. 8.851. 1-8.851. 10.

- [12].FAE'Q, A. A. Solutions of Partial Differential Equations Using Excel. *Pak. J. Appl. Sci.*, 2001, vol. 1, p. 458-465.
- [13].OCHKOV, Valery, ORLOV, Konstantin, VOLOSHCHUK, Volodymyr, *et al.* *Thermal Engineering Studies with Excel, Mathcad and Internet*. Springer International Publishing, 2016.
- [14].LARSEN, R. W., *Engineering with Excel*. New York, N.Y.: Pearson, 5th Edition, 2017.
- [15].LONA, Ferrareso, LONA, Liliane Maria Ferrareso, et FURTADO. *Step by Step Approach to the Modeling of Chemical Engineering Processes*. Springer International Publishing AG, 2018.
- [16].MATLAB & Simulink, www.mathworks.com/help/matlab/ref/pdepe.html, 2018/09/07.



Chapitre VI

*Modélisation analytique des biocapteurs
enzymatiques hautement sensible*



VI.1. Introduction

Dans le domaine des biocapteurs, les techniques électrochimiques telles que la voltamétrie cyclique (CV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) sont avérée avantageuse pour le développement de nouvelles méthodes de détermination des caractéristiques d'échantillons pharmaceutiques [1-2], environnementaux [3] et alimentaires [4]. Par conséquent, plusieurs chercheurs ont poursuivi l'étude du modèle de circuit équivalent pour l'interface qui comprend la géométrie de l'électrode et le paramètre d'électrolyte. Récemment, un biocapteur enzymatique ultrasensible a été développé [5-11].

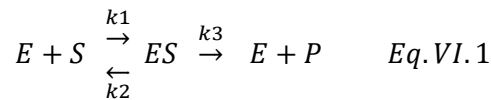
La préparation d'un nouveau biocapteur ultrasensible peut coûter très cher, car il peut nécessiter de nombreuses expériences en laboratoire. Il est sage de faire des expériences simulées avant les expériences réelles. Pour cette raison, une modélisation mathématique et une simulation du biocapteur devraient être mise au point. En génie chimique, la modélisation et la simulation sont des outils importants pour les ingénieurs et les chercheurs afin de mieux comprendre le comportement des processus chimiques. Le domaine de la modélisation est très utile pour concevoir et optimiser les usines chimiques, pour le contrôle des processus, pour la formation des opérateurs et pour la planification opérationnelle [12-16]

Les modèles mathématiques de la réponse des biocapteurs d'enzymes peuvent être modélisés en résolvant des équations aux dérivées partielles (EDP) de la diffusion des substrats et la conversion biocatalytique avec les conditions initiales et les conditions aux limites. La modélisation théorique des équations différentielles non linéaires dépendantes du temps pour les biocapteurs enzymatique implique l'utilisation d'un terme non linéaire lié au schéma cinétique de Michaelis-Menten pouvant être résolu analytiquement et numériquement. À cette fin, cet article vise à obtenir une expression analytique de la concentration du substrat et du produit à appliquer dans un biocapteur enzymatique hautement sensible en utilisant une méthode standard d'inversion d'une transformée de Laplace selon le théorème d'expansion de Heaviside.

VI.2. Modèle cinétique et mathématique

VI.2.1 Modèle cinétique

Le biocapteur électrochimique a été construit, dans de nombreux cas, en utilisant un système à trois électrodes. Une électrode de travail à enzyme modifiée, une électrode de référence Ag / AgCl et une contre-électrode de platine. La réaction enzymatique suivante a lieu dans l'électrode de travail [5]. L'utilisation de la spectroscopie électrochimique comme la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) dans ce domaine peut être utilisée pour discriminer et quantifier les différents processus déterminant la performance du biocapteur, tels que la résistance ohmique R_s , la résistance de transfert de charge R_{ct} , la résistance à la diffusion Z_w et la capacité C_{dl} (figure 1). Cependant, le modèle cinétique pour une action enzymatique, d'abord élucidé par *Michaelis et Menten* (Eq.VI.1), a suggéré la liaison de l'enzyme libre (E) au réactif ou substrat (S) formant un complexe enzyme-substrat (ES). Ce complexe subit une transformation en libérant le produit (P) et l'enzyme (E). Notez que la liaison du substrat est réversible mais que la libération du produit ne l'est pas. (Figure. VI.1).



Où k_1 , k_2 et k_3 sont les constantes vitesses (ou les coefficients de vitesse).

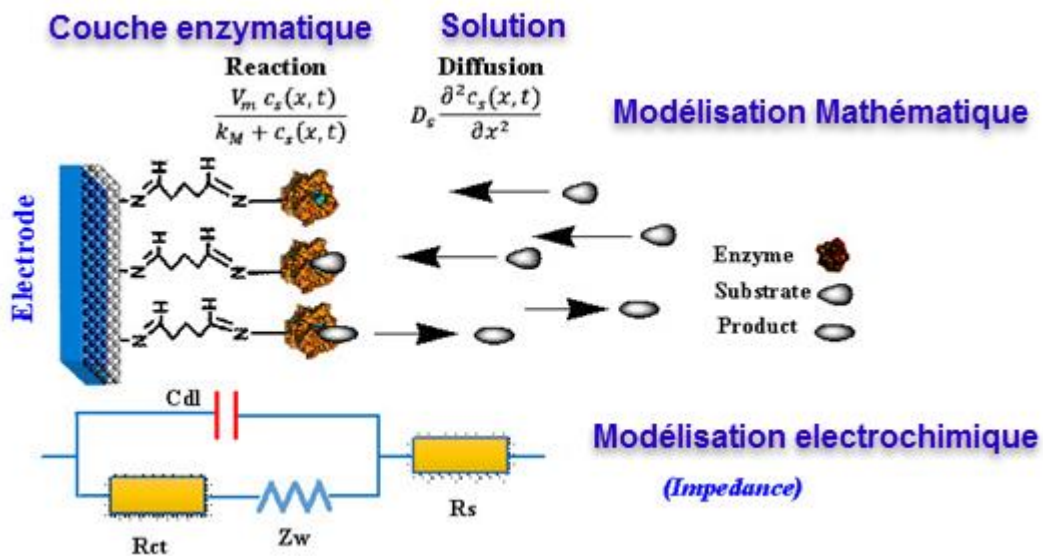


Figure. VI.1. Cinétique de la diffusion avec la réaction dans le processus du biocapteur.

VI.2.2 Modèle mathématique du biocapteur hautement sensible

En biocapteur, le couplage du transport du substrat avec la diffusion décrite par la loi de *Fick* en tenant compte de la réaction catalysée par une enzyme dans la couche enzymatique conduit aux équations suivantes :

$$\frac{\partial c_s(x, t)}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 c_s(x, t)}{\partial x^2} - \frac{V_m c_s(x, t)}{k_M + c_s(x, t)} \quad \text{Eq. VI. 2}$$

$$\frac{\partial c_p(x, t)}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 c_p(x, t)}{\partial x^2} + \frac{V_m c_s(x, t)}{k_M + c_s(x, t)} \quad \text{Eq. VI. 3}$$

Où x représente l'espace ; $c_s(x, t)$ et $c_p(x, t)$ sont les concentrations molaires du substrat S et du produit P dans la couche d'enzyme, respectivement ; V_m est le taux enzymatique maximal ; k_M est la constante de Michaelis ; d est l'épaisseur de la couche d'enzyme ; D_s et D_p sont les coefficients de diffusion. Pour un biocapteur enzymatique hautement sensible, la quantité de substrat est faible, nous avons vu que : La quantité de substrat c_s est négligeable par rapport à la valeur de la constante de Michaelis, k_M . Alors, les équations (Eq.VI.3) et (Eq.VI.4) seront réduites à la forme suivante :

$$\frac{\partial c_s(x, t)}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 c_s(x, t)}{\partial x^2} - \frac{V_m}{k_M} c_s(x, t) \quad \text{Eq. VI. 4}$$

$$\frac{\partial c_p(x, t)}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 c_p(x, t)}{\partial x^2} + \frac{V_m}{k_M} c_s(x, t) \quad \text{Eq. VI. 5}$$

$$\text{avec} \quad \begin{cases} c_s = 0, & c_p = 0, & t = 0; & 0 \leq x \leq d \\ \frac{\partial c_s(x, t)}{\partial x} = 0, & c_p = 0, & t > 0; & x = 0 \\ c_s = c_s^0, & c_p = 0, & t > 0; & x = d \end{cases} \quad \text{Eq. VI. 6}$$

VI.2.3 Forme sans dimension du problème

Les paramètres suivants sont utilisés pour convertir les équations Eq.VI.4 et Eq.VI.5 ci-dessus en formes sans dimension. Nous transformons les équations aux dérivées partielles non linéaires ci-dessus sous une forme sans dimension en définissant les paramètres suivants :

$$X = \frac{x}{d}, \quad T = \frac{D_s t}{d^2}, \quad C_S = \frac{c_s}{c_s^0}, \quad C_P = \frac{c_p}{c_s^0}, \quad D_s = D_p = D, \quad a = \frac{V_m d^2}{D k_M}$$

Les équations Eq.VI.4 et Eq.VI.5 se réduisent sous la forme sans dimension suivante :

$$\frac{\partial C_S(X, T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 C_S(X, T)}{\partial X^2} - a C_S(X, T) \quad \text{Eq. VI. 7}$$

$$\frac{\partial C_P(X, T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 C_P(X, T)}{\partial X^2} + a C_S(X, T) \quad \text{Eq. VI. 8}$$

Les conditions initiales et limites sans dimension sont les suivantes :

$$\begin{cases} C_S = 0, & C_P = 0, & T = 0; & 0 \leq X \leq 1 \\ \frac{\partial C_S(X, T)}{\partial X} = 0, & C_P = 0, & T > 0; & X = 0 \\ C_S = 1, & C_P = 0, & T > 0; & X = 1 \end{cases} \quad \text{Eq. VI.9}$$

VI.3 Solution analytique du biocapteur hautement sensible

En appliquant la transformation de Laplace aux équations différentielles partielles Eq.VI.7 et Eq.VI.8 et en utilisant les conditions de l'équation Eq.VI.9 les équations différentielles transformées suivantes sont obtenues. Pour cela il faut appliquer la méthode d'expansion et utilisation de l'inversion d'une transformée de Laplace pour résoudre ce système.

VI.3.1 Solution analytique pour déterminer l'évolution de la concentration du substrat

La transformée de Laplace réduit l'équation différentielle partielle (Eq.VI.7) à l'équation différentielle ordinaire (Eq.VI.10) :

$$\frac{\partial^2 \bar{C}_S(X, s)}{\partial X^2} - (s + a) \bar{C}_S(X, s) = 0 \quad \text{Eq. VI.10}$$

Avec des conditions aux limites :

$$\begin{cases} \frac{\partial \bar{C}_S(X, s)}{\partial X} = 0, & X = 0 \\ \bar{C}_S = \frac{1}{s}, & X = 1 \end{cases} \quad \text{Eq. VI.11}$$

Solution générale de cette équation :

$$\bar{C}_S(X, s) = A_1(s) e^{\sqrt{s+a} X} + A_2(s) e^{-\sqrt{s+a} X} \quad \text{Eq. VI.12}$$

Avec les conditions aux limites à $x = 0$ et $x = 1$, la solution est la suivante :

$$\bar{C}_S(X, s) = \left(\frac{1}{s} \frac{1}{e^{\sqrt{s+a}} + e^{-\sqrt{s+a}}} \right) [e^{\sqrt{s+a} X} + e^{-\sqrt{s+a} X}] \quad \text{Eq. VI.13}$$

Nous avons remarqué que la solution devienne la nouvelle fonction $F(X, s)$:

$$F(X, s) = \bar{C}_S(X, s) = \frac{e^{\sqrt{s+a} X} + e^{-\sqrt{s+a} X}}{s (e^{\sqrt{s+a}} + e^{-\sqrt{s+a}})} \quad \text{Eq. VI.14}$$

La méthode standard d'inversion d'une transformée de Laplace consiste à utiliser le théorème de Résidu [17]. Selon le théorème d'expansion de Heaviside [18], la transformée inverse de $F(s)$ est donnée par le théorème de résidu. C'est à dire :

$$F(X, s) = \frac{P(X, s)}{Q(X, s)} \quad \text{Eq. VI.15}$$

Ici nous avons :

$$P(X, s) = e^{\sqrt{s+a} X} + e^{-\sqrt{s+a} X} \quad \text{Eq. VI.16}$$

$$Q(X, s) = s (e^{\sqrt{s+a}} + e^{-\sqrt{s+a}}) \quad \text{Eq. VI.17}$$

En d'autres termes, la solution d'inversion d'une transformée de Laplace es la suivante :

$$f(t) = L^{-1}\{F(s)\} = \sum_1^{\infty} \rho_n(t) \quad \text{Eq.VI. 18}$$

Si S_n : est un simple pôle de F (s), alors $\rho_n(t)$ est donné par :

$$\rho_n(t) = \frac{P(S_n)}{Q'(S_n)} e^{S_n t} \quad \text{Eq.VI. 19}$$

Où $Q'(s_n)$ est la valeur de $\frac{dQ}{dt}$ évaluée au point d'intérêt singulier.

Rappeler que :

$$\frac{P(s)}{Q'(s_n)} = \lim_{s \rightarrow s_n} \frac{P(s)}{\left[\frac{Q(s) - Q(s_n)}{s - s_n} \right]} = \lim_{s \rightarrow s_n} (s - s_n) \frac{P(s)}{Q(s)} \quad \text{Eq.VI. 20}$$

Donc, ce Q simple zéro, situé dans les deux cas :

- Le premier pôle simple lorsque $S = 0$

$$\rho_0(t) = \lim_{s \rightarrow 0} (s - 0) \frac{P(s)}{Q(s)} e^{st} = \frac{e^{\sqrt{a}x} + e^{-\sqrt{a}x}}{(e^{\sqrt{a}} + e^{-\sqrt{a}})} \quad \text{Eq.VI. 21}$$

- le deuxième pôle : Quand : $s_n = \frac{-\pi^2(2n+1)^2 - 4a}{4}$

L'application de l'équation (Eq.VI.19) donne :

$$\rho_n(T) = \frac{\pi(2n+1)(-1)^{-n} \left(\cos \frac{\pi(2n+1)}{2} X \right)}{-(\pi^2(2n+1)^2 + 4a)/4} e^{\frac{-\pi^2(2n+1)^2 - 4a}{4} T} \quad \text{Eq.VI. 22}$$

Nous pouvons utiliser ces résultats pour obtenir l'inversion d'une transformée de Laplace pour la solution analytique de concentration de substrat, solution analytique donnée par :

$$C_S(X, T) = \frac{e^{\sqrt{a}x} + e^{-\sqrt{a}x}}{(e^{\sqrt{a}} + e^{-\sqrt{a}})} - 2 \sum_1^{\infty} (-1)^{-n} \frac{\lambda_n e^{-aT}}{\lambda_n^2 + a} \cos(\lambda_n X) e^{-\lambda_n^2 T} \quad \text{Eq.VI. 23}$$

$$\text{Avec : } \lambda_n = \pi(n + 1/2)$$

VI.3.2 Solution analytique pour déterminer l'évolution de la concentration du produit

On adopte la même procédure de calcul appliquée précédemment.

Après addition de l'Eq.VI.7 à l'Eq.VI.8 nous obtenons :

$$\frac{\partial(C_S(X, T) + C_P(X, T))}{\partial T} = \frac{\partial^2(C_S(X, T) + C_P(X, T))}{\partial X^2} \quad \text{Eq. VI. 24}$$

Nous devons introduire la nouvelle fonction $C_M(X, T)$:

$$C_M(X, T) = C_S(X, T) + C_P(X, T) \quad \text{Eq. VI. 25}$$

Nous obtenons un système d'équations différentielles ordinaires :

$$\frac{\partial C_M(X, T)}{\partial T} = \frac{\partial^2 C_M(X, T)}{\partial X^2} \quad \text{Eq. VI. 26}$$

En appliquant la transformation de Laplace dans l'équation Eq.VI.26 :

$$s \overline{C_M}(X, s) = \frac{\partial^2 \overline{C_M}(X, s)}{\partial X^2} \quad \text{Eq. VI. 27}$$

Avec

$$\begin{cases} \frac{\partial \overline{C_M}(X, s)}{\partial X} = 0, & ; X = 0 \\ \overline{C_M} = \frac{1}{s}, & ; X = 1 \end{cases} \quad \text{Eq. VI. 28}$$

La solution analytique de l'Eq.VI.27 avec les conditions initial et aux limite (Eq.VI.28) on obtient l'équation sous la forme :

$$\overline{C_M}(X, s) = F(X, s) = \frac{e^{\sqrt{s}X} + e^{-\sqrt{s}X}}{s(e^{\sqrt{s}} + e^{-\sqrt{s}})} \quad \text{Eq. VI. 29}$$

La solution analytique de l'Eq.VI.29 en utilisant la même méthode pour la résolution de l'équation Eq.VI.14 (cas $a = 0$), est la suivante :

$$C_M(X, T) = 1 - 2 \sum_1^{\infty} \frac{(-1)^{-n} (\cos \lambda_n X)}{\lambda_n} e^{-\lambda_n^2 T} \quad \text{Eq.VI.30}$$

En utilisant l'Eq.VI.23 dans l'équation Eq.VI.30, nous obtenons :

$$C_P(X, T) = \left[1 - \frac{e^{\sqrt{a}X} + e^{-\sqrt{a}X}}{(e^{\sqrt{a}} + e^{-\sqrt{a}})} \right] - 2 \sum_1^{\infty} (-1)^{-n} \frac{1}{\lambda_n} \cos(\lambda_n X) e^{-\lambda_n^2 T} \\ + 2 \sum_1^{\infty} (-1)^{-n} \frac{\lambda_n e^{-aT}}{\lambda_n^2 + a} \cos(\lambda_n X) e^{-\lambda_n^2 T} \quad \text{Eq.VI.31}$$

En utilisant l'équation Eq.VI.23 dans l'équation Eq.VI.29, nous obtenons

$$C_P(X, T) = \left[1 - \frac{e^{\sqrt{a}X} + e^{-\sqrt{a}X}}{(e^{\sqrt{a}} + e^{-\sqrt{a}})} \right] - 2 \sum_1^{\infty} (-1)^{-n} \frac{1}{\lambda_n} \cos(\lambda_n X) e^{-\lambda_n^2 T} \\ + 2 \sum_1^{\infty} (-1)^{-n} \frac{\lambda_n e^{-aT}}{\lambda_n^2 + a} \cos(\lambda_n X) e^{-\lambda_n^2 T} \quad \text{Eq.VI.32}$$

Après réarrangement, la solution de la concentration du produit est donnée par :

$$C_P(X, T) = \left[1 - \frac{e^{\sqrt{a}X} + e^{-\sqrt{a}X}}{(e^{\sqrt{a}} + e^{-\sqrt{a}})} \right] \\ + 2 \sum_1^{\infty} (-1)^{-n} \left(\frac{\lambda_n^2 (e^{-aT} - 1) - a}{\lambda_n (\lambda_n^2 + a)} \right) \cos(\lambda_n X) e^{-\lambda_n^2 T} \quad \text{Eq.VI.33}$$

VI.4 Résultats et discussions

VI.4.1 Validation de la solution analytique

Les solutions analytiques sont validées avec un ensemble de valeurs spécifique. Dans cet article, les données analytiques sont validées par des données numériques issues de la modélisation numérique avec le programme Matlab. La fonction `pdex4` du logiciel Matlab, qui est une fonction de résolution des problèmes de valeurs limites initiales pour les équations aux dérivées partielles paraboliques [19], est utilisée pour résoudre l'équation Eq.VI.7 et l'Eq.VI.8 pour les conditions aux limites correspondantes de l'Eq.VI.9.

La figure.VI.2 montre la réponse du biocapteur enzymatique pour diverses concentrations de substrat et de produit, deux cas sont acceptés $a = 0,1$ et $a = 1$ avec un temps différent $t = 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1$. Dans tous les cas, le pourcentage d'écart de la solution analytique par rapport au résultat numérique est moins de 1%. Ce qui est conforme. Les données modélisées avec une solution analytique sont très similaires aux données Matlab.

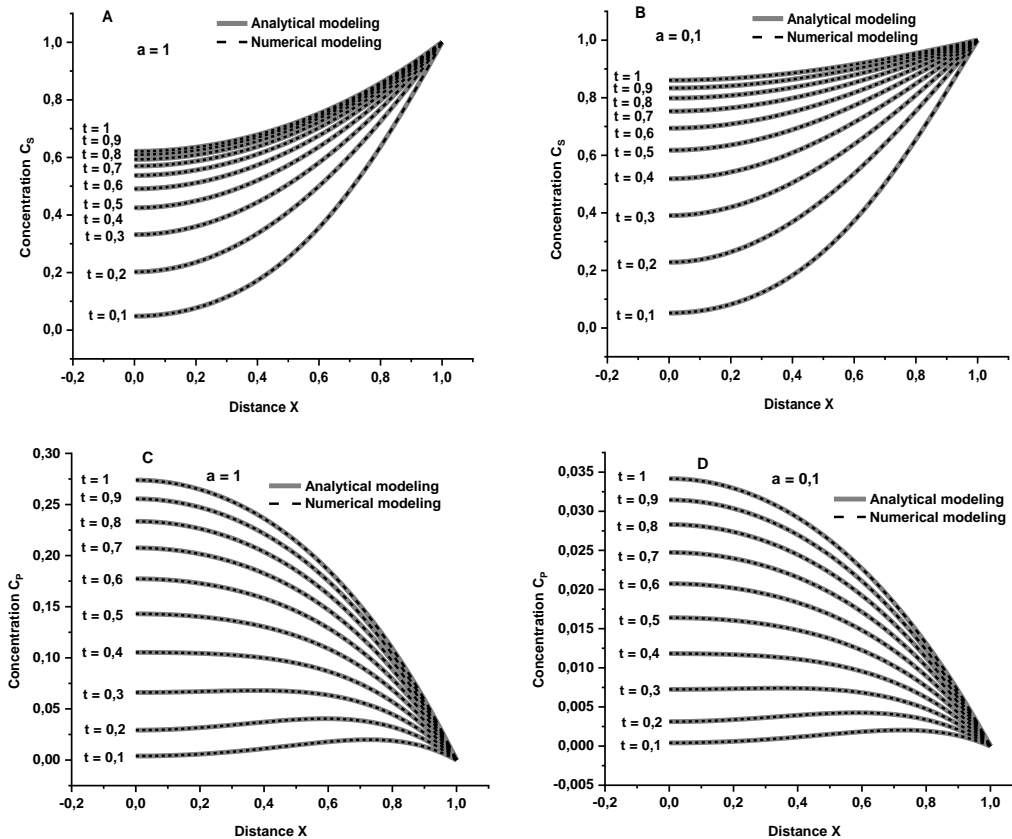


Figure .VI.2. Réponse de modélisation mathématique du biocapteur enzymatique A) substrat avec $a = 1$. B) Substrat avec $a = 0,1$ C), produit avec $a = 1$, D) produit avec $a = 0,1$

VI.4.2 Effet de la réaction - diffusion

Le modèle mathématique présenté ici dans l'équation Eq.VI.23 pour le substrat et l'Eq.VI.33 pour le produit utilise des équations de diffusion par des réactions catalysées par une enzyme bien développée. Elles ont été appliquées à un biocapteur enzymatique hautement sensible. Résultat de la solution mathématique illustrées par les Eq.VI.23 et Eq.VI.33 indiquent que la réponse du biocapteur est contrôlée par le facteur principal $a = \frac{V_m d^2}{D K_M}$.

Dans le cas des biocapteurs, le module de diffusion ou le nombre de Damkohler (a) compare essentiellement le taux de réaction enzymatique $\frac{V_m}{K_M}$ avec la diffusion $(\frac{D}{d^2})$ à travers la couche enzymatique.

Les figures.VI.3 et 4 montrent le profil de concentration pour différentes valeurs du nombre de Damkohler. Les faibles valeurs du nombre de Damkohler indiquent bien des contrôles de réaction de surface et qu'une quantité significative du réactif a bien diffusé dans la membrane sans réagir.

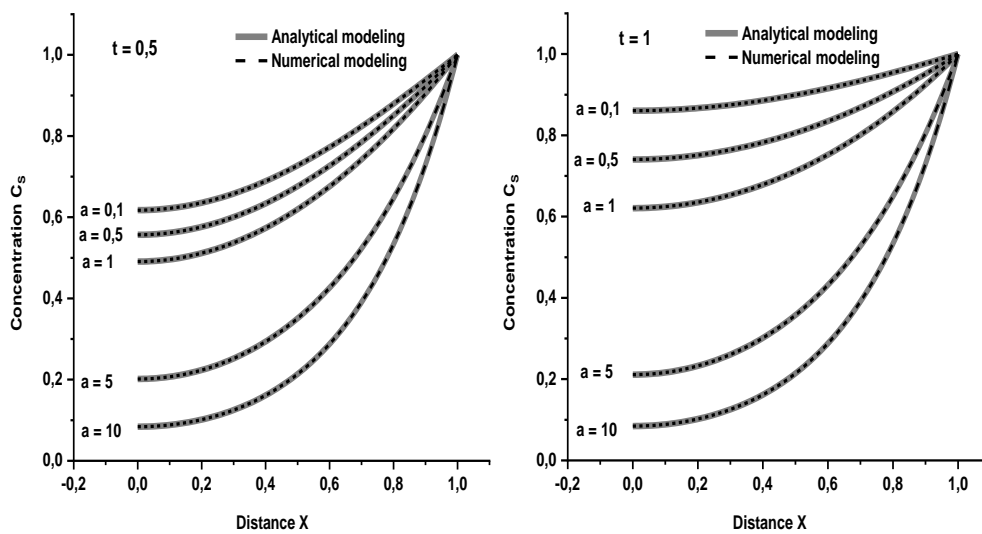


Figure. VI.3. Modélisation mathématique de l'évolution de la concentration du substrat

La figure.VI.4 montre facilement qu'avec la diminution du nombre de Damkohler, la dégradation de la concentration du substrat sans dimension augmente. À partir de la figure.VI.4 on constate que la concentration du produit diminue lorsque le nombre de Damkohler diminue.

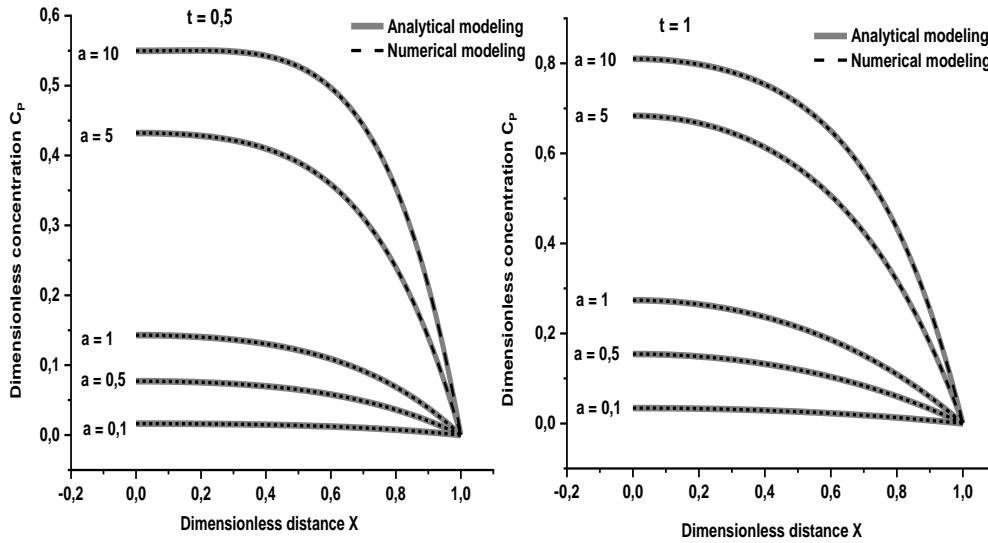


Figure.VI.4. Modélisation mathématique de la concentration du produit dans le biocapteur hautement enzymatique.

VI.5. Conclusion

Le modèle mathématique du biocapteur enzymatique hautement sensible est utilisé avec succès pour étudier la réponse des biocapteurs lorsque l'enzyme réagit avec son substrat pour produire un nouveau produit. L'expression analytique approximative du substrat et du produit final a été obtenue en utilisant une méthode standard d'inversion de la transformée de Laplace selon le théorème d'expansion de Heaviside pour résoudre les équations non linéaires couplées de diffusion et de réactions de Michaelis-Menten produites dans la couche enzymatique. Nos résultats sont comparés à la simulation numérique avec le logiciel MATLAB. Un bon accord est noté entre les résultats analytiques et numériques. La méthode analytique est une méthode extrêmement simple et une méthode prometteuse pour mieux comprendre le modèle des biocapteurs ultrasensible.

Références

- [1].DJAALAB, Elbahi, SAMAR, Mohamed, ZOUGAR, Saida, *et al.* Electrochemical Biosensor for the Determination of Amlodipine Besylate Based on Gelatin–Polyaniline Iron Oxide Biocomposite Film. *Catalysts*, 2018, vol. 8, no 6, p. 233.
- [2].GIL, Eric de Souza et MELO, Giselle Rodrigues de. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, vol. 46, no 3, p. 375-391.
- [3].WANEKAYA, Adam K., CHEN, Wilfred, et MULCHANDANI, Ashok. Recent biosensing developments in environmental security. *Journal of Environmental Monitoring*, 2008, vol. 10, no 6, p. 703-712.
- [4].VISWANATHAN, Subramanian, RADECKA, Hanna, et RADECKI, Jerzy. Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 2009, vol. 140, no 8, p. 891.
- [5].SETHURAMAN, V., MUTHURAJA, P., RAJ, J. Anandha, *et al.* A highly sensitive electrochemical biosensor for catechol using conducting polymer reduced graphene oxide–metal oxide enzyme modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, vol. 84, p. 112-119.
- [6].ZEHANI, Nedjla, FORTGANG, Philippe, LACHGAR, Mohamed Saddek, *et al.* Highly sensitive electrochemical biosensor for bisphenol A detection based on a diazonium-functionalized boron-doped diamond electrode modified with a multi-walled carbon nanotube-tyrosinase hybrid film. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, vol. 74, p. 830-835.
- [7].WANG, Xiaorui, HU, Jinming, ZHANG, Guoying, *et al.* Highly selective fluorogenic multianalyte biosensors constructed via enzyme-catalyzed coupling and aggregation-induced emission. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, vol. 136, no 28, p. 9890-9893.
- [8].TANG, Hao, YAN, Feng, LIN, Peng, *et al.* Highly sensitive glucose biosensors based on organic electrochemical transistors using platinum gate electrodes modified with enzyme and nanomaterials. *Advanced Functional Materials*, 2011, vol. 21, no 12, p. 2264-2272.
- [9].ZHENG, Zhaozhu, ZHOU, Yunlong, LI, Xinyu, *et al.* Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, vol. 26, no 6, p. 3081-3085.
- [10].LU, Jue, DRZAL, Lawrence T., WORDEN, Robert M., *et al.* Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets nafion membrane. *Chemistry of Materials*, 2007, vol. 19, no 25, p. 6240-6246.
- [11].LEE, Dohoon, LEE, Jinwoo, KIM, Jungbae, *et al.* Simple fabrication of a highly sensitive and fast glucose biosensor using enzymes immobilized in mesocellular carbon foam. *Advanced materials*, 2005, vol. 17, no 23, p. 2828-2833.
- [12].INGHAM, John, DUNN, Irving J., HEINZLE, Elmar, *et al.* *Chemical engineering dynamics: an introduction to modelling and computer simulation*. John Wiley & Sons, 2008.
- [13].YEO, Yeong Koo. *Chemical Engineering Computation with MATLAB®*. CRC Press, 2017.
- [14].AL-MALAH, Kamal. *MATLAB Numerical Methods with Chemical Engineering Applications*. McGraw-Hill Professional, 2013.
- [15].BUZZI-FERRARIS, Guido et MANENTI, Flavio. *Nonlinear systems and optimization for the chemical engineer: Solving numerical problems*. John Wiley & Sons, 2013.
- [16].ROSS, George. *Computer programming examples for chemical engineers*. Elsevier, 1987.
- [17].LONEY, Norman W. *Applied mathematical methods for chemical engineers*. CRC Press, 2006.

[18].MATHEWS, John et HOWELL, Russell. *Complex analysis for mathematics and engineering*. Jones & Bartlett Publishers, 2012.

[19].MATLAB & Simulink, www.mathworks.com/help/matlab/ref/pdepe.html, 2018/09/07

Conclusion Générale

Nous avons présenté dans ce travail de thèse une étude théorique et expérimentale sur le développement des (bio)capteurs pour l'amélioration de la détection des produits pharmaceutiques. L'ensemble des résultats obtenus a permis d'apporter de nouveaux modes de détection d'une importance fondamentale pour le contrôle médical et environnemental avec les notions de modélisation des systèmes de réaction-diffusion dans le processus du biocapteur.

Dans un premier temps, la composite polyaniline/ Fe_2O_3 conducteur a été synthétisée avec succès par une simple procédure chimique. L'analyse FTIR confirme la structure chimique de PANI/ Fe_2O_3 . Les spectres UV-vis confirment la formation de polymères.

La présente étude a montré que l'électrode de Pt modifiée par PANI/ Fe_2O_3 -Ge-CRL était un très bon support pour la réalisation d'un biocapteur CRL sensible pour l'analyse de l'AMD. Le comportement cathodique de l'AMD a été étudié à un potentiel de -0,185V.

Au cours de la deuxième étude, nous avons appliqué avec succès une méthode de voltampérométrie cyclique pour l'élaboration de l'électrode de platine modifiée par le PANI- β -CD par polymérisation électrochimique de β -CD / aniline. Les β -cyclodextrines inhibent la vitesse de polymérisation du film de polyaniline.

Cette étude a montré que l'électrode de Pt modifiée par PANI- β -CD est un très bon transducteur pour la réalisation d'une électrode sensible modifiée pour l'analyse de la pénicilline. Le comportement électrochimique de Peni-V a été étudié, dans les mêmes conditions opératoires en utilisant les deux techniques électrochimiques à savoir : la méthode potentiométrique et l'impédimétrie. Des relations linéaires entre le courant de pics et la résistance en fonction de la concentration de Peni-V (fonction logarithmique) ont été établis.

Dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés au développement et modélisation de la réponse d'un biocapteur. Le modèle mathématique non dimensionnel du biocapteur enzymatique bio-catalytique peut être utilisé avec succès pour étudier la réponse des biocapteurs. Les résultats montrent qu'Excel est un outil mathématique puissant pour résoudre les problèmes de valeurs initiales des équations différentielles partielles avec des conditions aux limites. Le changement des paramètres de l'équation nous donne des résultats immédiats. Cela nous montre la puissance de la feuille de calcul Excel dans la résolution numérique de la cinétique du biocapteur. Elle

est également utilisée pour déterminer la dépendance de la concentration en substrat non dimensionnel et la concentration du produit sur le nombre de Damkohler. Le nombre de Damkohler indique que le taux de réaction est déterminé par le taux de diffusion ou le taux cinématique de l'enzyme. Le modèle théorique décrit ici peut être utilisé pour optimiser la conception du biocapteur enzymatique.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés au modèle mathématique du biocapteur enzymatique hautement sensible pour étudier la réponse des biocapteurs lorsque l'enzyme réagit avec son substrat pour produire un nouveau produit. L'expression analytique approximative du substrat et du produit final a été obtenue en utilisant une méthode standard d'inversion de Laplace selon le théorème d'expansion de Heaviside pour résoudre les équations non linéaires couplées de diffusion et de réaction de Michaelis-Menten produites dans la couche enzymatique. Nos résultats sont comparés à la simulation numérique avec le logiciel MATLAB. Un bon accord est noté entre les résultats analytiques et numériques. La méthode analytique est une méthode extrêmement simple et une méthode prometteuse pour mieux comprendre le modèle des biocapteurs ultrasensible.

Annexes

Annexe A : Feuille Excelle pour la modélisation du biocapteur

« Etape par Etape »

Le but de ce travail est de créer une feuille sur EXCEL qui calcule la solution numérique de la réaction - diffusion dans le processus du biocapteur enzymatique.

L'idée de base de l'approche numérique pour résoudre les équations différentielles est de remplacer les dérivés de l'équation du biocapteur enzymatique par des quotients de différence et d'examiner les relations entre S et P en (X , T) et ses voisins à une distance Δ X distante et à un temps Δ T plus tard.

Etudes cinétiques sur le temps dépendant du temps de réaction catalysé par une enzyme dans l'application d'un biocapteur avec une forme sans dimension du problème en question équation (5) et (6).

Pour résoudre l'équation (5) et (6) pour les conditions aux limites correspondantes (7) :

A1. Simulation numérique du biocapteur enzymatique : équation du substrat

Créez une nouvelle feuille de travail et une étiquette intitulée " Modélisation numérique de la réaction de diffusion cinétique dans un processus de biocapteur enzymatique avec Excel Spreadsheet», et :

Étape 1. Entrer les valeurs de l'espace et du temps (étape Δ x, et Δ t).

La valeur de γ peut être calculée avec une formule de cellule selon (ΔT/ΔX²).

La configuration initiale peut ressembler à la partie de la feuille de calcul illustrée à la figure 1.

Dans ce cas, la valeur de c 2 a b een est entré dans la cellule H10, U 0 à D5, UL dans G5, Δ x en B10, et Δ t dans E10. (Le résultat est présenté à la figure A1)

La valeur de ΔX est situé dans la cellule B8

La valeur de ΔT est situé dans la cellule B9

La valeur de est situé dans la cellule B10

La valeur de est situé dans la cellule B11

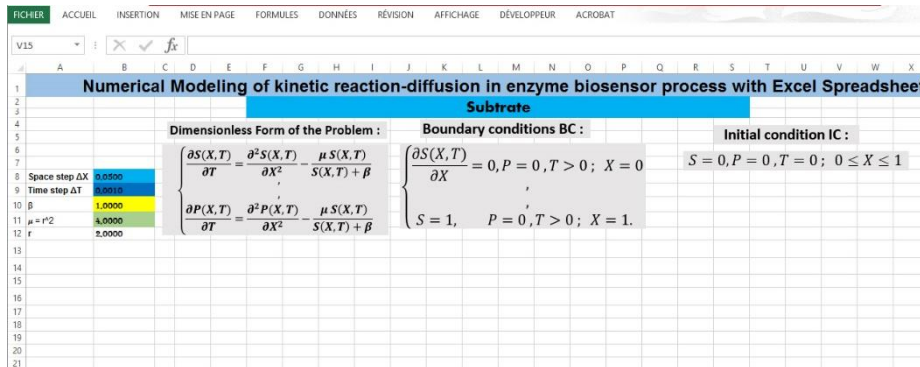


Figure A1: Créer une nouvelle feuille de calcul

Étape 2. Générez les points d'échantillonnage de l'intervalle spatial..

Entrez 0 (zéro) dans la cellule D14. Dans la cellule E14, tapez la formule = D14 + \$ B \$ 8 (notez la référence absolue à la cellule B8 qui contient Δ).

Copiez la formule de la cellule E14 dans la plage de cellules E14: X14. Le résultat pourrait ressembler à celui de la figure 2.

Étape 3. Générez les temps d'échantillonnage de l'intervalle de temps..

Entrez 0 (zéro) dans la cellule B16. Dans la cellule B17, tapez la formule = B17 + \$ B \$ 9 (notez la référence absolue à la cellule B9 contenant Δ).

Copiez la formule dans la cellule B17 dans la plage de cellules B23: B1016..

Annexes

Étape 4. Imposer l'état initial $S(x, 0) = S(x)$.

Tapé le 0 dans la cellule D16, et copier sur la plage de cellules E16: X16.

Étape 5. Imposer les conditions aux limites situées dans les cellules X.

Cette étape est accomplie en tapant la valeur 1 dans la cellule X17 et en la copiant dans la plage de cellules X17: X1016

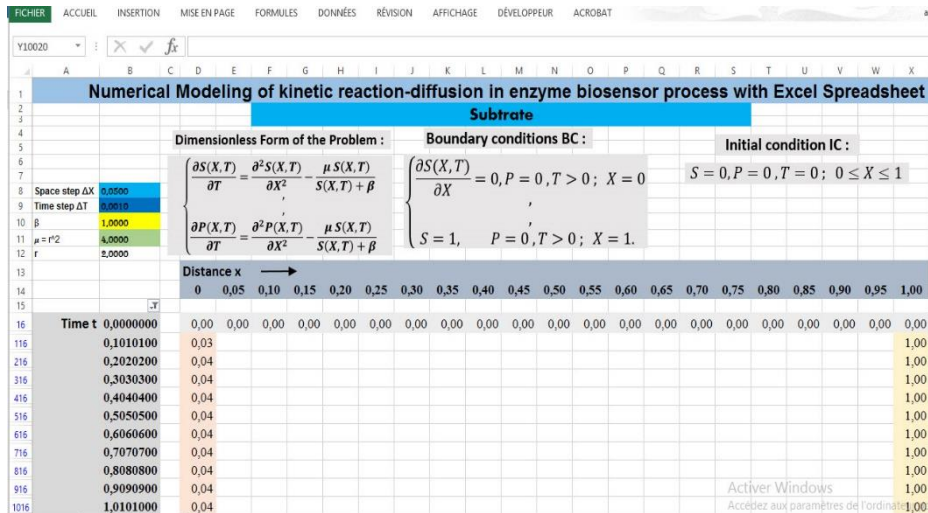


Figure A2. Feuille de calcul après avoir imposé les conditions aux limites et la condition initiale

Étape 6. Imposer les conditions aux limites situées dans les cellules D.

Ceci est accompli en tapant la formule

$$=(\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$E16-D16)-\$B\$9*(\$B\$11*D16/(\$B\$10+D16))+D16$$

dans la cellule D17 et en le copiant sur la plage de cellules D18: D1016;

De même, D18 = $(\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$E17-D17)-\$B\$9*(\$B\$11*D17/(\$B\$10+D17))+D17$.

$$D1016 = (\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$E1015-D1015) - \$B\$9*(\$B\$11*D1015/(\$B\$10+D1015))+D1015$$

Le résultat est présenté à la figure A2.

Étape 7. Calculer la solution numérique (cas du substrat)

Pour ce faire, tapez la formule

$$=(\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$D16-2*\$E16+\$F16)-\$B\$9*(\$B\$11*\$E16/(\$B\$10+\$E16))+\$E16$$

dans la cellule E17

(notez la référence absolue à la cellule B14 pour la valeur de β)

(notez la référence absolue à la cellule B15 pour la valeur de)

Copiez la formule de la cellule E17 dans la plage de cellules F17: W17.

Copiez la formule dans E17: W17 sur la plage de cellules E10016: W1016.

$$E17 = (\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$D16-2*\$E16+\$F16)-\$B\$9*(\$B\$11*\$E16/(\$B\$10+\$E16))+\$E16$$

$$W17 = (\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$V16-2*\$W16+\$X16)-\$B\$9*(\$B\$11*\$W16/(\$B\$10+\$W16))+\$W16$$

$$W10016 = (\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(\$V10015-2*\$W10015+\$X10015)-$$

$$\$B\$9*(\$B\$11*\$W10015/(\$B\$10+\$W10015))+\$W10015$$

A2. Simulation numérique du biocapteur enzymatique: équation de produit

Étape 1. Générez les points d'échantillonnage de l'intervalle spatial.

Entrez 0 (zéro) dans la cellule AK14. Dans la cellule AL14, tapez la formule = AK14 + \$ B \$ 8 (notez la référence absolue à la cellule B8 contenant Δ).
Copiez la formule de la cellule AK14 dans la plage de cellules AK14: BE14.

Étape 2. Générez les temps d'échantillonnage de l'intervalle de temps.

Entrez 0 (zéro) dans la cellule AI16. Dans la cellule AI17, tapez la formule = AI16 + \$ B \$ 9 (Notez la référence absolue à la cellule B9 qui contient ins Δ).
Copiez la formule de la cellule AI17 dans la plage de cellules AI17: AI1016. Le résultat pourrait ressembler à celui de la figure 3. Seules les 20 premières lignes sont représentées sur la figure. la cellule A670 affichera 3.275.

Étape 3. Imposer la condition initiale $P(x, 0) = P(x)$.

Pour ce faire, tapez 0 dans la cellule AK16 et copiez-le dans la plage de cellules. AL16: BE16.

Étape 4. Imposer les conditions aux limites situées dans les cellules X.

Cette étape est accomplie en tapant la valeur 0 dans la cellule BE17 et en la copiant dans la plage de cellules BE18: BE1016.

Step5. Imposer les conditions aux limites situées dans les cellules D5 et G5.

Ceci est accompli en tapant la formule = \$ D \$ 5 dans la cellule C15 et en la copiant dans la plage de cellules C16: C670;

cela explique la température (fixe) à l'extrémité gauche de la chaleur barre de conduite.

De même, en tapant la formule = \$ G \$ 5 dans la cellule W15 puis en le copiant sur la plage de cellules W16: W670 représentera la température à l'extrémité droite de la barre.

Une fois cette étape terminée, la feuille de calcul ressemblera à la figure 4 (ici encore, seules les 20 premières lignes sont affichées).

$$AK17=(\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(AL16-AK16) + \$B\$9*(\$B\$11*D16/(\$B\$10+D16)) + AK16$$

$$AK18=(\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(AL17-AK17) + \$B\$9*(\$B\$11*D17/(\$B\$10+D17)) + AK17$$

Step6. Calculer la solution numérique (cas du produit)

Pour ce faire, tapez dans la cellule AL17 la formule

$$=(\$B\$9/(\$B\$8*\$B\$8))*(D16-2*E16+F16)-\$B\$9*(\$B\$11*E16/(\$B\$10+E16))+E16$$

dans la cellule E17

Copiez la formule de la cellule AL17 dans la plage de cellules AM17: BD17.

Copiez la formule dans AL17: BD17 sur la plage de cellules AL10016: BD10016.

Annexe B: programme Matlab pour la modélisation de biocapteurs

La fonction intégrée pdepe de MATLAB® résout les problèmes des valeurs limites et initiales pour les équations aux dérivées partielles paraboliques / elliptiques de la forme [36] :

$$g\left(x, t, u, \frac{\partial u}{\partial x}\right) \frac{\partial u}{\partial t} = x^{-m} \frac{\partial}{\partial x} \left(x^{-m} f\left(x, t, u, \frac{\partial u}{\partial x}\right) \right) + r\left(x, t, u, \frac{\partial u}{\partial x}\right)$$

Où : $f(x, t, u, (\partial u / \partial x))$ est un terme de flux, $r(x, t, u, (\partial u / \partial x))$ est un terme source et $g(x, t, u, (\partial u / \partial x))$ est une matrice diagonale.

m peut être 0, 1 ou 2, correspondant à une symétrie de dalle, cylindrique ou sphérique, respectivement. Les équations aux dérivées partielles valent pour $t_0 \leq t \leq t_f$ and $a \leq x \leq b$.

L'intervalle $[a, b]$ doit être fini. (Voir <https://uk.mathworks.com/help/matlab/ref/pdepe.html>)

La condition initiale à $t = t_0$ est représentée par

$$u(x, t_0) = u_0(x)$$

et la condition aux limites en $x = a$ ou $x = b$ est donnée par [36]

$$p(x, t, u) + q(x, t) f\left(x, t, u, \frac{\partial u}{\partial x}\right) = 0$$

Une expression simple de la syntaxe pour pdepe est [36]

$$\text{sol} = \text{pdepe}(m, \text{pdefun}, \text{icfun}, \text{bcfun}, \text{xmesh}, \text{tspan})$$

où m est un paramètre correspondant à la symétrie du problème, pdefun est un handle d'une fonction qui définit les composants de l'équation aux dérivées partielles, icfun est un handle d'une fonction qui définit les conditions initiales, bcfun est un handle d'une fonction qui définit les conditions aux limites, et xmesh est un vecteur spécifiant les points auxquels une solution numérique est demandée pour chaque valeur de tspan . tspan est un vecteur spécifiant les points auxquels une solution est demandée pour chaque valeur de xmesh . pdepe renvoie les valeurs de la solution (sol) sur un maillage fourni dans xmesh .

Annexes

Matlab program to find numerical solution for biosensor modeling

```
function modeling_biosensor
m=0;
x =linspace(0,1);
t=linspace(0,10);
sol=pdepe(m,@pdex4pde,@pdex4ic,@pdex4bc,x,t);
u1=sol(:,:,1);
u2=sol(:,:,2);
%-----Plots and results-----
%--A surface plot is a good way to study a solution--
figure
surf(x,t,u1)
title('Numerical solution computed substrate')
xlabel('Distance x')
ylabel('Time t')
figure
surf(x,t,u2)
title('Numerical solution computed product')
xlabel('Distance x')
ylabel('Time t')
%-----Couple functions PDE for enzyme biosensor-----
function [c,f,s]=pdex4pde(x,t,u,DuDx);
c=[1;1];
f=[1;1].*DuDx;
a=4;% we use a to replace ?=(Vm*d^2)/(Ds*s0)
b=1;% we use b to replace ?=kM/s0
F1=-(a*u(1)/(b+u(1)));
F2=(a*u(1)/(b+u(1)));
s=[F1;F2];
%-----Initial conditions (IC)-----
function u0=pdex4ic(x);
u0=[0;0];
%----- boundary conditions (BC)-----
function [p1,q1,pr,qr]=pdex4bc(xl,u1,xr,ur,t);
p1=[0;0];
q1=[1;1];
pr=[ur(1)-1;ur(2)];
qr=[0;0];
```