



HAL
open science

**Etude du greffage d'enzymes sur des supports
inorganiques en oxyde de nickel et oxydes de silicium.
Réalisation d'un capteur enzymatique à base d'une
électrode palladium/oxyde de palladium**

Malik Abdul

► **To cite this version:**

Malik Abdul. Etude du greffage d'enzymes sur des supports inorganiques en oxyde de nickel et oxydes de silicium. Réalisation d'un capteur enzymatique à base d'une électrode palladium/oxyde de palladium. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1988. Français. NNT: . tel-01069979

HAL Id: tel-01069979

<https://theses.hal.science/tel-01069979v1>

Submitted on 30 Sep 2014

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

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

THESE

présentée par

Malik A. ABDUL
Ingénieur I.G.C.

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE ET DE
L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

Spécialité : Génie des Procédés

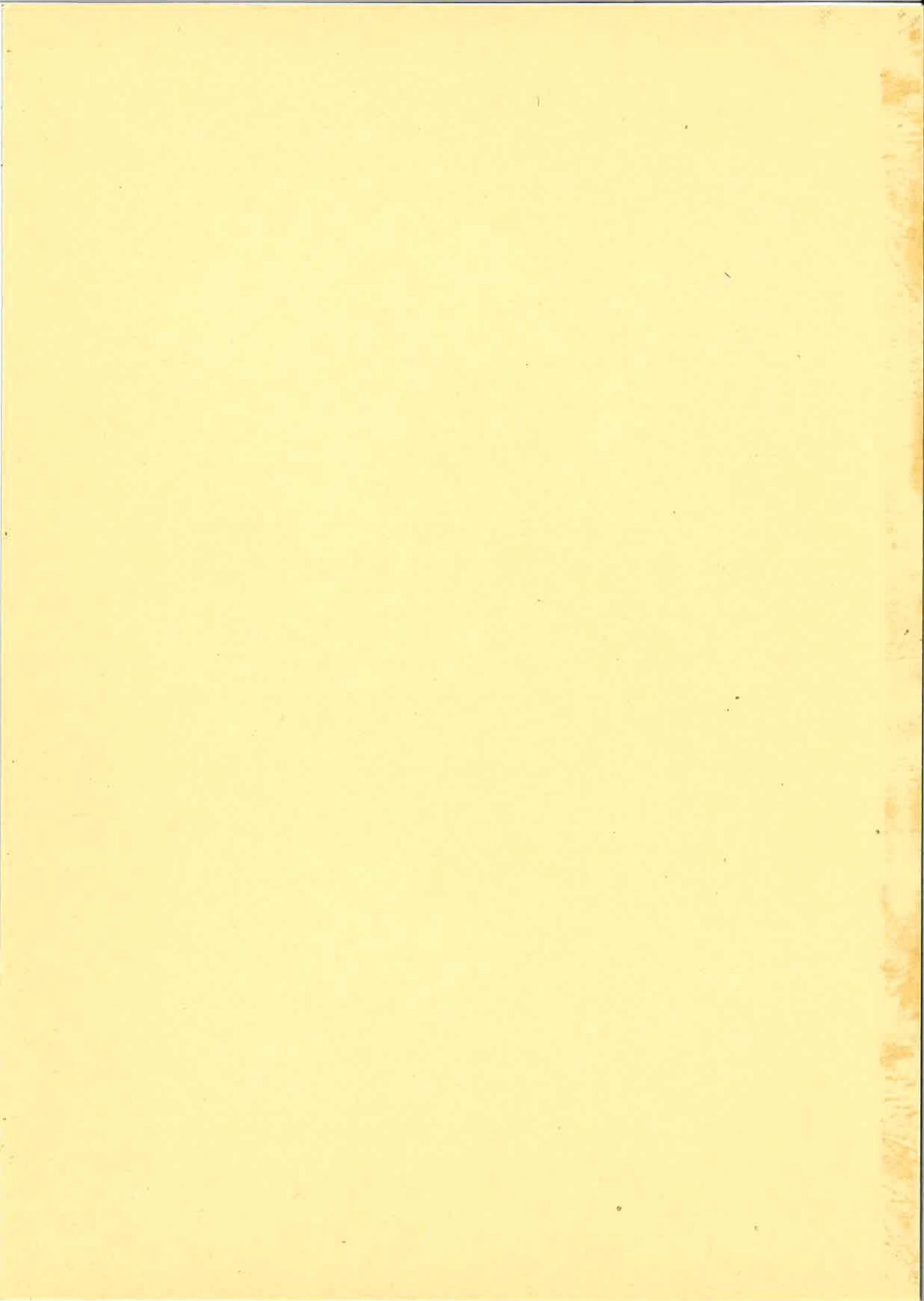
**Etude du greffage d'enzymes sur des supports inorganiques
en oxyde de nickel et oxydes de silicium**

**Réalisation d'un capteur enzymatique à base d'une électrode
palladium / oxyde de palladium**

soutenue à SAINT-ETIENNE le 15 Septembre 1988

composition du jury :

Monsieur	M. RENAUD	Président du jury
Messieurs	J. C. MARTIN J. D. R. THOMAS	Rapporteurs
Messieurs	R. PLANADE C. TRAN MINH J. WALLACH	Examineurs



THESE

présentée par

Malik A. ABDUL
Ingénieur I.G.C.

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE ET DE
L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

Spécialité : Génie des Procédés

**Etude du greffage d'enzymes sur des supports inorganiques
en oxyde de nickel et oxydes de silicium**

**Réalisation d'un capteur enzymatique à base d'une électrode
palladium / oxyde de palladium**

soutenue à SAINT-ETIENNE le 15 Septembre 1988

composition du jury :

Monsieur	M. RENAUD	Président du jury
Messieurs	J. C. MARTIN J. D. R. THOMAS	Rapporteurs
Messieurs	R. PLANADE C. TRAN MINH J. WALLACH	Examineurs

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT ETIENNE

Directeur	:	M. Philippe	SAINTE RAYMOND
Directeur des Etudes	:	M. Jean	CHEVALIER
Directeur des Recherches	:	M. François	MUDRY
Secrétaire Général	:	M. J. Claude	PLATEK

PROFESSEURS DE 1ère CATEGORIE

MM.	COINDE	Alexandre	Economie
	FORMERY	Philippe	Mathématiques Appliquées
	GOUX	Claude	Métallurgie
	LE COZE	Jean	Matériaux
	LOWYS	Jean-Pierre	Physique
	MATHON	Albert	Gestion
	PERRIN	Michel	Géologie
	PEROCHE	Bernard	Informatique
	PLA	Jean-Marie	Mathématiques
	RIEU	Jean	Mécanique-Résistance des Matériaux
	SOUSTELLE	Michel	Chimie
	VERCHERY	Georges	Mécanique et Matériaux

PROFESSEURS DE 2ème CATEGORIE

MM.	LADET	Pierre	Automatique
	TOUCHARD	Bernard	Physique Industrielle

DIRECTEUR DE RECHERCHE

M.	LESBATS	Pierre	Métallurgie
----	---------	--------	-------------

MAITRES DE RECHERCHE

MM.	BISCONDI	Michel	Métallurgie
	COURNIL	Michel	Chimie
	DAVOINE	Philippe	Hydrogéologie
	DRIVER	Julian	Matériaux
Mle	FOURDEUX	Angeline	Matériaux
MM.	GIRARDOT	Jean-Jacques	Informatique
	GUILHOT	Bernard	Chimie
	KOBYLANSKI	André	Métallurgie
	LALAUZE	René	Chimie
	LANCELOT	Francis	Génie Electrochimique-Biotechnologie
	MONTHEILLET	Franck	Matériaux
	THEVENOT	François	Génie des Matériaux
	THOMAS	Gérard	Chimie
	TRAN MINH	Cahn	Génie Electrochimique-Biotechnologie

PERSONNALITE HABILITEE A DIRIGER LES TRAVAUX DE RECHERCHE.

M.	MAGNIN	Thierry	Matériaux
----	--------	---------	-----------

PROFESSEUR A L'U.E.R. DE SCIENCES DE SAINT-ETIENNE

M.	VERGNAUD	Jean-Marie	Chimie des Matériaux
----	----------	------------	----------------------

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été menés au laboratoire Biotechnologie-Enzymes de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne sous la direction de Monsieur C. TRAN-MINH, Maître de Recherches de ce laboratoire, que je tiens à remercier ici pour m'avoir donné l'opportunité de les effectuer.

Je remercie par ailleurs Monsieur M. RENAUD, Professeur à l'Ecole Française de Papeterie de Grenoble, pour avoir honoré ce travail en tant que président de jury, ainsi que Monsieur J. C. MARTIN, Directeur de Recherches à l'E.S.C.I.L., et Monsieur J.D.R. THOMAS, Professeur à l'Université de Cardiff, pour avoir accepté le rôle de rapporteurs, en dépit de leurs nombreuses occupations pendant les mois de Juillet et de Septembre.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Monsieur J. WALLACH, Professeur à l'Université de Lyon, pour son rôle en tant que membre de jury, mais aussi pour ses avis personnels concernant le fond de ce travail, ainsi qu'à Monsieur R. PLANADE, Ingénieur au Centre d'Etudes du BOUCHET, qui, à tout moment, a montré l'intérêt qu'il portait aux résultats présentés ici, et y a vu une base de travail future commune. Je ne saurais oublier et remercier Monsieur P. CUNIN, Ingénieur de l'Armement pour avoir accepté, malgré les charges qui l'ont empêché d'assister à la soutenance orale, de juger ce travail.

Les spectres Infra-Rouge à Transformée de Fourier ont été effectués au Laboratoire du C.N.R.S. de Solaize. Mes remerciements vont tout particulièrement à Monsieur M. BARTHOLIN pour s'être occupé de ces spectres, et pour m'avoir aidé dans leur interprétation.

Je ne saurais oublier que l'aspect expérimental de ce travail présenté ici, de même que la réalisation pratique de ce manuscrit ont dû faire appel à de bonnes volontés ; merci à H. VAILLANT, M. C. BARTHOLIN, M. C. MATHAIS, A. M. DANNA et D. CHAVANNE pour avoir toujours répondu à mes sollicitations.

ORGANIGRAMME DE PRESENTATION

Etude du greffage
d'enzymes sur supports
inorganiques

Réalisation d'un capteur
métal/oxyde métallique à
enzymes immobilisées

Les supports choisis sont :

- l'oxyde de nickel NiO
- les oxydes du silicium SiO et SiO₂

Les méthodes de greffage choisies sont:

- l'activation au chlorure de cyanuryle pour NiO
- la silanisation par l'intermédiaire d'un silane aminé pour SiO et SiO₂

Les enzymes retenues pour le greffage sont :

- l'uréase pour NiO et SiO
- la butyrylcholinestérase pour SiO₂

Le métal choisi est le Palladium

L'immobilisation d'enzyme se fait par dépôt d'un gel enzymatique ou greffage de l'enzyme sur la partie sensible de l'électrode

Les enzymes retenues sont :

- l'uréase
- la butyrylcholinestérase

Modélisation de la réponse de l'électrode Pd/PdO à enzyme immobilisée

SOMMAIRE

	pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u>	
A - LES BIOCAPTEURS	2
A-I INTRODUCTION	2
A-II CONCEPTION DES BIOCAPTEURS	5
A-II-1 Biocapteurs obtenus par mise en contact d'une membrane biologique et d'un capteur électrochimique ou optoélectronique	
A-II-2 Biocapteur nécessitant la préparation ou l'activation du capteur électrochimique	
A-II-3 Biocapteurs utilisant des semi-conducteurs	
A-II-4 Propriétés des enzymes immobilisées	
B - PRESENTATION DU TRAVAIL	14
B-I CHOIX DES SUPPORTS	14
B-II CHOIX DES ENZYMES TEST	15
B-II-1 L'uréase : E.C. 3.5.1.5.	
B-II-2 La butyrylcholinestérase : E.C. 3.1.1.8.	
<u>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES</u>	
A - METHODES ANALYTIQUES - APPAREILLAGE	18
A-I SPECTROMÉTRIE INFRA-ROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER	18
A-I-1 Description	
A-I-2 Préparation de l'échantillon	
A-II PH-MÉTRIE - TITRIMÉTRIE	20
A-III SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE	22
A-IV LES SOLUTIONS TAMPONNÉES	24

A-V	EAU ULTRA-PURE	24
B	PRODUITS	24
<u>CHAPITRE 3 : ETUDES DU GREFFAGE D'ENZYMES SUR DES POUDRES INORGANIQUES</u>		
A	LE MONOXYDE DE SILICIUM COMME SUPPORT DE GREFFAGE	26
A-I	INTRODUCTION	26
A-II	PROCÉDÉS DE GREFFAGE D'ENZYME SUR LA POUDRE DE SiO	27
	A-II-1 Rappel sur la méthode appelée silanisation	
	A-II-2 Généralités	
	A-II-3 Procédé SiO-1 : Silanisation en présence de benzène	
	A-II-4 Procédé SiO-2 : Silanisation en phase aqueuse, à pH acide	
	A-II-5 Procédé SiO-3 : Silanisation en présence d'acétone	
	A-II-6 Traitement au glutaraldéhyde	
	A-II-7 Greffage d'enzyme sur la poudre Si(II)O activée	
A-III	SUIVI DE LA SILANISATION PAR LA SPECTROMÉTRIE INFRA-ROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER	33
A-IV	TEST DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE AU pH-STAT	33
	A-IV-1 Test pH-stat de la poudre traitée par le procédé SiO-1, utilisant le benzène.	
	A-IV-2 Test pH-stat de la poudre traitée par le procédé SiO-2, en phase aqueuse, à pH=4	
	A-IV-3 Test pH-stat de la poudre traitée par le procédé SiO-3, utilisant l'acétone.	
A-V	CONCLUSION	41
B	LA SILICE COMME SUPPORT DE GREFFAGE	42

B-I	INTRODUCTION	42
B-II	PROCÉDÉS DE GREFFAGE D'ENZYME SUR LA SILICE	42
	B-II-1 Généralités	
	B-II-2 Modes Opérateires	
	B-II-3 Interprétation des spectres IRTF	
B-III	TEST DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE AU SPECTROPHOTOMETRE	47
B-IV	TEST DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE APRES INHIBITION PAR LE PARAOXON	53
B-V	CONCLUSION	53
C -	L'OXYDE DE NICKEL COMME SUPPORT D'IMMOBILISATION	54
C-I	INTRODUCTION	54
C-II	PROCÉDÉS UTILISÉS POUR L'ACTIVATION DE L'OXYDE DE NICKEL	56
	C-II-1 Rappel et complément sur le mécanisme d'activation au chlorure de cyanuryle	
	C-II-2 Obtention de NiO hydraté	
	C-II-3 Activation NiO-1	
	C-II-4 Activation NiO-2	
	C-II-5 Activation NiO-3	
	C-II-6 Activation NiO-4	
C-III	CARACTÉRISATION DE L'EFFICACITÉ DU GREFFAGE PAR IRTF	60
	C-III-1 Rappels sur la méthode	
	C-III-2 Suivi d'un procédé de greffage par spectrométrie IRTF	
	C-III-3 Interprétation des spectres	
C-IV	OBTENTION D'UNE POUDRE ENZYMATIQUEMENT ACTIVE	66
	C-IV-1 Mode opératoire	
	C-IV-2 Test de l'activité enzymatique au pH - stat	
C-V	INFLUENCE DES DIFFÉRENTS PARAMETRES SUR L'EFFICACITÉ	

DE L'ACTIVATION	68
C-V-1	Activité de la poudre à uréase adsorbée
C-V-2	Influence du pré-traitement à la soude
C-V-3	Influence du mode d'activation sur l'activité enzymatique de la poudre
C-V-4	Influence du temps de traitement
C-V-5	Influence de la concentration en chlorure de cyanuryle
C-V-6	Conservation de l'activité enzymatique de la poudre d'oxyde de nickel à uréase greffée

C-VI CONCLUSION	84
------------------------	-----------

CHAPITRE 4 : REALISATION D'UNE ELECTRODE Pd/PdO A ENZYMES IMMOBILISEES

INTRODUCTION	85
A - MISE AU POINT D'UNE ELECTRODE Pd/PdO	87
A-I PRÉPARATION DE L'ÉLECTRODE DE pH EN Pd/PdO	87
A-I-1	Oxydation du Palladium
A-I-2	Présentation de l'électrode sous sa forme définitive
A-II CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉLECTRODE RÉALISÉE	89
A-II-1	Pentes moyennes de l'électrode Pd/PdO
A-II-2	Temps de réponse
A-II-3	Courbe d'étalonnage et dérive de l'électrode Pd/PdO
A-II-4	Définition du domaine de travail
A-II-5	Durée de vie de l'électrode Pd/PdO
A-III PRÉCAUTIONS DE FABRICATION ET D'EMPLOI	94
A-IV INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	95
B - MISE AU POINT DE L'ELECTRODE A MEMBRANE ENZYMATIQUE A BASE DE Pd/PdO	96
B-I ELECTRODE Pd/PdO À URÉASE	97
B-I-1	Dépôt d'un gel contenant l'uréase sur la partie sensible de l'électrode
B-I-2	Réponse de l'électrode en présence d'urée
B-I-3	Etalonnage de l'électrode enzymatique
B-I-4	Récupération de l'électrode
B-II ELECTRODE Pd/PdO À BUTYRYLCHOLINESTÉRISE	104

- B-II-1 Dépôt d'un gel contenant la butyrylcholinestérase (BuChE) sur la partie sensible de l'électrode.
- B-II-2 Réponse de l'électrode en présence de butyrylcholine
- B-II-3 Interprétations des interférences constatées par la choline
- B-II-4 Etalonnage de l'électrode à BuChE, et influence de la "force tampon"

C - MISE AU POINT DE L'ELECTRODE ENZYMATIQUE A BASE DE Pd/PdO ACTIVE 111

- C-I **PRÉLIMINAIRES: MISE AU POINT DE L'ÉLECTRODE Pd/PdO 111**
 - C-I-1 Mode opératoire
 - C-I-2 Caractéristiques

C-II ACTIVATION DE L'ÉLECTRODE ET GREFFAGE DE L'URÉASE EN MONOCOUCHE 113

- C-II-1 Définition
- C-II-2 Activation de l'électrode par traitement au chlorure de cyanuryle
- C-II-3 Greffage de l'uréase en monocouche
- C-II-4 Test de l'activité enzymatique de l'électrode
- C-II-5 Résultats et interprétation

C-III GREFFAGE DE L'URÉASE EN MULTICOUCHE 116

- C-III-1 Mode opératoire
- C-III-2 Résultats et discussion
- C-III-3 Vieillessement de l'électrode Pd/PdO à uréase greffée en "multicouches"

CONCLUSION 120

CHAPITRE 5 : MODELISATION DE LA REPONSE D'UNE ELECTRODE Pd/PdO A ENZYMES IMMOBILISEES

INTRODUCTION 122

- A - EQUATIONS DE BASE 122
- B - DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DES DIFFÉRENCES FINIES 125
- C - CALCUL DE LA REPONSE THÉORIQUE DE L'ELECTRODE 126
- D - RESULTATS ET INTERPRETATION 128

CONCLUSION 132

CONCLUSION 133

BIBLIOGRAPHIE 135

ANNEXES

ANNEXE 1 : DOSAGE DES FONCTIONS SILANOLS DES POUDRES D'OXYDES DE SILICIUM. 143

ANNEXE 2 : CALCUL DE LA VITESSE APPARENTE ET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT, POUR UNE POUDRE GREFFEE, DONT L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EST MESUREE AU pH-STAT. 144

ANNEXE 3 : TRANSFORMATION DE LINEWEAVER -BURK. 147

ANNEXE 4 : ORGANIGRAMME ET PROGRAMME DE MODELISATION. 148

LISTE DES SYMBOLES

A	Absorbance
c_T	Concentration en tampon phosphate (mole/l)
D_S, D_P	Coefficients de diffusion du substrat S et du produit P (m^2/s)
$\Delta G_{H_2O}^\circ$	Enthalpie libre de formation de l'eau (J/mole)
ΔG_{PdO}°	Enthalpie libre de formation de l'oxyde PdO (J/mole)
e	Epaisseur de la membrane enzymatique à la surface de l'électrode Pd/PdO (m)
$\epsilon_{\text{acétone}}$	Constante diélectrique de l'acétone
$\epsilon_{\text{benzène}}$	Constante diélectrique du benzène
ϵ_{DMSO}	Constante diélectrique du diméthylsulfoxyde
ECS	Potentiel absolu de l'électrode de référence au calomel saturé (V ou mV)
E	Potentiel absolu de l'électrode Pd/PdO (V ou mV)
E°	Potentiel standard de l'électrode Pd/PdO (V ou mV)
E_{ch}	Potentiel absolu de l'électrode Pd/PdO à butyrylcholinestérase immobilisée (V ou mV)
E_{ch}°	Potentiel absolu de l'électrode Pd/PdO à butyrylcholinestérase immobilisée en l'absence de butyrylcholine (V ou mV)
E_u	Potentiel absolu de l'électrode Pd/PdO à uréase immobilisée (V ou mV)
E_u°	Potentiel absolu de l'électrode Pd/PdO à uréase immobilisée en l'absence d'urée (V ou mV)
F	Nombre de Faraday
Φ	Diamètre du fil de palladium (mm)
K_a	Constante d'acidité (M)
K_h	Constante d'hydratation du gaz carbonique dissous dans l'eau
K_m	Constante de Michaelis (mole/l)
P	Produit de la réaction enzymatique
R	Constante des gaz parfaits (J/mole.K)
S	Substrat de la réaction enzymatique
S_0	Concentration en substrat loin de l'électrode enzymatique Pd/PdO (mole/l)
S(x), P(x)	Concentrations en substrat S et en produit P à une distance x de l'interface électrode-membrane enzymatique (mole/l)
t	Temps (h ou mn ou s)
T	Température (K ou °C)
t_{act}	Temps d'activation au chlorure de cyanuryle des poudres (h ou mn)
t_{sil}	Temps de silanisation des poudres (h ou mn)

V_m	Vitesse maximale de l'équation de Michaelis-Menten (mole/l.mn)
V_a	Vitesse apparente des poudres à enzymes immobilisées obtenue au pH-stat (mole/l.mn.gpoudre)
V_{am}	Vitesse apparente maximale des poudres à enzymes immobilisées obtenue au pH-stat (mole/l.mn.gpoudre)
$V_{m,gel}$	Vitesse maximale de l'équation de Michaelis-Menten au sein du gel d'uréase-albumine (mole/l.mn)
$V_{SiO_2}^O$	Cinétique à l'instant $t=0$ de l'hydrolyse de l'iodure de butyrylcholine par une poudre de silice à butyrylcholinestérase immobilisée (mole/l.mn.gSiO ₂)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

HSA	Human serum albumin (Albumine du sérum humain)
γ -APTS	γ -aminopropyltriéthoxysilane
BuChCl	Chlorure de butyrylcholine
BuChE	Butyrylcholinestérase
BuSChI	Iodure de butyrylthiocholine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTNB	Di-thio-dinitrobenzène
IRTF	Infra-rouge à Transformée de Fourier

INTRODUCTION

Les **biocapteurs** ou les **réacteurs à enzymes immobilisées** cherchent à utiliser au mieux les propriétés catalytiques de ces molécules : leur catalyse est spécifique d'un produit, ou au plus, d'une famille de produits, et ce dans des conditions de température et de pression très douces, comparer à celles qu'exigent les catalyseurs chimiques classiques. Fixer ces molécules dans des structures rigides permet de réutiliser leur activité catalytique, ce qui est irréalisable avec une enzyme libre.

Les biocapteurs et les réacteurs enzymatiques sont nés de l'association d'enzymes fixées et de supports, qui sont des capteurs dans le premier cas (électrodes, optrodes) et des garnissages inertes dans le second.

Les travaux que nous exposons ici portent sur l'étude de la fixation de deux enzymes, l'uréase et la butyrylcholinestérase, sur des supports en oxyde de nickel, oxydes de silicium et oxyde de palladium. Pour ce dernier support, l'objectif était la réalisation d'une électrode enzymatique miniaturisable.

Le travail effectué a été réparti en 5 chapitres.

Des "rappels bibliographiques" permettront de situer le cadre et les objectifs de l'étude ; ils seront ensuite suivis de l'exposé des "matériels et méthodes" utilisés, ces dernières étant essentiellement analytiques ; elles visent la détermination de l'efficacité des différents modes d'immobilisation testés, ainsi que la mesure de l'activité enzymatique des supports greffés.

Dans le **Chapitre 3**, nous aborderons les résultats obtenus pour le greffage d'uréase et de butyrylcholinestérase sur des supports granulaires en oxyde de nickel et oxydes de silicium.

Dans le **Chapitre 4**, nous présenterons l'électrode Pd/PdO réalisée et ses caractéristiques. Nous étudierons ensuite son comportement après dépôt d'un gel enzymatique ainsi que son comportement après activation de sa surface et greffage d'enzymes en monocouche ou en multicouches. Les résultats obtenus expérimentalement ont été approfondis par un modèle théorique qui sera exposé au **Chapitre 5**.

CHAPITRE 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

A - LES BIOCAPTEURS

A-I INTRODUCTION

Le champ des capteurs électrochimiques s'est élargi, et tourné vers une plus grande spécificité grâce à l'adjonction de molécules biologiques: enzymes, microorganismes.... Entre autres molécules intéressantes, la biochimie dispose d'une panoplie de catalyseurs, les enzymes, dont on a cherché à utiliser le pouvoir catalytique très élevé, dans des conditions très douces de température et de pression, et la grande spécificité. En immobilisant ces molécules dans des structures rigides qui leur préservent leur pouvoir catalytique, et en les associant à des capteurs existants, on a donné naissance à plusieurs générations de biocapteurs. Ce chapitre des "Biotechnologies" s'est ouvert il y a environ 20 ans [1]. Une bonne synthèse de DAVIS fait le point de l'avancement de ces biocapteurs, et de leur impact industriel [2].

D'une façon générale, tout biocapteur peut être schématisé comme suit:

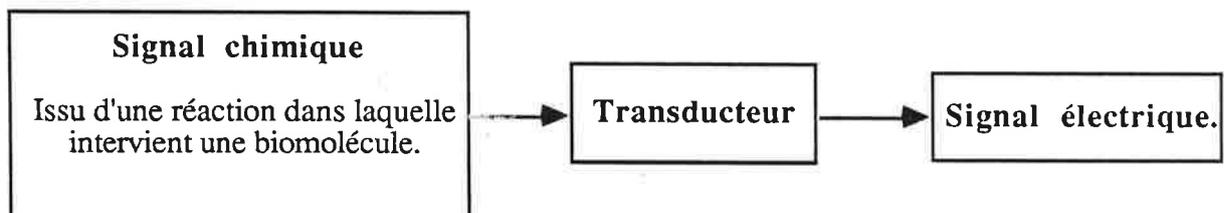


Figure 1: Schématisation d'un biocapteur

La réalisation d'un biocapteur fait appel à des disciplines aussi différentes que la Biochimie, l'Electrochimie, la Chimie, ou la Physique des Solides, ce qui peut être schématisé comme suit:

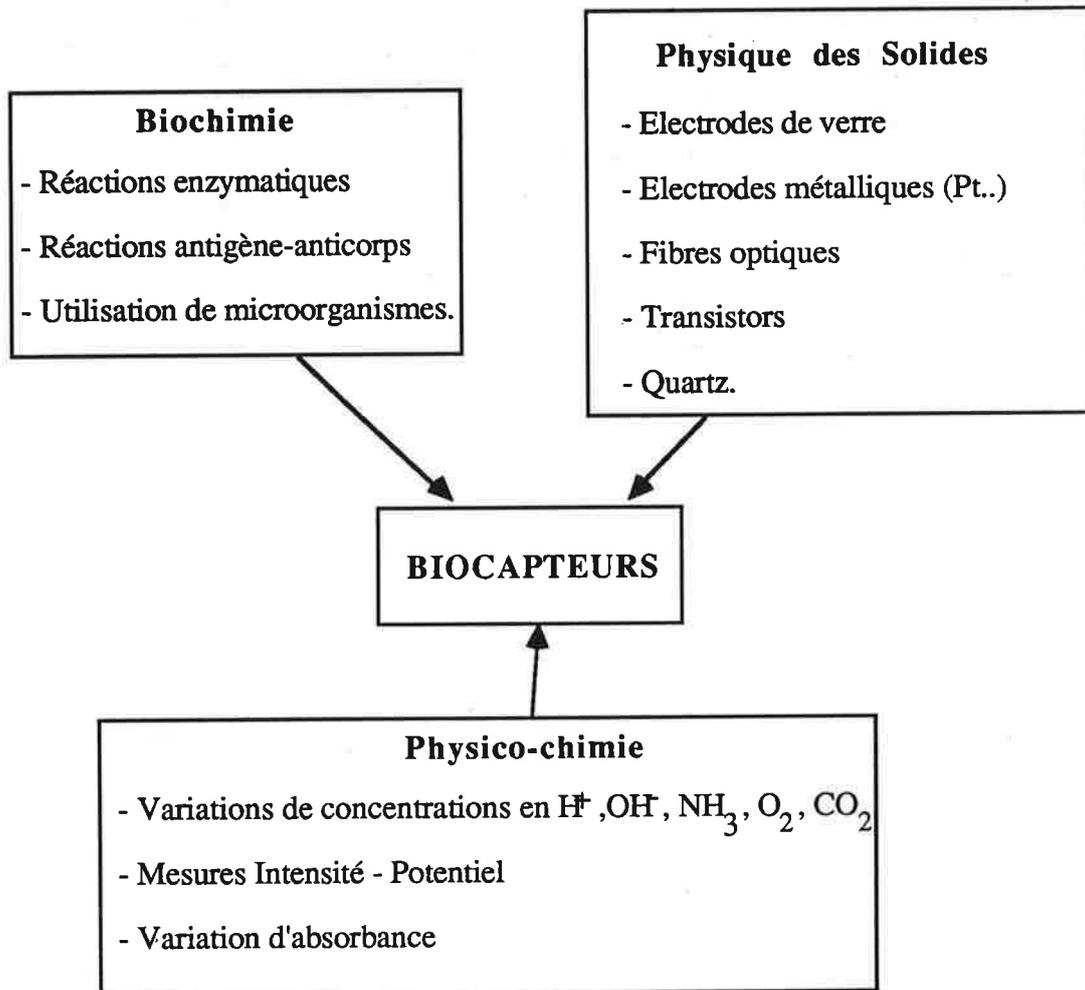


Figure 2: Différentes étapes dans la conception d'un biocapteur

L'évolution qu'on constate dans la mise au point de ces biocapteurs est sous-tendue par une recherche constante de performances nouvelles:

- Spécificité accrue vis-à-vis d'un produit ou d'une classe de produits.
- Limitation des interférences possibles.
- Souci constant de gagner en sensibilité et en temps de réponse.

Nous avons cherché à nous inscrire dans cette évolution: l'axe classique de notre laboratoire est la mise au point d'électrodes enzymatiques [3-5]; nous avons orienté notre étude vers la conception de nouveaux biocapteurs, en élargissant d'une part *le champ des capteurs électrochimiques*, d'autre part *les méthodes d'immobilisation d'enzymes sur ceux-ci*.

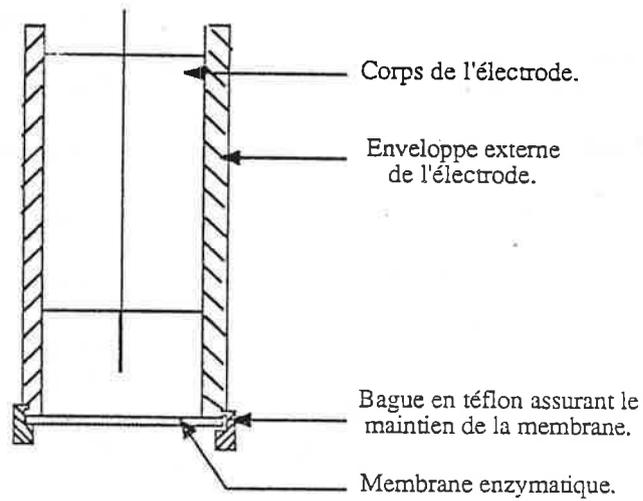


Figure 3 a : Schématisation d'une électrode enzymatique à butyrylcholinestérase [5]

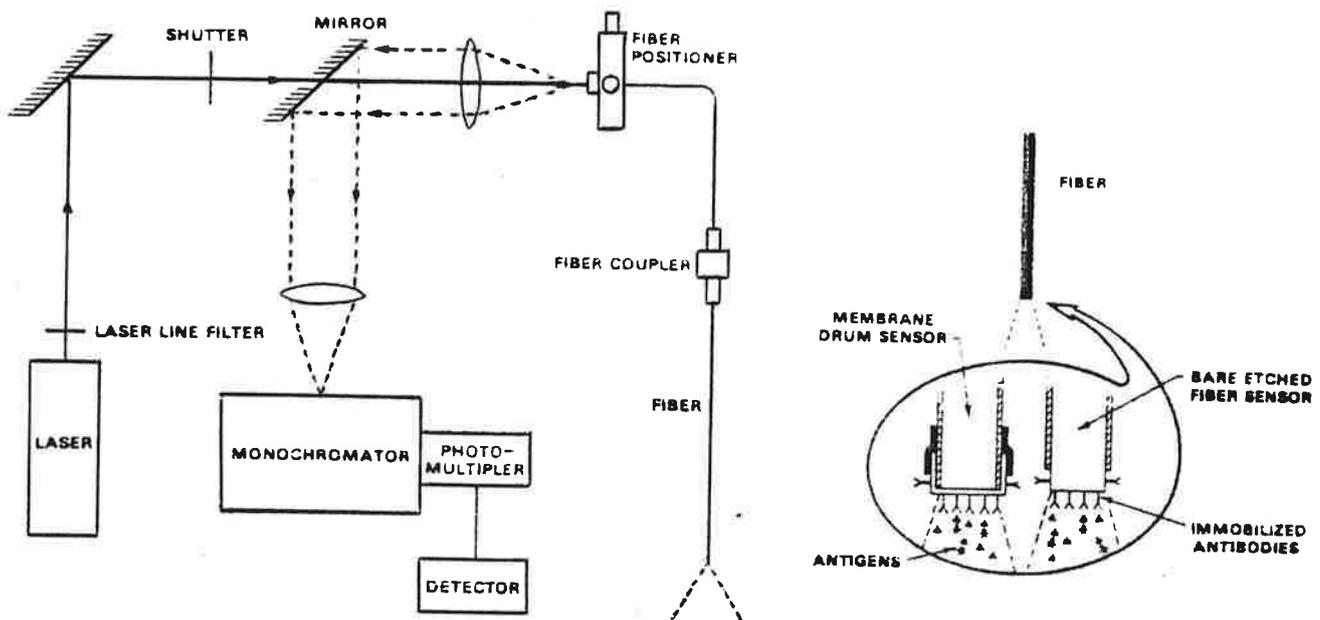


Figure 3 b : Schématisation d'un biocapteur à fibre optique à anticorps immobilisés [20].

A-II CONCEPTION DES BIOCAPTEURS

A-II-1 Biocapteurs obtenus par mise en contact d'une membrane biologique et d'un capteur électrochimique ou optoélectronique existant

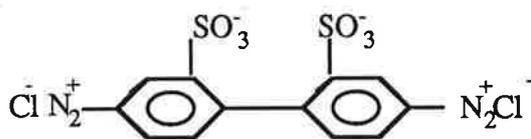
Les capteurs utilisés sont:

- des électrodes potentiométriques de pH [6-9], pNH₃ [10-12].
- des électrodes ampérométriques [13-15].
- des électrodes à antimoine [16], ou en platine [17-18].
- des capteurs conductimétriques [19].
- plus récemment, des fibres optiques [20-25], ou des cristaux piezoélectriques [26].

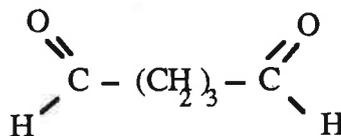
La membrane enzymatique qui leur est associée étroitement, comme le montrent les Figures 3 a et 3 b, est un film dans lequel l'enzyme a été incorporée préalablement, physiquement ou chimiquement, tout en gardant tout ou partie de son activité catalytique, celle-ci pouvant être réutilisée de nombreuses fois.

Les modes les plus couramment utilisés de fabrication de ces membranes enzymatiques sont les suivants:

- **la réticulation:** méthode chimique consistant à créer des liaisons covalentes avec un agent pontant: l'acide bis-diazobenzidine-2,2'-disulfonique et le glutaraldéhyde, sont les agents les plus utilisés; leurs formules respectives sont les suivantes:



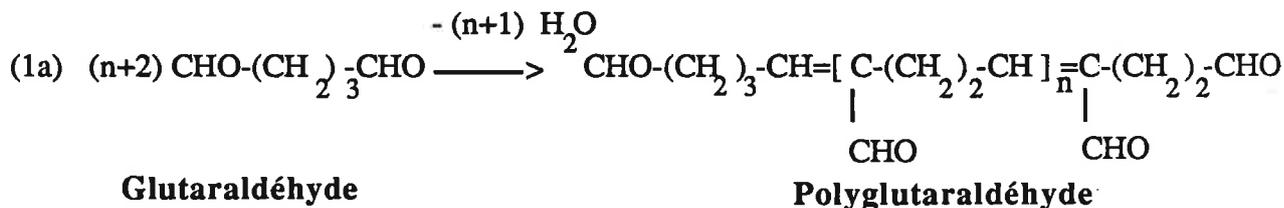
Acide bis-diazobenzidine-2,2'-disulfonique.



Glutaraldéhyde.

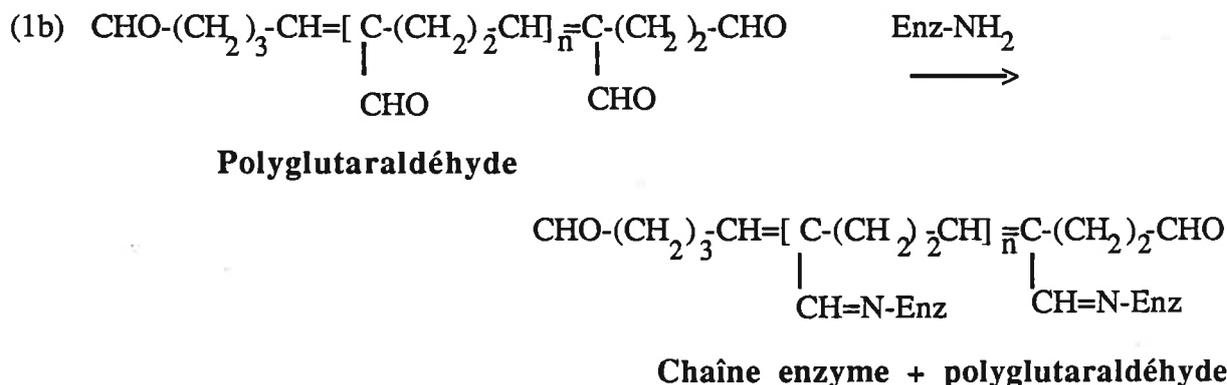
Exemples d'agents pontants.

Le mode d'action du glutaraldéhyde a été largement étudié [27]. Il est en général admis qu'aux pH auxquels on travaille pour réaliser les immobilisations d'enzymes (au voisinage de la neutralité), il se trouve sous une forme polymérisée comme le montre le schéma réactionnel (1a):



Formation du polyglutaraldéhyde.

Cette forme est propice à la formation de liaisons covalentes avec les fonctions amines présentes dans les enzymes (schéma réactionnel (1b)).



Réticulation enzyme - polyglutaraldéhyde

Il se forme alors un gel, et ce de façon irréversible. Ce gel est catalytiquement actif; le temps pendant lequel l'activité enzymatique est conservée dépend de la nature même de l'enzyme, ainsi que de facteurs mécaniques (cassures éventuelles du gel ...).

- *l'encapsulation*: méthode physique consistant à emprisonner la molécule dans un gel [28-33].

- *l'électropolymérisation*: cette méthode consiste à créer, à partir d'une solution de monomère, un polymère à la surface d'une électrode en platine, en se plaçant au bon

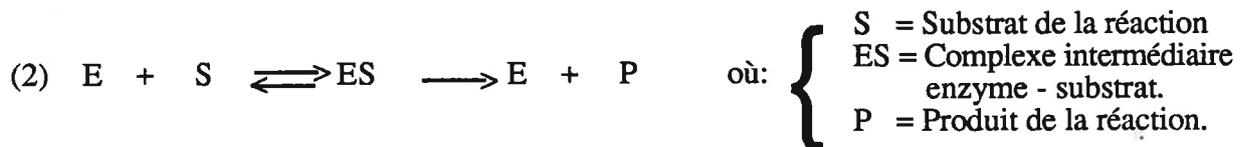
potentiel [34-35]. Si la solution de monomère contient aussi l'enzyme, une partie de celle-ci est prise au sein du film de polymère qui se forme à la surface de l'électrode.

Parmi les monomères utilisés, on peut citer: l'indole [36] et le pyrrole [37], qui forment des polymères conducteurs, et l'acrylamide [38].

Comment un biocapteur fonctionne-t-il ?

L'association du type de membrane décrit précédemment avec un capteur permet de suivre, dans un milieu, en continu ou en discontinu, un produit dont la transformation au sein de la membrane, catalysée par l'enzyme qui s'y trouve, libère ou consomme une entité (H⁺, OH⁻, CO₂, NH₃, H₂O₂...), que le capteur est susceptible de doser.

La cinétique de la réaction enzymatique, schématisée comme suit:



obéit à la loi de Michaelis-Menten [34]:

$$(3) \quad V_e = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{où: } \begin{cases} V_e = \text{vitesse de la réaction enzymatique.} \\ K_m = \text{constante caractéristique de l'enzyme} \\ V_m = \text{vitesse maximale de la réaction enzymatique} \\ \quad \text{dépendant de la quantité d'enzyme utilisée.} \end{cases}$$

L'évolution de la réaction au sein de la membrane enzymatique sera donc décrite par l'équation suivante:

$$(4) \quad V = V_e + V_d \quad \text{où: } \begin{cases} V_e = \text{vitesse enzymatique, décrite ci-dessus.} \\ V_d = \text{vitesse de diffusion au sein de la membrane,} \\ \quad \text{régie par la seconde loi de Fick.} \end{cases}$$

La spécificité et la sensibilité de ces méthodes enzymatiques sont souvent très grandes. On rencontre cependant deux lacunes importantes:

- Les films formés présentent des épaisseurs trop grandes, ce qui induit des problèmes de diffusion de substrat et de produit au sein de ces membranes [3][39].

- La résistance mécanique des films est faible. Il en résulte une perte d'activité enzymatique de la membrane due essentiellement à sa détérioration physique. Ce problème a été pallié partiellement par la mise au point de membranes enzymatiques utilisant des supports en nylon [5][40-43], ou autre polymère synthétique[44].

C'est avant tout pour limiter ces deux effets, et aussi pour atteindre des temps de réponse plus courts, que l'on a été amené à greffer directement les enzymes sur des supports solides.

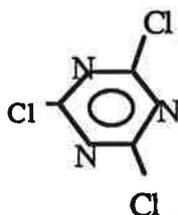
A-II-2 Biocapteur nécessitant la préparation ou l'activation du capteur électrochimique

Pour diminuer le temps de réponse des biocapteurs, on a donc été amené à réduire l'épaisseur de la couche enzymatique, et pour ce faire, immobiliser directement l'enzyme à la surface de l'élément sensible du capteur, par liaison covalente.

Les supports susceptibles d'être utilisés sont le graphite [45-47], le carbone vitreux [48-49], le couple métal/oxyde métallique [50-52].

Ces supports ne comportant pas de fonctions adéquates (OH, NH₂...), susceptibles de former des liaisons avec l'enzyme, on est amené, dans un premier temps, à créer ces fonctions à leur surface: c'est la phase d'activation. Une fois ces fonctions obtenues, la deuxième phase, qui est l'immobilisation proprement dite de l'enzyme, peut être effectuée.

Les principaux agents d'activation rencontrés dans la littérature sont les suivants: le chlorure de cyanuryle, le carbodiimide, et le γ -aminopropyltriéthoxysilane ou γ -APTS [53]. Leurs formules respectives apparaissent ci-dessous:

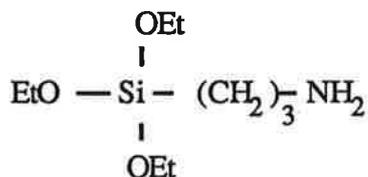


Chlorure de cyanuryle



où R et R' sont des alkyles.

Carbodiimide



γ - Amino-propyl-triéthoxysilane

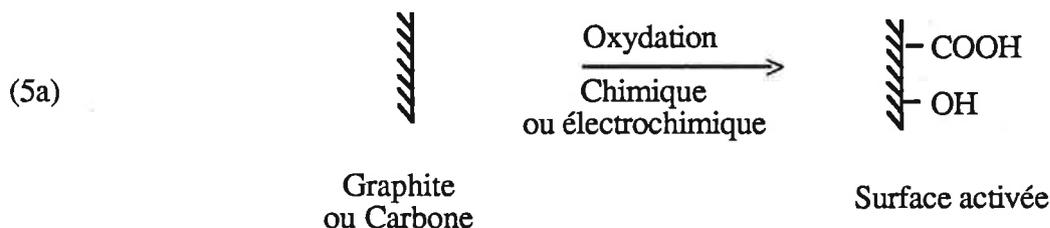
ou γ - APTS

Principaux agents d'activation utilisés

Deux exemples de supports traités :

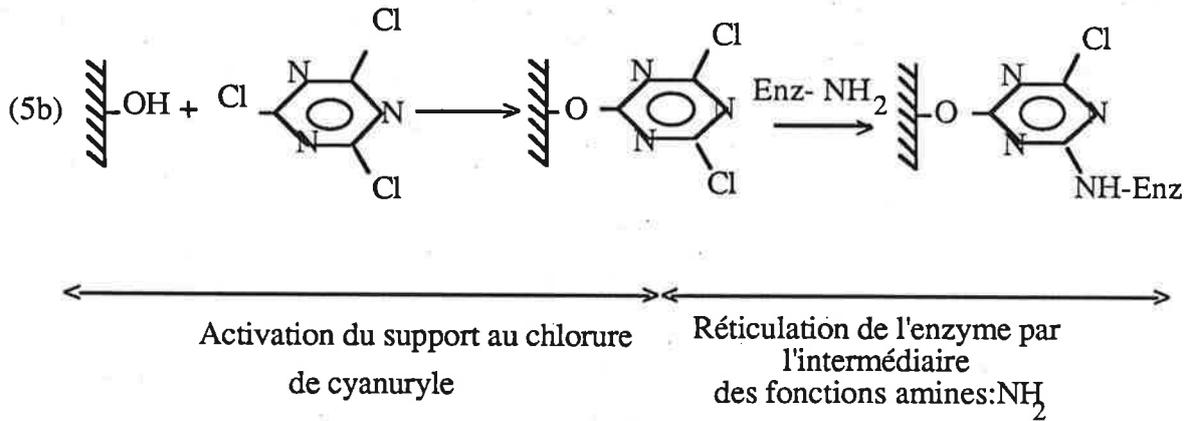
a) Le support est en carbone ou graphite

L'activation se fait ici par oxydation, chimique [54-55] ou électrochimique [56], du support, qui aboutit à la formation de fonctions acides ou alcools à sa surface. Ces fonctions permettent ensuite de greffer sur ce support, par liaisons covalentes, des agents pontants tels le carbodiimide, ou le chlorure de cyanuryle, comme le montre l'équation (5a).

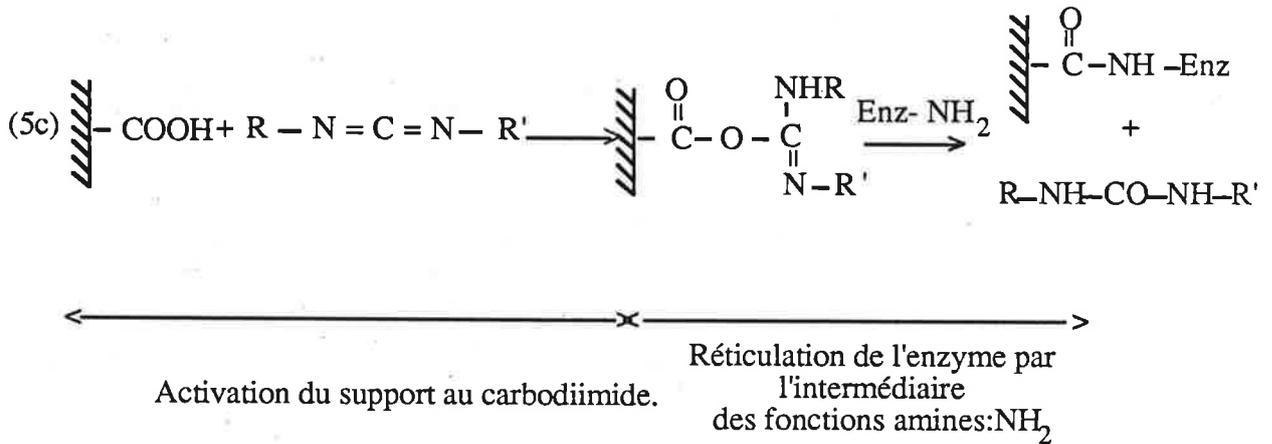


Création de fonctions OH à la surface du carbone ou du graphite.

L'immobilisation de l'enzyme est alors possible, et se fait suivant le schéma réactionnel (5b) quand on utilise le chlorure de cyanuryle, (5c) quand on utilise le carbodiimide.



Immobilisation de l'enzyme sur un support activé à l'aide du chlorure de cyanuryle



Immobilisation de l'enzyme sur un support activé à l'aide de carbodiimide

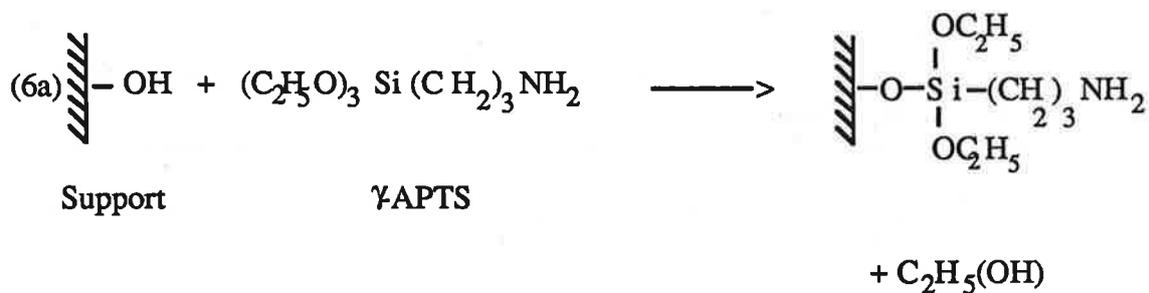
b) Le support est en oxyde métallique

L'oxyde métallique est préalablement hydraté, par chauffage dans de l'eau bouillante. Deux modes d'activation sont utilisables ensuite:

- Activation par le chlorure de cyanuryle [50], en une seule étape, qui se fait de la même façon que celle décrite ci-dessus pour le carbone, par le schéma réactionnel (5b).

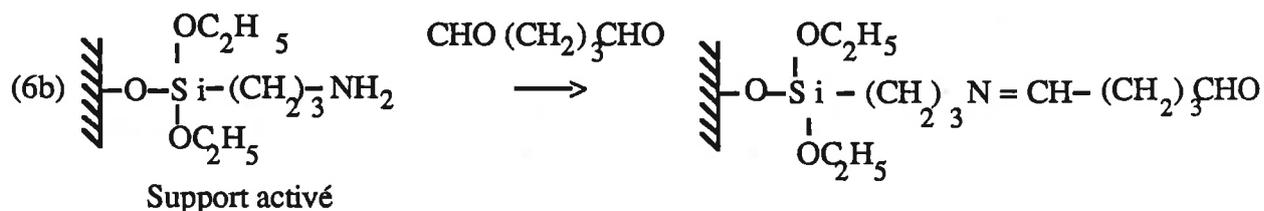
- "Silanisation", en deux étapes [57]: création de fonctions amine, par action du γ -aminopropyltriéthoxysilane (γ -APTS), suivi de l'association avec le glutaraldéhyde.

Ces deux étapes peuvent être résumées par les équations (6a) et (6b):



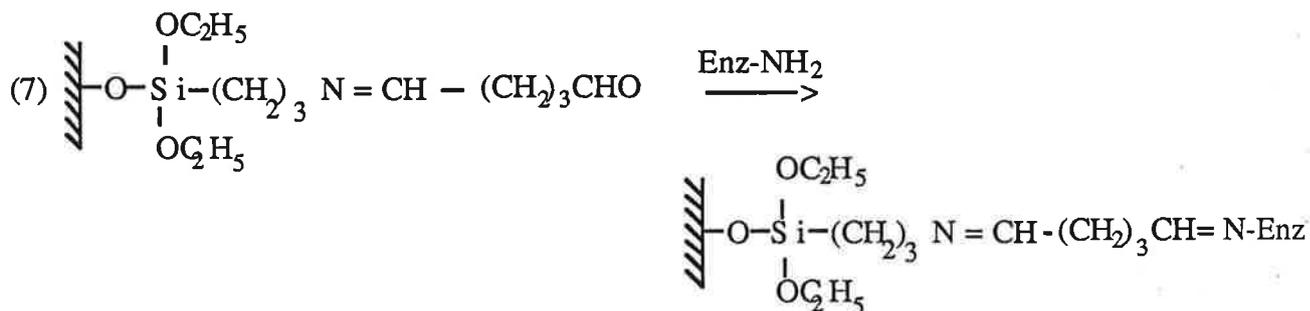
Activation du support en oxyde métallique:

cette réaction est obtenue:
soit en milieu aqueux (acide ou basique)
soit en milieu organique.



Support activé traité au glutaraldéhyde.

L'oxyde métallique ainsi activé est ensuite susceptible de fixer l'enzyme, comme le montre l'équation (7):



Association de l'enzyme avec le support traité

L'enzyme est notée sous la forme Enz-NH₂

Support	Modes d'immobilisation	Enzyme immobilisée	Biocapteur
Graphite	Chlorure de cyanuryle	Glucose oxydase	Electrode ampérométrique pour le dosage du glucose [45].
Pd / PdO	Co-réticulation albumine-glutaraldéhyde.	Uréase	Electrode potentiométrique pour le dosage de l'urée [52].
Sb / Sb ₂ O ₃	Carbodiimide Polyacrylamide Membrane BSA- Glutaraldéhyde	Pénicillinase	Capteur potentiométrique pour le dosage de la pénicilline[51].
Ti - Ir O ₂	Chlorure de cyanuryle.	Uréase	Capteur potentiométrique pour le dosage de l'urée [50].
Graphite	Carbodiimide	Phosphatase alcaline.	Dosage des ions Zn ²⁺ [46].
Carbone vitreux	Carbodiimide	Glucose oxydase	Electrode ampérométrique pour le dosage du glucose [48-49].

Tableau I: Exemples de biocapteurs

Comme on le voit dans la description des modes d'activation, l'enzyme est pratiquement immobilisée en "monocouche" sur l'élément sensible du capteur électrochimique. Le gain en épaisseur est alors considérable par rapport aux méthodes citées précédemment, en II-1; on en escompte un gain en sensibilité. Le risque encouru cependant est de détériorer l'élément sensible du support, par modification de sa surface.

Le tableau I donne quelques exemples de biocapteurs réalisés sur ces principes.

A-II-3 Biocapteurs utilisant des semi-conducteurs

Nous situons ces biocapteurs à part, en raison de l'importance qu'ils prendront vraisemblablement dans un avenir proche. En effet, des études sur les capteurs à semi-conducteurs sont actuellement menées, avec pour objectif la mise au point d'électrodes de pH basées sur ces matériaux [58-61], en remplacement des électrodes de verre classiques. Ces capteurs présentent l'avantage de pouvoir être miniaturisés par les techniques de fabrication des semi-conducteurs: on pourra voir apparaître des micro-capteurs biologiques à semi-conducteur.

Les deux méthodes précédemment décrites sont utilisées avec ce type de biocapteur; nous citerons en particulier des études actuellement en cours sur le greffage direct d'enzyme sur l'élément sensible des semi-conducteurs, qui visent la possibilité de dosages d'antigènes avec le capteur: (métal)-(semi-conducteur-SiO₂)-(anticorps de l'antigène à doser)[62].

A-II-4 Propriétés des enzymes immobilisées

L'emploi des enzymes immobilisées permet une catalyse hétérogène, avec pour principal avantage de pouvoir réutiliser l'activité catalytique de l'enzyme plusieurs fois. Cet objectif est en général atteint par toutes les méthodes que nous avons citées; les auteurs sont d'accord sur les faits suivants [63-69]:

- Le rendement à immobilisation est en général faible.
- Il y a un léger déplacement dans les conditions optimales de travail de l'enzyme, en particulier pH et température.

Les changements des propriétés enzymatiques sont dus à:

- *des effets conformationnels*: la conformation de l'enzyme, en particulier des acides aminés du site actif, est susceptible d'être modifiée par la réaction d'immobilisation.

- *des effets stériques*: des changements stériques de la molécule peuvent affecter les interactions enzyme-substrat.

- *des effets de partage*: la nature chimique du support peut intervenir, par des réactions électrostatiques ou hydrophobes avec les espèces de faible poids moléculaire présentes en solution. Le microenvironnement peut ainsi être modifié.

- *des effets de transfert de matière*: ceux-ci proviennent d'une résistance diffusionnelle au transport du substrat, de la solution vers les sites catalytiques, et inversement de la réaction vers la solution, pour le ou les produits générés.

Ces résistances diffusionnelles peuvent être classées de deux manières:

- soit comme des *effets de transfert de matière interne* quand l'enzyme est localisée dans un milieu poreux.

- soit comme des *effets de transfert de matière externe* qui peuvent avoir lieu entre la solution et la surface externe de la matrice enzymatique.

Il est évident que les modifications observées des propriétés enzymatiques après immobilisation sont la résultante des différents facteurs cités, l'effet de chaque facteur isolé étant difficile à déterminer.

B - PRESENTATION DU TRAVAIL

Deux orientations ont été données au travail présenté ici:

- La préparation de colonnes à catalyseur biochimique immobilisé.
- La conception de biocapteurs du type décrit au paragraphe II-2, c'est-à-dire mettant en jeu un capteur électrochimique, sur lequel on greffe directement les molécules biochimiques concernées.

L'étape commune aux deux orientations est l'étude de l'immobilisation directe des produits biologiques sur des supports inorganiques, ces supports variant suivant l'utilisation ultérieure escomptée.

B-I CHOIX DES SUPPORTS

Les supports utilisés dans ce travail sont les oxydes de silicium SiO et SiO₂, l'oxyde de nickel NiO, lesquels oxydes sont sous forme de poudre, et le palladium recouvert d'une couche d'oxyde de palladium PdO obtenue par oxydation thermique:

- l'oxyde de silicium SiO a été choisi afin d'élargir le champ des supports de greffage des produits biologiques destinés au garnissage des colonnes ou des réacteurs

- l'étude du greffage d'enzymes sur la poudre de silice SiO₂ s'inscrit dans le cadre d'une étude de faisabilité des capteurs à fibre optique. Ces fibres sont en général en silice

- les essais de greffage d'enzymes sur la poudre d'oxyde de nickel NiO sont préliminaires à la réalisation d'un capteur enzymatique à base de Ni/NiO

- l'immobilisation d'enzymes sur le support palladium/oxyde de palladium est un exemple de réalisation de capteur enzymatique.

On peut cependant noter ici que la technique d'étude du greffage d'enzyme dépend de la surface mise en jeu. Les problèmes posés ne sont pas les mêmes suivant que le support est un capteur (petite surface) ou une poudre (grande surface spécifique).

Dans le premier cas, on suit généralement le signal délivré par le biocapteur pour conclure sur l'efficacité du greffage. Dans le second cas, la technique la plus souvent employée est le pH-stat.

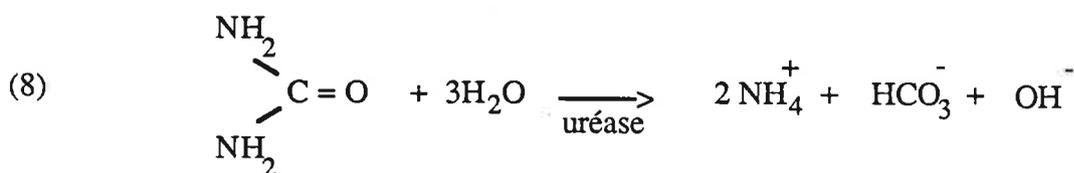
B-II CHOIX DES ENZYMES TEST

Le seul moyen de vérifier l'efficacité d'une méthode de greffage de l'enzyme sur un support est de tester son activité résiduelle après immobilisation.

Deux enzymes ont été choisies pour ces tests systématiques: l'uréase et la butyrylcholinestérase. Ces deux enzymes sont du groupe des hydrolases.

B-II-1 L'uréase : E.C. 3.5.1.5

L'uréase est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse de l'urée. Au voisinage de la neutralité, le schéma réactionnel peut être schématisé comme suit (8):



Hydrolyse de l'urée en présence d'uréase.

Cette enzyme a été la première à être isolée, pure, sous sa forme cristalline, en 1926, par SUMMER. Son poids moléculaire est de 480 000 Dalton.

Le schéma réactionnel montre que globalement, la réaction génère une base. Le suivi de l'activité enzymatique de l'uréase, en particulier au pH-stat, est donc facile.

Cette enzyme est disponible sur le marché, et peu chère. Elle présente une assez bonne résistance aux variations de température et de pH, ce qui élimine une part de risques d'erreurs. Ces raisons ont influencé le choix de cette enzyme en tant qu'enzyme test de toutes les expériences d'immobilisation futures.

B-II-2 La butyrylcholinestérase : E.C. 3.1.1.8

Nous avons utilisé cette enzyme en particulier avec les électrodes de type métal/oxyde métallique. Elle présente un intérêt certain dans la recherche de toxiques du type organophosphorés et carbamates, autant pour la pollution des eaux que de l'air [26] [70-71].

C'est une enzyme du système nerveux, qu'on trouve essentiellement dans le plasma sanguin de plusieurs espèces animales, et dans une moindre mesure, dans le foie, le pancréas, la muqueuse intestinale, et le système nerveux central. Son rôle physiologique exact est un peu moins bien connu que celui de l'acétylcholinestérase [72]. Elle participe à la conduction de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse d'un substrat, la butyrylcholinestérase, suivant le schéma réactionnel (9).

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

A - METHODES ANALYTIQUES - APPAREILLAGE

Tout au long de ce travail, il s'est avéré nécessaire:

- de déceler et caractériser les fonctions créées sur les surfaces des supports traités, ce qui a été fait par la spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier, ou IRTF.

- de caractériser l'état du greffage de l'enzyme, et son niveau d'activité, d'où l'utilisation de méthodes pH-stat, et de spectrophotométrie.

Dans un souci de clarté, seules ces méthodes seront décrites ici. Les méthodes d'activation et de greffage le seront dans les chapitres ultérieurs, et seront suivis des résultats et conclusions les concernant.

A-I SPECTROMÉTRIE INFRA-ROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER

La caractérisation des liaisons créées à la surface des poudres par l'analyse des spectres Infra-Rouge, obtenus classiquement par transmission, s'est avérée impossible, à cause du trop faible rapport entre la quantité de molécules greffées, et le poids de la poudre elle-même. Il a alors été nécessaire d'avoir recours à des spectres utilisant la spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier.

A-I-1 Description

L'appareil utilisé est un Nicollet, aimablement mis à disposition par le C.N.R.S. de Solaize. Il est décrit sur la Figure 4.

L'originalité d'un spectromètre à Transformée de Fourier, par rapport aux spectromètres Infra-Rouge classiques, est qu'il possède un interféromètre de Michelson à la place d'un monochromateur. C'est une lame séparatrice qui partage le faisceau issu de la source (en filament de tungstène) en deux autres faisceaux, l'un dirigé vers un miroir fixe, l'autre vers un miroir mobile. Celui-ci se déplace d'une distance x , et les deux faisceaux se recombinaient, après la séparatrice, avec une différence de trajet optique x . Un aller-retour du miroir mobile permet une analyse simultanée de toutes les longueurs d'onde du rayon Infra-Rouge incident. Le détecteur reçoit alors une énergie qui correspond à la figure d'interférences obtenue par recombinaison des deux faisceaux (ou interférogramme), modulée par l'absorption de l'échantillon.

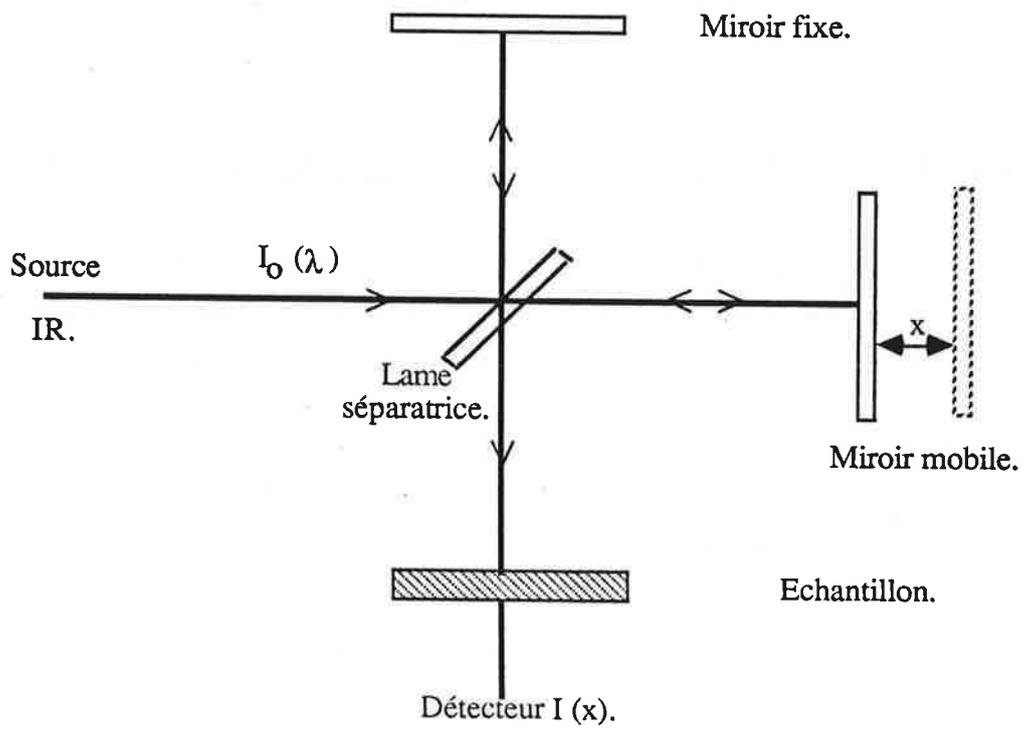


Figure 4: Schéma d'ensemble d'un spectromètre à Transformée de Fourier.

Le spectromètre à Transformée de Fourier est mono-faisceau: le détecteur mesure l'intensité I reçue après absorption par l'échantillon, puis l'intensité I_0 reçue en l'absence de l'échantillon, et le rapport I/I_0 est effectué. Le détecteur fonctionne sur le principe de transformation de l'énergie thermique Infra-Rouge en énergie électrique. Un spectre complet est obtenu en quelques dixièmes de seconde, ce qui correspond au temps nécessaire pour un aller-retour du miroir.

C'est la transformation mathématique de Fourier qui permet de passer de la figure d'interférences, fonction de x , au spectre Infra-Rouge classique, fonction de la fréquence n , d'où le nom de la méthode. Un mini-ordinateur couplé au spectromètre est indispensable pour effectuer les calculs.

Avantage de la méthode: l'interféromètre ne comporte aucune fente comme dans le système classique, donc l'énergie qui atteint le détecteur est environ 100 fois plus élevée que celle d'un appareil classique, d'où sa très grande sensibilité.

A-I-2 Préparation de l'échantillon

Il est nécessaire de travailler sur un échantillon de poudre qui ne comporte aucune trace des produits intermédiaires du traitement adsorbés en surface. L'échantillon est donc lavé plusieurs fois à l'acétone ou au benzène avant d'être placé sous vide pendant un à deux jours, pour séchage complet.

Pour les poudres les plus hydrophiles, un flux d'azote est maintenu pendant environ trente minutes au dessus de l'échantillon, de façon à évacuer toute trace de vapeurs d'eau. Des spectres préliminaires sont effectués à intervalles réguliers, jusqu'à disparition complète des pics des solvants ou de l'eau adsorbée.

A-II pH-METRIE - TITRIMETRIE

Cet appareillage, plus couramment appelé pH-stat, est un ensemble de titrage automatique, schématisé en Figure 5. Il est constitué de:

- un pH-mètre Radiometer pH M64, qui fait partie d'une unité de régulation et de contrôle, TTT60, relié à une burette automatique AB12, de capacité 1 ou 2,5 cm³.
- un enregistreur REC61, muni d'un tiroir enregistreur couplé au déplacement du piston de la pompe, commandée par le TTT60.

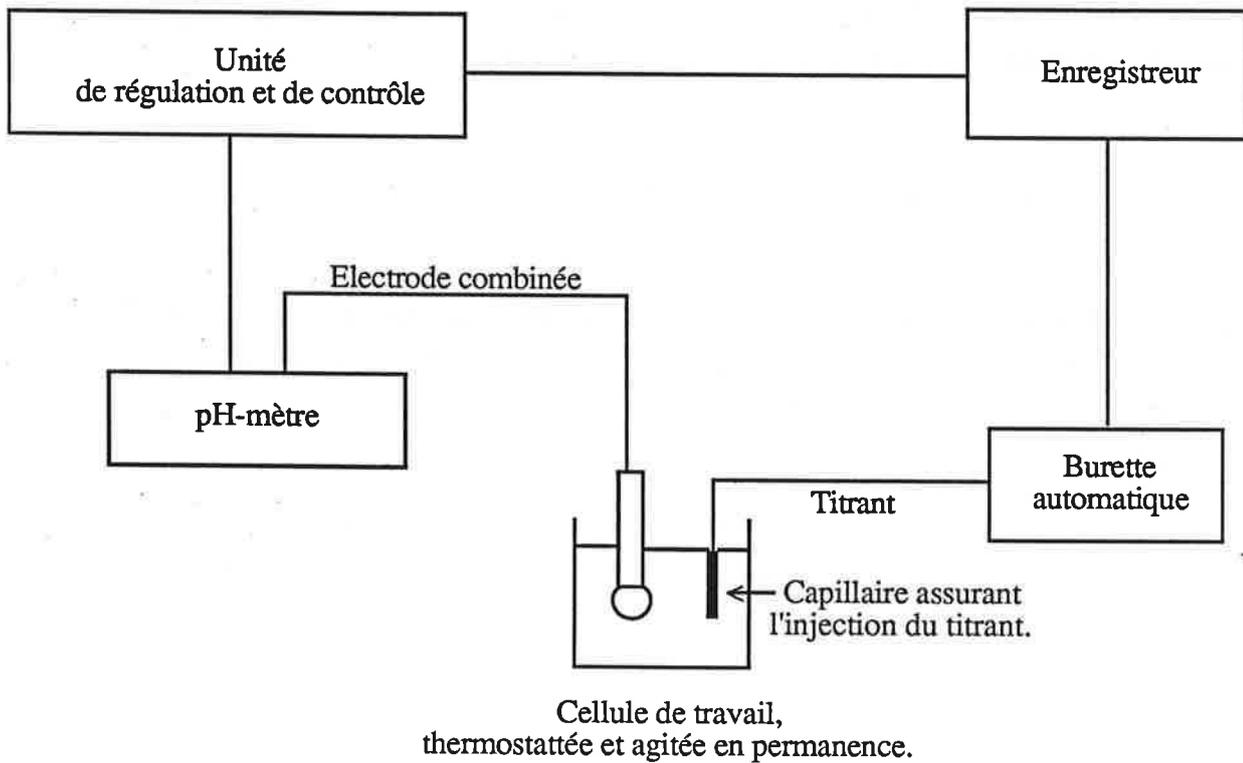
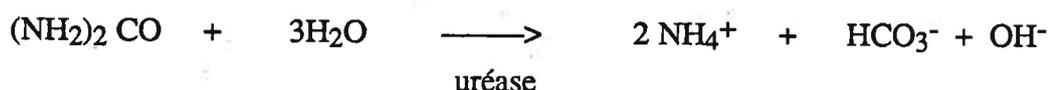


Figure 5: Schéma d'ensemble d'un "pH-Stat".

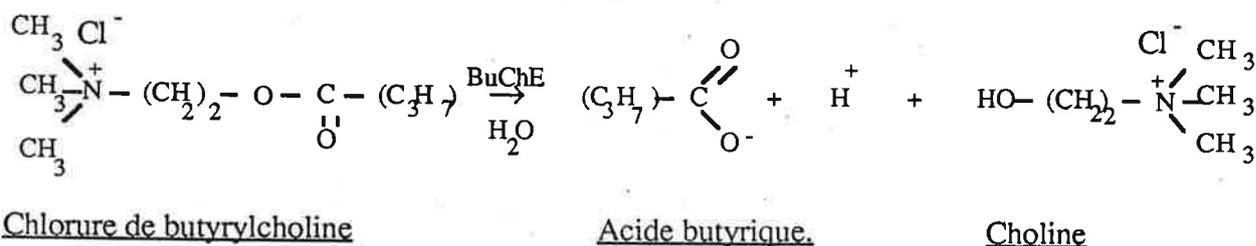
L'enzyme, ou la poudre sur laquelle on a préalablement greffé l'enzyme, se trouve dans une cellule thermostattée à 25°C, sauf précisions, qui est le siège de la réaction. Un tube capillaire, relié à la burette automatique, et plongeant dans la cellule, l'alimente en soude ou acide doseurs; le pH est mesuré par l'intermédiaire d'une électrode combinée, de type Radiometer GK-2401 C.

L'évolution de la réaction enzymatique, et ses diverses caractéristiques, peuvent être obtenues grâce à la courbe délivrée par l'enregistreur: Volume de soude (ou acide) ajouté = f(temps).

L'activité des deux enzymes testées dans cette étude: uréase et butyrylcholinestérase a pu être suivie au pH-stat, puisque leur catalyse de l'urée et de la butyrylcholine, respectivement, met en jeu une variation de pH (cf. Chapitre 1); rappelons ici les équations réactionnelles, détaillées dans le Chapitre 1 (équations (8) et (9)) :



Hydrolyse de l'urée en présence d'uréase

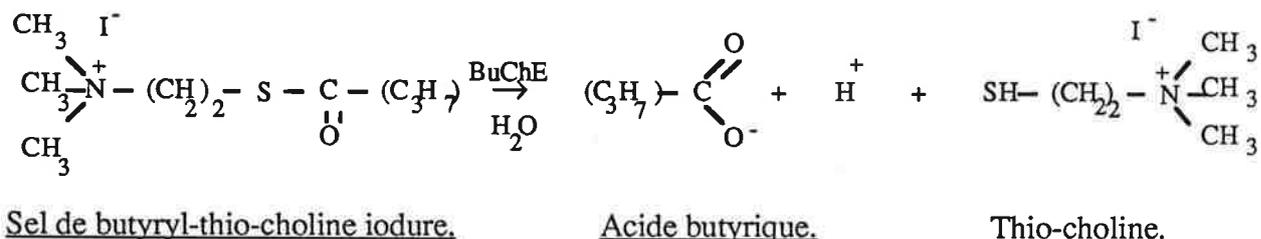


Hydrolyse du chlorure de butyrylcholine en présence de BuChE

A-III SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE

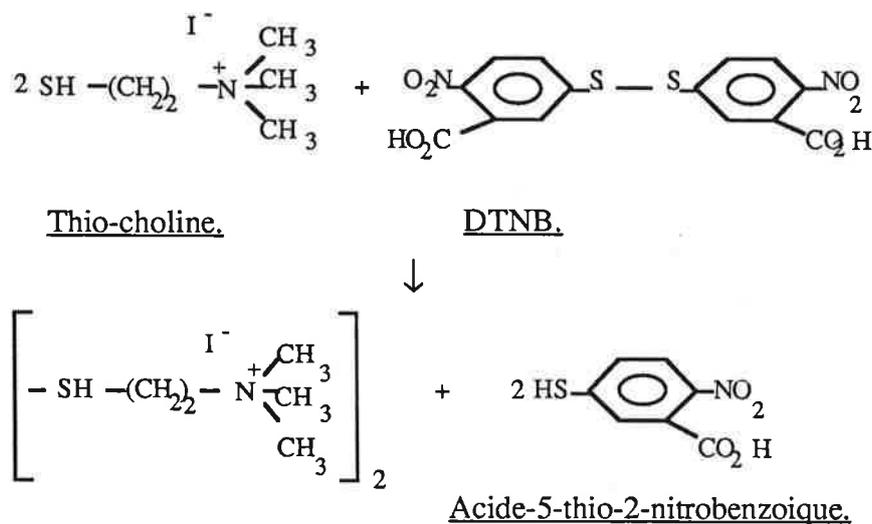
Le suivi de certaines réactions présentant une absorbance dans l'Ultra-Violet ou le visible a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible, de type Kontron-Uvikon 860. Les cuves associées à cet appareil sont des cuves en quartz, de type Hellman 100 QS, de 10 mm de trajet optique.

D'autre part, une méthode spectrophotométrique a été utilisée pour le suivi de l'activité enzymatique de la BuChE [73]. Celle-ci catalyse l'hydrolyse de l'iodure de butyrylthiocholine (BuSChI), selon le schéma réactionnel suivant :



Hydrolyse d'un sel de butyrylthiocholine par la BuChE.

La thio-choline, produit d'hydrolyse de la réaction, réagit en présence de di-thio-di-nitrobenzène (DTNB) ou réactif d'Ellman selon le schéma réactionnel :



Réaction d'Ellman.

L'acide 5-thio-2 nitrobenzoïque formé au cours de cette réaction absorbe à 410 nm. Le suivi de l'absorbance à cette longueur d'onde permet d'atteindre la cinétique de la réaction enzymatique, suivant la loi de Beer-Lambert:

$$\text{Abs} = K. [\text{Acide nitro-benzoïque}] = K. [\text{Thio-choline}].$$

Une courbe d'étalonnage préliminaire a permis de déterminer K: $K = 1,36. 10^4 \text{ (mole/l)}^{-1}$.

Cette méthode a été utilisée pour étudier l'activité enzymatique de silice sur laquelle la BuChE a été greffée. Elle présente l'avantage, par rapport aux méthodes pH-métriques, de pouvoir travailler à des concentrations en tampon élevées, sans interférences de celui-ci.

A-IV LES SOLUTIONS TAMPONNÉES

Les tampons utilisés dans ce travail sont, sauf mention contraire, des tampons phosphates à pH = 7,2. Leurs concentrations peuvent varier de 0,1 M à 10^{-4} M, et cela suivant l'usage qu'on en fait. Le tampon phosphate 0,1 M, qui a une force ionique élevée, sert expressément au lavage des poudres à enzymes immobilisées pour éliminer les enzymes retenues à la surface par adsorption physique. Quant au tampon phosphate 10^{-4} M, il ne sert qu'à assurer une conductivité suffisante lors des expériences au pH-stat sans masquer la réaction enzymatique.

A-V EAU ULTRA-PURE

Le lavage des poudres, ainsi que celui des électrodes réalisées, nécessite l'utilisation d'une eau filtrée. Le laboratoire dispose d'un appareil Millipore, produisant de l'eau ultra-pure. Cette eau a été utilisée systématiquement pour tous les rinçages effectués.

B - PRODUITS

Produits

Provenance

Enzymes

Uréase

Sigma

(de Jack beans, Type IX)

Butyrylcholinestérase

Sigma

(du sérum de cheval, Type IV-S)

Substrats

Urée

Sigma

Chlorure de butyrylcholine

Merck

	Iodure de butyrylthiocholine	Merck
<i>Inhibiteur de la BuChE</i>	Paraoxon	Merck
<i>Agents pontants</i>	γ -aminopropyltriéthoxysilane	Janssen
	Chlorure de cyanuryle	Merck
	Glutaraldéhyde	Sigma
<i>Poudres</i>	Oxyde de Nickel : NiO (11,2 m ² /g)	Prolabo
	Oxyde de Silicium : SiO (4,5 m ² /g)	Alfa-Ventron
	Silice : SiO ₂ (0,9 m ² /g)	Alfa-Ventron
<i>Métal</i>	Palladium (pureté 99,999%)	Alfa-Ventron
<i>Solvants</i>	Acétone	Prolabo
	Diméthylsulfoxyde	Merck
	Benzène	Prolabo
	Eau Ultrapure	Millipore
	di-Sodium hydrogénophosphate	Prolabo
	Sodium dihydrogénophosphate	Prolabo
<i>Autres</i>	Soude	Prolabo
	Acide chlorydrique	Prolabo
	Acide Nitrique	Prolabo
<i>Résines</i>	Araldite (AY 103, HY 956)	Ciba-Geigy
	Lecoset (7007)	Ciba-Geigy

CHAPITRE 3

**ETUDE DU GREFFAGE
D'ENZYMES SUR DES POUDRES
INORGANIQUES**

A - LE MONOXYDE DE SILICIUM COMME SUPPORT DE GREFFAGE

A-I INTRODUCTION

Le monoxyde de silicium SiO n'a pas été étudié pour le greffage de molécules biologiques, contrairement à la silice SiO_2 , pour laquelle les publications sont nombreuses [20], [29], [74-76].

Utiliser le monoxyde de silicium nous a semblé offrir deux intérêts essentiels: il présente une grande stabilité vis-à-vis du pH du milieu dans lequel il est amené à travailler, ainsi qu'une bonne résistance mécanique. De plus, quand il est sous forme de poudre, il offre une grande surface spécifique, et peut acquérir sur cette surface, après hydratation, des groupements hydroxyles utilisables pour la première étape du greffage de produits biologiques. Enfin, la récupération de la poudre, après traitement, est très aisée, et se fait par simple décantation-filtration.

Ces diverses caractéristiques font du monoxyde de silicium un composé dont on peut envisager l'utilisation, après greffage, comme garnissage de colonnes ou de réacteurs sièges de réactions:

- antigène-anticorps, auquel cas SiO est le support d'immobilisation d'anticorps.
- enzymatiques, auquel cas SiO est le support d'immobilisation d'enzyme.

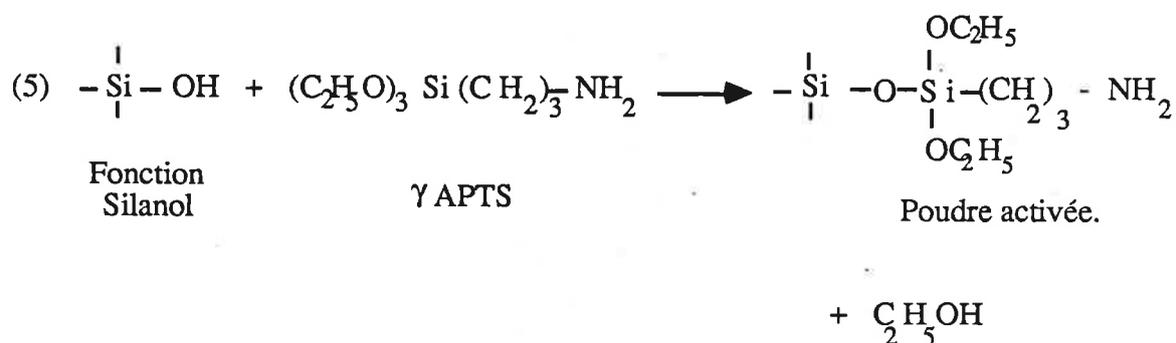
Le travail qui suit est une démonstration de faisabilité, qui a été effectuée pour les réactions enzymatiques, et qui pourra être étendue ultérieurement aux systèmes antigène-anticorps. L'enzyme test utilisée est l'uréase.

Le monoxyde de silicium utilisé est sous forme de poudre pour des raisons de commodité de mesure de l'activité enzymatique, au pH-stat. Le greffage d'enzyme sur cette poudre a été adapté de la méthode de silanisation étudiée pour la silice [53][74-76] et pour l'oxyde de nickel [57]. Son extension à SiO nous a semblée possible, ces composés ayant des propriétés communes.

A-II PROCÉDÉS DE GREFFAGE D'ENZYME SUR LA POUDRE DE SiO

A-II-1 Rappel sur la méthode appelée silanisation

La silanisation consiste à faire interagir le γ -aminopropyltriéthoxysilane sur les fonctions silanols de la poudre, comme le montre le schéma réactionnel (1).



Réaction de Silanisation des fonctions terminales de l'oxyde de Silicium.

Cette première étape permet d'obtenir en surface du monoxyde de silicium des molécules, liées de façon covalente et présentant des groupements $-\text{NH}_2$ terminaux. Ces mêmes groupements permettent, dans une étape ultérieure, l'association avec un agent pontant, le glutaraldéhyde comme le montre le schéma réactionnel (2a).

Le greffage de l'enzyme qui s'ensuit utilise les groupements aldéhydes de cet agent pontant, et $-\text{NH}_2$ de l'enzyme pour former des liaisons covalentes (schéma réactionnel (2b)) [60].

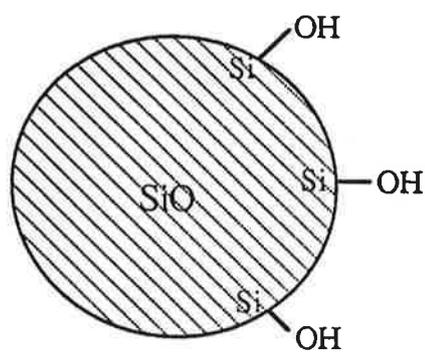


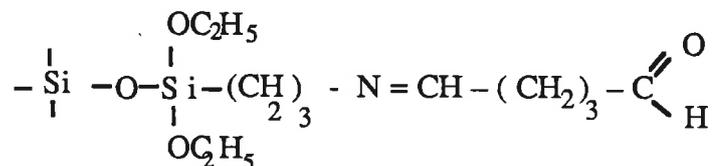
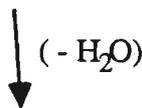
Figure 6 : Schématisation de la poudre de monoxyde de silicium SiO.



Poudre de Si(II)O silanisée

Glutaraldéhyde.

(6a)



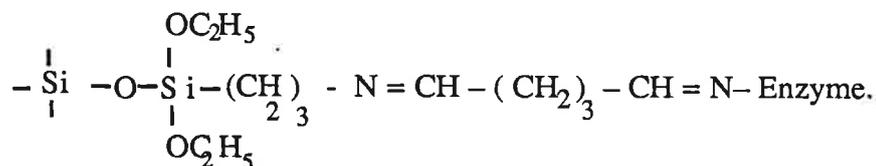
Poudre silanisée traitée au glutaraldéhyde, prête au greffage d'enzyme

Greffage d'enzyme par leurs fonctions -NH₂



(- H₂O)

(6b)



Poudre enzymatiquement active.

A-II-2 Généralités

La poudre d'oxyde de silicium Si (II) O est une poudre inorganique, de couleur marron: celle utilisée pour nos expériences est de 99,9 % de pureté, et de surface spécifique de 4,5 m²/g, peu poreuse. Elle possède des groupements OH en surface, appelés "silanol", qui permettent de procéder à son activation chimique. La concentration en fonctions hydroxyles a été déterminée par la méthode de dosage à l'oxyde de calcium (Annexe 1); elle est de 2,64 10⁻⁵ mole/gSiO . La Figure 6 représente schématiquement cette poudre.

Nous avons cherché à optimiser les conditions de la silanisation, en adoptant trois modes opératoires différents :

- traitement de la poudre dans du benzène à l'ébullition, sous reflux.
- traitement de la poudre dans l'eau, à pH acide, et à ébullition.
- traitement de la poudre dans l'acétone, à température ambiante.

Avant toute silanisation, la poudre est débarrassée des contaminants organiques éventuels par un lavage à l'acide nitrique 10 %, porté à ébullition, puis rincée à l'eau ultra-pure jusqu'à obtention d'un pH neutre, avant d'être séchée à l'étuve portée à 110°C, pendant une nuit.

L'efficacité de chacun de ces procédés est vérifiée par les deux méthodes suivantes:

- en effectuant des spectres Infra-Rouge à Transformée de Fourier, sur les poudres silanisées.
- en testant l'activité enzymatique de la poudre au pH-stat, après greffage de l'uréase.

A-II-3 Procédé SiO-1 : Silanisation en présence de benzène **[53],[76]**

5 g de poudre de Si(II)O, lavée et séchée, sont dispersés dans 50 cm³ d'une solution de γ -aminopropyltriéthoxysilane à 10 % dans du benzène. Le tout est agité, et porté à ébullition, sous reflux total, pendant un temps allant de 2 à 24 heures. La poudre est ensuite récupérée par une simple filtration (utilisation de papier filtre Wattman), avant d'être lavée abondamment à l'acétone. Elle est ensuite séchée à l'étuve à 110 °C pendant 4 heures.

A-II-4 Procédé SiO-2 : Silanisation en phase aqueuse, à pH acide **[53]**

5 g de poudre de Si(II)O, lavée et séchée, sont dispersés dans 50 cm³ d'eau tamponnée au tampon acétate, à pH = 4, et contenant du γ -aminopropyltriéthoxysilane à 10 %. L'ensemble est agité et porté à ébullition sous reflux pendant un temps allant de 2 à 24 heures.

La poudre est ensuite filtrée (papier Wattman), lavée à l'eau ultra-pure jusqu'à pH neutre, puis séchée à l'étuve portée à 110 °C, pendant 24 heures.

A-II-5 Procédé SiO-3 : Silanisation en présence d'acétone [57]

2 g de la poudre de Si (II) O, lavée et séchée, sont mis en contact avec 20 cm³ d'acétone à 2 % de γ -aminopopyltriéthoxysilane ; l'ensemble est laissé sous agitation magnétique à température ambiante, pendant 20 mn. La poudre est ensuite récupérée par filtration (papier Wattman), et immédiatement séchée à l'étuve, à 50°C, pendant 4 heures.

A-II-6 Traitement au glutaraldéhyde

Le greffage du glutaraldéhyde sur la poudre activée a été réalisé de la même façon, quel que soit le procédé de silanisation utilisé.

200 mg de poudre silanisée sont dispersés dans 10 cm³ de tampon phosphate 0,1M à 12,5 % en polyglutaraldéhyde. L'ensemble est agité, à température ambiante, pendant 3 heures. La poudre, récupérée par filtration et lavée avec 50 cm³ de tampon phosphate 0,1 M, est prête au greffage d'enzyme.

A-II-7 Greffage d'enzyme sur la poudre Si(II)O activée

Seule l'uréase a été testée avec le monoxyde de silicium. 10 mg d'uréase sont dissous dans 10 cm³ de tampon phosphate 0,1 M; après rajout dans cette solution de 200 mg de poudre de Si(II)O préalablement activée, l'ensemble est placé au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures.

La poudre enzymatiquement active ainsi obtenue est ensuite lavée à plusieurs reprises avec une solution de tampon phosphate 0,1 M, puis une fois avec le même tampon à 10⁻⁴ M, dans le but de ne garder en surface que les molécules d'uréase greffées de façon covalentes, et d'éliminer toutes celles qui seraient simplement adsorbées.

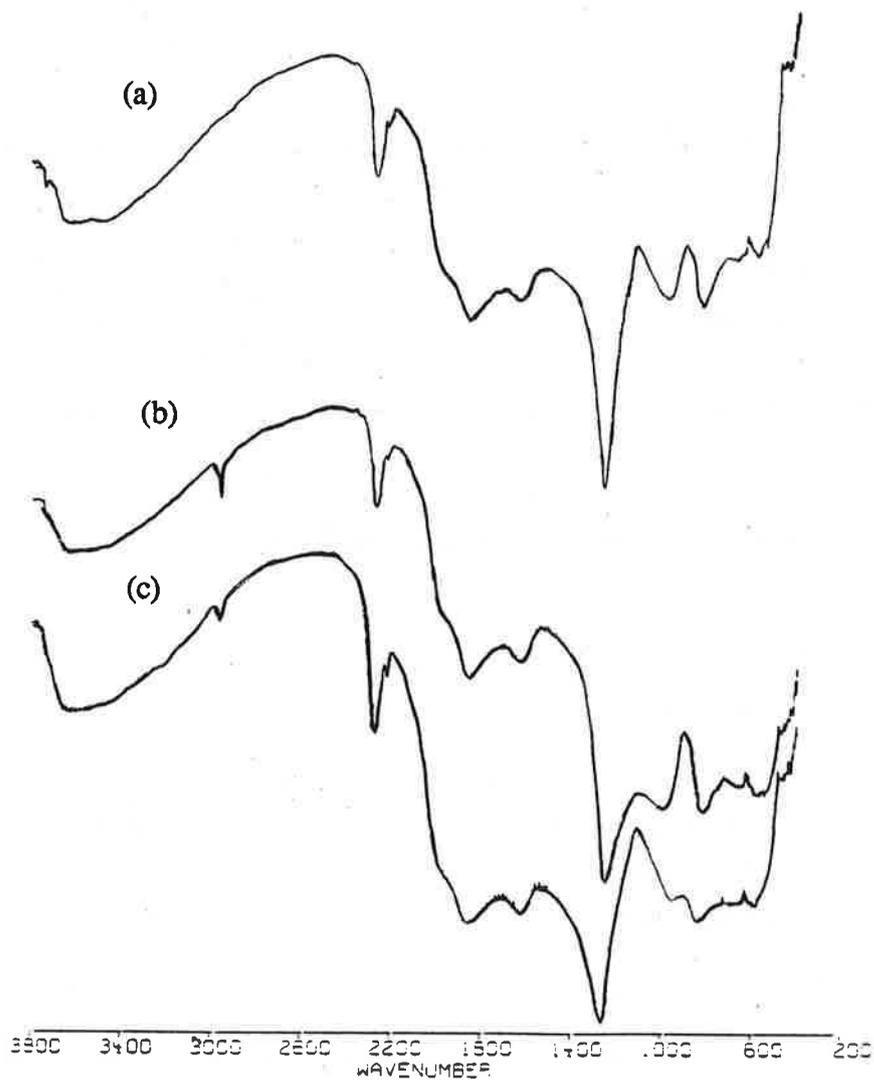


Figure 7 : Spectres IRTF de :
(a) la poudre SiO d'origine.
(b) la poudre SiO silanisée suivant le procédé SiO1 (solvant=benzène, T=80°C).
(c) la poudre SiO silanisée suivant le procédé SiO-2 (solvant=eau, T=100°C).

A-III SUIVI DE LA SILANISATION PAR LA SPECTROMÉTRIE INFRA-ROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER.

Les deux premiers procédés décrits, notés SiO-1 et SiO-2, sont des procédés calqués sur la littérature concernant la silanisation de la silice SiO_2 ; sur ce type de poudre de bons rendements de silanisation sont obtenus, soit en milieu aqueux, soit en phase organique. Le transfert à la poudre Si(II)O aboutit à des résultats peu probants, comme on le voit sur les spectres IRTF de la Figure 7. Ces spectres montrent que les pics d'absorption caractéristiques des bandes C-H et N-H sont présents (respectivement 2900 et 3500 cm^{-1}), mais avec une intensité très faible. D'autre part les spectres des poudres traitées suivant ces 2 procédés montrent que ces pics ne semblent pas évoluer avec le temps de traitement de la poudre.

Le procédé SiO-3, qui correspond à une silanisation utilisant l'acétone comme solvant, mène quant à lui à des résultats satisfaisants. La Figure 8 montre les spectres IRTF des poudres traitées par ce dernier procédé. Les pics d'absorbance caractéristiques des fonctions -CH et -NH, respectivement 2900 cm^{-1} et 3500 cm^{-1} apparaissent sur ces spectres. Il n'a pas été possible de faire une étude quantitative plus poussée, qui aurait permis de connaître de façon précise la quantité exacte de sites fonctionnalisés par cette méthode.

On constate aussi que le séchage effectué en fin de traitement favorise le rendement de la silanisation. Ceci confirme les résultats dont fait état Dunnill [57] qui insiste sur l'influence du traitement thermique, c'est-à-dire de la température et du temps de séchage sur la qualité de la silanisation de la poudre d'oxyde de nickel.

A-IV TEST DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE AU pH-STAT

L'étude IRTF sur les poudres Si(II)O silanisées a permis d'avoir un aperçu de l'efficacité de la première étape du traitement de greffage : la silanisation. Le test de l'activité enzymatique permet de confirmer ces premiers résultats (on ne pourra greffer que peu d'enzyme sur une poudre mal silanisée), et de vérifier l'efficacité de la seconde étape qui est le traitement au glutaraldéhyde.

a) Description du test

Le test pH-stat est réalisé dans une cellule thermostattée à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et d'un volume maximal de 50 cm^3 (voir le schéma du montage dans le Chapitre 2). On y ajoute la poudre précédemment obtenue ainsi que 40 cm^3 de tampon phosphate 10^{-4} M . Le tout est homogénéisé

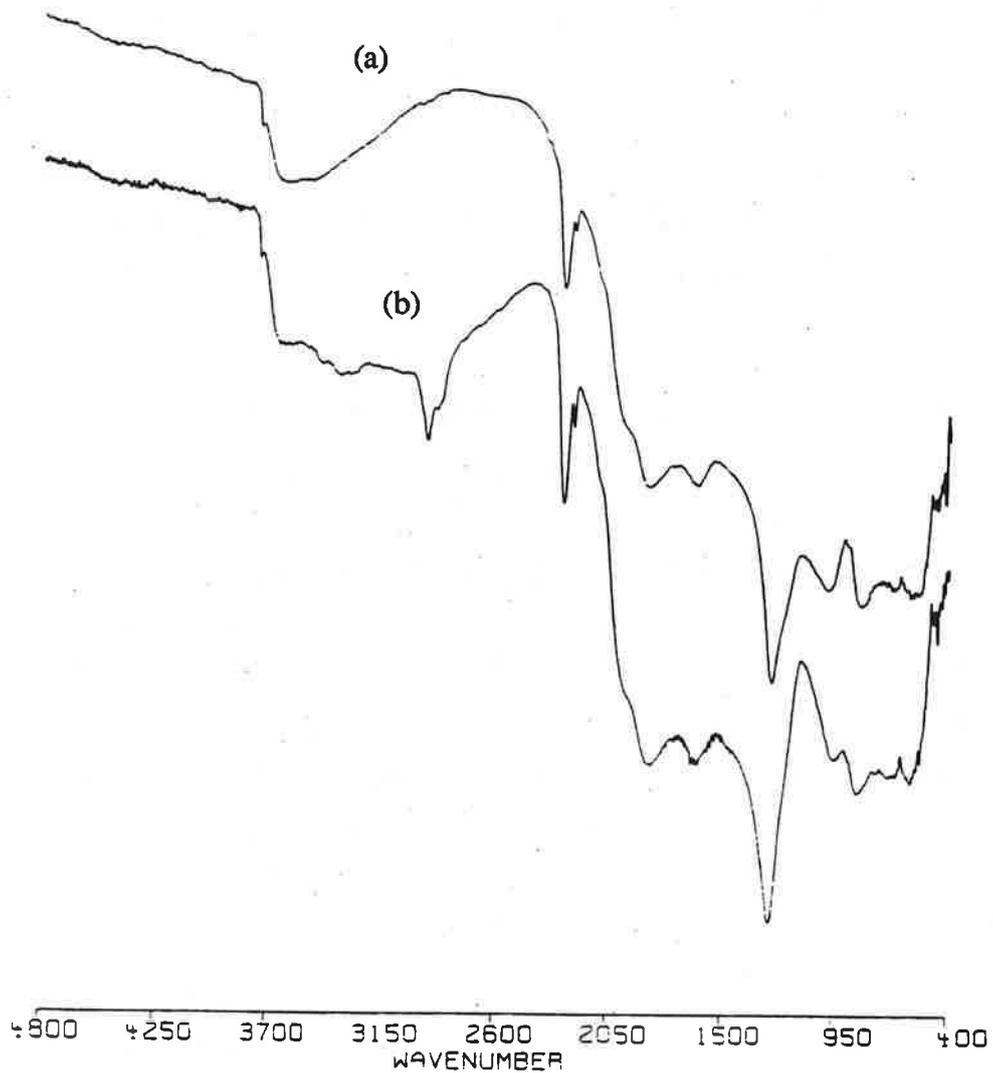


Figure 8 -

Spectres IRTF de :

(a) la poudre SiO d'origine.

(b) la poudre SiO silanisée suivant SiO-3 (solvant=acétone, T=25°C) puis séchée à l'étuve à 50°C

par agitation magnétique. La solution titrante utilisée dans ce test est une solution d'acide chlorhydrique. Afin d'obtenir des résultats exploitables, plusieurs essais ont été nécessaires pour déterminer la concentration en HCl satisfaisante et éviter ainsi des rajouts trop importants de solution titrante (forte activité catalytique de la poudre ou/et faible concentration en HCl) ou insignifiants (faible activité catalytique ou/et forte concentration en HCl). Les courbes expérimentales qu'on exploitera ci-dessous sont les résultats de ces différents essais.

D'autre part, pour éviter d'avoir des temps de test pH-stat trop longs, surtout quand la poudre est faiblement active, nous avons ajouté le substrat dans la cellule de façon à avoir, dans le milieu de travail, des concentrations en substrat croissantes: 10^{-3} M, $5 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-2} M, $5 \cdot 10^{-2}$ M, 10^{-1} M. Pour ce faire, nous avons préparé une solution mère de substrat de 5 M et cela avant chaque expérience.

Les courbes délivrées par l'enregistreur Volume (HCl) = f (temps) seront exploitées ultérieurement par la méthode de Lineweaver - Burk, en traçant $1/V_a = f(1/[S])$, où:

- V_a est la vitesse apparente de la réaction exprimée en mole de substrat / mn.l.g de SiO.

- $[S]$ la concentration en substrat exprimée en mole / l.

Le calcul de cette concentration, ainsi que celui de la vitesse apparente sont explicités dans l'Annexe 2.

b) Quels renseignements peut-on tirer des courbes

$1/V_a = f(1/[S])?$

Dans le cas d'une réaction en milieu homogène (i.e. enzymes en solution), l'exploitation de ces courbes ne pose aucun problème. En l'occurrence, si la cinétique est michaélienne, la courbe obtenue est une droite de pente K_m/V_m coupant l'axe des ordonnées en $1/V_m$ (Annexe 3), où :

- K_m est la constante de Michaelis ,

- V_m la vitesse de la réaction à saturation en substrat, qui est proportionnelle à la concentration en enzyme. Sinon, on peut recourir à d'autres modèles de cinétique enzymatique qui ont été largement détaillés dans la littérature [39].

Dans le cas d'une réaction en milieu hétérogène (i.e. enzymes immobilisées sur une poudre ou dans un gel), des précautions doivent être prises dans l'interprétation des résultats car, au phénomène de la réaction enzymatique s'ajoute le phénomène de diffusion de la matière qui se manifeste à l'intérieur de la particule poreuse, ou d'un agrégat de particules, et à l'interface particule-solution. La conséquence en est la modification de l'allure de la courbe $1/V_a = f(1/[S])$. Cependant, dans le cas où la réaction enzymatique est michaélienne, l'extrapolation de la courbe à l'axe des ordonnées permet d'atteindre la vitesse apparente maximale V_{am} de la poudre et donc la quantité d'enzyme immobilisée [77-82].

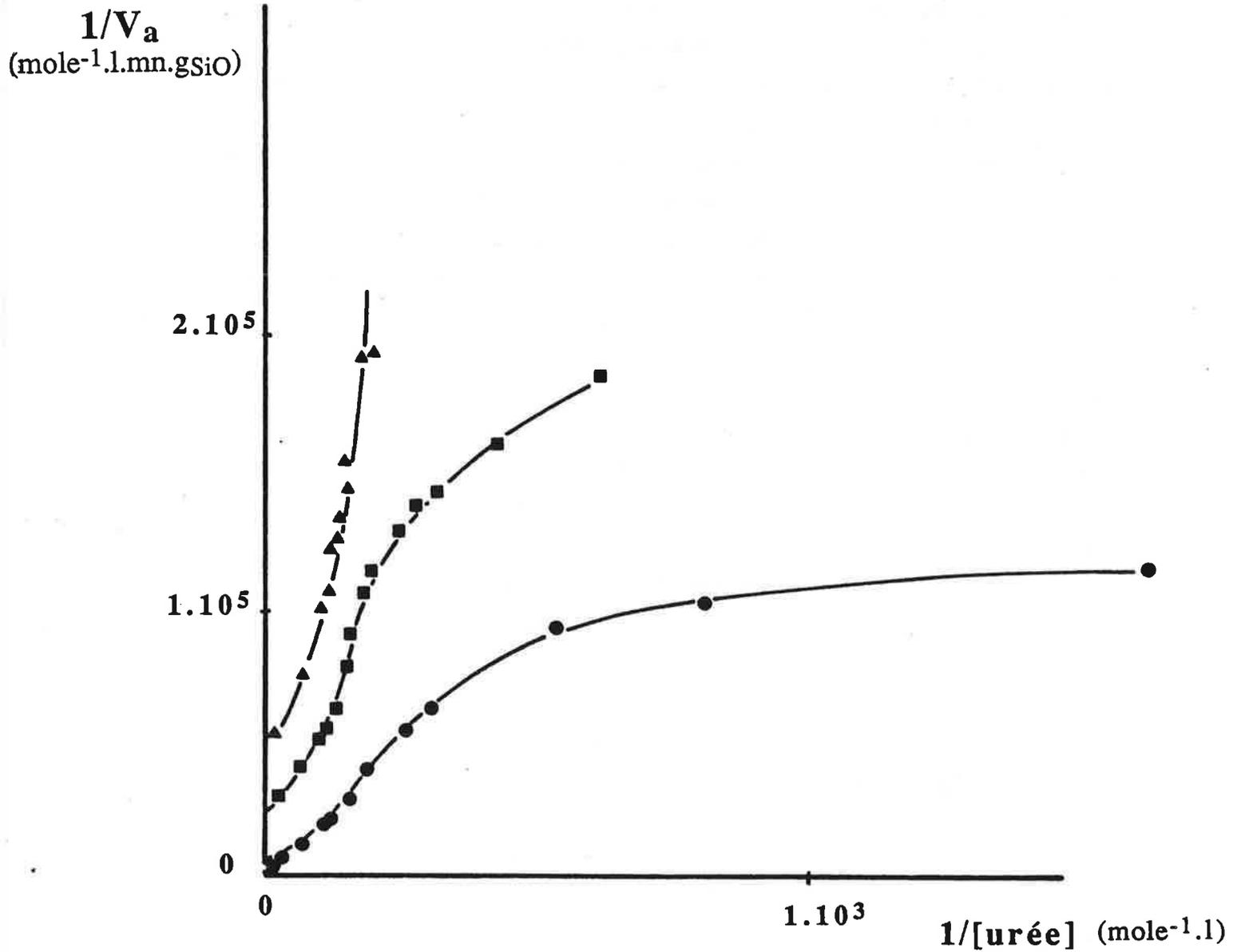


Figure 9 :

Tracés de Lineweaver-Burk obtenus lors du premier essai de l'activité de SiO silanisé suivant le procédé SiO-1 (solvant=benzène, T=80°C), pour différents temps de silanisation.

● $t_{sil} = 3$ h, ■ $t_{sil} = 8$ h, ▲ $t_{sil} = 24$ h

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

A-IV-1 Test pH-stat de la poudre traitée par le procédé SiO-1, utilisant le benzène

Le test pH-stat de cette poudre met en évidence deux aspects :

- Le V_{am} obtenu à la première utilisation de la poudre activée est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-4}$ mole/l.mn.g_{SiO} (Figure 9), ce qui correspond à une activité enzymatique correcte.

- Après lavage et réutilisation, ou séjour prolongé dans une solution de tampon phosphate 0,1 M, l'activité enzymatique chute très vite, et disparaît (Figure 12). Ceci indique que malgré un lavage prolongé, une grande partie de l'activité catalytique obtenue au premier test est due à l'enzyme adsorbée.

Ce comportement est donc la conséquence d'une silanisation peu efficace d'une part, ce qui était aussi la conclusion des spectres IRTF; d'autre part, le contact prolongé avec le benzène rend la poudre hydrophobe et gêne les étapes ultérieures du traitement d'activation. On constate, en effet, quand on effectue la phase du traitement au glutaraldéhyde (paragraphe B-II-6), que la poudre a tendance à être repoussée à la surface de l'eau, ce qui nuit à l'homogénéité du mélange, et donc à l'efficacité du traitement avec cet agent pontant. Cette hydrophobie favorise la formation d'aggrégats, et par conséquent modifie l'allure des courbes $1/V_a = f(1/[S])$. Celles-ci ne sont pas des droites comme c'est le cas du traitement à l'acide SiO-2, décrit ci-après.

A-IV-2 Test pH-stat de la poudre traitée par le procédé SiO-2, en phase aqueuse, à pH=4

On retrouve le même comportement que celui décrit ci-dessus pour le procédé SiO-1 : le V_{am} obtenu à la première utilisation est de $2 \cdot 10^{-4}$ mole/l.mn.g_{SiO} (Figure 10); il tend vers 0 au bout de quelques essais; il en est de même que si la poudre séjourne dans une solution de tampon phosphate à 0,1M (Figure 12).

Il n'y a pas d'hydrophobicité de la poudre comme dans le cas précédent, et le traitement au polyglutaraldéhyde se fait dans de bonnes conditions. On ne peut mettre en cause ici que le mauvais rendement de la silanisation, constaté par le spectre IRTF ; l'activité enzymatique obtenue à la première mesure est le fait de molécules adsorbées, qui sont lentement relarguées dans le milieu de travail.

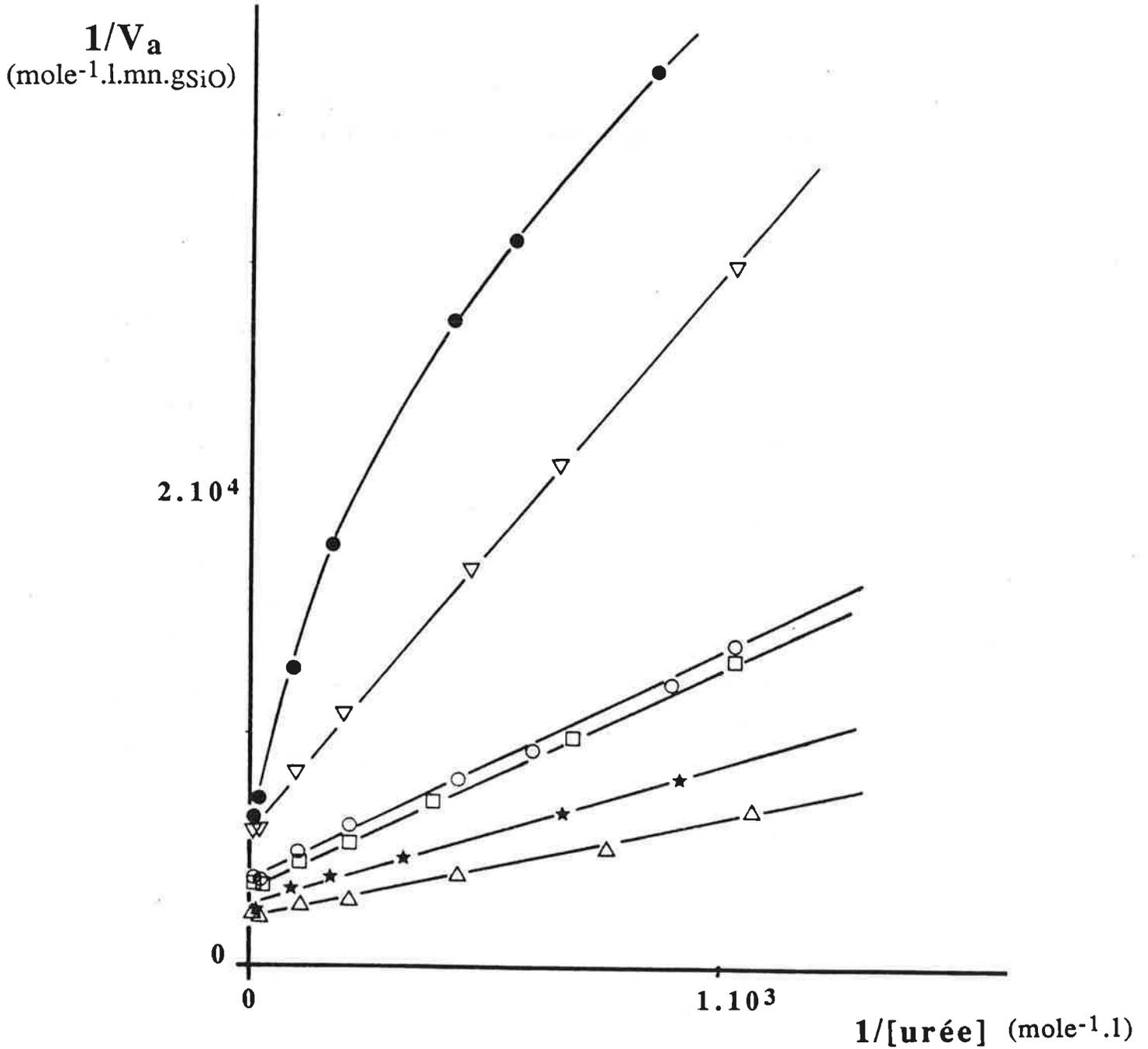


Figure 10 :

Tracés de Lineweaver-Burk obtenus lors du premier essai de l'activité de SiO silanisé suivant le procédé SiO-2 (en phase aqueuse, T=100°C) pour différents temps de silanisation:

- ▽ $t_{sil} = 2$ h
- ★ △ $t_{sil} = 6$ h
- $t_{sil} = 24$ h
- $t_{sil} = 48$ h

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

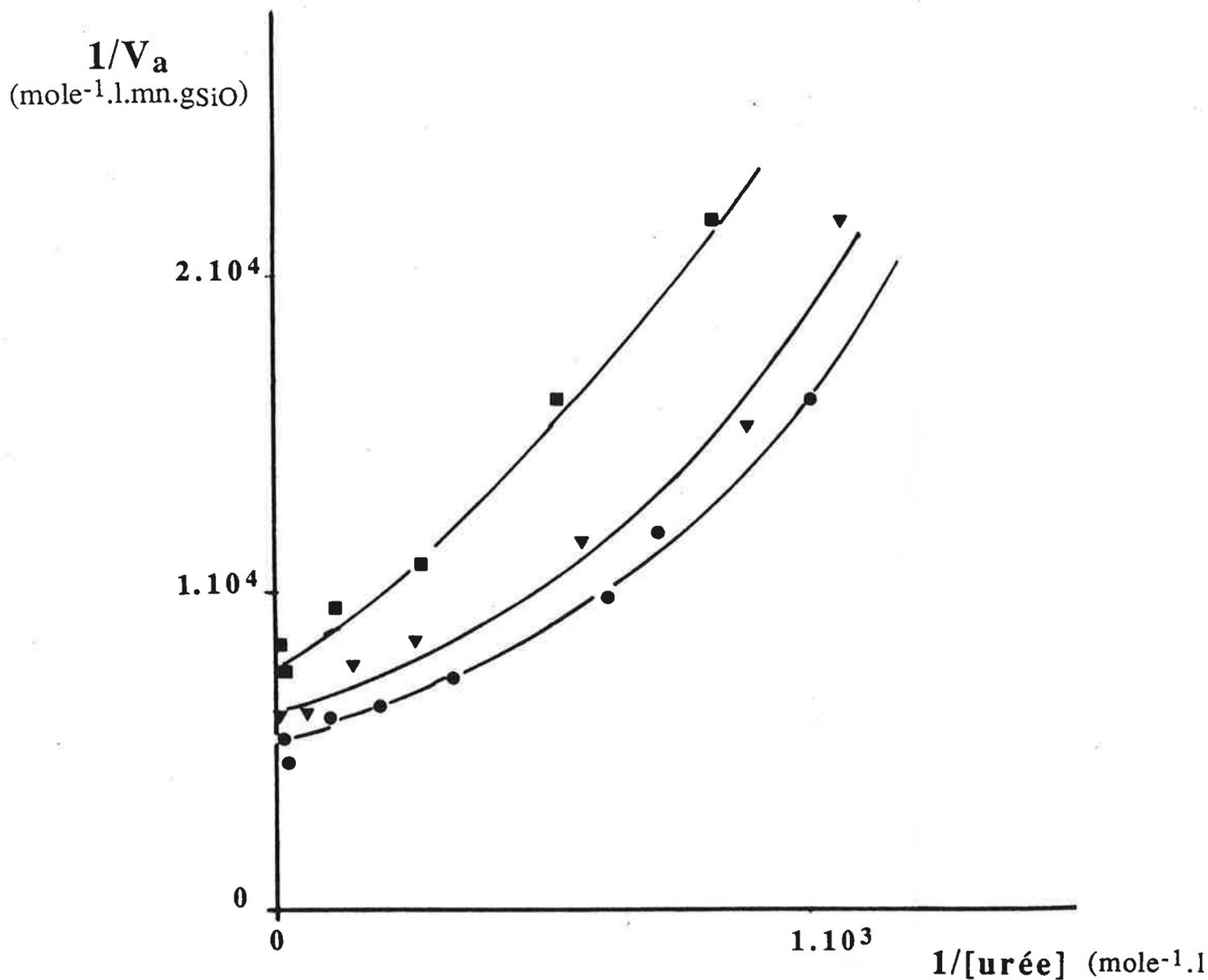


Figure 11 : Tracés de Lineweaver-Burk obtenus lors du premier essai de l'activité de SiO silanisé suivant le procédé SiO-3 (solvant=acétone, T=25°C). Les trois échantillons ■ ▼ ● sont préparés dans les mêmes conditions. Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

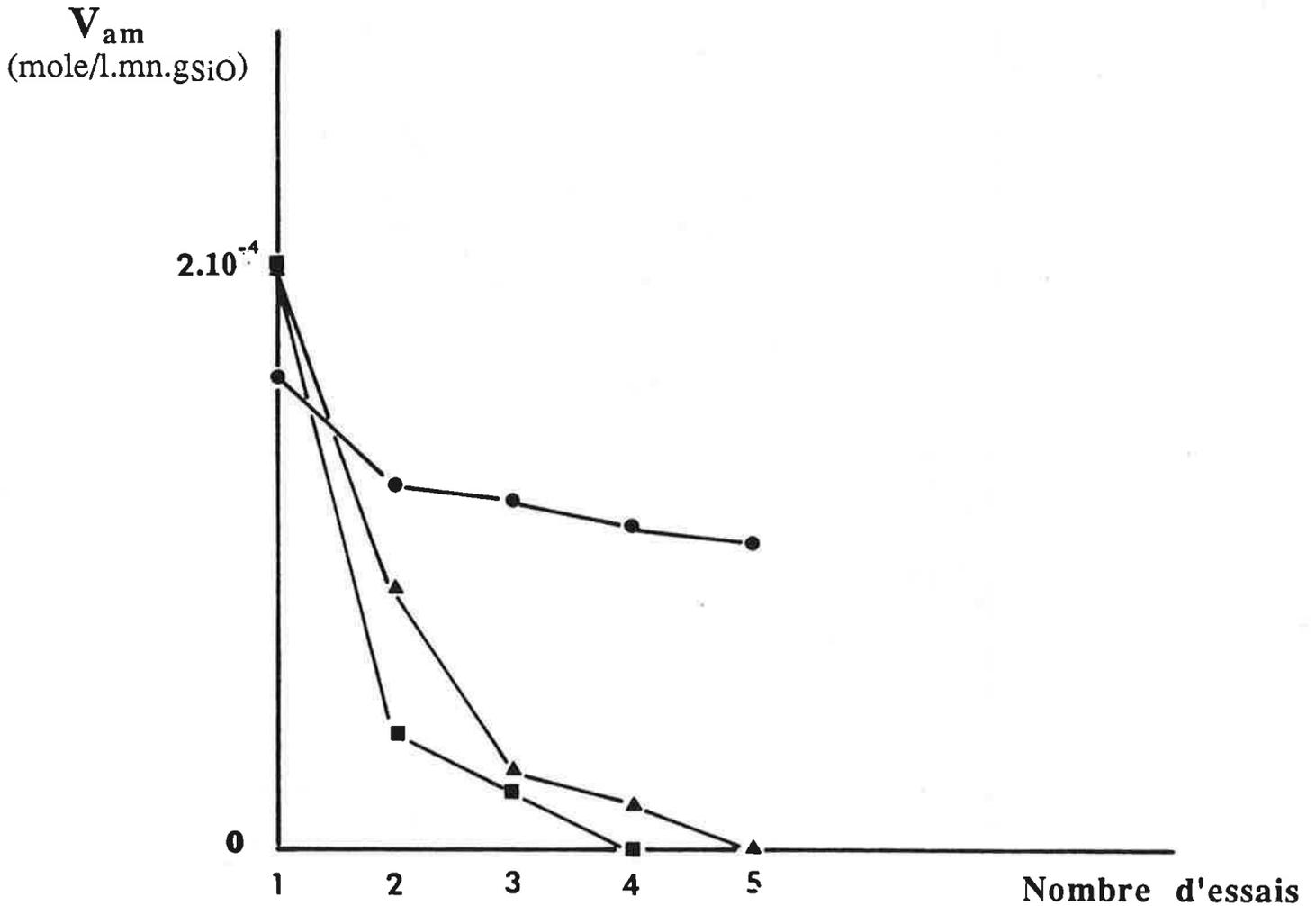


Figure 12 : Evolution de V_{am} en fonction du nombre d'essais :
■ SiO silanisé suivant le procédé SiO-1 (solvant=benzène, T=80°C)
▲ SiO silanisé suivant le procédé SiO-2 (solvant=eau, T=100°C)
● SiO silanisé suivant le procédé SiO-3 (solvant=acétone, T=25°C)
Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

A-IV-3 Test pH-stat de la poudre traitée par le procédé SiO-3, utilisant l'acétone

L'activité catalytique de cette poudre est montrée sur la Figure 11. Les résultats de l'étude IRTF laissaient prévoir que ce procédé serait le plus efficace. C'est en effet confirmé par le test pH-stat : le V_{am} obtenu à la première utilisation est de $1,5 \cdot 10^{-4}$ mole/l.mn.gSiO (Figure 12); ce V_{am} décroît pour les utilisations ultérieures, pour tendre vers une valeur limite qui est de 30 % inférieure environ. Cette baisse signifie qu'une partie de l'enzyme est adsorbée, et non greffée par liaison covalente. Une fois qu'il y a eu relargage de la partie adsorbée, l'activité enzymatique reste stable, ce qui est le signe d'un greffage efficace.

Une poudre obtenue par ce procédé, conservée au réfrigérateur à environ 4°C, dans du tampon phosphate 0,1 M garde son activité enzymatique pendant 4 semaines environ.

A-V CONCLUSION

Les deux solvants classiquement utilisés pour la silanisation de la poudre de silice, le benzène et l'eau, ne favorisent pas celle de la poudre d'oxyde de silicium Si(II)O.

En revanche, un bon rendement de silanisation, vérifié par la spectrométrie IRTF, et confirmé par le test pH-stat, est obtenu avec *le traitement utilisant l'acétone comme solvant, et ce dans des conditions douces (température ambiante)*, avec un temps de contact poudre - γ -aminopropyltriéthoxysilane de l'ordre de 20 mn. Ce dernier traitement présente en plus l'avantage d'éviter le benzène, solvant plus dangereux que l'acétone.

B - LA SILICE COMME SUPPORT DE GREFFAGE

B-I INTRODUCTION

L'immobilisation de produits biologiques sur la silice a été largement étudiée. Des essais d'immobilisation par greffage direct sur ce support par l'intermédiaire de BrCN ont été tentés par Weetall et coll. [74]. De même, l'immobilisation par adsorption sur la silice poreuse rendue hydrophobe par traitement chimique a été étudiée par Karimian et coll.[83]. Cependant, l'immobilisation de ces produits biologiques passe généralement par la silanisation de la silice avec un silane [53][76][84]. Le silane est en général aminé. Les fonctions ainsi créées à la surface du support servent ultérieurement au greffage de produits biologiques, par l'intermédiaire d'agents pontants tels le glutaraldéhyde [76], le trichlorure de bore [85], ou le bis-dithioester [86].

Dans cette partie nous avons cherché à immobiliser de la butyrylcholinestérase sur une poudre de silice, et à vérifier l'efficacité des méthodes de greffage sur ce support. L'objectif visé était de faire un travail préliminaire à la réalisation d'un biocapteur à fibres optiques. Les fibres optiques utilisées pour ces biocapteurs sont en silice, permettant de travailler dans la zone UV-Visible [20]. De plus, elles présentent une atténuation du signal lumineux de l'ordre de 0,2 dB/km, suffisamment faible pour ne pas avoir d'impact sur la conception d'un biocapteur, dans la mesure où la longueur des fibres utilisées n'est pas grande.

Ce biocapteur est envisagé pour deux raisons:

- remplacer les électrodes de pH à BuChE, ce qui est envisageable car la réaction catalysée par cette enzyme peut être suivie de façon colorimétrique (Méthode d'Ellman [73] décrite dans le Chapitre 2).

- cette méthode permet de travailler dans un milieu suffisamment tamponné pour éviter les variations de pH importantes.

Les résultats obtenus avec la poudre de silice seront ensuite transposés aux fibres optiques. Le détail des schémas réactionnels concernant la silanisation est donné dans le paragraphe précédent, pour le monoxyde de silicium; nous décrirons donc directement les modes opératoires utilisés ici.

B-II PROCÉDES DE GREFFAGE D'ENZYME SUR LA SILICE

B-II-1 Généralités

La poudre de silice utilisée présente une granulométrie de 60 mesh (210 microns), une surface spécifique de 0,9 m²/g, et le nombre de fonctions hydroxyles par unité de masse est de 3,3.10⁻⁶ mole/gramme de SiO₂ .

Avant tout traitement, la poudre est lavée avec une solution d'acide nitrique à 10 %, portée à ébullition pendant une heure. Elle est ensuite filtrée et lavée à l'eau Millipore jusqu'à la neutralité de l'eau de lavage, puis séchée à l'étuve à 110 °C pendant 24 heures.

B-II-2 Modes Opératoires

La littérature cite des procédés de silanisation effectués en milieu organique [53],[57],[76], et en milieu aqueux[53]. Nous en avons testés deux, pour cerner les conditions optimales du greffage.

a) Procédé SiO₂ -1 : Silanisation en phase aqueuse, à pH acide [53]

5 g de poudre de silice sont dispersés dans 50 cm³ d'eau tamponnée au tampon acétate, à pH 4. L'agent d'activation, γ -aminopropyltriéthoxysilane, est rajouté dans le milieu jusqu'à 10 %. L'ensemble est agité, et porté à ébullition sous reflux pendant un temps que nous avons fait varier de 2 h à 48 h. La poudre est ensuite filtrée à l'aide de papier Wattman, et lavée à l'eau ultra-pure plusieurs fois, jusqu'à pH neutre. Le séchage est effectué à l'étuve portée à 110°C pendant 24 heures.

b) Procédé SiO₂ -2 : Silanisation en présence d'acétone. [57]

Le traitement a porté sur 500 mg de poudre de SiO₂ qu'on disperse dans une solution de γ -aminopropyltriéthoxysilane, à 2 % dans l'acétone. Après un temps de contact de 30 mn sous une agitation intermittante et à la température ambiante, la poudre est filtrée, lavée de nouveau à l'acétone, et séchée à l'étuve portée à 50°C pendant 4 heures.

c) Traitement au glutaraldéhyde [76]

Ce traitement peut être effectué au fur et à mesure des besoins, la poudre silanisée pouvant être conservée sans détérioration des fonctions créées à sa surface.

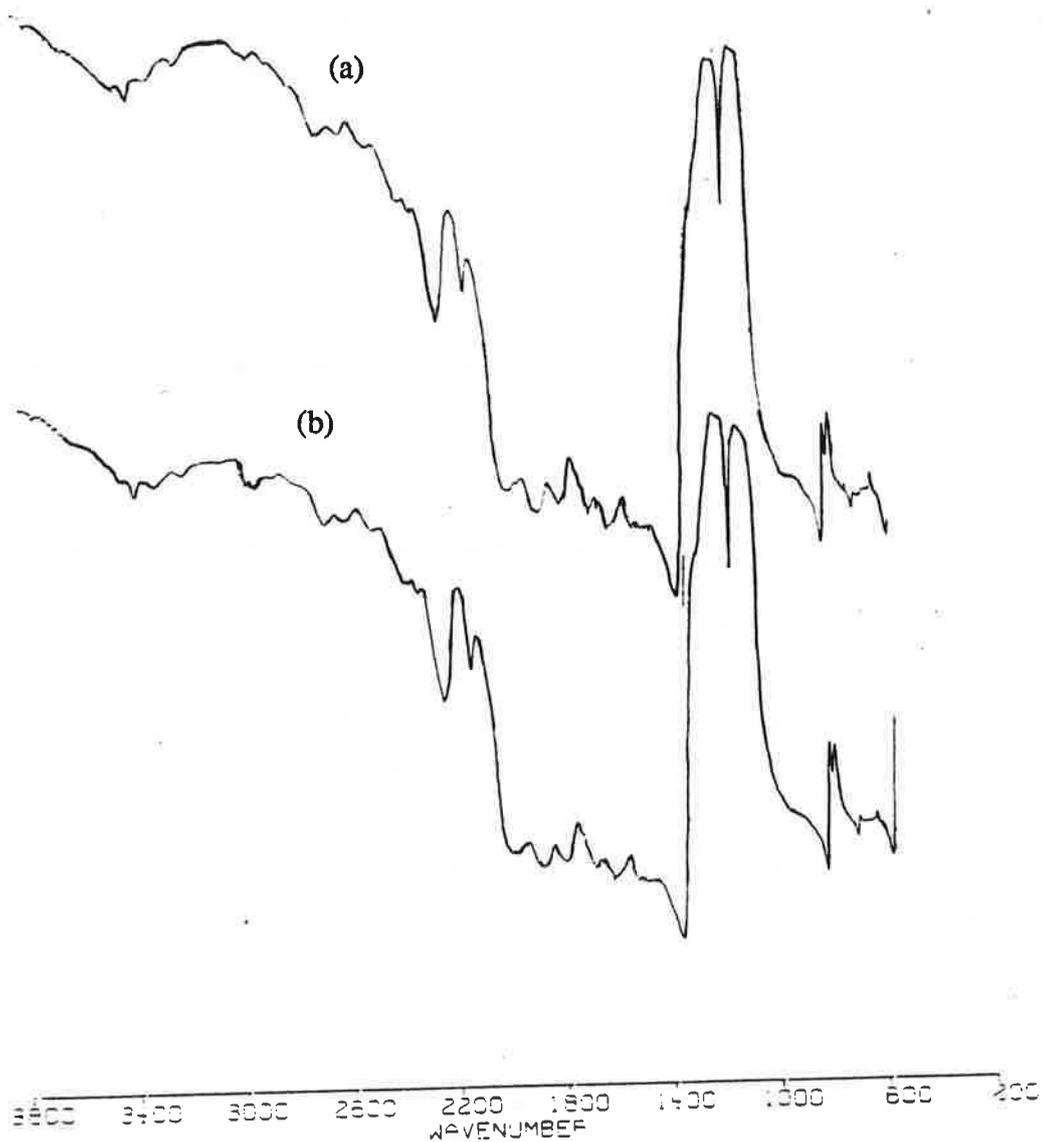


Figure 13 : Spectres IRTF de la poudre de silice d'origine (a) et de la poudre de silice traitée suivant le procédé SiO₂-1 (solvant=eau, T=100°C) (b).

Les 500 mg de SiO₂ silanisée sont dispersés dans 1 cm³ de solution de glutaraldéhyde à 5 % dans du tampon phosphate 10⁻²M. Après agitation, l'ensemble est laissé 30 mn au réfrigérateur, puis filtré, et lavé avec le même tampon.

d) Greffage de la BuChE

Le greffage de la poudre se fait par simple mise en contact de la poudre obtenue après le traitement précédent, avec une solution enzymatique. 500 mg de poudre sont dispersés dans 2 cm³ de tampon phosphate 10⁻² M, contenant 1 mg de BuChE. L'ensemble est laissé 6 heures à 4°C, puis la poudre est filtrée et lavée au même tampon phosphate. Dans le but de voir l'influence du nombre de cycles de traitement glutaraldéhyde-BuChE sur l'activité catalytique de la poudre, ce traitement a été répété plusieurs fois avec une même poudre, et cela en observant des conditions opératoires identiques. Le but escompté était d'augmenter l'activité catalytique de cette poudre en augmentant le nombre de couches d'enzymes à sa surface.

e) Description de la mesure spectrale

Comme on l'a précisé en Introduction de ce paragraphe B, c'est la méthode spectrophotométrique d'Ellman, explicitée dans le paragraphe A-III du Chapitre 2 qui a servi à mesurer l'activité cholinestérasique de la poudre greffée.

Les conditions de travail sont les suivantes :

La poudre à BuChE greffée est mise sous agitation en présence d'une solution de tampon 10⁻² M contenant le substrat BuSChI à 10⁻⁴ M, et le chromogène di-thio-dinitrobenzène à 2.10⁻⁴ M. La longueur d'onde caractéristique de la réaction enzymatique est 410 nm. Des prélèvements du liquide surnageant sont effectués toutes les 3 mn, et son absorbance à 410 nm mesurée. Cela permet de tracer l'évolution de l'absorbance, notée A, en fonction du temps, et donc d'accéder à l'activité enzymatique de la poudre.

B-II-3 Interprétation des spectres IRTF

Les spectres IRTF obtenus sur les poudres ayant subi les deux traitements de silanisation décrits précédemment sont présentés sur les Figures 13 et 14.

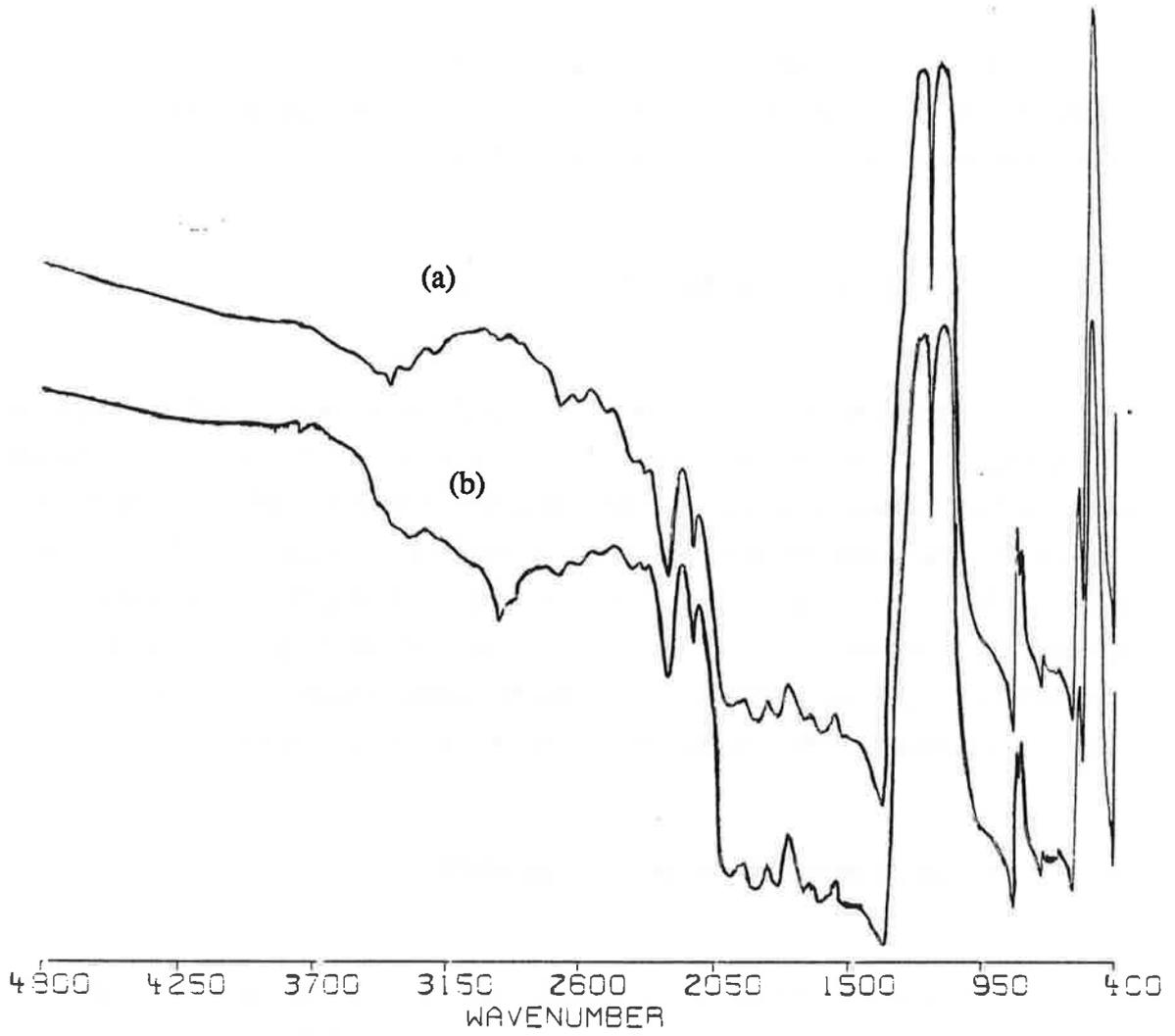


Figure 14 : Spectres IRTF de la poudre de silice d'origine (a) et de la poudre de silice traitée suivant le procédé SiO₂-2 (solvant=acétone, T=25°C) (b).

Le *procédé SiO₂-1*, qui est réalisé en phase aqueuse, semble le moins efficace d'après les spectres IRTF de la Figure 13. On voit *apparaître vers 2900 cm⁻¹* la bande d'absorption de la liaison C-H *avec une faible intensité*, et celle vers 3500 cm⁻¹ correspondant à la liaison N-H. Cependant, il s'est révélé impossible de corrélérer l'évolution de l'intensité de ces bandes d'absorption au temps de traitement.

Le spectre de la Figure 14 est celui de la poudre de silice traitée dans l'acétone, par le *procédé SiO₂-2*. On voit en revanche ici qu'un pic apparaît à 2900 cm⁻¹, correspondant aux liaisons C-H, et la bande d'absorption vers 3500 cm⁻¹, caractéristique des liaisons N-H, avec une intensité plus forte que pour le traitement précédent. La silanisation obtenue dans l'acétone est donc efficace ; il est d'autre part inutile de la prolonger au-delà de 30 mn, les spectres effectués à des durées supérieures ne présentant pas d'évolution notable. Nous attribuons la réussite de la silanisation non au temps de contact de la solution de γ -APTS avec la poudre, mais au traitement thermique qui la concluait.

On a pu mettre en évidence d'une autre façon la présence de fonctions amines sur la poudre obtenue par le procédé SiO₂-2 : en la faisant réagir avec une solution de glutaraldéhyde à 12,5 %, on obtient une coloration jaune due à la résonance des doubles liaisons du produit résultant de la condensation des fonctions amines de γ -APTS avec le glutaraldéhyde [27].

Les résultats du greffage de la BuChE qui suivent ne concernent que ce procédé SiO₂-2.

B-III TEST DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE AU SPECTROPHOTOMETRE

Le suivi de l'activité enzymatique de la poudre greffée est effectué par la méthode spectrophotométrique d'Ellman. L'allure dynamique de la courbe obtenue : $A = f(\text{temps})$ ou $[\text{Thiocholine}] = f(\text{temps})$ est illustrée par la Figure 15. Sur la Figure 16-a, on retrouve cette allure pour une poudre ayant subi un seul cycle de traitement glutaraldéhyde-greffage de BuChE, et sur la Figure 16-b pour une poudre ayant subi 2 cycles. La dernière montre une activité plus faible que la précédente, contrairement à ce qui était attendu. Cette tendance est confirmée par des expériences répétées, comme le montre la Figure 17, sur laquelle on ne fait figurer que la cinétique d'hydrolyse de BuSChI à l'instant $t=0$, notée encore $V_{\text{SiO}_2}^{\text{O}}$, par la poudre de silice à BuChE greffée. Celle-ci montre que la poudre ayant subi un seul cycle de greffage présente une activité catalytique plus forte que celle ayant subi 2 cycles. Cependant, on observe, pour la première, une baisse importante de l'activité catalytique dans le temps, qui est probablement due au relargage de l'enzyme. Par contre, la deuxième maintient son activité dans le temps.

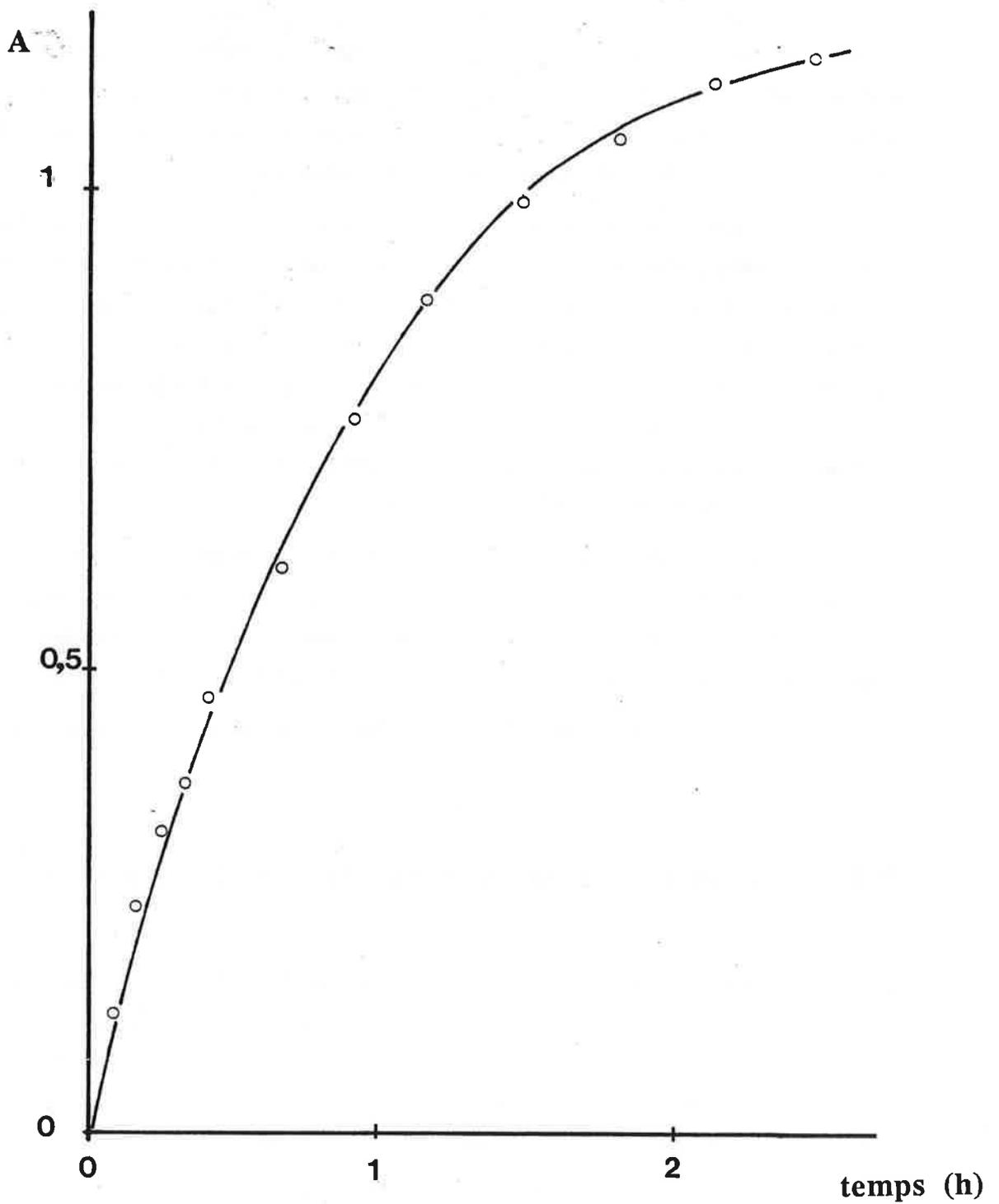


Figure 15 : Cinétique d'hydrolyse du substrat BuSChI par la poudre de silice à BuChE greffée suivant le procédé SiO₂-2 (solvant=acétone, T=25°C). Conditions opératoires : 500 mg de silice dans 5 cm³ de tampon phosphate 10⁻² M à pH=7,2 et contenant BuSChI à 10⁻⁴ M et DTNB à 2.10⁻⁴ M.

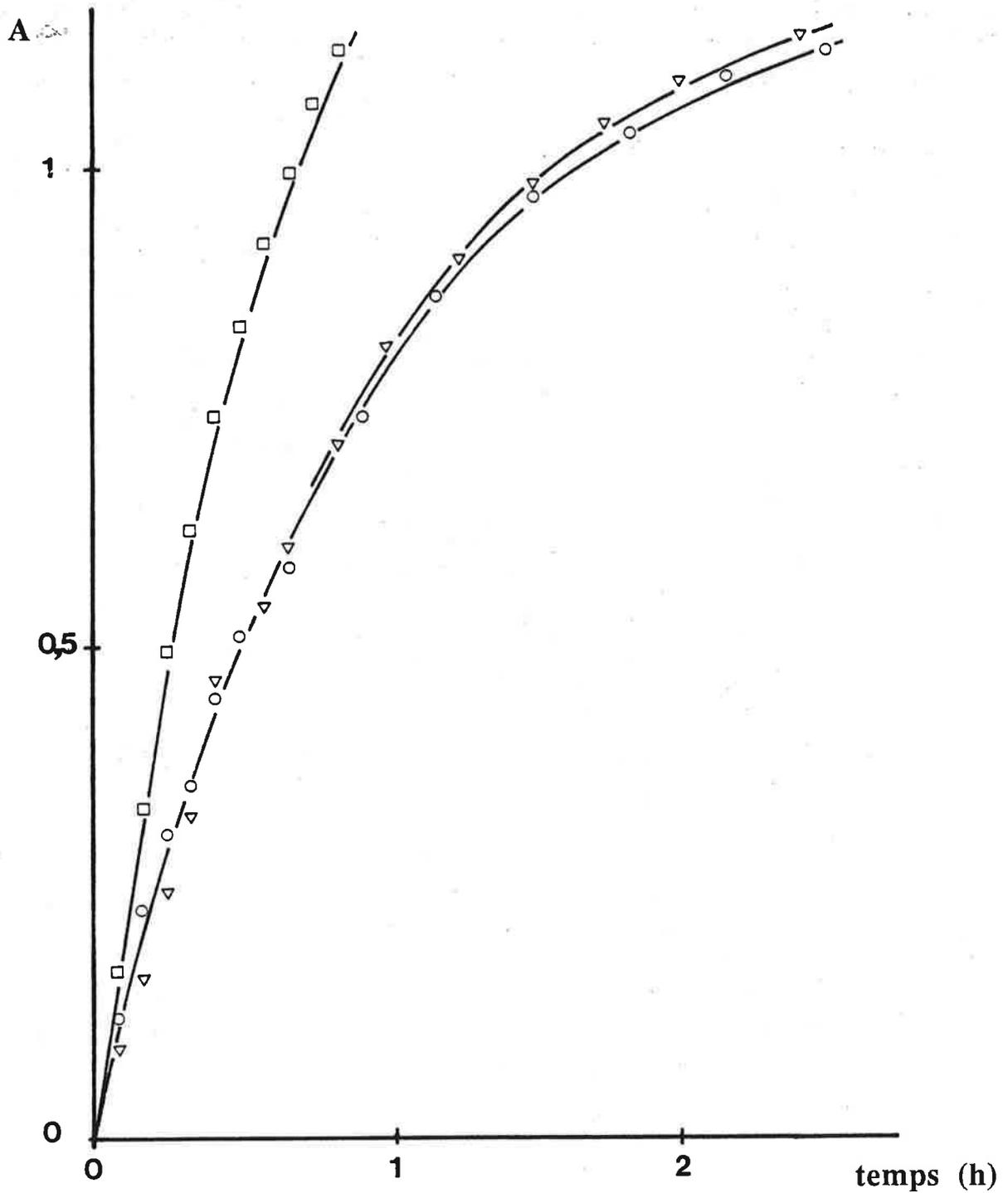


Figure 16 a : Cinétique d'hydrolyse du substrat BuSChI par la poudre de silice à BuChE greffée suivant le procédé SiO₂-2 (solvant=acétone, T=25°C).

□ 1^{er} essai de l'activité enzymatique

▽○ 2^e et 3^e essais de l'activité enzymatique

Conditions opératoires : 500 mg de silice dans 5 cm³ de tampon phosphate 10⁻² M à pH=7,2 et contenant BuSChI à 10⁻⁴ M et DTNB à 2.10⁻⁴ M.

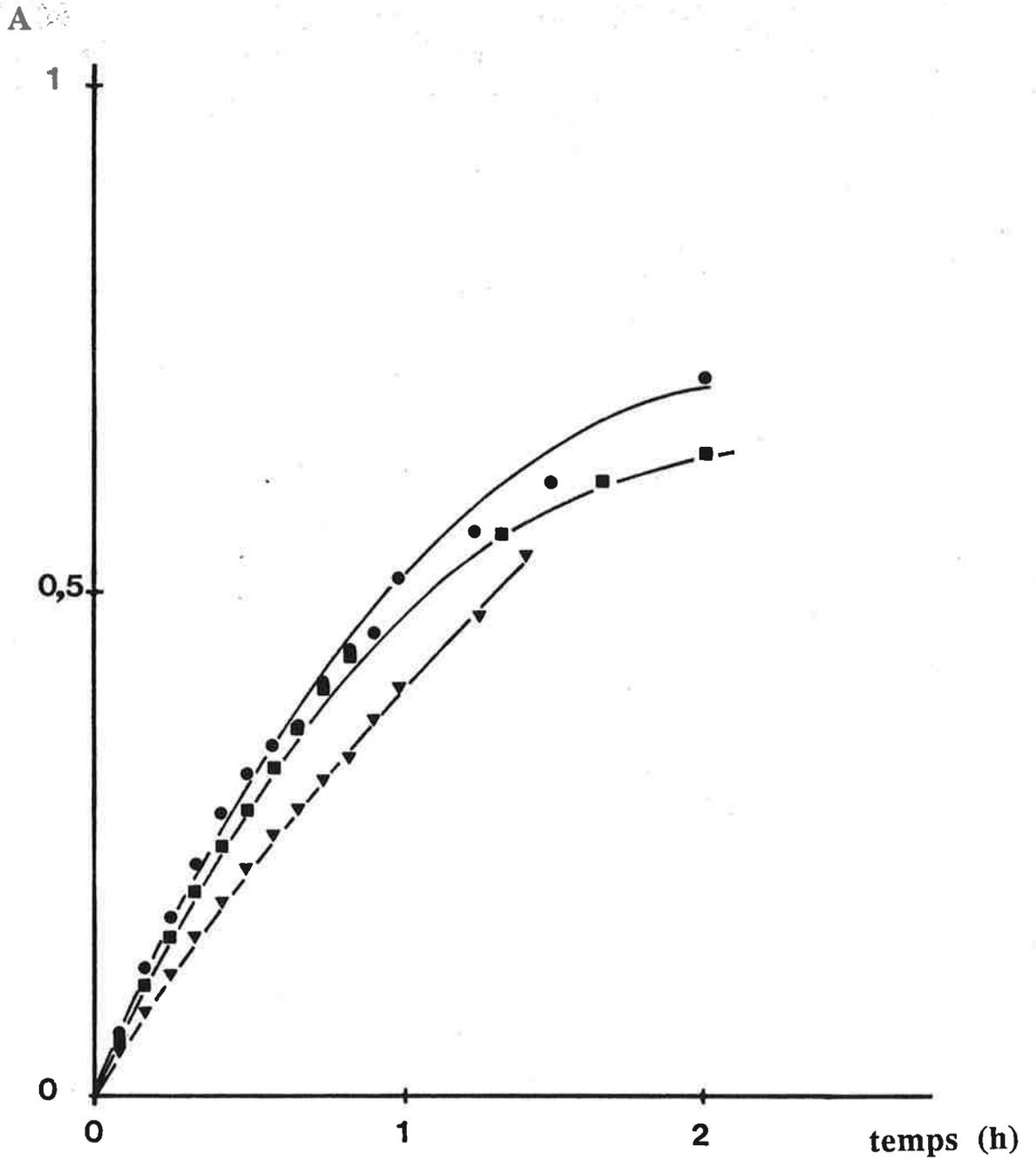


Figure 16 b : Cinétique d'hydrolyse du substrat BuSChI par la poudre de silice à BuChE greffée suivant le procédé SiO₂-2 (solvant=acétone, T=25°C), suivi d'un cycle de traitement glutaraldéhyde-BuChE.

- 1^{er} essai de l'activité enzymatique
- 2^e essai de l'activité enzymatique
- ▼ 3^e essai de l'activité enzymatique

Conditions opératoires : 500 mg de silice dans 5 cm³ de tampon phosphate 10⁻² M à pH=7,2 et contenant BuSChI à 10⁻⁴ M et DTNB à 2.10⁻⁴ M.

$V_{SiO_2}^{\circ} \cdot 10^6$
(mole/l.mn.gSiO₂)

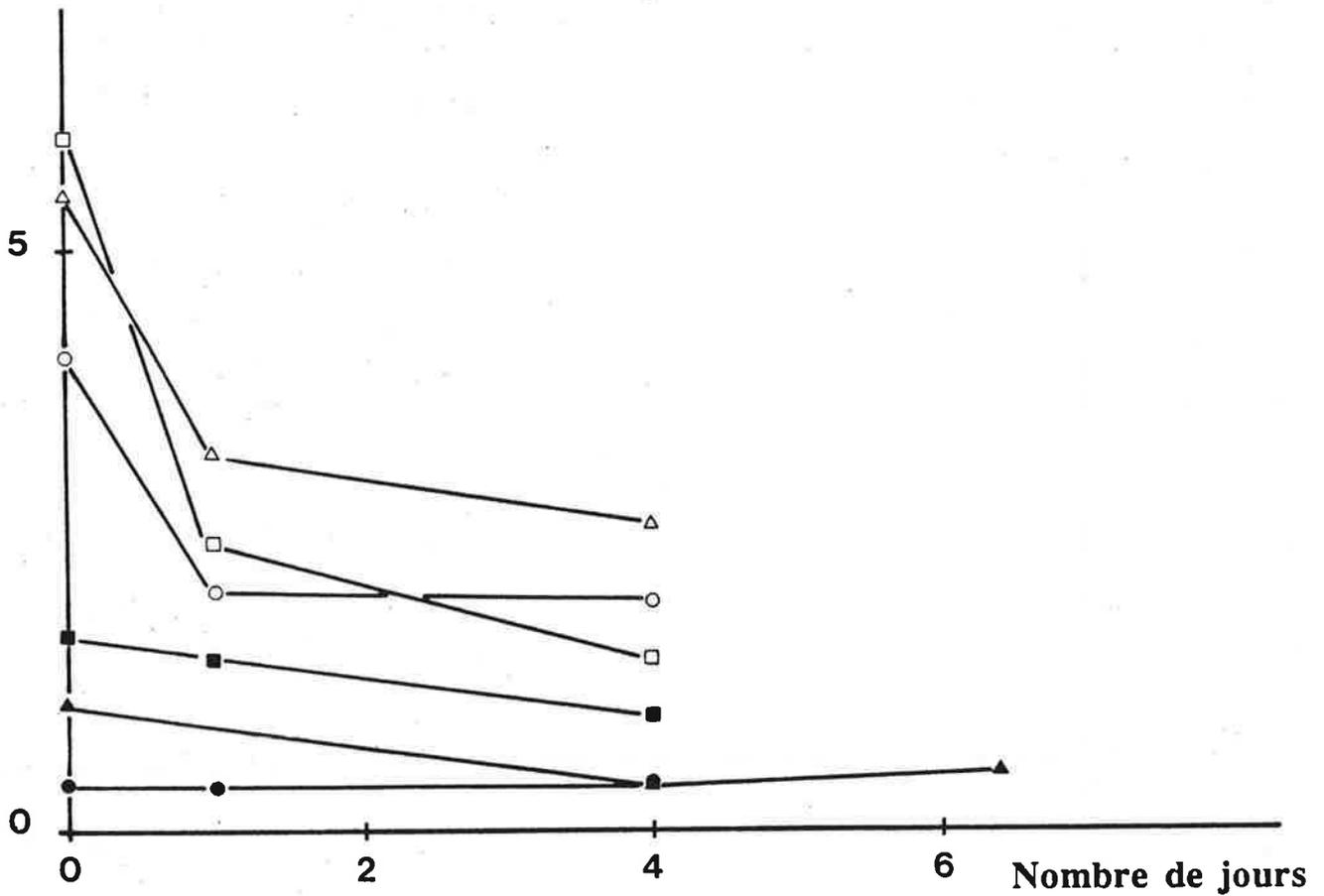


Figure 17 : Cinétique d'hydrolyse $V_{SiO_2}^{\circ}$ à l'instant $t=0$ du substrat BuSChI par la poudre de silice à BuChE greffée suivant le procédé SiO₂-2 (solvant=acétone, T=25°C) Δ \square \circ , suivi d'un cycle de traitement glutaraldéhyde-BuChE \blacktriangle \blacksquare \bullet , en fonction du temps de conservation. Entre deux essais, la poudre est conservée dans du tampon phosphate 10^{-2} M à pH=7,2 et à 4°C. Conditions opératoires : 500 mg de silice dans 5 cm³ de tampon phosphate 10^{-2} M à pH=7,2 et contenant BuSChI à 10^{-4} M et DTNB à $2 \cdot 10^{-4}$ M.

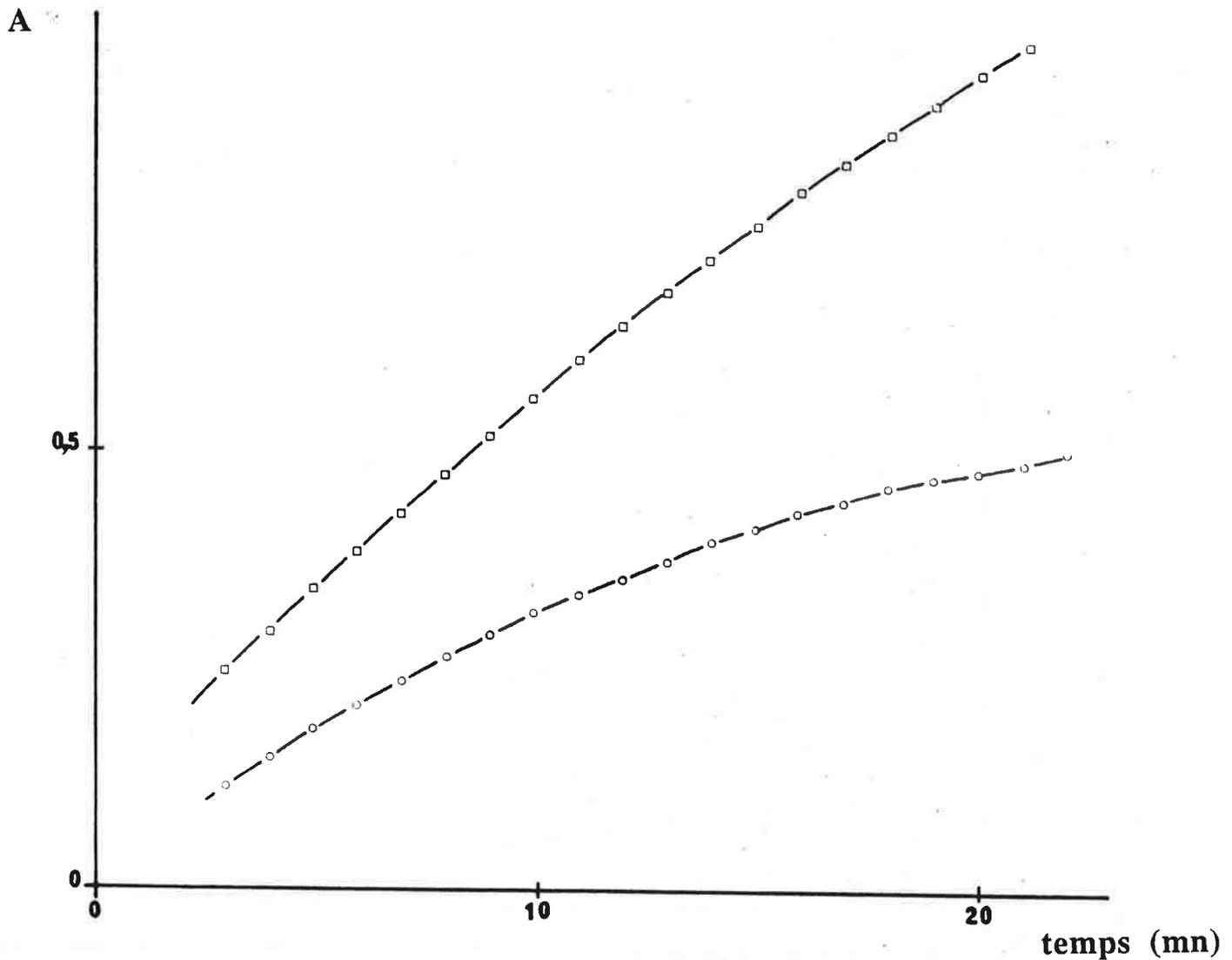


Figure 18 : Cinétique d'hydrolyse du substrat BuSChI par la poudre de silice à BuChE greffée suivant le procédé $\text{SiO}_2\text{-2}$ (solvant=acétone, $T=25^\circ\text{C}$).
□ Activité enzymatique obtenue immédiatement après le greffage de BuChE.
○ Activité enzymatique résiduaire après 15 mn de contact avec une solution tampon 10^{-2}M contenant du paraoxon à $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$.
Conditions opératoires : 500 mg de silice dans 5 cm^3 de tampon phosphate 10^{-2}M à $\text{pH}=7,2$ et contenant BuSChI à 10^{-4}M et DTNB à $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$.

Une explication peut justifier ce type de comportement: le deuxième traitement au glutaraldéhyde, au lieu de créer des liaisons entre enzymes immobilisées et enzymes en solution, servirait surtout à créer des liaisons entre les enzymes à la surface de la poudre, contribuant ainsi à diminuer leur activité catalytique.

Nous verrons ultérieurement, dans le Chapitre 4 que, pour un fil de palladium, le greffage en multicouche contribue au contraire à augmenter l'activité catalytique du support.

B-IV TEST DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE APRES INHIBITION PAR LE PARAOXON

Un inhibiteur de l'activité de la BuChE [87-89] : le paraoxon, qui est un insecticide, a été mis en présence de la poudre silice à BuChE greffée, ceci dans le but de vérifier que les propriétés classiquement observées de la BuChE subsistent après son greffage par le procédé décrit. Pour une concentration en paraoxon de 5.10^{-4} M et un temps de contact poudre-paraoxon de 15 mn, on constate une baisse effective de l'activité enzymatique de la poudre, qui est illustrée par la Figure 18. Des utilisations ultérieures de silice greffées pour la détection d'inhibiteurs de la butyrylcholinestérase peuvent donc être envisagées.

B-V CONCLUSION

Cette étude de faisabilité est suffisamment concluante pour envisager de l'étendre à la réalisation d'un biocapteur à fibre optique, à butyrylcholinestérase greffée, destiné à la détection d'inhibiteurs de cette enzyme. Il restera à optimiser le choix de la fibre, et ses dimensions, ainsi que la quantité d'enzyme à greffer, de façon à en obtenir un signal exploitable, et un niveau de sensibilité très bas.

C - L'OXYDE DE NICKEL COMME SUPPORT D'IMMOBILISATION

C-I INTRODUCTION

Comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre 1, le greffage de l'enzyme sur le support en oxyde de nickel NiO est préliminaire à la réalisation d'un capteur enzymatique à base de Ni/NiO.

Les méthodes de greffage sur oxydes métalliques citées dans la bibliographie cherchent à utiliser les fonctions hydroxyles -OH qui se trouvent à leur surface, pour créer des liaisons covalentes avec l'enzyme par l'intermédiaire d'un agent pontant. Elles mettent en jeu des réactifs tels le carbodiimide sur Sb_2O_3 [51], le chlorure de cyanuryle sur IrO_2 [50], et le bromure de cyanogène sur TiO_2 [90].

En ce qui nous concerne, le réactif utilisé pour greffer l'enzyme sur le support NiO est le chlorure de cyanuryle.

L'utilisation de l'oxyde de nickel NiO comme support d'immobilisation d'enzyme n'est pas toute récente. En effet, Weetal est le premier à l'utiliser comme support à l'immobilisation de glucose oxydase [91]. Il est suivi plus tard par Munro et coll. [92], puis Dunnill et coll. [57]. Ces auteurs ont choisi cet oxyde essentiellement pour les raisons suivantes:

- il présente une résistance substantielle à la corrosion.
- c'est un oxyde qui présente une surface spécifique assez importante, bien que ses particules ne soient pas poreuses.

L'oxyde de nickel utilisé est en général obtenu par oxydation contrôlée d'une poudre de nickel. L'activation de ce support se fait ensuite par la même méthode de silanisation explicitée dans les paragraphes A et B de ce chapitre.

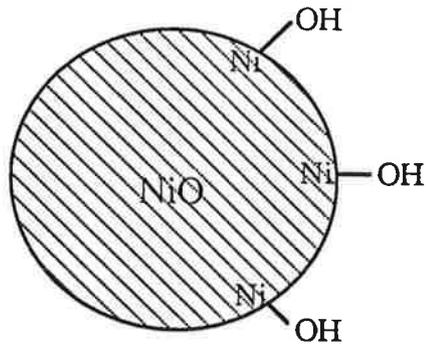


Figure 19 a: Schématisation de la poudre d'oxyde de nickel

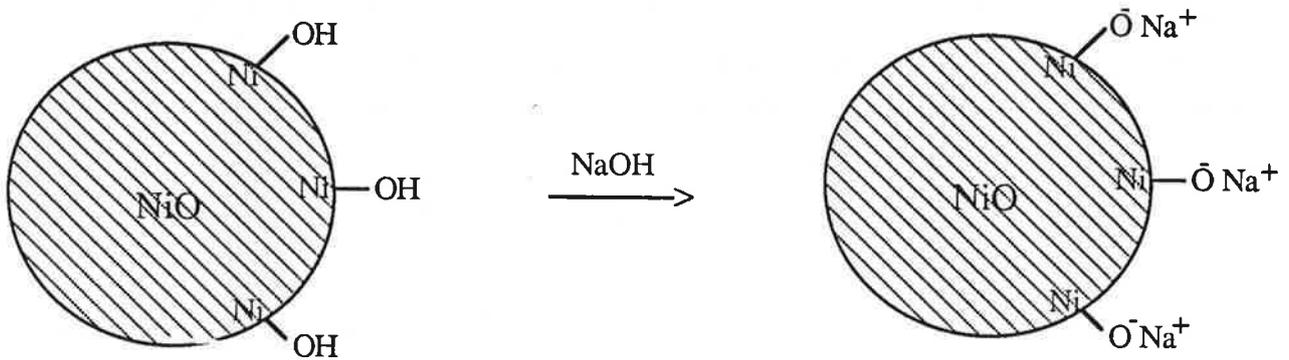


Figure 19 b: Ionisation des fonctions de surface de la poudre de NiO

Il est à remarquer d'autre part qu'aucune étude concernant l'adsorption d'enzymes sur la poudre d'oxyde de nickel n'a été faite en amont des travaux cités, ce qui nous a semblé être une lacune compte tenu du fait que cette adsorption peut être importante, comme c'est le cas pour l'alumine par exemple [93].

Suite aux constatations faites ci-dessus, nous avons cherché à étudier:

- d'une part l'adsorption de l'enzyme sur la poudre de NiO.
- d'autre part une méthode d'immobilisation sur l'oxyde de nickel, qui ne nécessiterait qu'une seule étape. La méthode d'activation au chlorure de cyanuryle, citée dans le Chapitre 1 pour l'activation des supports organiques en cellulose ou collagène, a été retenue.

La méthodologie de travail est la suivante:

Divers procédés d'activation au chlorure de cyanuryle, appliqués dans la littérature à des supports que nous rappellerons au fur et à mesure, sont repris pour l'oxyde de nickel. L'influence de paramètres tels *le traitement préalable de la poudre à la soude, le solvant de travail, la concentration en chlorure de cyanuryle, et le temps de traitement* a été étudiée.

La température est un paramètre qui a été optimisé par les auteurs des différents procédés; nous avons conservé la température optimale citée dans chaque cas.

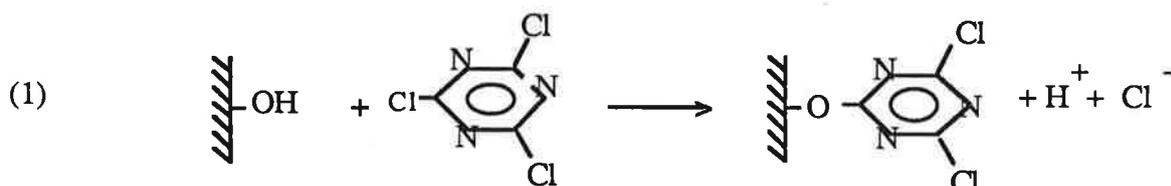
La poudre d'oxyde de nickel sur laquelle on a travaillé est fournie par Prolabo. Elle est de couleur verdâtre, et de granulométrie inconnue. Sa surface, mesurée par la méthode BET est de $11,9 \text{ m}^2/\text{g}$, et sa densité : $d= 6,67$.

C-II PROCÉDÉS UTILISÉS POUR L'ACTIVATION DE L'OXYDE DE NICKEL

Quatre modes opératoires différents ont été testés pour activer cette poudre. Leur point commun reste l'utilisation du chlorure de cyanuryle, dont nous pouvons rappeler ici qu'elle est active sur des surfaces présentant des fonctions -OH. La surface de l'oxyde de nickel est schématisée sur la Figure 19 a. Les solvants et les conditions de travail varient d'un procédé à l'autre, procédés qui ont été adaptés d'après les utilisations bibliographiques que nous rappellerons.

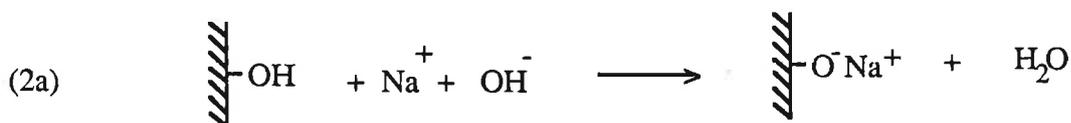
C-II-1 Rappel et complément sur le mécanisme d'activation au chlorure de cyanuryle

Les carbones du chlorure de cyanuryle sont les cibles d'attaques nucléophiles, qui se traduisent par une substitution des chlorures par des groupements chargés négativement. Ainsi, il a été démontré [54][56][64][94] que les groupements -OH de la cellulose ou du graphite oxydé pouvaient interagir avec le chlorure de cyanuryle de la façon suivante :

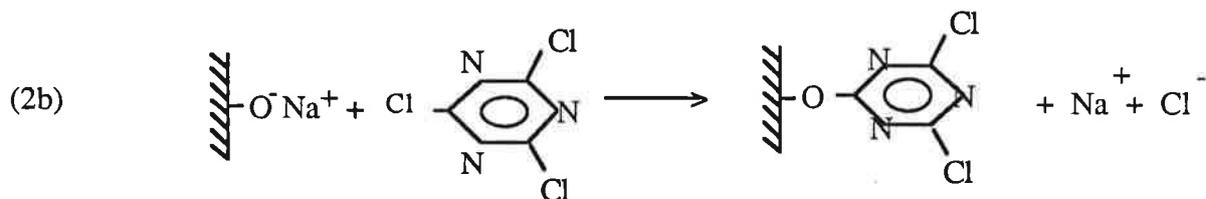


Intéraction entre les groupements -OH du support et le chlorure de cyanuryle

La cinétique de cette réaction est lente, à cause de la faible nucléophilie du groupement -OH. Les auteurs l'ont accélérée [54] en transformant ce groupement en $\text{-O}^- \text{Na}^+$ (schématisation Figure 19 b), obtenu par simple traitement à la soude du graphite pyrolytique, comme le montrent les schémas réactionnels 4a-4b :



Ionisation des fonctions OH du support,



Intéraction entre les groupements $\text{-O}^- \text{Na}^+$ du support et le chlorure de cyanuryle

Dans les procédés que nous décrivons ultérieurement, l'étape de traitement à la soude est souvent reprise, dans le but d'assurer les meilleurs conditions pour que la substitution ait lieu. Pour ce faire, nous équilibrons la poudre de NiO, préalablement hydratée (cf.

paragraphe C-II-2), avec une solution de soude 1 M. Cette poudre est ensuite filtrée sur papier filtre Wattman, et séchée soit sous vide, soit à l'étuve. Nous la notons alors NiO_h-NaOH.

C-II-2 Obtention de NiO hydraté

Quelques premiers essais d'adsorption d'enzyme sur la poudre non traitée nous ont fourni des résultats décevants: la poudre, après un temps d'adsorption de 12 h, ne présentait qu'une très faible activité enzymatique, résultat que nous avons attribué à son hydrophobicité.

Nous avons alors été amenés à effectuer systématiquement une hydratation de la poudre à activer: cette opération est en général obtenue [76] sur la silice par traitement à l'acide nitrique concentré. L'oxyde de nickel quant à lui se dissout dans cet acide, avec formation de nitrate de nickel ; pour l'hydrater, nous l'avons simplement placé sous agitation, dans de l'eau portée à ébullition, pendant 20 mn. Il est ensuite séché sous vide en présence de silica gel pendant deux jours. La poudre obtenue est notée NiO_h.

C-II-3 Activation NiO-1

Ce procédé a été adapté de celui décrit par [45], pour le traitement de graphite destiné à l'immobilisation de glucose oxydase, en vue de l'obtention d'une électrode à glucose.

Le traitement porte sur 5g de NiO_h-NaOH, qui sont dispersés dans 50 cm³ de benzène, contenant 1g de chlorure de cyanuryle; le tout est porté à ébullition, sous reflux, pendant un temps t, dont l'influence sera étudiée au paragraphe C-IV-2-a .

La poudre est ensuite récupérée par filtration, puis lavée à l'acétone plusieurs fois, avant d'être séchée à l'étuve portée à 50°C, pendant une nuit.

C-II-4 Activation NiO-2

La cellulose a été activée à l'aide d'un dérivé du chlorure de cyanuryle [95], pour l'obtention d'un garnissage de colonne chromatographique à enzyme immobilisée. Ce protocole est repris ici, pour la poudre d'oxyde de nickel.

On traite 1g de NiO_h, successivement lavé avec une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans l'eau, dans un rapport volumique de 1 à 9, puis dans un rapport de 9 à 1. La poudre est récupérée par centrifugation, puis laissée en contact avec 100 mg de chlorure de

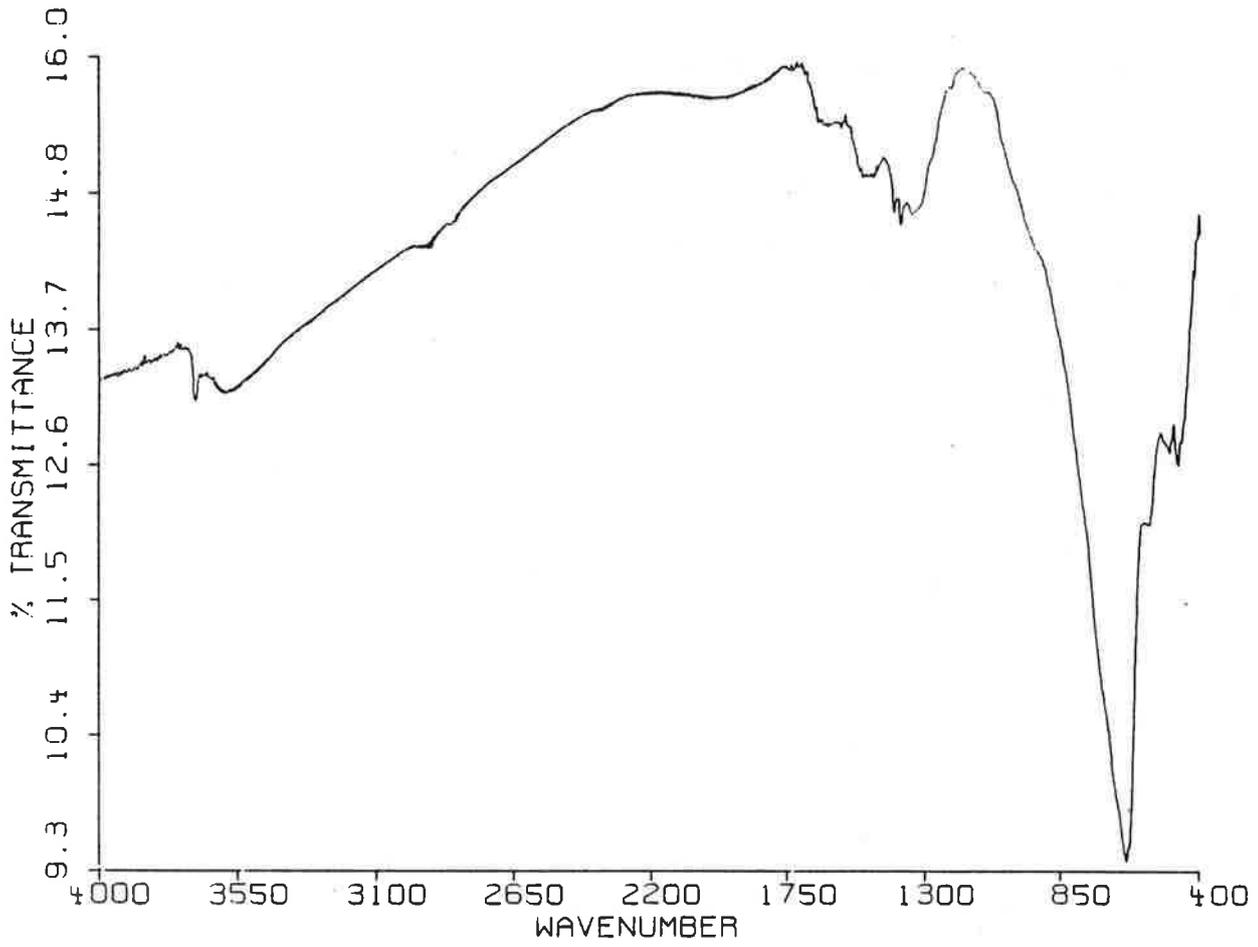


Figure 20 : Spectre IRTF de l'oxyde de nickel d'origine.

cyanuryle, dans 10 cm³ d'un mélange DMSO / H₂O à 9/1 (v/v), et de la soude à 0,1M. Le tout est maintenu à 4°C pendant un temps de réaction de 1 heure environ. La poudre est récupérée par filtration, lavée avec le mélange DMSO / H₂O à 1/9, (v/v), puis lavée à l'eau ultra-pure.

C-II-5 Activation NiO-3

Le dioxyde d'irridium IrO₂ a été activé par cette voie par Yacynych et coll. [50], qui ont ensuite immobilisé à sa surface de l'uréase, pour obtenir une électrode à urée. Yacynych et coll. ont démontré que le dioxyde d'irridium pouvait fonctionner comme électrode de pH. Les auteurs ont ensuite cherché à l'utiliser comme électrode à urée en greffant de l'uréase à sa surface. Le chlorure de cyanuryle est utilisé comme agent pontant. Nous avons cherché à transposer ce procédé à l'oxyde de nickel; le protocole est le suivant:

On disperse 1g de NiO_h ou NiO_h-NaOH dans 50 cm³ d'acétone, contenant une masse donnée de chlorure de cyanuryle, à 0°C. Le temps de contact, ainsi que la concentration en chlorure de cyanuryle ont un effet sur le traitement, qui sera discuté ultérieurement, dans les paragraphes C-IV-2-b, et C-IV-3.

Le traitement est conclu par plusieurs lavages à l'acétone, avant de laisser sécher la poudre, sous vide, et en présence de Silica Gel.

C-II-6 Activation NiO-4

Nous avons mis au point ce procédé, après avoir fait une synthèse des résultats obtenus avec ceux que nous avons adaptés précédemment.

Le traitement porte sur 1,5 g de NiO_h-NaOH, qui sont dispersés dans 10 cm³ de DMSO, contenant 300 mg de chlorure de cyanuryle. Le tout est laissé sous agitation, à 4°C, pendant 3 heures. La poudre est ensuite lavée à l'eau ultra-pure.

C-III CARACTERISATION DE L'EFFICACITE DU GREFFAGE PAR IRTE

C-III-1 Rappels sur la méthode

Les échantillons sont systématiquement lavés plusieurs fois à l'acétone pour éliminer les contaminants éventuels, dont les produits intermédiaires du traitement, adsorbés en surface. Ils sont ensuite placés sous vide pendant 1 à 2 jours pour être complètement séchés.

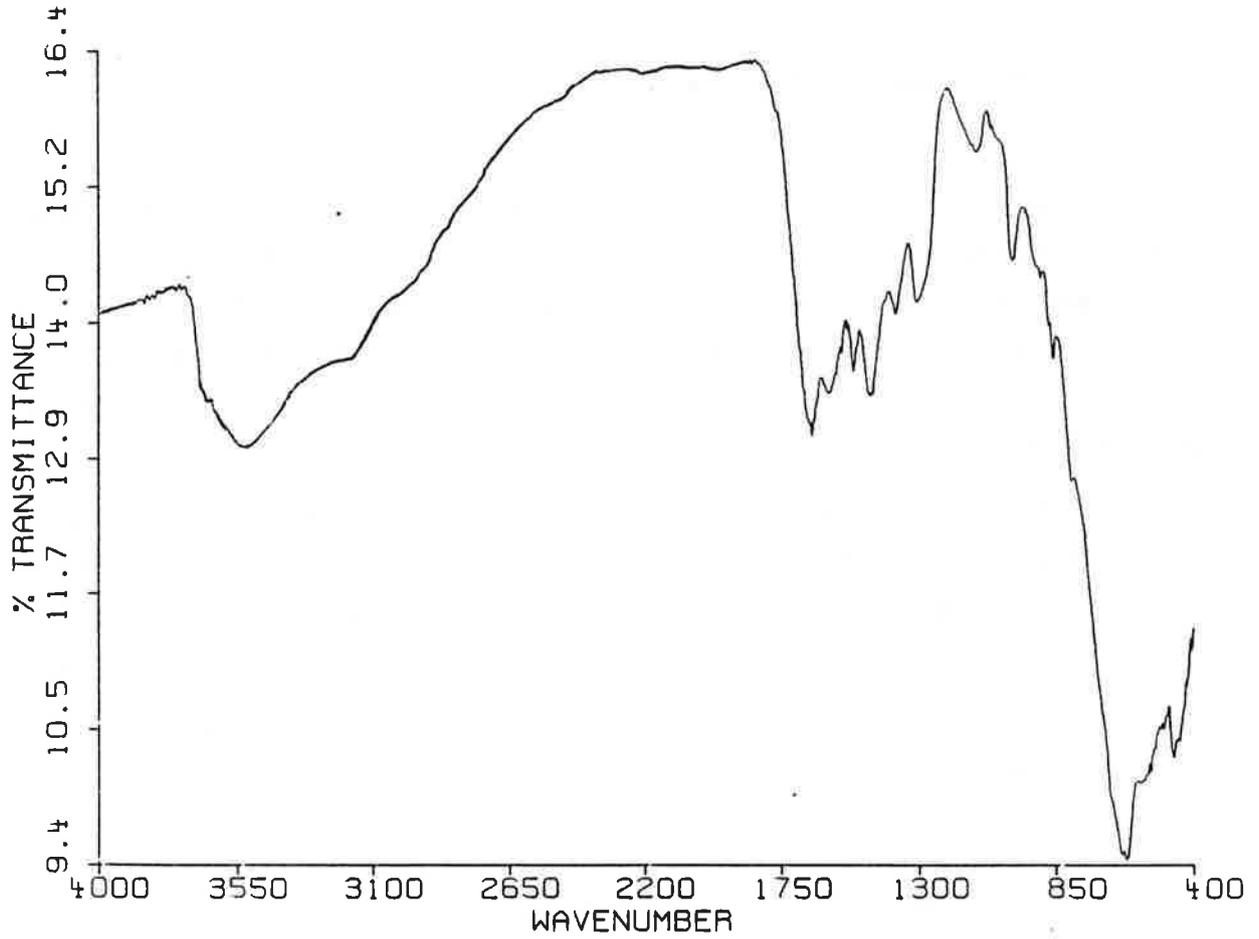


Figure 21 : Spectre IRTF de l'oxyde de nickel hydraté, et traité à la soude ($\text{NiO}_h\text{-NaOH}$).

Un flux d'azote est mis en circulation au-dessus de l'échantillon pendant 30 mn environ, pour évacuer toute trace de vapeur d'eau, immédiatement avant de prendre les premiers spectres. On en effectue quelques-uns pendant le séchage ; ils sont considérés comme définitifs quand toute trace des pics des solvants a disparu.

C-III-2 Suivi d'un procédé de greffage par spectrométrie IRTF

Seuls les spectres IRTF obtenus avec le procédé NiO-3 seront explicités ici, par souci de ne pas alourdir le texte. Trois échantillons ont été passés au spectromètre IRTF:

- Oxyde de nickel d'origine, sans aucun traitement; son spectre est celui de la Figure 20.
- Oxyde de nickel hydraté par un séjour dans l'eau à ébullition, puis traité à la soude 0,1 M, et séché; son spectre est celui de la Figure 21.
- Oxyde de nickel ayant subi le traitement au chlorure de cyanuryle suivant le procédé NiO-3; son spectre est celui de la Figure 22.

C-III-3 Interprétation des spectres

Le spectre IRTF de l'oxyde de nickel d'origine, (Figure 20), présente un pic vers 3680 cm^{-1} , qui est dû à des liaisons OH en surface de la poudre, ainsi qu'une "bosse" vers 3550 cm^{-1} , qu'on attribue à des groupements OH intramoléculaires. On confirme ainsi la présence de fonctions -OH en surface de la poudre, et donc la possibilité d'opérer sur celle-ci un greffage du chlorure de cyanuryle.

Le traitement de l'oxyde de nickel par la soude concentrée avait pour but d'ioniser la surface de la poudre, suivant le schéma réactionnel décrit en (4a). L'efficacité de ce traitement est confirmée par le spectre IRTF obtenu (Figure 21), qui ne présente pas de pic à 3680 nm comme précédemment, ce qui est une preuve que les H^+ des fonctions -OH de surface ont été remplacés par des ions Na^+ . D'autre part, on retrouve la "bosse" à 3550 cm^{-1} , qui montre que les liaisons OH intramoléculaires ne sont pas perturbées par le traitement à la soude.

L'interprétation du spectre de l'oxyde de nickel obtenu après le traitement au chlorure de cyanuryle (Figure 22), nous a obligés à envisager des réactions parasites. En effet,

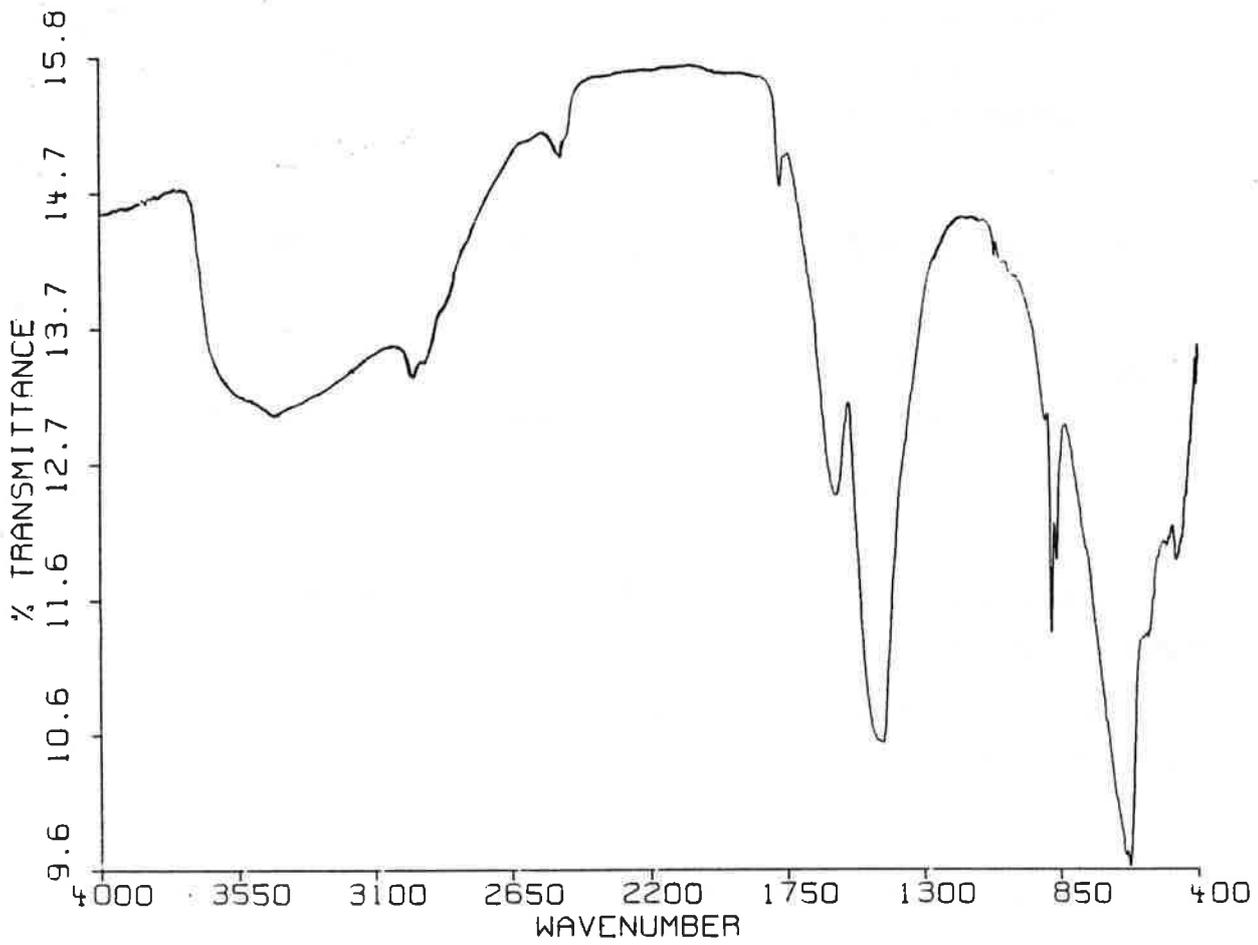
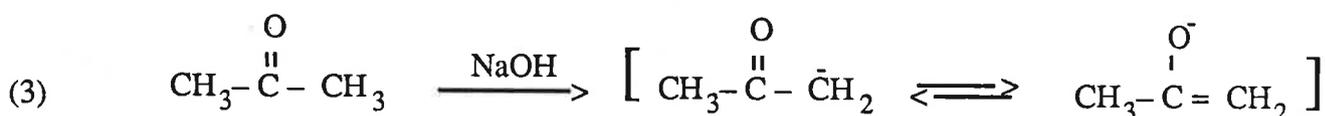


Figure 22 : Spectre IRTF de l'oxyde de nickel hydraté, traité à la soude, puis au chlorure de cyanuryle suivant le procédé NiO-3.

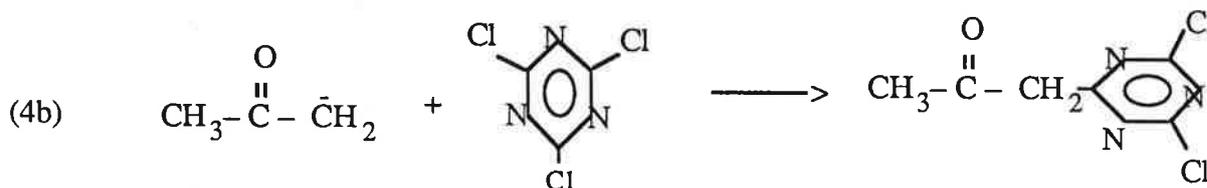
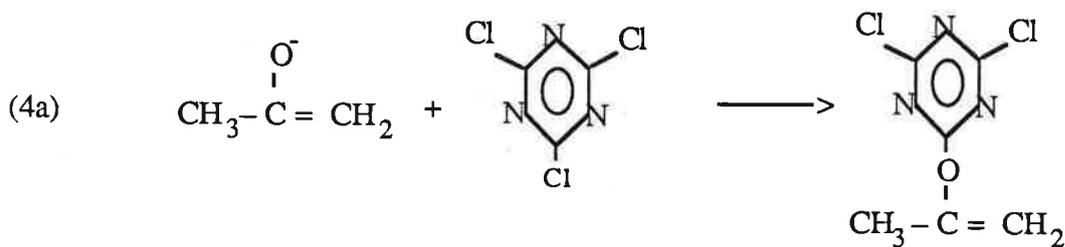
si on n'était qu'en présence de chlorure de cyanuryle à la surface de la poudre, on retrouverait exclusivement les bandes d'absorption de celle-ci, lesquelles sont données sur la Figure 23. Or, ce n'est pas le cas, puisqu'on retrouve une bande d'absorption vers 3000 cm⁻¹, correspondant la liaison C-H, mais aussi des bandes à 1780, 1600, 1450, 900, 875, et 850 cm⁻¹.

Les sous-produits parasites dont nous observons la présence peuvent être issus des réactions secondaires issus d'une "énolisation" de l'acétone comme le montre le schéma réactionnel (5).



Enolisation de l'acétone en milieu basique.

L'énolate obtenu, stabilisé par résonance, est responsable de la coloration jaune du milieu qu'on observe; les réactions parasites qui peuvent résulter de la présence de cet énolate sont décrites par les schémas réactionnels (6a) et (6b).



Réactions parasites: acétone énolisé + chlorure de cyanuryle

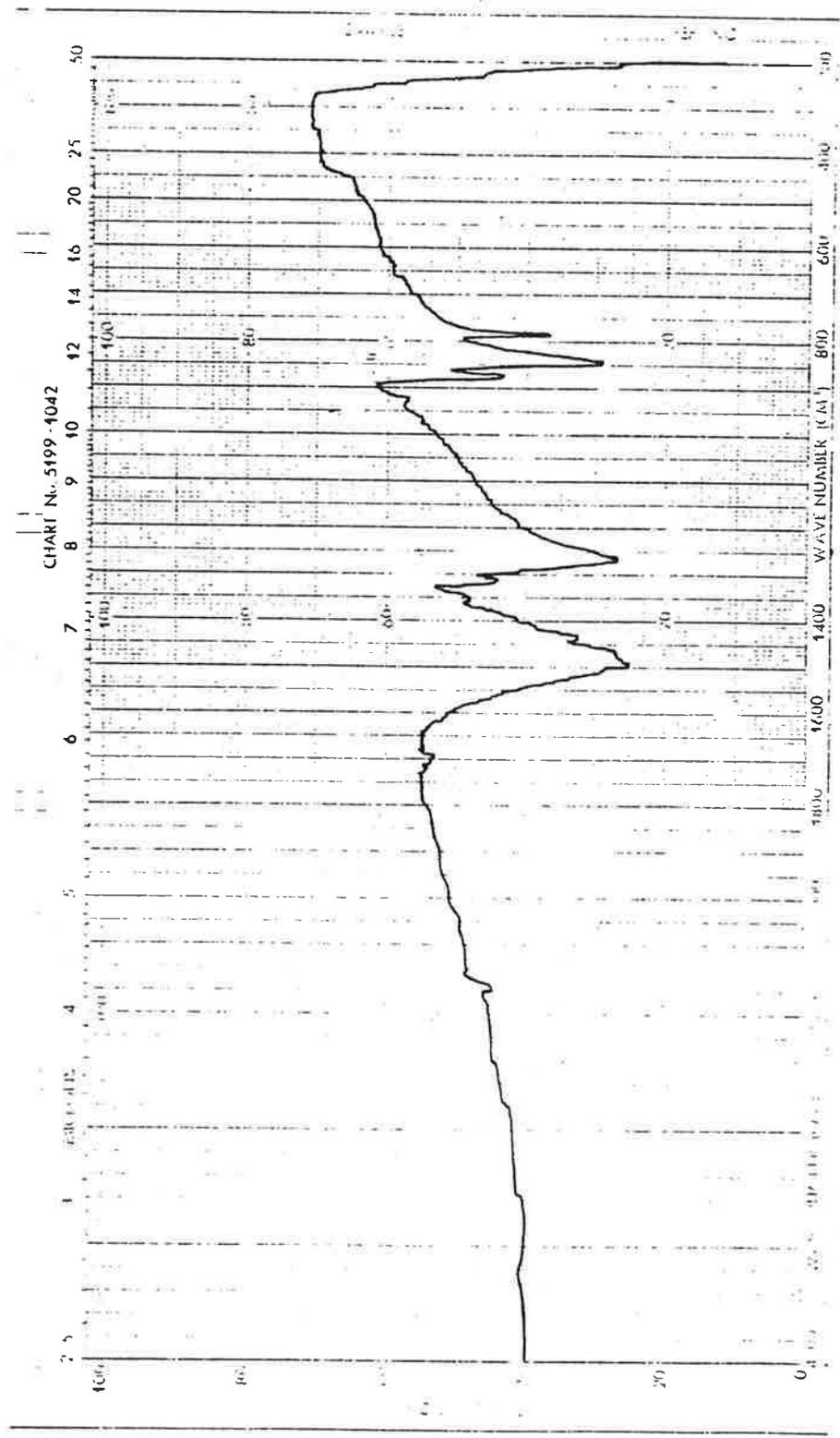


Figure 23 : Spectre infra-rouge du chlorure de cyanuryle.

Cette hypothèse semble confirmée par le spectre IRTF, puisqu'on peut attribuer les bandes d'absorption observées:

- aux déformations des liaisons C=CH₂, pour 1780 cm⁻¹.
- aux élongations des liaisons C=C pour 1600 cm⁻¹.
- aux élongations des liaisons C=N, et C-N, ainsi qu'aux déformations des liaisons C=CH₂, pour 1450 cm⁻¹.
- à l'élongation des liaisons C-O, pour 1075 cm⁻¹.
- et aux liaisons C-Cl pour les deux derniers pics à 850 et 875cm⁻¹.

Conclusion:

On peut donc conclure que ce traitement permet certes de greffer le chlorure de cyanuryle sur la surface de l'oxyde de nickel, mais aussi des sous-produits indésirables. A ce stade de notre travail, nous ne pouvons dire par quel moyen ces sous-produits restent fixés en surface malgré des lavages fréquents à l'acétone, et s'ils sont simplement adsorbés ou greffés par des liaisons covalentes.

C-IV OBTENTION D'UNE POUDRE ENZYMATIQUEMENT ACTIVE

C-IV-1 Mode opératoire

Une fois l'étape "activation" réalisée, la poudre est séchée sous vide en présence de Silica Gel pendant 2 jours. Elle est ensuite conservée dans un flacon hermétiquement clos pour minimiser toute variation de masse due à l'adsorption de la vapeur d'eau de l'atmosphère. L'immobilisation de l'enzyme sur la poudre peut être réalisée au fur et à mesure des besoins. Elle est effectuée comme suit :

200 mg de poudre sont dispersés dans 10 cm³ de tampon 0,1 M contenu dans un tube à essai de 15 cm³, et 10 mg d'uréase, correspondant à 700 UI, sont ensuite dissous dans cette solution. Le tout est agité de façon intermittente, à l'aide d'un agitateur Vortex, et placé au réfrigérateur (environ 4°C) pendant 24 heures. La poudre est ensuite récupérée par

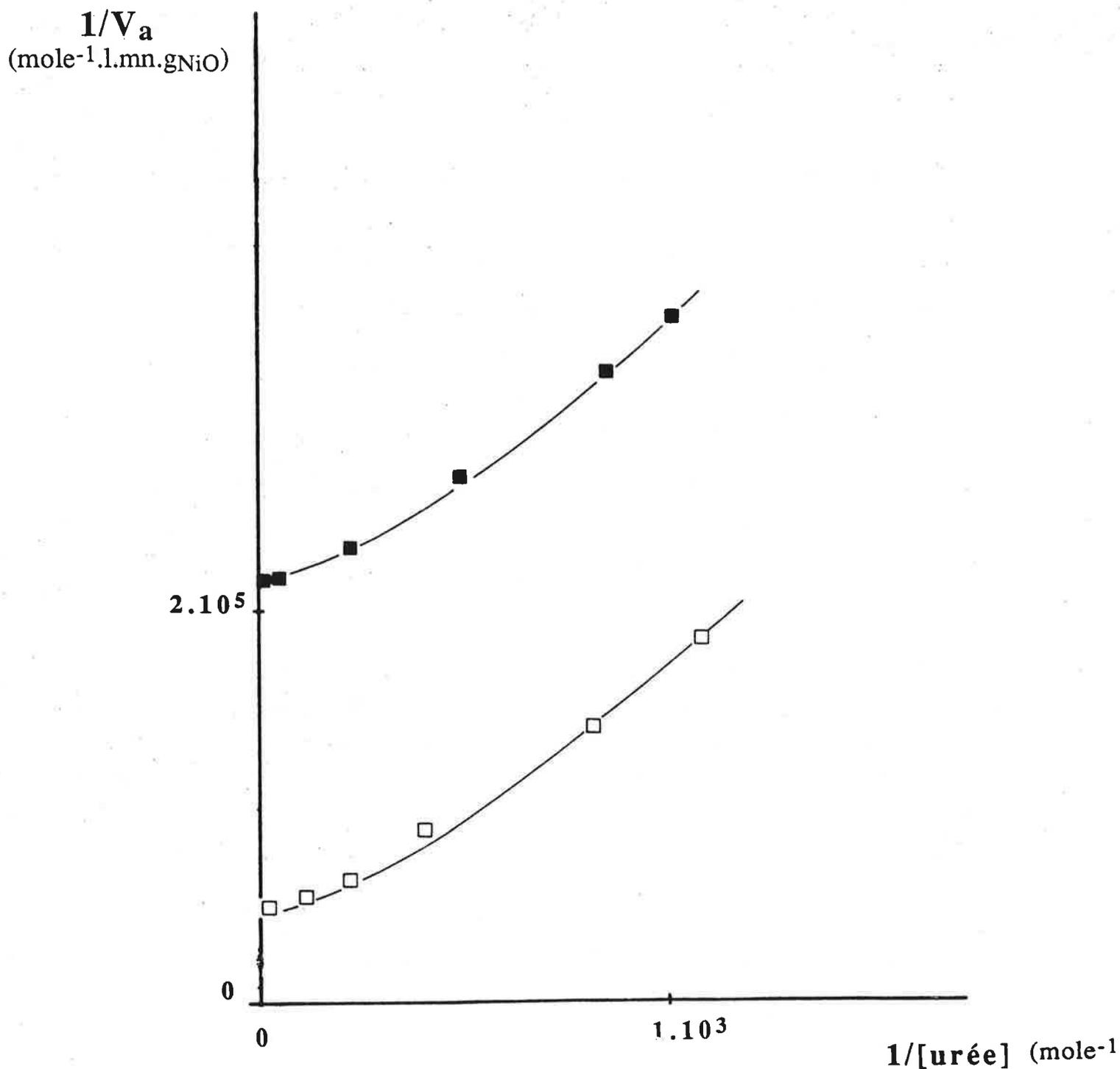


Figure 24 :

Tracé de Lineweaver-Burk pour NiO à uréase adsorbée :

- l'oxyde de nickel non hydraté
- l'oxyde de nickel hydraté (NiO_h).

Conditions de l'adsorption : 200 mg de poudre en contact avec 10 cm³ d'une solution de tampon phosphate 0,1 M, pH=7,2, à 1 mg d'uréase/cm³, pendant 12 h, à 4°C.

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

centrifugation ($v = 2000$ tours/min à $+ 4^{\circ}\text{C}$). Plusieurs cycles de lavage au tampon phosphate $0,1$ M, et de récupération par centrifugation sont nécessaires pour éliminer les enzymes retenues à la surface de la poudre par simple adsorption physique. Pour ce faire, il est nécessaire de suivre l'évolution de la concentration en protéines des eaux de lavage par spectrophotométrie en se calant à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm, bande d'absorption des liaisons peptidiques des protéines.

Une fois qu'on s'est assuré de la disparition totale des protéines dans les eaux de lavage, la poudre est ensuite rincée 3 fois avec du tampon phosphate 10^{-4} M. Elle est alors prête à l'emploi, et en particulier au test du pH-stat, qui permet de déterminer l'activité enzymatique de la poudre ainsi traitée.

Le même mode opératoire a été appliqué à une poudre NiO d'origine, puis à une poudre NiO_h, ceci dans le but de connaître le taux d'adsorption d'enzymes sur la poudre non traitée. Les résultats obtenus sont indispensables pour conclure sur l'intérêt du traitement d'activation.

C-IV-2 Test de l'activité enzymatique au pH - stat.

Le test pH-stat est effectué dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe A-IV de ce chapitre, pour la poudre de monoxyde de silicium. De la même façon, l'exploitation des tracés délivrés par l'enregistreur est effectuée par la méthode de Lineweaver - Burk, et permet d'obtenir le V_{am} de la poudre active.

C-V INFLUENCE DES DIFFÉRENTS PARAMETRES SUR L'EFFICACITÉ DE L'ACTIVATION

C-V-1 Activité de la poudre à uréase adsorbée

Les tracés de Lineweaver-Burk obtenus pour l'oxyde de nickel à uréase adsorbée sont résumés sur la Figure 24. Deux constatations s'imposent:

- La poudre NiO_h hydratée présente une activité enzymatique nettement supérieure à celle de la poudre d'origine. L'étape d'hydratation favorise donc l'adsorption des protéines.

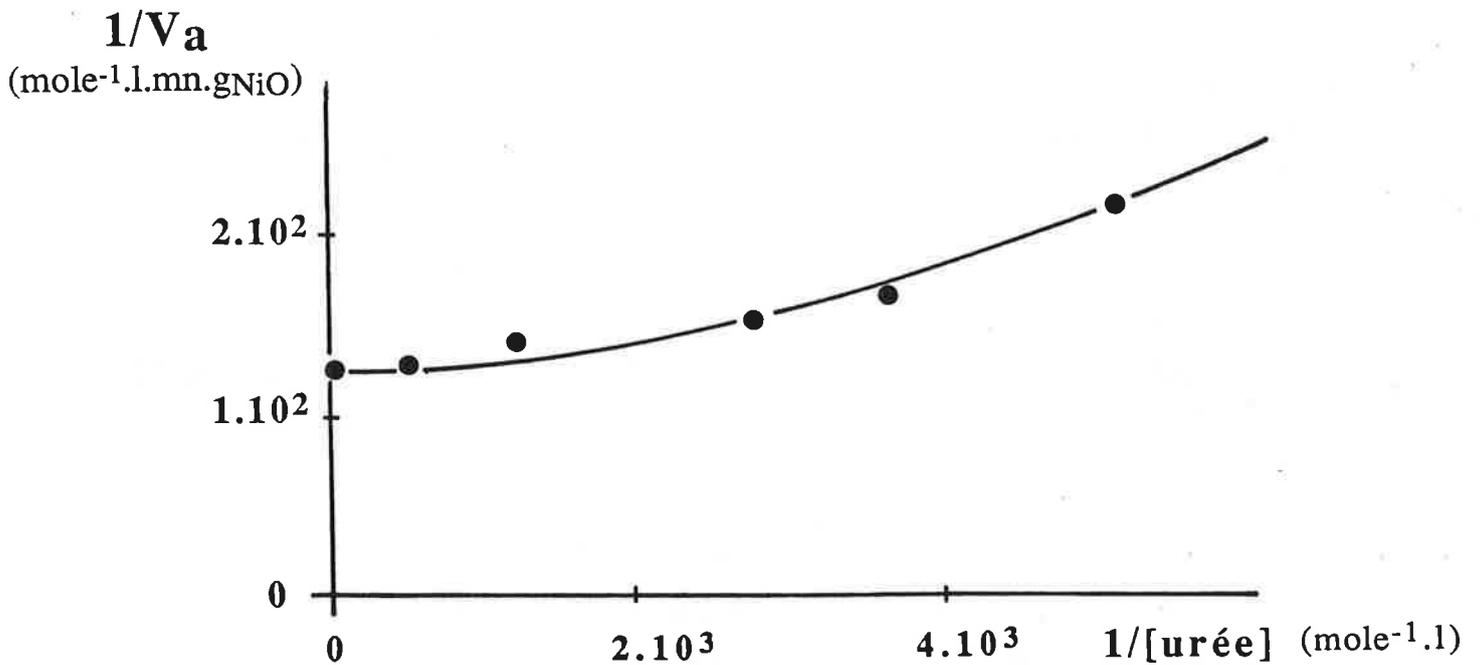
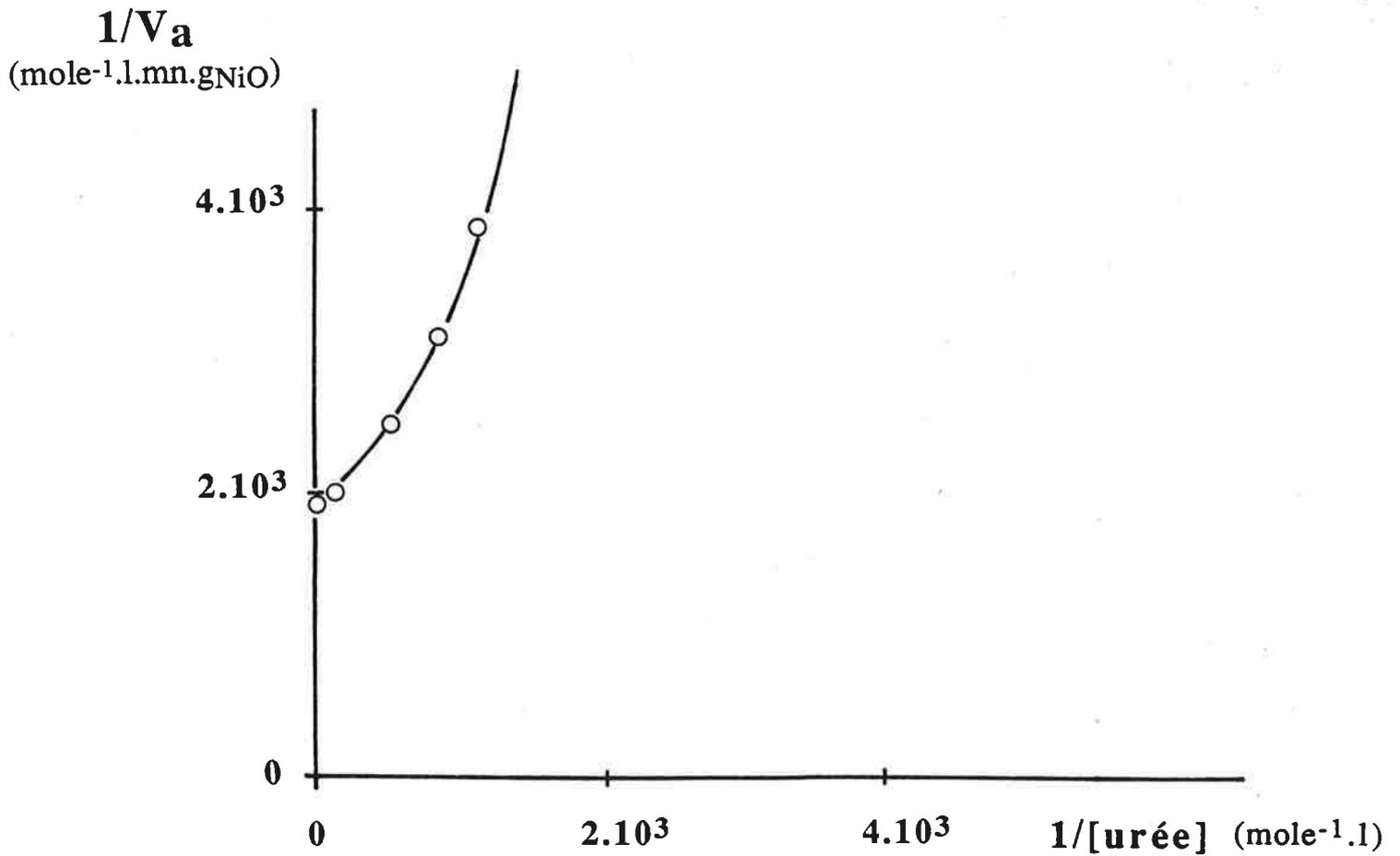


Figure 25 a : Influence du pré-traitement à la soude sur les tracés de Lineweaver-Burk pour NiO à uréase greffée suivant le procédé NiO - 1 (solvant = benzène, T= 80°C). Le temps d'activation t_{act} est de 5 h.

- NiO a été préalablement traité à la soude (NiOH-NaOH).
- NiO n'a pas été traité à la soude (NiO_h).

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 ml de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

- L'adsorption de l'enzyme est réversible: un contact de la poudre à uréase adsorbée avec une solution de tampon phosphate 0,1 M, et à 4°C cause la perte totale de toute activité enzymatique au bout de 2 jours. Cela nous amène à aborder la poudre à uréase greffée.

C-V-2 Influence du prétraitement à la soude

Les Figures 25 a, 25 b, et 25 c montrent les tracés de Lineweaver-Burk obtenus avec trois modes d'activation effectués avec et sans pré-traitement à la soude de la poudre d'oxyde de nickel. Dans tous les cas, son effet semble déterminant: la poudre prétraitée présente une activité enzymatique nettement plus élevée que celle qui ne l'est pas. On confirme d'une part le résultat du spectre IRTF, (paragraphe C-III-2), qui montrait que l'action de la soude sur la surface était effective, d'autre part l'importance d'ioniser la surface de la poudre pour garantir une activation efficace ultérieurement.

C-V-3 Influence du mode d'activation sur l'activité enzymatique de la poudre

Sur la Figure 26, nous avons superposé les tracés de Lineweaver-Burk obtenus pour les méthodes d'activation NiO-1, NiO-3, NiO-4, qui ont été appliqués à la poudre NiO pré-traitée à la soude. Le tableau I résume les valeurs des V_{am} qui sont déterminées à partir de ces tracés. Il est à noter que l'étape d'immobilisation étant maintenue identique, cette variation du V_{am} ne peut être imputée qu'aux traitements d'activation subis par la poudre. *On note une variation considérable du V_{am} suivant le procédé choisi.*

On constate une évolution croissante de l'activité de la poudre dans le sens: NiO-1 > NiO-3 > NiO-4, et dans le sens inverse des constantes diélectriques des solvants utilisés, c'est-à-dire: $\epsilon_{\text{benzène}}=1 < \epsilon_{\text{acétone}} = 29 < \epsilon_{\text{DMSO}} = 46$. Cependant, il n'est pas possible de conclure à l'influence de la constante diélectrique sur l'évolution de l'activité enzymatique de la poudre, à cause de la formation de produits due à des réactions parallèles, qui viennent s'adsorber à la surface de cette poudre, et peuvent en modifier l'état. C'est le cas des réactions d'énolisation qui ont lieu quand l'acétone est le solvant, comme on l'a déjà montré à l'aide des spectres IRTF (paragraphe C-III-2). C'est aussi le cas pour le mode d'activation NiO-2, où le solvant utilisé était un mélange eau-DMSO: le V_{am} de la poudre obtenue par ce procédé est inférieure à tous les autres, y compris celui correspondant à l'adsorption (Tableau I). On peut attribuer ce fait à la réaction parasite décrite par le schéma réactionnel suivant:

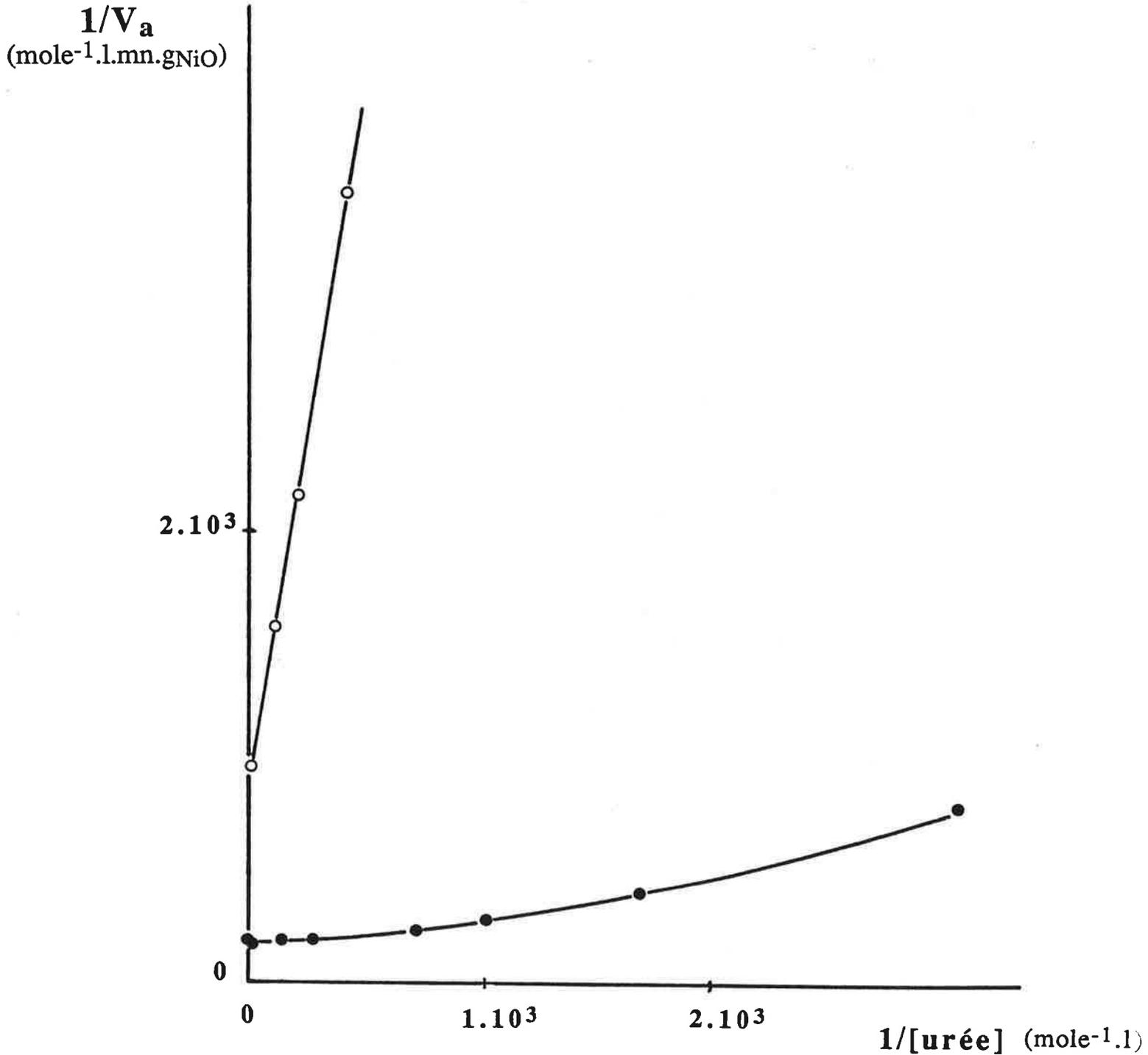


Figure 25 b : Influence du pré-traitement à la soude sur les tracés de Lineweaver-Burk pour NiO à uréase greffée suivant le procédé NiO-3 (solvant = acétone, $T = 0^\circ\text{C}$). Le temps d'activation t_{act} est de 3 h.
● NiO a été préalablement traité à la soude ($\text{NiO}_h\text{-NaOH}$).
○ NiO n'a pas été traité à la soude (NiO_h).
Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm^3 de solution de tampon phosphate 10^{-4} M à $\text{pH}=7,2$ et à $T=25^\circ\text{C}$.

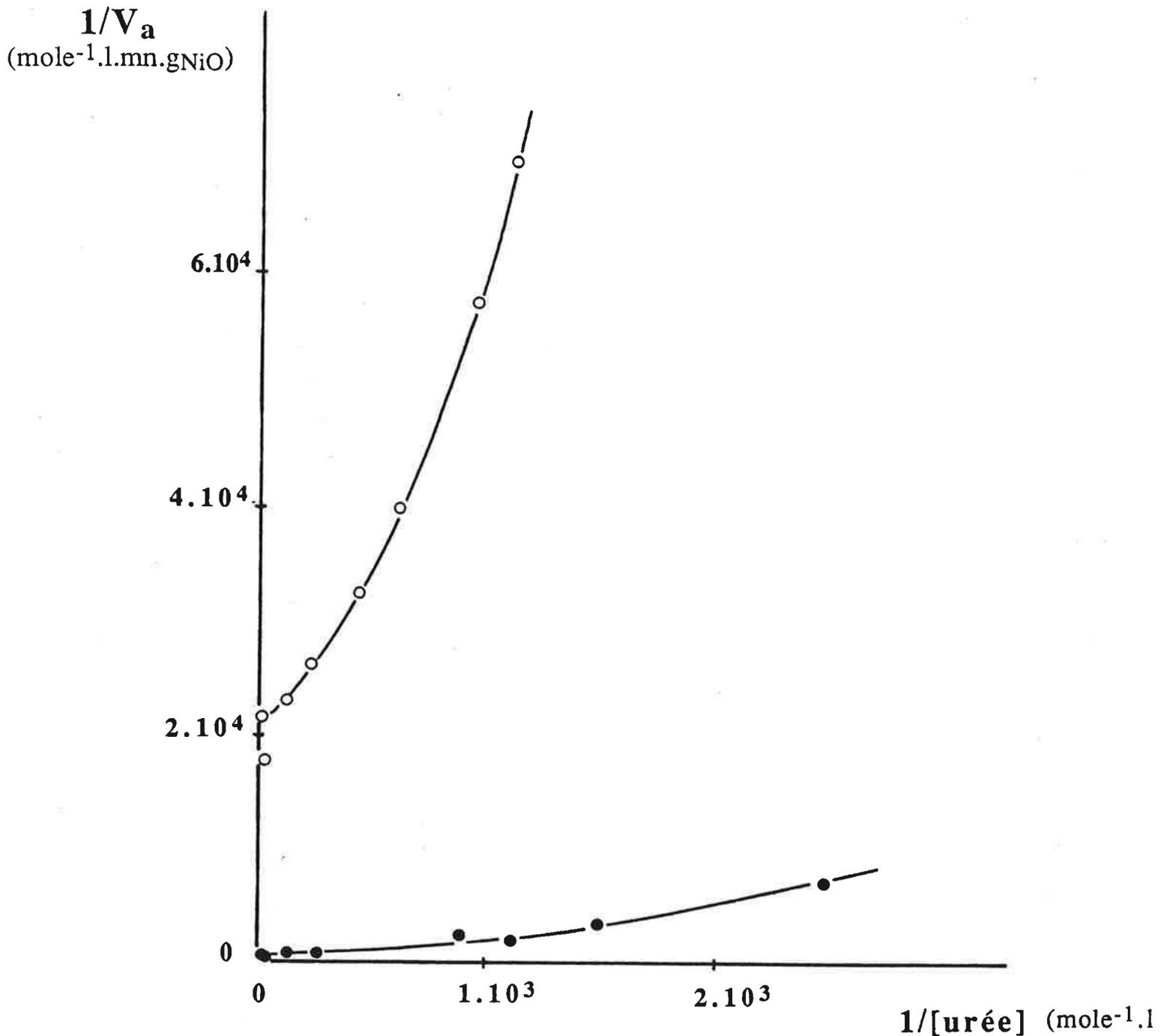


Figure 25 c : Influence du pré-traitement à la soude sur les tracés de Lineweaver-Burk pour NiO à uréase greffée suivant le procédé NiO-4 (solvant=DMSO, T = 4°C). Le temps d'activation t_{act} est de 3 h.
● NiO est préalablement traité à la soude (NiO_h-NaOH).
○ NiO n'est pas traité à la soude (NiO_h).
Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

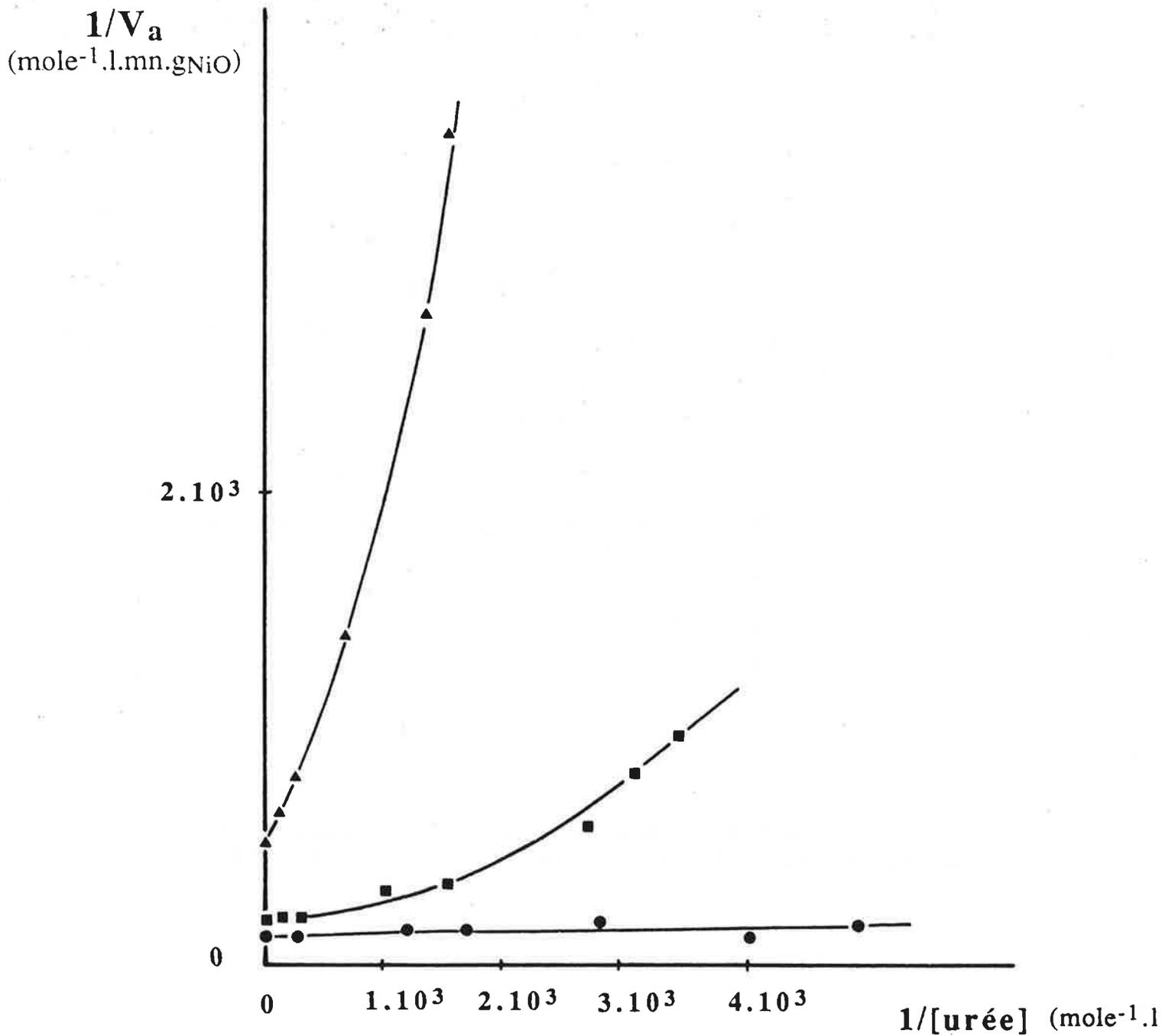


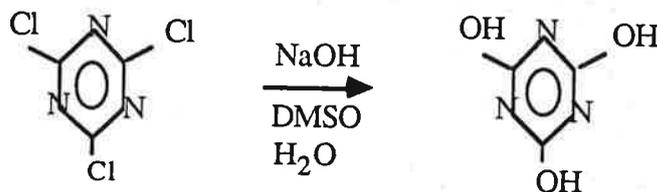
Figure 26 : Influence du mode d'activation sur les tracés de Lineweaver-Burk pour la poudre de NiO à uréase greffée, préalablement traitée à la soude (NiO_h - NaOH).

- Procédé NiO-1 (solvant = benzène, T = 80°C) avec $t_{act} = 5$ h.
- Procédé NiO-3 (solvant = acétone, T = 0°C) avec $t_{act} = 3$ h.
- ▲ Procédé NiO-4 (solvant = DMSO, T = 4°C) avec $t_{act} = 3$ h.

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

Activation	Adsorption sur NiO _h	Benzène procédé NiO-1		DMSO procédé NiO-2		Acétone procédé NiO-3		DMSO / H ₂ O
		sans NaOH	avec NaOH	sans NaOH	avec NaOH	sans NaOH	avec NaOH	
V _{am} (mole/l.mn.gNiO)	2 . 10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁴	6.10 ⁻³	5.10 ⁻⁵	2.10 ⁻³	10 ⁻³	5.10 ⁻³	2.10 ⁻⁶

Tableau I : Récapitulatif des valeurs de V_{am} obtenues avec les différents modes d'activation de la poudre d'oxyde de nickel



En effet, lors de la dissolution du chlorure de cyanuryle dans le mélange eau - DMSO, contenant de la soude, on constate un dégagement de chaleur, dont il résulte une formation d'acide cyanurique. Les groupements OH de cet acide remplacent les ions chlorures, et sont moins susceptibles de donner lieu à une réaction de substitution nucléophile ultérieurement, en présence des groupements O-Na⁺ de l'oxyde de nickel. Le chlorure de cyanuryle n'est alors plus apte à jouer son rôle d'agent pontant. Cette expérience conduit à éliminer l'eau de tous les traitements d'activation utilisant le chlorure de cyanuryle.

Conclusions:

Les effets des différents solvants testés sur la même poudre pour son activation (eau-DMSO, DMSO, Benzène, Acétone) mettent en évidence quelques aspects clés pour le choix ultérieur d'un procédé d'activation :

- Le solvant ne doit pas interagir avec l'agent pontant (chlorure de cyanuryle ou autre).
- L'ionisation préalable des fonctions terminales de la poudre à traiter est une étape qui conditionne l'efficacité ultérieure de tout procédé.

Ces effets de solvants sur le même support sont constatés ici pour la première fois.

Il reste que la transposition d'un procédé d'activation efficace sur un support donné au traitement d'un support de nature différente est une opération délicate: les résultats du traitement de la cellulose par un procédé utilisant le mélange eau-DMSO, décrit comme satisfaisants dans la littérature, ne sont pas du tout retrouvés quand on passe à l'oxyde de nickel.

Dans les expériences que nous décrivons ultérieurement, nous avons retenu le benzène et l'acétone comme solvants d'activation efficaces.

C-V-4 Influence du temps de traitement

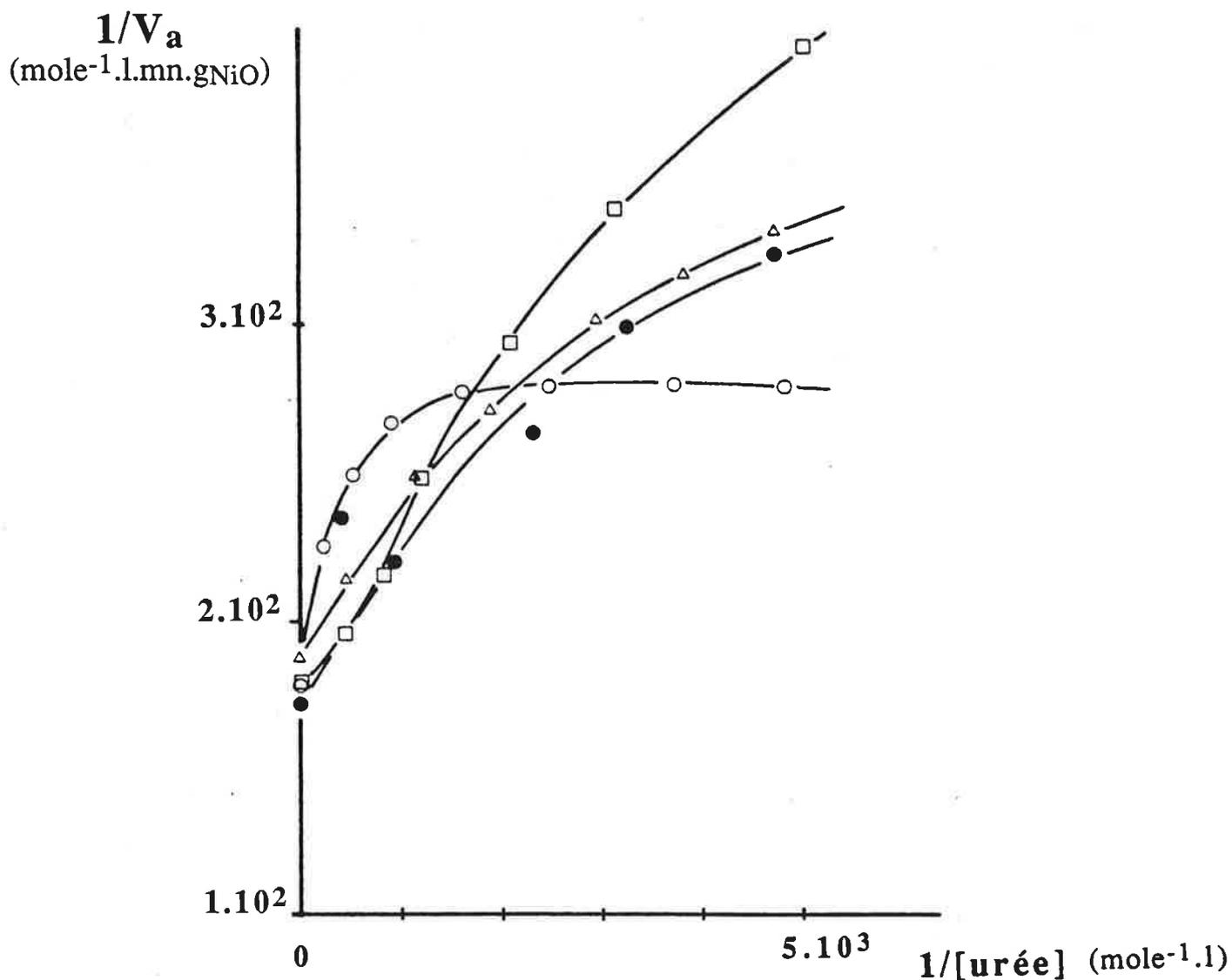


Figure 27 a : Influence du temps de traitement sur les tracés de Lineweaver-Burk pour la poudre de NiO à uréase greffée, préalablement traitée à la soude (NiO_h - NaOH), suivant le procédé NiO-1 (solvant = benzène, T = 80°C).

- t_{act} = 3 h
- △ t_{act} = 6 h 30
- t_{act} = 29 h
- t_{act} = 48 h

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

Comme nous l'avons dit précédemment, les deux solvants retenus pour les expériences ultérieures d'activation de l'oxyde de nickel sont le benzène et l'acétone. L'influence du temps de traitement a été étudiée dans les deux cas, de manière à définir les conditions optimales de greffage de l'enzyme sur la poudre.

a) Influence du temps de traitement sur le procédé NiO-1, au benzène:

Description de l'expérience :

Le procédé NiO-1 est repris comme il a été décrit dans le paragraphe C.II.3. Le traitement porte sur 5 g de NiO, traités dans 50 cm³ de benzène contenant 1 g de chlorure de cyanuryle. La solution est portée à ébullition (85°C), et à reflux total. Des prélèvements de poudre sont effectués aux intervalles de temps suivants : 3 h, 6 h 30, 29 h, 48 h. Les quantités prélevées sont toutes traitées de la même façon : filtration sur papier filtre Wattman, lavages à l'acétone, séchage à 50°C pendant 4 heures. L'immobilisation de l'uréase sur chaque fraction prélevée est menée de façon identique : 200 mg de poudre sont mis en contact avec 10 cm³ d'une solution d'uréase à 1 mg/cm³, dans du tampon phosphate 0,1 M, toute une nuit, à 4°C. Les poudres ainsi greffées sont ensuite lavées au tampon phosphate 0,1 M jusqu'à disparition du pic d'absorption des liaisons peptidiques à 280 nm.

Test pH-stat.:

La mesure de l'activité enzymatique de chacune des fractions est effectuée au pH-stat, avec l'urée comme substrat, et une solution d'acide chlorhydrique 0,2 M. Les courbes obtenues, transformées en $1/V_a = f(1/[\text{Substrat}])$ sont rassemblées sur la Figure 27a.

Résultats et interprétation :

Comme le montre la Figure 27a, toutes les courbes de Lineweaver-Burk tracées pour les différentes fractions coupent l'axe des ordonnées ($1/V_a$) au même point. Le V_{am} ne varie donc quasiment pas d'une fraction à l'autre, et semble indépendant du temps d'activation de la poudre d'oxyde de nickel. En d'autres termes, il est inutile de prolonger le temps de traitement de cette poudre au-delà de 3 h.

Il est d'autre part intéressant de constater que l'allure des courbes tracées : $1/V_a = f(1/[\text{Substrat}])$ n'est pas la même suivant le temps de traitement, ce qui signifie que pour chaque fraction de poudre, l'évolution de la réaction d'hydrolyse de l'urée ne se fait pas de la

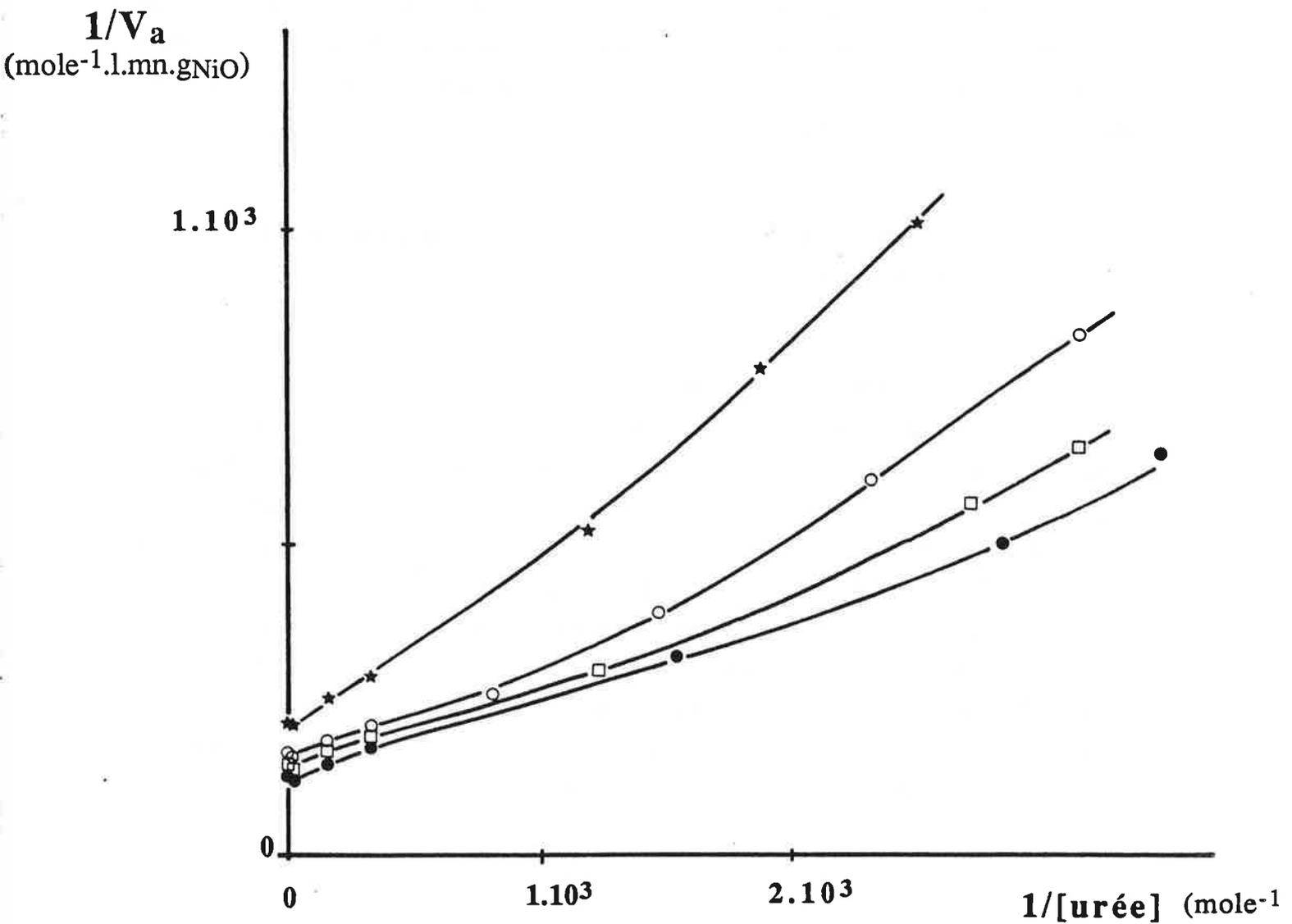


Figure 27 h : Influence du temps de traitement sur les tracés de Lineweaver-Burk pour la poudre de NiO à uréase greffée, préalablement traitée à la soude (NiOH - NaOH), suivant le procédé NiO-3 (solvant = acétone, T = 0°C).

- ★ $t_{act} = 1$ h
- $t_{act} = 3$ h
- $t_{act} = 5$ h
- $t_{act} = 24$ h

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

même façon. Le V_{am} étant constant, donc la caractéristique cinétique identique, c'est donc à une diffusion différente du substrat dans la poudre qu'il faut attribuer le phénomène constaté. Seule la formation d'aggrégats de particules peut alors l'expliquer. Un contact prolongé de la poudre avec le benzène favorise l'adsorption de ce solvant à sa surface, adsorption qui doit favoriser la formation d'aggrégats[77].

b) Influence du temps de traitement sur le procédé NiO-4, à l'acétone.

Description de l'expérience :

On travaille directement sur des fractions de 200 mg de poudre de NiO, ce qui évite les prélèvements. Chaque fraction, préalablement traitée à la soude, est mise en présence de 30 mg de chlorure de cyanuryle, dans 10 cm³ d'acétone. Les tubes sont agités à l'aide d'un agitateur Vortex pendant 10 s environ, puis laissés à 4°C. Les poudres des différentes fractions sont successivement récupérées, au bout de 1 h, 5 h, 9 h et 24 h, par centrifugation à 2000 tours/mn, et à 10°C. Après plusieurs lavages au tampon phosphate 0,1 M, à chaque fois suivis d'une centrifugation, l'immobilisation de l'uréase est effectuée de la même façon pour chaque fraction: on rajoute dans le tube à essais 10 cm³ de tampon phosphate 0,1 M contenant 10 mg d'uréase; après une agitation de 10 s environ au Vortex, la réaction d'immobilisation se déroule pendant une nuit, à 4°C.

Test pH-stat:

La mesure de l'activité enzymatique de la poudre se fait au pH-stat, comme on l'a décrit précédemment pour les fractions traitées au benzène. Les courbes obtenues sur l'enregistreur sont transformées en courbes de Lineweaver-Burk, et sont résumées sur la Figure 27b.

Résultats et interprétation:

On observe une augmentation du V_{am} quand on passe d'un traitement stoppé au bout d'une heure, au traitement qui dure 5 heures. Pour les échantillons traités plus longtemps, le V_{am} diminue, ce qui traduit une cinétique plus lente. On obtient donc un optimum de greffage enzymatique avec le traitement qui dure 5 heures. Au-delà de ce temps, le traitement perd en efficacité, ce qui doit résulter des réactions parasites précédemment décrites (paragraphe C-IV-1-d): la formation d'énolates à partir de l'acétone contribue au blocage progressif des sites du chlorure de cyanuryle, et bloque toute réaction ultérieure avec l'enzyme.

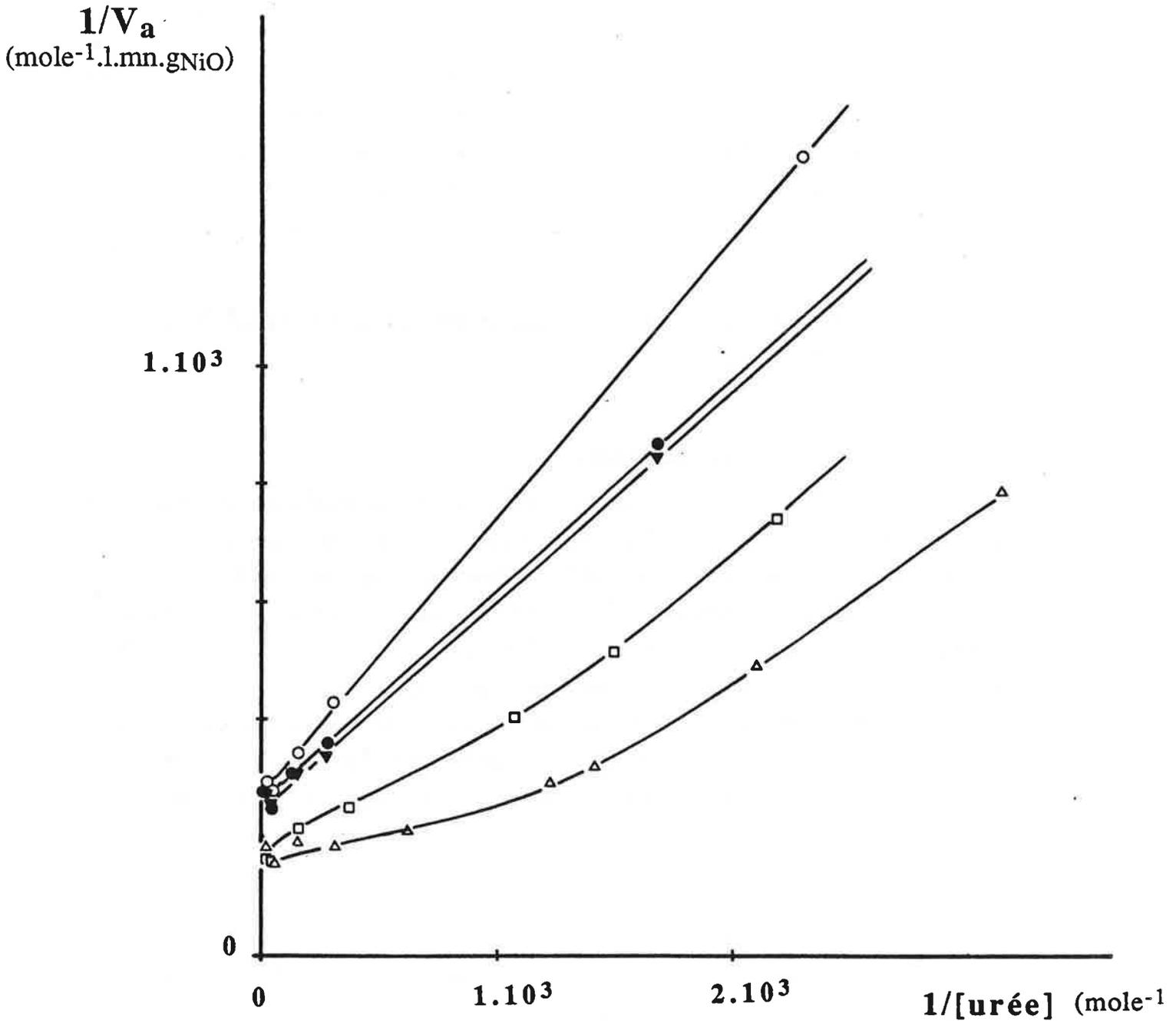


Figure 28 : Influence de la concentration en chlorure de cyanuryle sur les tracés de Lineweaver-Burk pour la poudre de NiO à uréase greffée, préalablement traitée à la soude, suivant le procédé NiO-3 (solvant = acétone, T = 0°C). Le temps d'activation t_{act} est de 6 h.

- 0 mg/10 cm³ d'acétone
- 8 mg/10 cm³
- △ 30mg/10 cm³
- ▼ 75mg/10 cm³
- 150mg/10 cm³

Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm³ de solution de tampon phosphate 10⁻⁴ M à pH=7,2 et à T=25°C.

Il est à noter cependant que, contrairement à ce qui était observé pour le benzène, l'allure des courbes de Lineweaver-Burk obtenue n'est pas modifiée par la durée du traitement. Il semble donc que dans le cas où on utilise l'acétone à la place du benzène, la formation d'aggrégats n'est pas favorisée.

C-V-5 Influence de la concentration en chlorure de cyanuryle

Description de l'expérience:

Ce paramètre a été étudié uniquement dans le cas du procédé utilisant l'acétone comme solvant. Cinq expériences comme celles décrites dans le paragraphe C-V-4-b, sont reprises, le temps de traitement étant cette fois fixé à 5 heures. Chaque tube à essais contient 200 mg d'oxyde de nickel, préalablement traité à la soude, puis séché; 10 cm³ d'acétone sont rajoutés dans chacun des tubes à essais, contenant respectivement 0 mg, 8 mg, 30 mg, 75 mg et 150 mg de chlorure de cyanuryle. Au bout de 5 heures de temps de contact poudre-chlorure de cyanuryle, l'oxyde de nickel est récupéré par centrifugation, et lavé plusieurs fois à l'acétone puis à l'eau, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation et d'une filtration. Le greffage de l'enzyme qui se fait ensuite sur chaque fraction de poudre activée est effectué comme décrit précédemment: par mise en contact de la poudre avec 10 cm³ de tampon phosphate 0,1 M contenant 10 mg d'uréase. Le test pH-stat est effectué dans les mêmes conditions que celles décrites dans les paragraphes précédents. Les tracés de Lineweaver-Burk qui en sont tirés sont rassemblés sur la Figure 28.

Résultats et interprétation:

Une première constatation concerne l'expérience pour laquelle la poudre a été mise en contact avec l'acétone exempte de chlorure de cyanuryle: elle présente une activité enzymatique nettement supérieure à celle qui était obtenue par simple adsorption, ce qui signifie que les produits issus des réactions parallèles participent aussi à l'immobilisation de l'enzyme, par un mécanisme que nous n'avons pu expliciter jusqu'à présent.

Quand la concentration en chlorure de cyanuryle augmente, cette activité de départ est accrue jusqu'à être doublée (Figure 28), puis diminue. Une concentration aux alentours de 30 mg de chlorure de cyanuryle pour 10 cm³ d'acétone est celle qui permet le meilleur greffage d'uréase. Le fait que l'activité enzymatique diminue quand la concentration en chlorure de cyanuryle dépasse cette concentration est encore inexplicé. On peut émettre l'hypothèse qu'une modification de l'état de surface de la poudre peut être à l'origine de cette évolution.

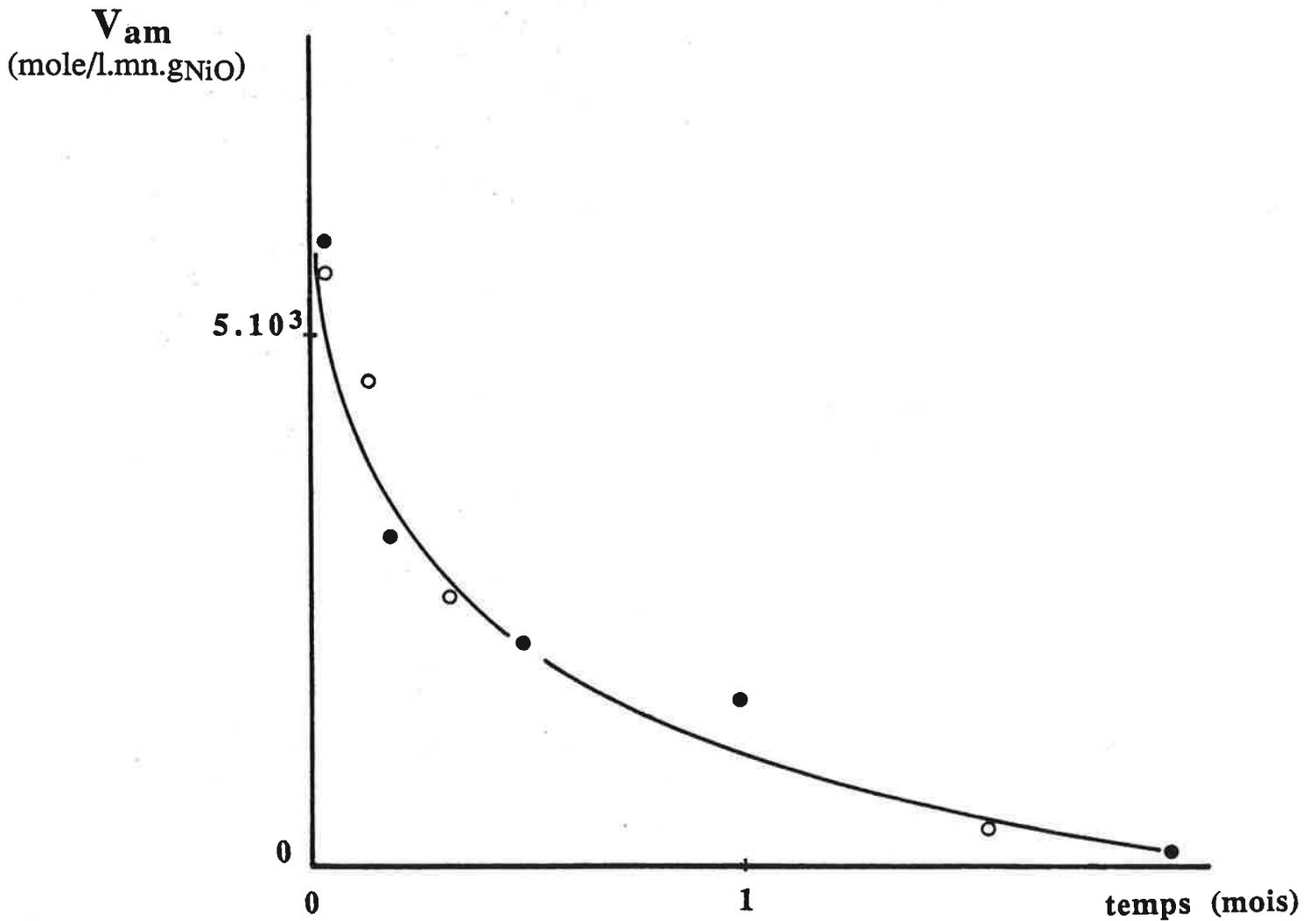


Figure 29 : Conservation de l'activité enzymatique de la poudre enzymatique de la poudre de NiO à uréase greffée, préalablement traitée à la soude, suivant le procédé NiO-3 (solvant = acétone, $T = 0^{\circ}\text{C}$).
Le temps d'activation t_{act} est de 6 h. ● ○
La concentration en chlorure de cyanuryle est de 3 mg/cm^3 .
Conditions de mesure de l'activité: 200 mg de poudre enzymatique dans 50 cm^3 de solution de tampon phosphate 10^{-4} M à $\text{pH}=7,2$ et à $T=25^{\circ}\text{C}$.

Conclusion:

Le greffage d'enzyme sur cellulose ou graphite résulte selon ses auteurs des schémas réactionnels décrits dans le paragraphe C-II-1 ci dessus. Nous émettons des réserves quant aux schémas réactionnels qui régissent le greffage d'enzyme sur la poudre d'oxyde de nickel: des produits issus de réactions parallèles, et une modification de l'état de surface semblent participer au résultat final obtenu.

C-V-6 Conservation de l'activité enzymatique de la poudre d'oxyde de nickel à uréase greffée

Mode opératoire:

L'activité d'un même échantillon de poudre d'oxyde de nickel à uréase greffée a été testée sur une durée de 2 mois. Le greffage est effectué suivant le mode opératoire optimum issu des essais précédents:

- 200 mg de poudre de $\text{NiO}_h\text{-NaOH}$ sont dispersés dans 10 cm^3 d'acétone contenant 30 mg de chlorure de cyanuryle; l'ensemble est agité au Vortex puis placé à 4° C pendant 6 heures. La poudre récupérée comme on l'a décrit au paragraphe C-II-5 est ensuite mise en contact avec 10 cm^3 de tampon phosphate 0,1 M contenant 10 mg d'uréase, à 4° C, pendant 24 heures. La poudre ainsi traitée est centrifugée et lavée plusieurs fois au tampon phosphate 0,1 M, jusqu'à disparition du pic d'absorbance à 280 nm, puis conservée dans ce même tampon, à 4° C.

L'activité enzymatique de cette poudre est suivie au pH-stat à divers intervalles de temps, puis la poudre est lavée et centrifugée pour être de nouveau conservée dans du tampon phosphate à 4° C.

L'activité du tampon de conservation de la poudre est aussi mesurée au pH-stat, pour constater s'il y a relargage ou non de l'enzyme.

Résultats et interprétation:

L'activité enzymatique de la poudre au cours du temps est résumée par la Figure 29; celle du liquide surnageant n'a pas été figurée car elle était toujours nulle, ce qui permet d'affirmer qu'il n'y a pas relargage de l'uréase dans la solution. La baisse d'activité que présente la poudre ne peut être attribuée qu'à une évolution normale de l'uréase, similaire à celle qui est observée quand cette enzyme est en solution.

C-VI CONCLUSION

Cette étude était conçue au départ comme une étude préliminaire à la réalisation d'un biocapteur à base d'une électrode en nickel / oxyde de nickel. Parallèlement aux essais de greffage exposés ici, des expériences étaient menées pour mettre au point une électrode à base de Ni/NiO. Les caractéristiques qu'elle présentait se sont révélées décevantes, ce qui nous a amenés à abandonner le projet initial, et à réaliser un biocapteur utilisant le palladium comme métal; il est présenté dans le Chapitre 4.

CHAPITRE 4

**REALISATION D'UNE ELECTRODE
Pd/PdO A ENZYMES IMMOBILISEES**

INTRODUCTION

Certains métaux, après avoir subi une oxydation adéquate, deviennent sensibles à la variation du pH d'une solution électrolytique. Cette sensibilité peut être directement reliée à la mesure du potentiel électrique du métal par rapport à une référence, qui est en général une électrode au calomel saturé. Un simple lavage du métal oxydé permet le retour à son potentiel électrique de départ : la condition de réversibilité indispensable à son utilisation en tant qu'électrode est donc assurée.

Des métaux tels l'irridium [50], l'antimoine [51], le palladium [52][96-97], ou l'étain [98], ont été transformés avec succès en électrode de pH, après oxydation. Les auteurs préconisent l'emploi de métaux plus nobles que l'antimoine. Cependant, des métaux trop nobles ne forment pas d'oxydes assez stables, ce qui conduit à choisir des métaux intermédiaires, nobles, mais pas trop.

La préparation de l'électrode passe par une oxydation électrochimique ou une oxydation thermique, la première se faisant en présence de sel fondu, la seconde en portant le métal à une température élevée fixe: cette température dépend de la nature du métal, et doit en particulier être inférieure à la température au-delà de laquelle l'oxyde du métal devient instable.

On peut noter ici que ce type d'électrodes n'est pas utilisable sur toute la gamme des potentiels d'oxydation qu'on peut trouver dans l'eau (les limites en sont fixées par le diagramme de Pourbaix). Il est donc indiqué de préciser le domaine de travail auquel il faut se tenir pour chaque électrode réalisée.

D'autre part, certaines interférences sont à redouter, en particulier avec les réducteurs, qui interagissent avec la couche d'oxyde. Les auteurs citent en particulier l'acide ascorbique, ou des couples rédox tel le ferricyanure/ferrocyanure [97].

Le métal qui réunit le maximum de qualités pour réaliser une électrode métal/oxyde métallique est le palladium : il s'oxyde plus facilement que le platine, et l'oxyde obtenu présente une bonne stabilité en milieu aqueux. C'est ce métal que nous avons choisi pour réaliser une électrode enzymatique.

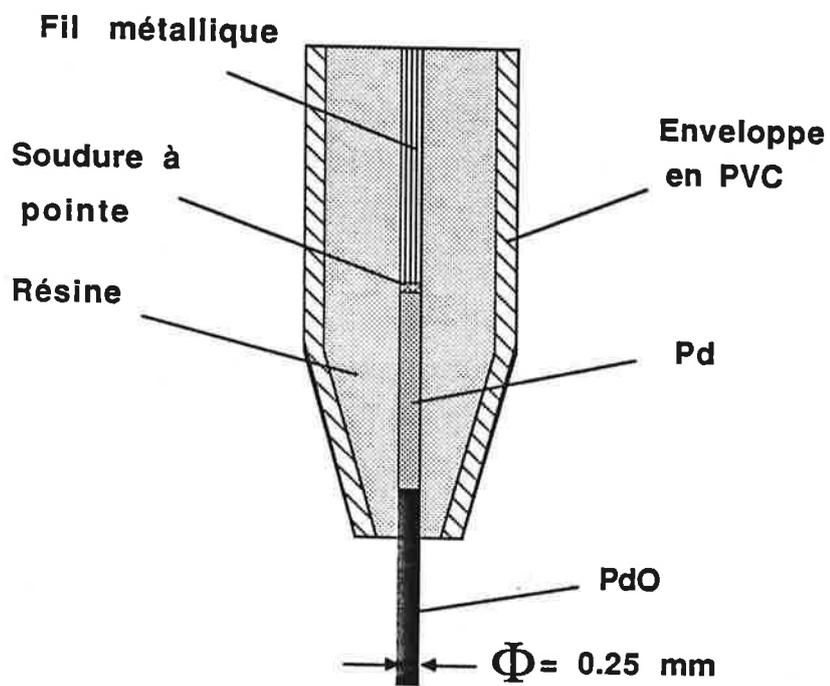


Figure 30 a : Schématisation de l'électrode Pd/PdO réalisée.

A - MISE AU POINT D'UNE ELECTRODE Pd/PdO

A-I PREPARATION DE L'ELECTRODE DE pH EN Pd/PdO

A-I-1 Oxydation du palladium

a) Préliminaires

Comme mentionné ci-dessus, l'oxydation du palladium peut être effectuée par voie électrochimique ou thermique. Pour des raisons de commodité (présence de four au laboratoire), notre choix s'est porté sur cette dernière méthode.

L'oxydation du palladium peut être réalisée entre 350°C et 800°C [96-97], la température limite de stabilité de l'oxyde de palladium étant de 938°C. Des expériences d'oxydation effectuées simplement en présence d'air ont été menées à ces températures, la réponse au pH obtenue s'est alors révélée inexploitable, preuve que la couche d'oxyde était insuffisamment formée. Pour cette raison, on a été amené à utiliser de la soude ou de la potasse, l'action de ces bases fortes à chaud favorisant la formation de la couche d'oxyde. La température d'oxydation a été choisie à 800°C, le temps de réaction étant alors beaucoup plus court qu'à des températures plus faibles.

b) Mode opératoire

On utilise un fil de palladium de diamètre $\Phi=0,25$ mm, et 99,999 % de pureté (provenant de chez Alfa-Ventron). Pour réaliser une électrode, on prend 1,5 cm de ce fil, qu'on commence par laver à l'eau régale ($\text{HNO}_3/4\text{HCl}$), puis à l'eau ultrapure. Une extrémité de ce fil est ensuite immergée dans la soude à 50 % massique dans l'eau, sur une longueur d'environ 0,5 cm, puis séchée immédiatement sous un flux d'azote (l'Air Liquide), pendant 30 mn.

On transfère ensuite le fil dans un four dont la température est fixée à $800^\circ\text{C} \pm 20^\circ\text{C}$, pendant environ 20 mn. Après avoir été retiré du four, le fil est laissé à l'air libre, pour refroidir.

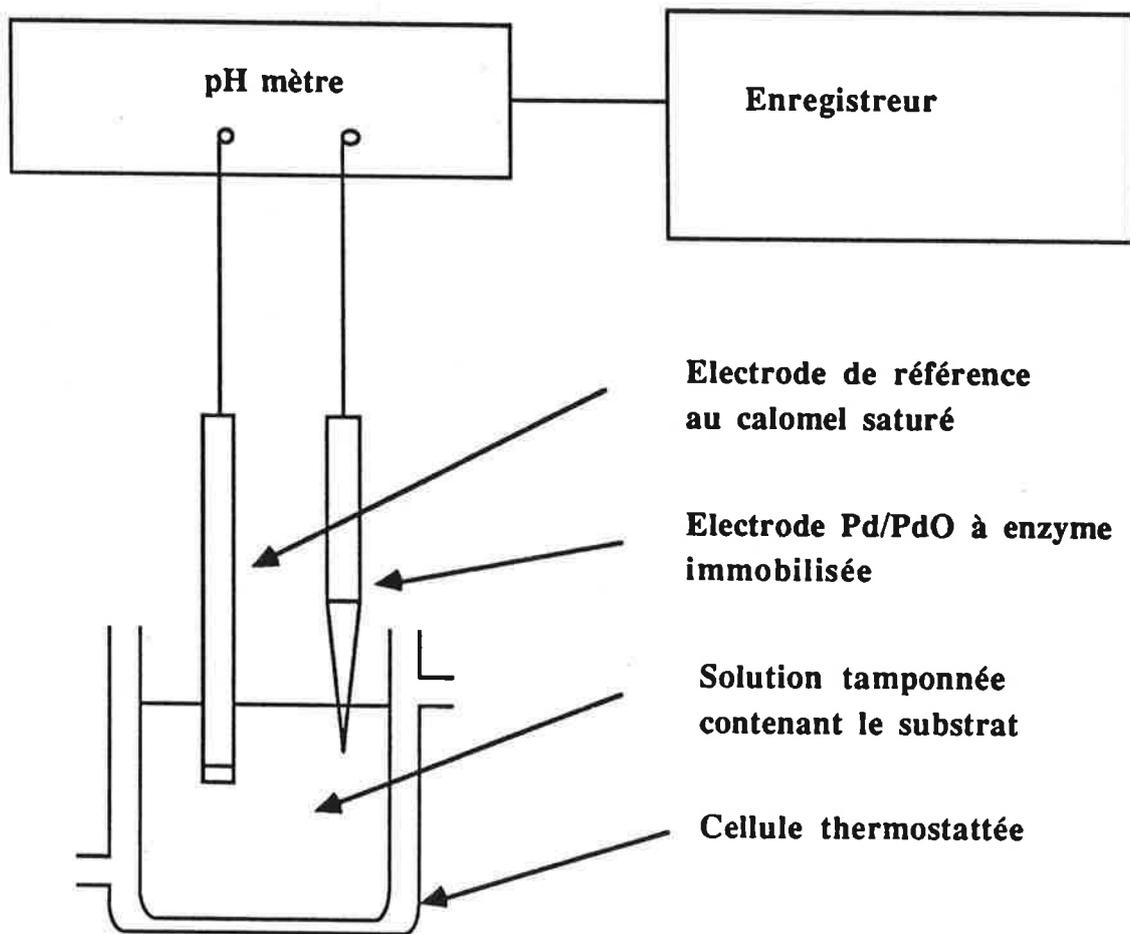


Figure 30 b : Schématisation de l'ensemble de mesure utilisant l'électrode Pd/PdO.

Afin de pouvoir suivre le potentiel de l'électrode ainsi obtenue, on est amené à la souder à un fil électrique. On est d'abord tenu d'éliminer la couche d'oxyde formée (non conductrice) sur la partie non recouverte par la soude.

Pour ce faire, on peut :

- soit dissoudre la couche d'oxyde en immergeant le fil pendant 3 mn dans de l'eau régale, sur une longueur de 0,5 cm.

- soit frotter la partie concernée à l'aide de papier Emery.

Ainsi traité, le fil est ensuite lavé à l'eau ultrapure, puis séché à l'étuve portée à 110°C, pendant 30 mn.

A-I-2 Présentation de l'électrode sous sa forme définitive

Au niveau de la partie du fil dégarni, on fait une soudure à pointe, avec un fil électrique, qui permettra de relier l'électrode à l'appareil de mesure.

Pour donner une certaine résistance mécanique à l'électrode, le fil ainsi obtenu (fil électrique + fil Pd) est introduit dans un tube en PVC, se terminant par un cône, comme le montre la Figure 30 a. On coule ensuite de la résine électriquement isolante, en prenant garde qu'elle ne couvre pas la couche d'oxyde.

La mesure du potentiel E de cette électrode s'effectue dans une cellule thermostattée à 25°C et par rapport à une électrode de référence qui est dans notre cas l'électrode au calomel saturé notée ECS (Figure 30 b).

A-II CARACTÉRISTIQUES DE L'ELECTRODE REALISEE

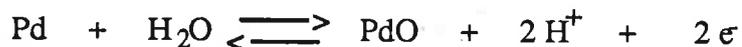
Un certain nombre d'électrodes a été réalisé suivant le protocole décrit ci-dessus. Elles présentent toutes un comportement moyen semblable.

A-II-1 Pentés moyennes de l'électrode Pd/PdO

	Pente de l'electrode (mV/pH)
Electrode n° 1	- 53.5
Electrode n° 2	- 53
Electrode n° 3	- 47
Electrode n° 4	- 48
Moyenne de nos électrodes	≈ -50
Valeurs obtenues par Grubb [96,97]	de -54 à -57
Valeurs obtenues par Szuminsky [52]	de -53 à -65

Tableau I : Quelques valeurs de pente obtenues avec les électrodes Pd/PdO

La sensibilité de l'électrode Pd/PdO aux variations de pH résulte d'interactions schématisées par l'équation suivante:



Le potentiel de l'électrode répond à l'équation de Nernst :

$$E = E^\circ - (2,3 R \cdot T/F) \text{pH} \quad , \text{ avec: } E^\circ = (\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^\circ - \Delta G_{\text{PdO}}^\circ) / F.$$

où $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^\circ$ et $\Delta G_{\text{PdO}}^\circ$ sont les enthalpies libres de formation de H_2O et de PdO .

La pente théorique est donc de 59 mV par unité de pH. Les pentes réelles mesurées sur 3 électrodes différentes sont résumées sur le tableau I, la moyenne obtenue étant de 50 mV. Ce même tableau donne une idée des valeurs obtenues par d'autres auteurs.

A-II-2 Temps de réponse

La Figure 31 montre l'allure de la réponse dynamique de l'électrode au pH. Le temps d'obtention du pH est en moyenne situé entre 30 secondes et 1,5 mn.

A-II-3 Courbe d'étalonnage et dérive de l'électrode Pd/PdO

Le tracé de la réponse de l'électrode aux différents pH est donné par la Figure 32. Il a été effectué à partir de mesures prises dans des solutions de tampon phosphate, concentrées à 0,1 M, et de pH allant de 4,5 à 9,5. On constate une dérive de l'électrode, qui dépend légèrement de la zone de pH à laquelle on travaille: à pH = 7,2, elle est de 5 mV sur une durée de 20 heures, ce qui implique un réétalonnage fréquent de l'électrode en utilisation continue.

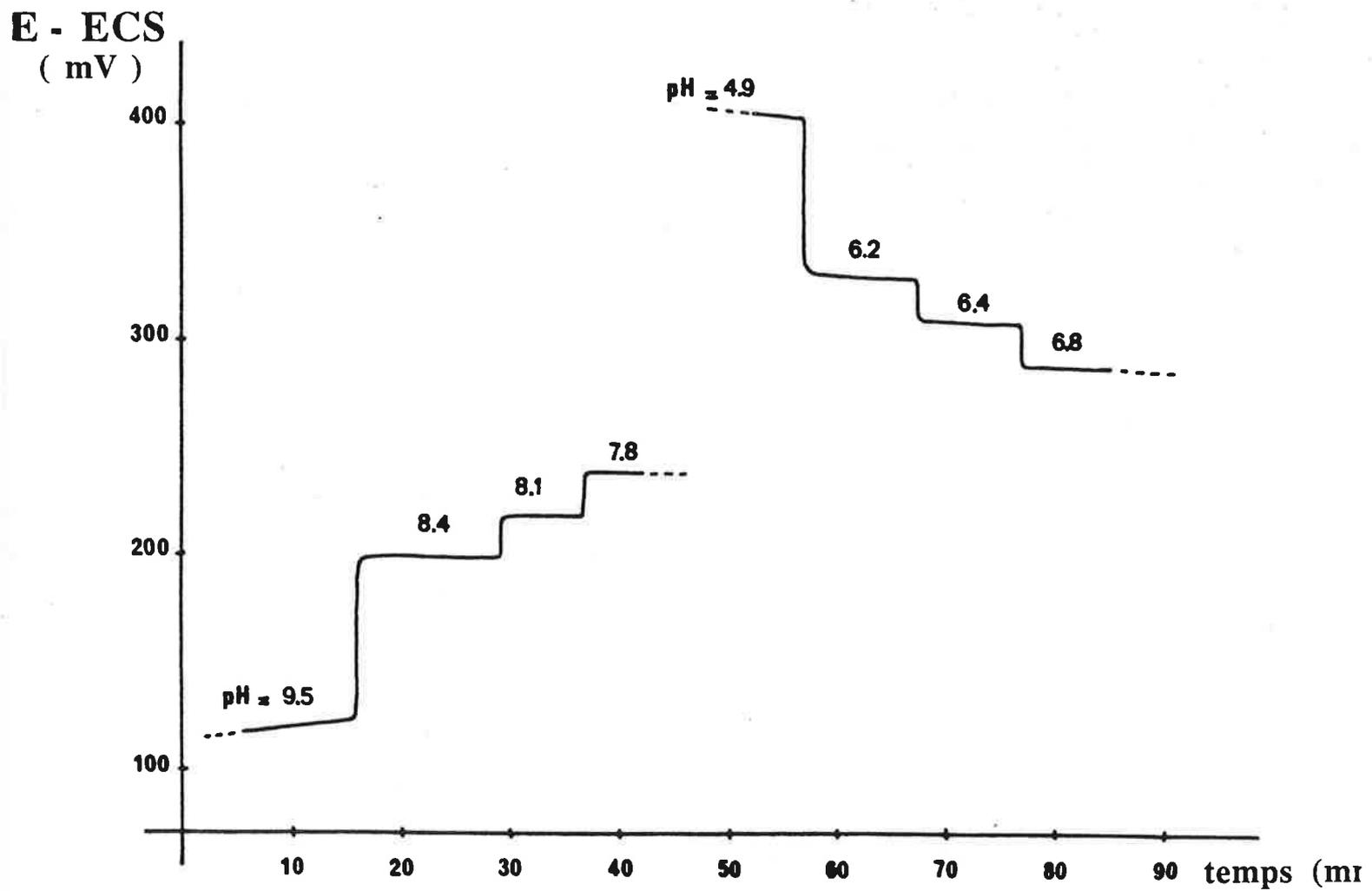


Figure 31 : Réponse dynamique d'une électrode Pd/PdO aux variations de pH. La solution de départ est une solution de $Na_2 HPO_4$ 0,1 M (ou NaH_2PO_4 0,1 M) à laquelle on rajoute progressivement une solution de NaH_2PO_4 0,1 M (ou Na_2HPO_4 0,1 M).

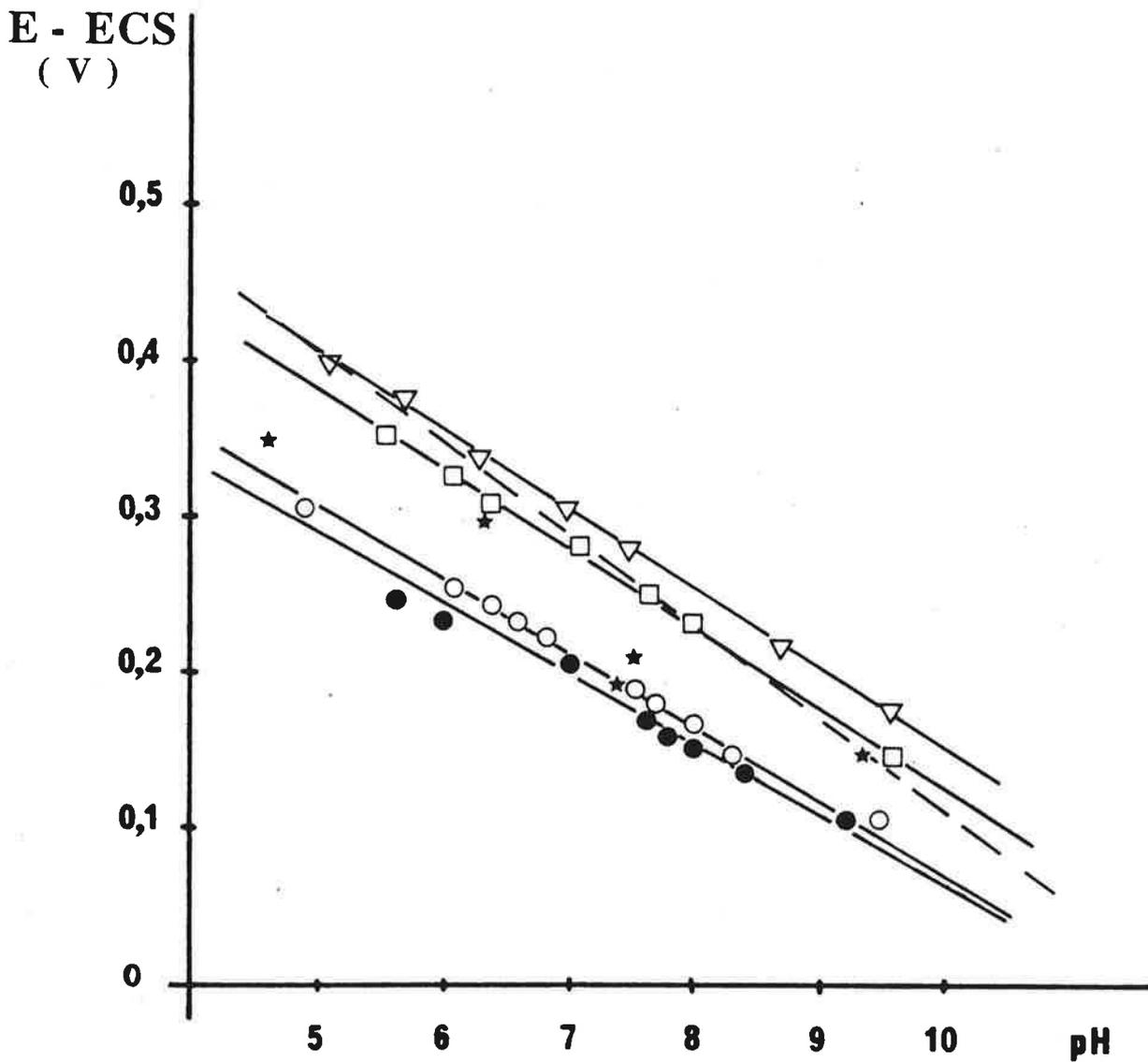


Figure 32 : Courbes d'étalonnage potentiel - pH d'un groupe d'électrodes Pd/PdO - L'électrolyte est une solution de tampon phosphate 0,1 M. Les électrodes sont préparées suivant le protocole A-I-1, utilisant la résine Lecoset 7007 (□○●), et la résine araldite (★), suivant C-I-1 (▽). Température de travail = 25°C. La courbe théorique est donnée par (- - -). La température de travail est de 25°C.

A-II-4 Définition du domaine de travail

Bien que la littérature [96] affirme que ce type d'électrode peut fonctionner dans des milieux de pH allant de 2 à 9, nous constatons à l'usage qu'elle présente la dérive la plus faible au voisinage de la neutralité. Il nous semble donc préférable de limiter son utilisation à des zones comprises entre 5 et 9 ; ce domaine de mesure est largement suffisant pour une utilisation en tant qu'électrode enzymatique, puisqu'il englobe le pH optimum d'un grand nombre d'enzymes.

A-II-5 Durée de vie de l'électrode Pd/PdO

Une électrode Pd/PdO peut fonctionner longtemps à condition d'être conservée dans des milieux exempts d'éléments réducteurs. Ainsi, en période de non fonctionnement, nous l'avons conservée dans de l'eau ultrapure. En cas de doute sur la pureté de l'eau de conservation, on peut rajouter dans le milieu des complexants des cations métalliques, tels l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).

Dans ces conditions, la durée de vie de l'électrode est au moins égale à 6 mois, période pendant laquelle nous l'avons testée à intervalles de temps réguliers.

A-III PRECAUTIONS DE FABRICATION ET D'EMPLOI

Après avoir effectué un certain nombre d'expériences, il s'est avéré que certains points, dans la fabrication de l'électrode, devaient être effectués avec un soin particulier, sous peine de fausser les résultats ultérieurs.

Précaution n°1

Dans la première étape consistant à déposer une fine couche de solution NaOH à 50 % sur le métal, il faut éviter le contact prolongé avec l'air. En effet, lors de ce contact, le CO₂

de l'air peut se dissoudre dans la couche de soude, et l'acidifier avec formation de Na_2CO_3 , ce qui nuit à l'oxydation ultérieure de la surface du palladium.

Précaution n°2

Après avoir effectué l'oxydation thermique du fil de palladium, il faut faire attention à ne pas faire subir à la partie du fil recouverte par la couche d'oxyde toute torsion mécanique ou frottement abrasif ; ceci conduit en effet à la formation de petites cassures (invisibles à l'oeil nu) qui nuisent à l'uniformité de la couche d'oxyde, et par conséquent à une réponse correcte aux variations de pH.

Précaution n°3

L'isolation électrique de la partie de l'électrode non oxydée doit être correctement assurée : on utilise pour ce faire une résine isolante électriquement. Nous avons utilisé :

- l'Araldite
- La Lecoset 7007

L'Araldite, testée en premier lieu, a été abandonnée après qu'on ait constaté qu'elle avait une tenue médiocre dans l'eau. En effet, un séjour prolongé de cette résine dans l'eau conduit à son gonflement, et donc à la détérioration de l'isolation désirée. L'électrode préparée avec l'Araldite a donc une durée de vie très courte : en moyenne un jour.

Ces constatations nous ont amenés à changer de résine, et à préférer la résine Lecoset 7007, très utilisée dans les études métallographiques. Le résultat est tout autre : cette résine résiste à l'eau, et assure une très bonne isolation électrique. La durée de vie d'une électrode préparée avec cette résine, et en respectant les précautions citées précédemment se trouve ainsi prolongée : elle est de 6 mois en moyenne.

A-IV INTERPRETATION DES RÉSULTATS

Pourquoi les pentes obtenues en pratique sont-elles différentes de la pente théorique donnée par l'équation de Nernst?

Nous pouvons quant à nous émettre deux hypothèses, qui relèvent de la façon d'opérer l'oxydation du fil de palladium:

1- La couche d'oxyde de palladium réalisée de la façon que nous avons décrite n'a pas la même épaisseur sur toute la surface traitée. Il faudrait, pour garantir l'uniformité de la couche, pouvoir imprimer un mouvement de rotation très rapide au fil traité, et ce pendant toute la durée de l'oxydation.

2- Le temps de séjour dans le four, et la quantité de soude sont deux paramètres qui restent à optimiser; nous avons en effet remarqué qu'une oxydation trop poussée du palladium, que ce soit à cause d'un séjour trop long dans le four, ou encore d'une couche trop importante de soude, nuit au bon fonctionnement de l'électrode future, et peut même causer une absence totale de réponse au pH.

Une explication plus théorique, touchant à la nature même de la couche d'oxyde de palladium obtenue par la méthode thermique décrite ci-dessus, est donnée par Grubb et King [97]: ces auteurs ont analysé la couche d'oxyde formée en surface du palladium, après l'avoir "gratté" et réduite en poudre. Les particules obtenues sont analysées par la méthode de Debye-Sherrer: la structure normale de PdO est tétragonale, avec: $a_0 = 3,04 \text{ \AA}$, et $c_0 = 5,34 \text{ \AA}$. Les auteurs retrouvent cette structure, complétée par d'autres lignes caractérisées par: $a_0 = 9,05 \text{ \AA}$, et $c_0 = 5,34 \text{ \AA}$. Cet oxyde de palladium constitué, différent de celui attendu théoriquement, peut être à l'origine d'un comportement de l'électrode vis-à-vis du pH sensiblement différent du comportement théorique répondant à l'équation de Nernst.

Quant aux différences observées entre les pentes que nous obtenons avec nos électrodes et celles réalisées par les auteurs cités dans le tableau I, en dehors de variations dues au mode opératoire et à la technique de chacun, nous pouvons rajouter comme élément d'explication la taille de l'électrode: le fil de palladium que nous utilisons est celui qui présente les plus petites dimensions, 0,25 mm de diamètre, les autres étant de 0,75 mm.

B - MISE AU POINT DE L'ELECTRODE A MEMBRANE ENZYMATIQUE A BASE DE Pd/PdO

Une fois préparée l'électrode pH type Pd/PdO, et testée sa réponse au pH, on peut passer à l'étape suivante qui consiste à la transformer en électrode enzymatique. Pour ce faire, deux méthodes ont été testées :

- électrode enzymatique obtenue par dépôt d'un gel sur le fil en Pd/PdO.

- électrode enzymatique obtenue par activation de la surface par le chlorure de cyanuryle, avant fixation d'enzyme par liaison covalente.

Les deux enzymes testées choisies sont de la classe des hydrolases : uréase et butyrylcholinestérase, ces deux enzymes catalysant des réactions où intervient une variation de pH.

B-I ELECTRODE Pd/PdO À URÉASE

B-I-1 Dépôt d'un gel contenant l'uréase sur la partie sensible de l'électrode

Le dépôt du gel est réalisé à partir des deux solutions suivantes :

Solution 1 : 5 mg d'uréase sont dissous dans 0,1 cm³ d'albumine humaine à 20 % v/v.

Solution 2 : Une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans de l'eau ultra-pure est préparée à partir de glutaraldéhyde à 25 % dans l'eau.

La solution 1 est mélangée avec 0,1 cm³ de la solution 2. L'extrémité oxydée de l'électrode Pd/PdO est immergée dans la solution ainsi obtenue, puis retirée et laissée à l'air libre pendant une vingtaine de minutes, avant d'être lavée avec du tampon phosphate 0,1 M. Une fine couche enzymatique a donc réticulé sur la surface de l'électrode.

Remarques : Pour arrêter la réticulation, certains auteurs [52] proposent de laver l'électrode avec une solution de glycine 0,1 M. Nous avons effectué ce lavage, et observé que dans notre cas, il n'avait aucun effet notable sur la réponse ultérieure de l'électrode à l'urée. Nous pouvons donc en déduire qu'au bout de 20 mn, la réticulation peut être considérée comme terminée.

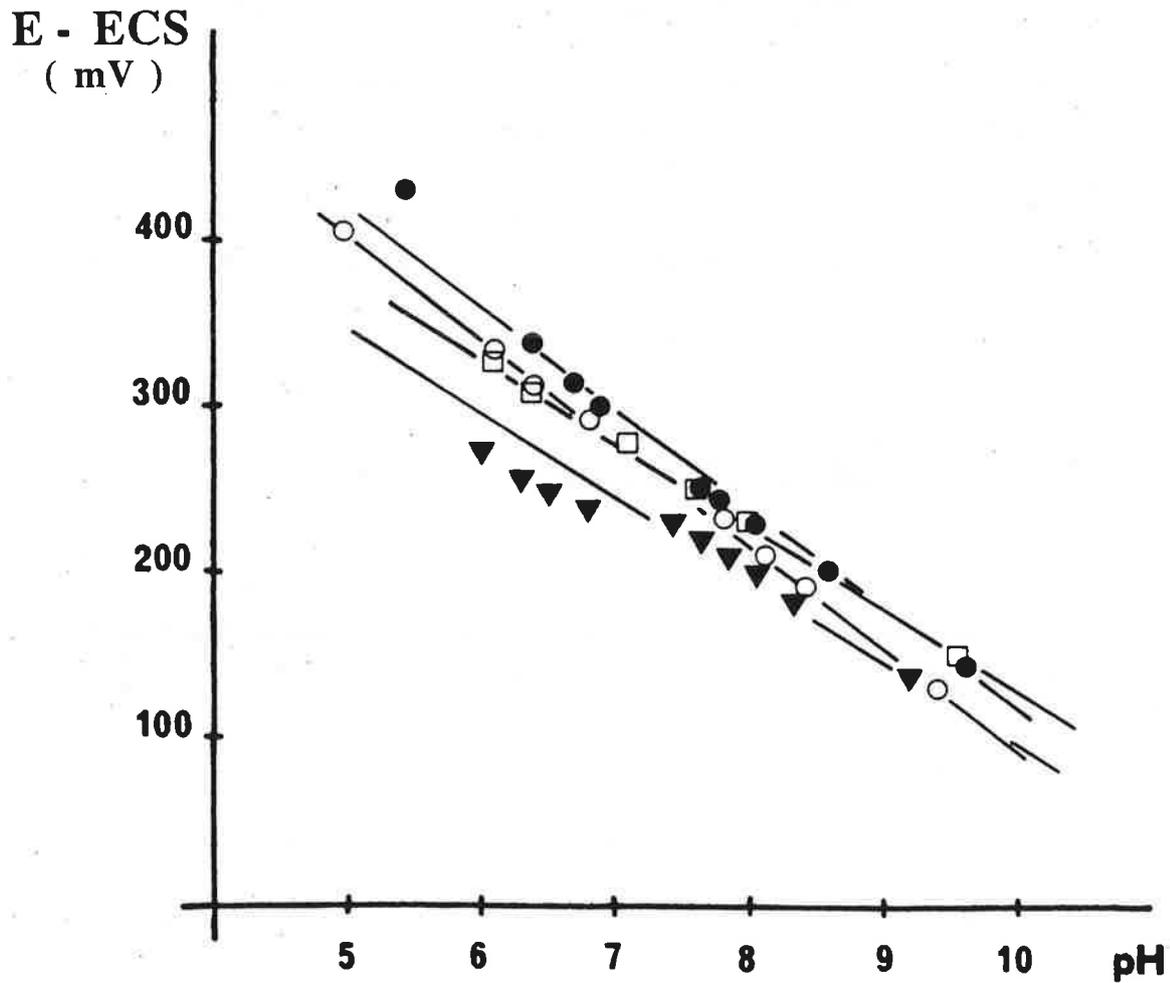


Figure 33 : Courbes d'étalonnage potentiel - pH d'une même électrode à différentes étapes du traitement.
□ après avoir séjourné 2 heures dans l'eau Millipore
● après un séjour de 2 jours dans l'eau Millipore
○ après un dépôt d'un gel de HSA - glutaraldéhyde
▼ après élimination du gel par traitement à la soude 0,1 M, pendant 12 heures, et passage à la cuve à ultrasons pendant 10 mn.

B-I-2 Réponse de l'électrode en présence d'urée

a) Préliminaire: Fonctionnement de l'électrode recouverte d'un gel d'albumine, non enzymatique

Il était important de vérifier, dans un premier temps, que le dépôt d'un gel à la surface de l'électrode ne perturbait pas son fonctionnement. Pour ce faire, le même gel que celui décrit dans le paragraphe précédent a été réalisé, avec une solution d'albumine humaine ne contenant pas d'uréase. Une fois ce gel constitué en surface, l'électrode est lavée au tampon phosphate 0,1 M, puis testée dans différentes solutions de tampon phosphate 0,1 M, dont le pH était échelonné de 4,5 à 9,4. La réponse de l'électrode à membrane non-enzymatique est alors mesurée et comparée aux réponses obtenues avec l'électrode exempte de gel. Comme on le voit sur la Figure 33, la pente de l'électrode avec dépôt de gel non enzymatique est voisine de celle de l'électrode de départ dans la zone de pH allant de 6 à 9. De plus, les temps de réponse ne sont pas affectés de façon notable par ce dépôt de gel, et restent compris entre 30 s et 2 mn. Nous pouvons donc conclure que le gel n'a pas détérioré la couche d'oxyde de l'électrode.

b) Réponse de l'électrode enzymatique

Le test de l'électrode à uréase est ensuite effectué à différentes concentrations d'urée dans du tampon phosphate 0,01 M, ou, pour augmenter la sensibilité de la réponse, dans du tampon 0,001 M, contenant du NaCl à 0,01 M. L'évolution du potentiel E_u de l'électrode à uréase ainsi obtenue rapporté au potentiel de l'électrode de référence ECS est illustrée sur la Figure 34. Elle est caractérisée par un régime transitoire, qui dure entre 30 s et 1 mn, au bout duquel l'état stationnaire est obtenu. La limite de sensibilité de l'électrode à l'urée se situe à $5 \cdot 10^{-5}$ M.

c) Comparaison avec l'électrode enzymatique de verre

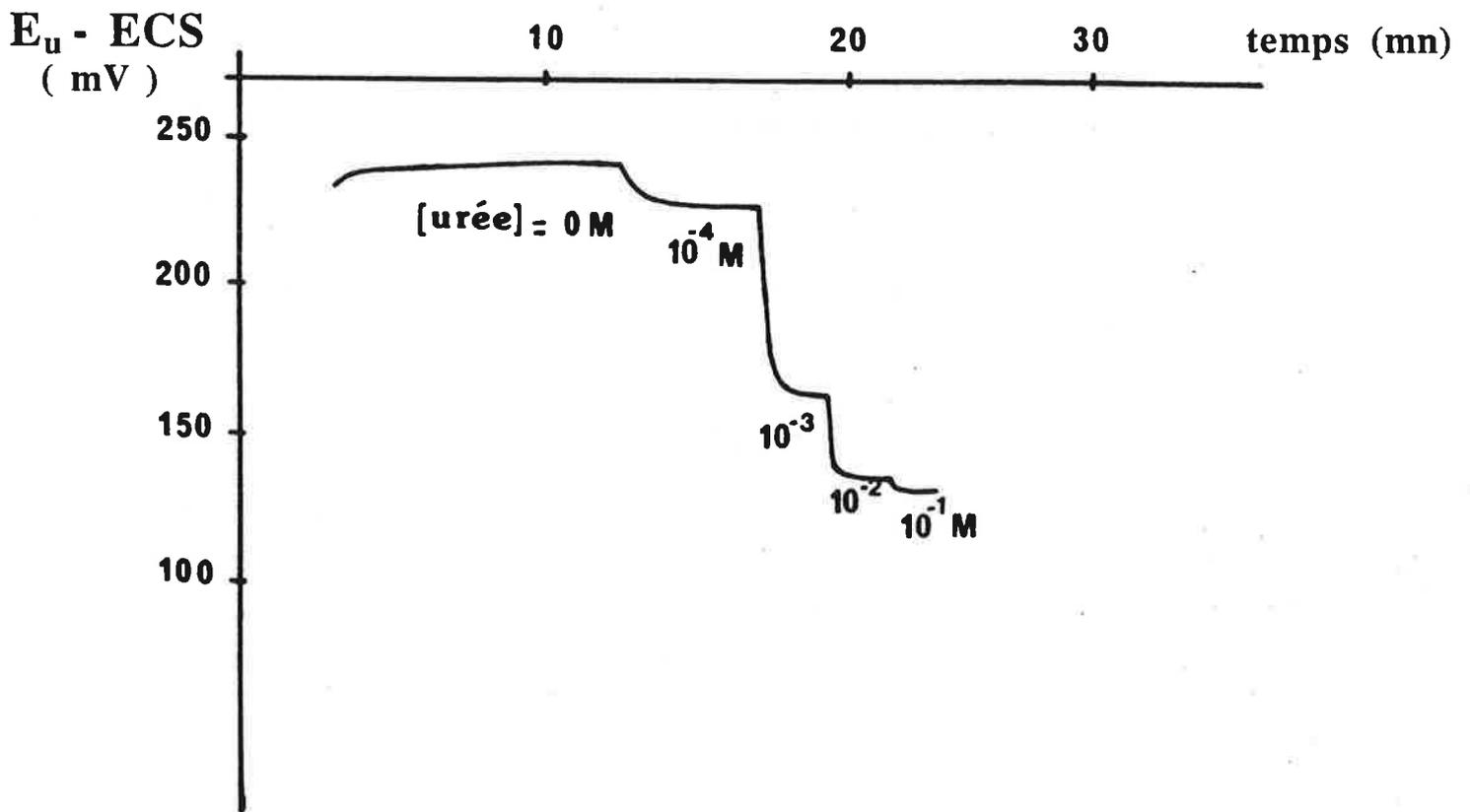


Figure 34 : Réponse dynamique d'une électrode Pd/PdO avec dépôt de gel uréase-HSA aux variations de la concentration en urée. La solution est tamponnée à pH = 7,2, avec du tampon phosphate $10^{-3} M$; la température de travail est de $25^{\circ}C$.

Avec les électrodes à uréase immobilisée sur une électrode en verre décrite dans le Chapitre 1, la limite de sensibilité à l'urée était la même que pour l'électrode décrite ici [99-100].

Par contre, le temps d'obtention de l'état stationnaire, dans le cas d'une électrode de verre, était de l'ordre de 2 à 5 mn. Les dimensions réduites de l'électrode Pd/PdO, et la finesse de la couche enzymatique qui est déposée dessus, limitant les temps de diffusion, sont à l'origine de ces écarts dans les temps de réponse de l'électrode.

B-I-3 Etalonnage de l'électrode enzymatique

La courbe d'étalonnage caractéristique d'une électrode à uréase a l'allure illustrée par la Figure 35. Elle est tracée en portant en abscisse le logarithme de la concentration en urée, et en ordonnée la différence entre le potentiel E_u^0 de l'électrode enzymatique obtenu en l'absence de substrat, et celui obtenu à l'état stationnaire après addition de celui-ci, E_u . Après la limite de sensibilité, la courbe obtenue est linéaire, puis atteint un palier, quand la vitesse maximale de la catalyse est atteinte.

La Figure 35 montre cette courbe d'étalonnage, tracée dans trois conditions de travail différentes:

- tampon phosphate 10^{-3} M
- tampon phosphate 10^{-3} M+ NaCl 10^{-2} M
- tampon phosphate 10^{-2} M

On constate que :

- aux faibles concentrations en urée, une forte concentration en tampon phosphate (10^{-2} M) a pour effet de diminuer la sensibilité de la réponse de l'électrode.

- par contre, aux concentrations plus élevées en urée ($\geq 10^{-2}$ M), la réponse de l'électrode est exactement la même dans les 2 tampons : 10^{-2} M et 10^{-3} M. Cet effet tampon est classiquement décrit dans les utilisations des électrodes enzymatiques.

Une force ionique élevée est en général considérée comme un facteur stabilisant de la réponse d'une électrode enzymatique [101-102]. C'est pour cette raison qu'on a été amené à effectuer le test de l'électrode à uréase en présence de tampon 10^{-3} M additionné de chlorure de

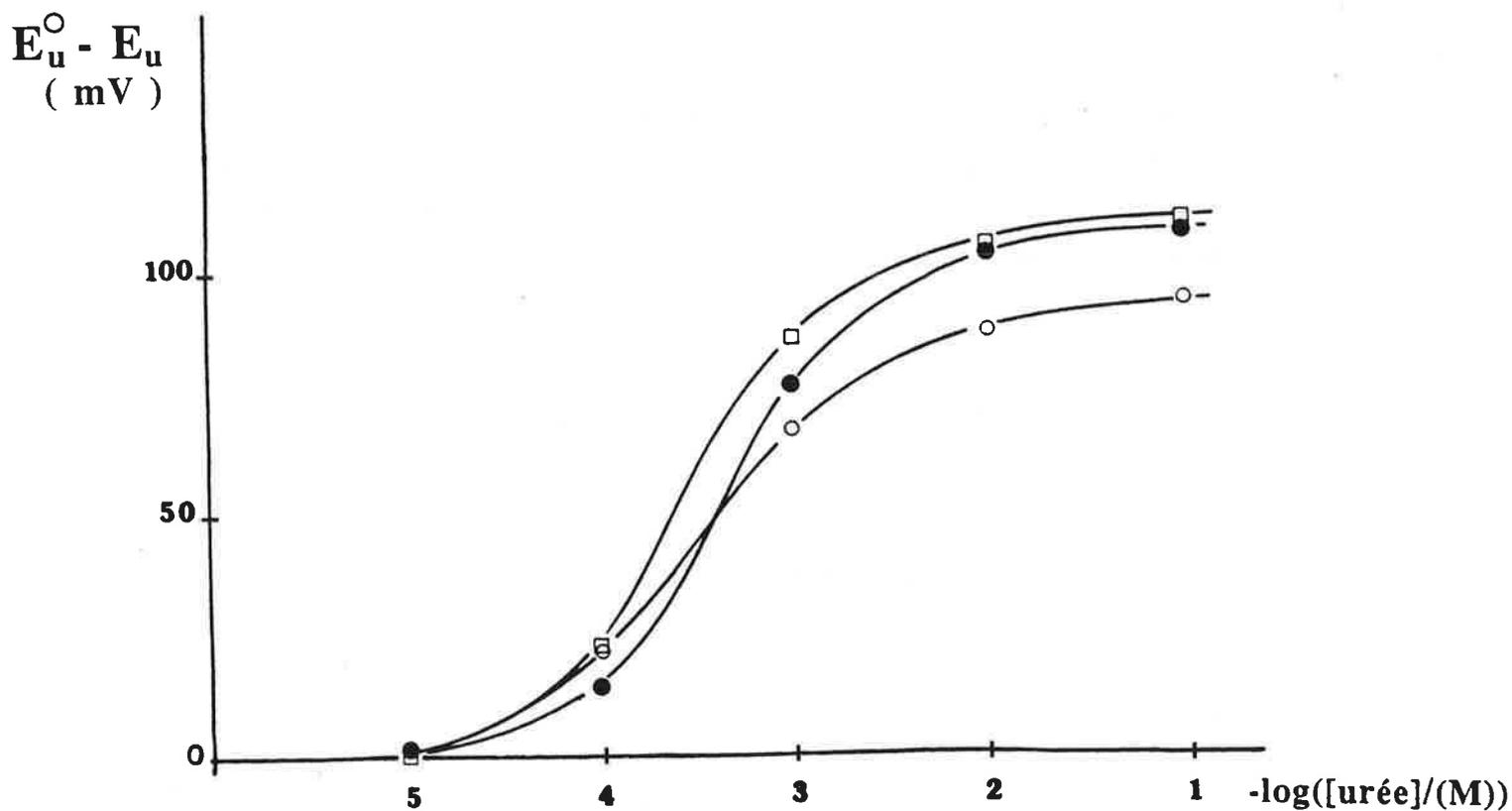


Figure 35 : Courbe d'étalonnage de l'électrode Pd/PdO à uréase, pour des tampons phosphates à différentes concentrations :
□ 10^{-3} M
● 10^{-2} M
○ 10^{-3} M avec du NaCl à 10^{-2} M
La température de travail est de 25°C .

sodium à 10^{-2} M. Il en résulte, comme on le voit sur la Figure 35, une baisse notable de la réponse de l'électrode à l'urée. Cet effet est réversible. On retrouve ici un résultat déjà cité [3] : les ions chlorures sont des inhibiteurs réversibles de l'activité enzymatique de l'uréase.

Conclusions:

- Dans toute utilisation ultérieure de cette électrode enzymatique, il faudra éviter la présence de sels de fond, dont l'effet inhibiteur sur l'uréase masque l'effet stabilisant attendu d'une force ionique élevée.

- Le choix de la force tampon de travail dépend du domaine de dosage de l'urée : aux faibles concentrations de celle-ci, il est préférable d'utiliser du tampon phosphate concentré à 10^{-3} M; aux fortes concentrations d'urée, un tampon phosphate à 10^{-2} M est plus indiqué.

- Dans de bonnes conditions de stockage (eau tamponnée à $\text{pH} = 7,2$ et 4°C), et de fonctionnement, la durée de vie de cette électrode enzymatique tourne autour de 3 semaines au moins. Nous n'avons pu réaliser d'essais au-delà.

B-I-4 Récupération de l'électrode

Une fois que le gel a perdu toute activité enzymatique, ou quand on veut changer d'enzyme de travail, il est possible de récupérer l'électrode pour une utilisation ultérieure. On a vu, dans les précautions d'emploi (paragraphe A - III de ce chapitre) qu'un frottement abrasif endommageait l'électrode. Le meilleur traitement que nous ayons trouvé pour débarrasser l'électrode de son gel est alors le suivant :

- laisser le gel "gonfler" dans une solution de soude 0,1 M pendant une nuit.
- passer ensuite l'électrode à la cuve à ultra-sons, pendant 30 mn, toujours dans la soude 0,1 M.

L'électrode ainsi débarrassée de son gel ne perd aucune de ses caractéristiques de départ (Figure 33).

B-II ELECTRODE Pd/PdO À BUTYRYLCHOLINESTÉRISE

B-II-1 Dépôt d'un gel contenant la butyrylcholinestérase (BuChE) sur la partie sensible de l'électrode

La transformation de l'électrode Pd/PdO en électrode enzymatique à butyrylcholinestérase se fait comme on l'a décrit précédemment pour l'uréase : sur la partie sensible d'une électrode Pd/PdO qui répond de façon satisfaisante au pH, on dépose une couche enzymatique contenant la BuChE. Pour ce faire, on trempe l'électrode Pd/PdO dans une solution enzymatique résultant du mélange des deux solutions suivantes :

Solution 1 : 5 mg de BuChE à 20 UI/ mg de protéine sont dissous 0,1 cm³ d'albumine humaine à 20 %, ce qui correspond à 100 UI.

Solution 2 : Cette solution de glutaraldéhyde est la même que celle préparée pour l'uréase (2,5 % dans de l'eau ultra-pure).

Les deux solutions sont mélangées à volume égal (0,1 cm³ de chacune), et l'extrémité sensible d'une électrode Pd/PdO est trempée dans ce mélange, avant d'être retirée et laissée à l'air libre pendant vingt minutes. Au bout de ce temps de réticulation, l'électrode est rincée avec du tampon phosphate 0,1 M, avant d'être utilisée comme capteur à butyrylcholine.

Remarques : On peut constater ici que la BuChE utilisée est à 20 UI / mg de protéine, alors que l'uréase testée dans le paragraphe précédent était à 70 UI / mg de poudre ; dans la mesure où la masse d'enzymes utilisée pour effectuer le gel est la même dans les deux cas, il est tout à fait normal de s'attendre à une variation globale de potentiel moins importante qu'avec l'uréase, aux mêmes concentrations en substrat.

B-II-2 Réponse de l'électrode en présence de butyrylcholine

Le dosage de la butyrylcholine est effectué en milieu tamponné à pH = 7,2 et thermostatté à 25 °C. Des quantités croissantes de butyrylcholine sont rajoutées dans le milieu, de façon à obtenir des concentrations finales de : 10⁻⁵ M, 5.10⁻⁴ M, 10⁻³ M, 5.10⁻³ M, 10⁻² M.

$E_{ch} - ECS$
(mV)

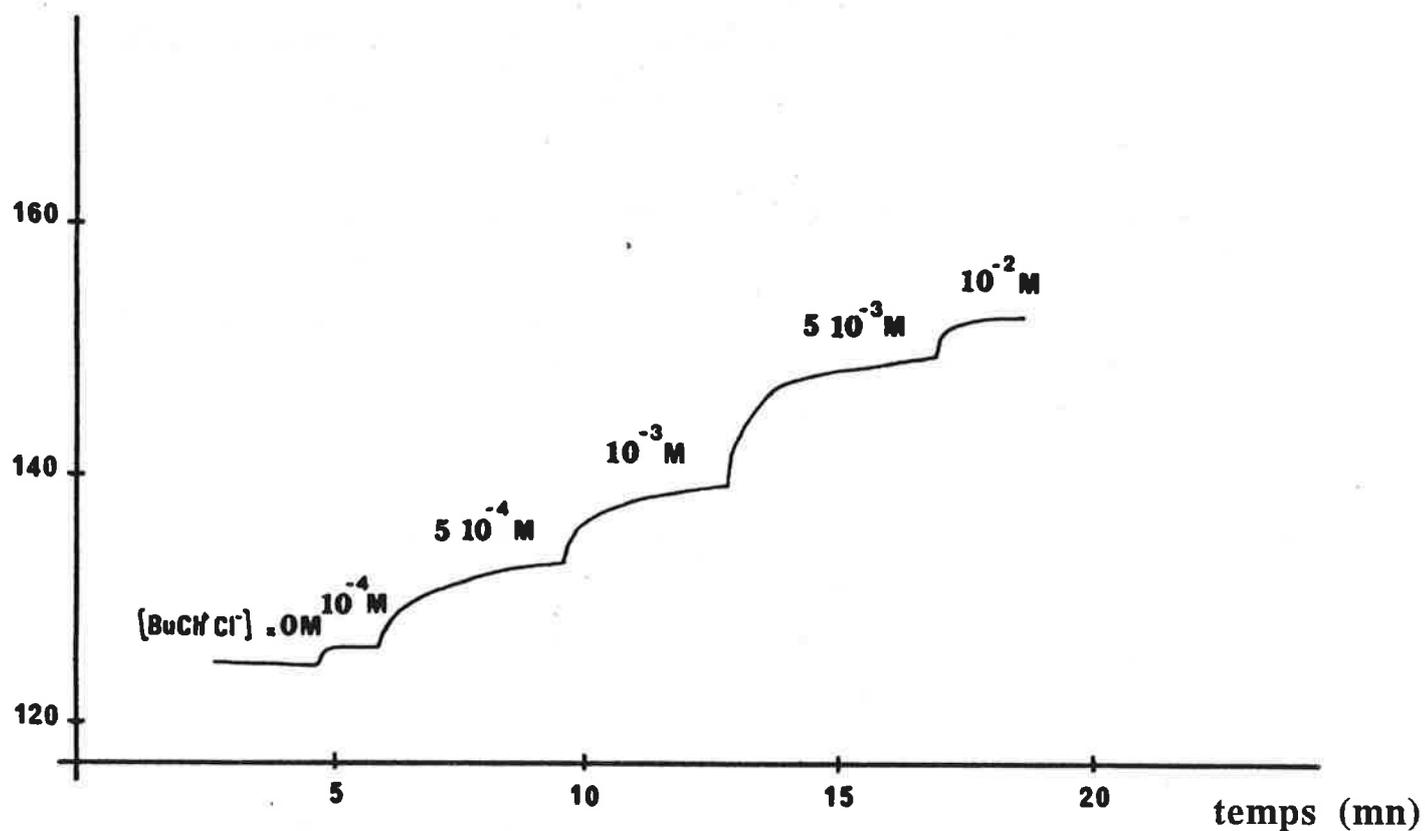
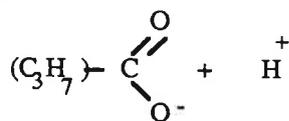


Figure 36 : Réponse dynamique d'une électrode Pd/PdO à butyrylcholinestérase.
Le substrat est le chlorure de butyrylcholine.
La solution est tamponnée avec du tampon phosphate 10^{-3} M à pH=7,2
La température de travail est de 25°C.

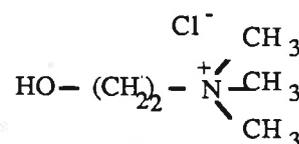
L'évolution du potentiel E_{ch} de l'électrode à BuChE rapporté au potentiel de l'électrode de référence ECS, obtenue à chaque concentration en butyrylcholine, est illustrée sur la Figure 36. Comme pour l'uréase, on peut remarquer qu'elle est caractérisée par un régime transitoire qui dure 1 à 4 mn, ce qui est rapide en comparaison avec les temps généralement obtenus avec l'électrode de pH en verre (en général 5 à 8 mn) [40][103-105]. L'intensité de la réponse est fonction de la quantité d'enzyme immobilisée : on ne s'étonnera donc pas (comme dit dans la remarque ci-dessus) d'une variation de potentiel plus faible que celle obtenue pour l'urée aux mêmes concentrations.

Une fois le régime transitoire terminé, l'état stationnaire est caractérisé par une légère dérive comme on le voit sur la Figure 36. Ce n'était pas le cas avec l'uréase, pour laquelle on atteignait un palier tout à fait horizontal à une valeur fixe de potentiel.

La dérive constatée est certainement le résultat d'interférences qui ne pouvaient être attribuées qu'à la choline, ou à l'acide butyrique, les deux produits de la réaction, dont nous pouvons rappeler les formules ci-dessous :



Acide butyrique.



Choline.

B-II-3 Interprétations des interférences constatées par la choline

a) Préliminaires

Une expérience a été effectuée, mettant en présence de la choline avec l'électrode Pd/PdO à BuChE. Cette électrode est immergée dans du tampon phosphate à 10^{-3} M. Des quantités connues de choline, sous forme de sel de chlorure, sont rajoutées dans le milieu, afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : $5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-3} M, $5 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-2} M, et la lecture du potentiel de l'électrode à courant nul effectuée.

On constate alors, une baisse de ce potentiel, comme le montre la Figure 37, baisse qui est fonction de la concentration en choline, et qui est très lente.

b) Interprétation

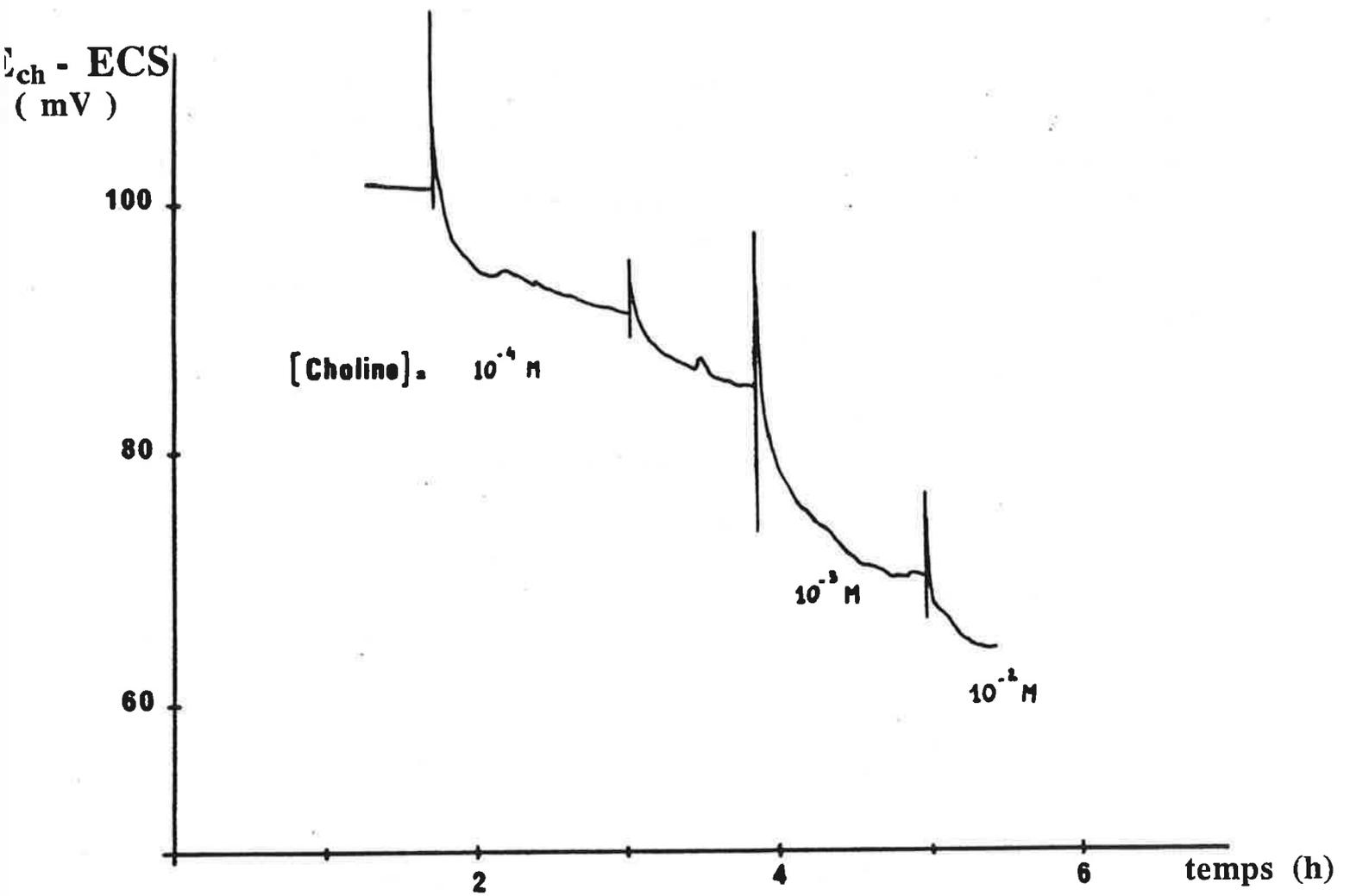


Figure 37 : Effet de différentes concentrations en choline sur le potentiel de l'électrode Pd/PdO, mesuré dans une solution de tampon phosphate $10^{-2} M$, à pH = 7,2.

Nous savons que certains couples métal/oxyde métallique sont utilisés comme catalyseurs dans les synthèses de composés organiques par voie électrochimique [106-108]. Ils se comportent comme des médiateurs dans l'oxydation de ces composés si certaines conditions sont réunies:

D'après Wendt [109], ces conditions sont les suivantes:

- L'électrode doit être maintenue à un potentiel suffisamment élevé.
- La réoxydation du métal ou de l'oxyde métallique de faible valence doit être un processus rapide.
- La réduction de l'oxyde métallique par les composés organiques ne doit pas s'accompagner d'une corrosion.

Nous pouvons citer les couples $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$, $\text{Co}/\text{Co}(\text{OH})_2/\text{Co}_2\text{O}_3$, $\text{Ni}/\text{Ni}(\text{OH})_2/\text{NiOOH}$, $\text{Pt}/\text{PtO}_2/\text{PtO}_2\text{O}$. Il est à noter que l'oxydation se fait soit en milieu aqueux, soit en milieu organique. Dans le cas particulier des alcools, des exemples montrent qu'elle peut se faire en milieu aqueux à pH basique. Les produits de cette oxydation peuvent être des aldéhydes, des cétones, ou des acides carboxyliques, suivant que l'alcool est primaire, secondaire ou tertiaire, cela avec un pourcentage non négligeable de sous-produits.

L'interférence observée dans notre cas, électrode Pd/PdO à BuChE, peut être expliquée comme suit par ce type de réaction: la choline, produit de la réaction enzymatique, possède une fonction alcool en bout de chaîne; il est alors probable qu'au contact de l'oxyde de palladium, elle subisse une oxydation, comme le font les alcools ordinaires (méthanol, éthanol...), à la surface de catalyseurs électrochimiques métal/oxyde métallique. Il en résulte une réduction de l'oxyde de palladium, qui se traduit par la baisse du potentiel libre de l'électrode, comme le montre la Figure 37. Nous ne pouvons entrer ici dans le détail du mécanisme d'oxydation qui est complexe, et nécessiterait des expériences supplémentaires mettant en jeu la voltammétrie ou l'Infra Rouge à Transformée de Fourier.

Ce phénomène est lent par rapport à l'évolution du potentiel de l'électrode due à la variation de pH résultant de la production d'acide butyrique. Grâce à cela, la détection de la butyrylcholine utilisant une électrode Pd/PdO à BuChE reste possible. Le temps de réponse d'une telle électrode (3 à 5 mn) est cependant plus grand que celui de l'électrode Pd/PdO à uréase (1 à 3 mn), présentant les mêmes caractéristiques (activité catalytique de la couche enzymatique, pente de la courbe $E = f(\text{pH})$).

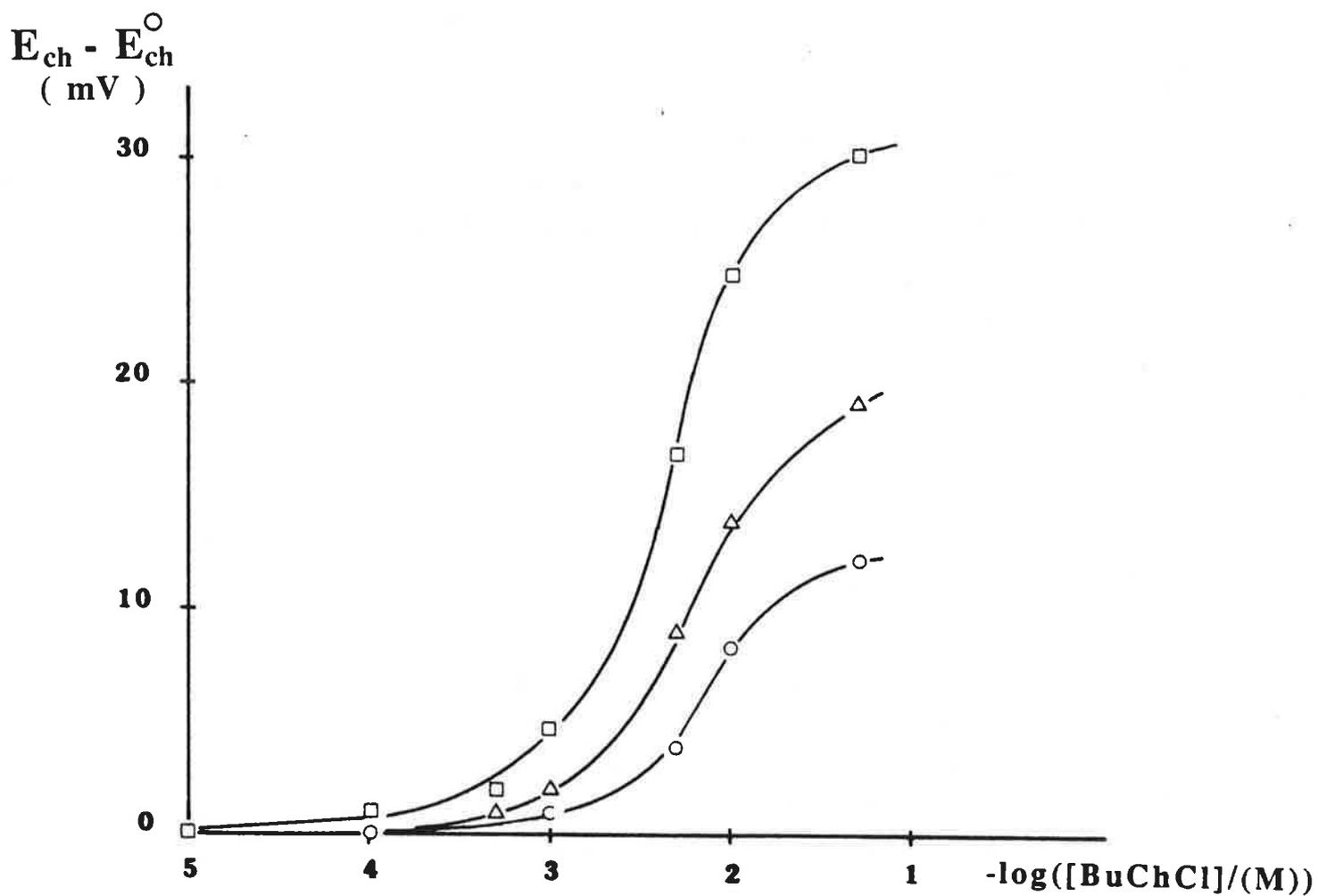


Figure 38 : Courbes d'étalonnage de l'électrode Pd/PdO à Butyrylcholinestérase, pour des tampons à différentes concentrations :
□ $10^{-3} M$
△ $10^{-2} M$
○ $10^{-1} M$
La température de travail est de $25^{\circ}C$.

Remarque: L'oxydation de la thiocholine, par voie électrochimique utilisant une électrode en platine, est dans certains cas utilisée pour suivre l'activité enzymatique de la butyrylcholinestérase [110].

B-II-4 Etalonnage de l'électrode à BuChE, et influence de la "force tampon"

Comme pour l'uréase, on trace la courbe d'étalonnage caractéristique de chaque électrode à BuChE réalisée, en portant en abscisses le logarithme de la concentration en butyrylcholine, et en ordonnées le potentiel de l'électrode enzymatique à l'état stationnaire E_{ch} rapporté à son potentiel en l'absence de substrat E_{ch}^0 .

L'allure de la courbe d'étalonnage obtenue (Figure 38) est tout à fait conforme aux prévisions, malgré la légère dérive constatée, interprétée dans le paragraphe précédent. La limite de sensibilité est de 10^{-4} M en butyrylcholine dans les conditions de travail imposées, et la vitesse maximale de catalyse, caractérisée par l'obtention d'un palier, est atteinte aux environs de $5 \cdot 10^{-2}$ M.

La Figure 38 illustre l'effet de la concentration en tampon phosphate, celle-ci ayant été fixée à : 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M. On retrouve l'effet caractéristique attendu pour une électrode enzymatique à faible catalyse enzymatique: plus la concentration en tampon est élevée, plus la sensibilité de la réponse diminue, pour une même concentration en substrat.

Conclusions:

Les électrodes Pd/PdO mises au point comme on l'a décrit dans le paragraphe A de ce chapitre, présentent, en tant qu'électrodes de pH, les avantages et inconvénients suivants:

- Du point de vue de leur taille et de leur forme, beaucoup de configurations peuvent être adoptées, selon le besoin. Il est évident que c'est la possibilité de miniaturiser ce type d'électrodes qui retiendra le plus l'attention.

- Leur utilisation peut être étendue: électrode rédox classique, électrode à O_2 ou CO_2 si on leur adjoint la membrane sélective et l'électrolyte adéquats.

- Leur mise au point pour le moment reste artisanale, ce qui explique le pourcentage d'électrodes défectueuses de l'ordre de 20 % que nous obtenons; ce pourcentage nous semble pouvoir être réduit par une fabrication en série plus systématique.

En tant qu'électrodes à membranes enzymatiques, elles ont été testées avec deux enzymes différentes: l'uréase et la butyrylcholinestérase, et deux concentrations enzymatiques différentes: élevée pour l'uréase, relativement faible pour la BuChE. Dans tous les cas de figures, elles ont présenté un comportement tout à fait conforme à ce qu'on pouvait prévoir, avec, par rapport à l'électrode de verre classique, une rapidité d'obtention de la réponse nettement améliorée, surtout pour l'uréase.

Il faut cependant faire attention à des interférences qui peuvent être le fait d'interactions entre les substrats ou produits de la réaction enzymatique et l'électrode elle-même, comme dans le cas de la choline précédemment explicité. Sans entraîner d'impossibilité d'utilisation totale, ce type d'interactions peut induire des comportements légèrement différents de l'électrode. Une autre précaution à prendre consiste à s'assurer de l'utilisation de ce type d'électrode dans des milieux exempts de couples rédox sensibles aux ions métalliques.

C - MISE AU POINT DE L'ÉLECTRODE ENZYMATIQUE A BASE DE Pd/PdO ACTIVE

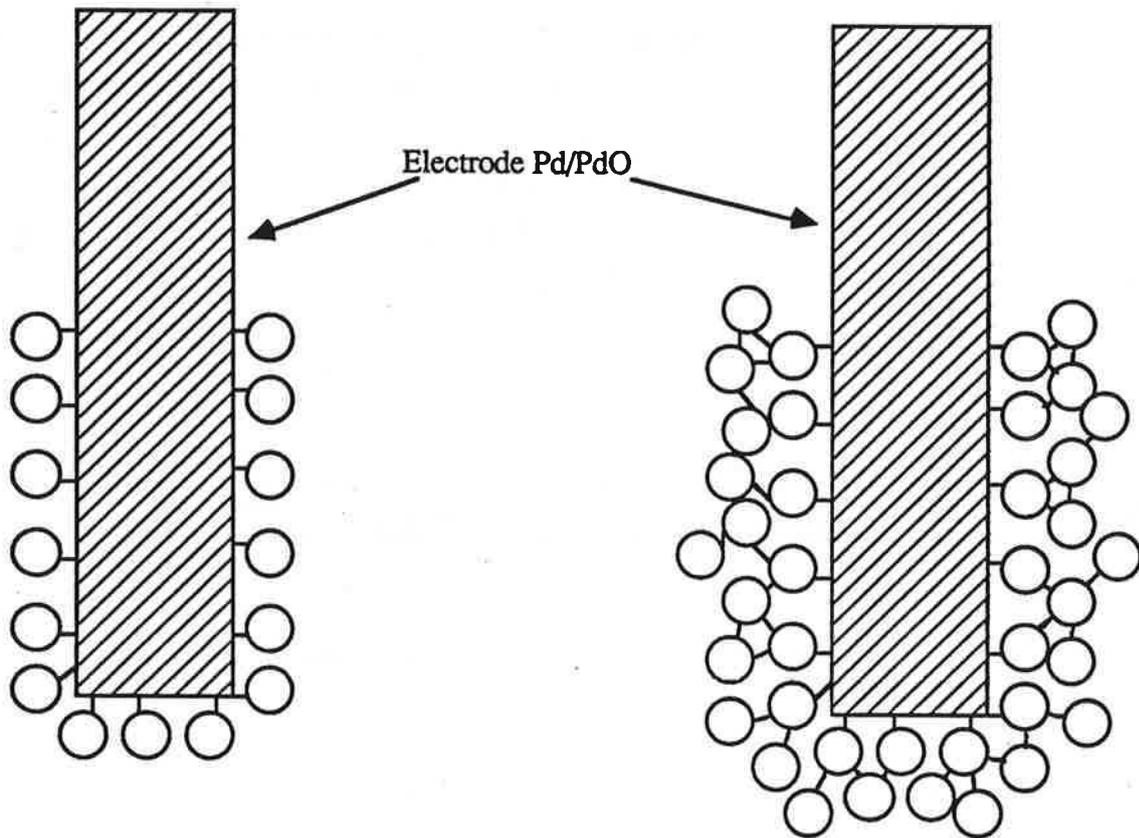
C-I PRÉLIMINAIRES: MISE AU POINT DE L'ÉLECTRODE Pd/PdO

C-I-1 Mode opératoire

Le traitement d'activation au chlorure de cyanuryle, pour créer des sites actifs en surface du palladium, passe par des phases où l'utilisation d'acétone et de soude est nécessaire. La mise au point de l'électrode a été légèrement modifiée en conséquence, la résine supportant mal le procédé qui va suivre.

Le mode opératoire que nous avons adapté pour éliminer ce problème est le suivant:

- Le fil de palladium utilisé, de 0,25 mm de diamètre et 99,999% de pureté, est toujours le même. La soudure à pointe, avec un fil électrique, est réalisée avant l'étape d'oxydation du palladium, et le fil obtenu introduit dans une pipette Pasteur en verre. Pour éviter l'utilisation de la résine telle que nous l'avons décrite dans le Paragraphe C de ce chapitre, on a été amené à fondre ensemble, l'extrémité de la pipette Pasteur et le fil de palladium, à la flamme d'un bec Bunsen. Le tout est alors d'une seule pièce et suffisamment rigide pour les utilisations ultérieures en tant qu'électrode.



Greffage d'enzymes en monocouche

Greffage d'enzymes en multicouches

Figure 39 : Schématisation d'une électrode traitée en "monocouche" et en "multicouches".

- L'oxydation de l'extrémité du palladium est réalisée dans une seconde étape. Après un lavage préalable à l'eau régale, cette extrémité est trempée dans de la soude à 50% massique dans l'eau, puis séchée immédiatement après sous un flux d'azote, pendant 30 mn.

- L'oxydation est réalisée à l'aide d'un four porté à 700°C; l'extrémité utile de l'électrode est déposée dans une cavité pratiquée dans le four, ce qui permet d'imprimer à l'électrode un mouvement de rotation pendant la durée de l'oxydation, qui a été réduite à 3 mn simplement.

- Une fois retirée du four, le fil est laissé refroidir à l'air libre.

C-I-2 Caractéristiques

Les caractéristiques de l'électrode ainsi traitée restent les mêmes que celles obtenues dans le paragraphe A-I-1 (Figure 32).

C-II ACTIVATION DE L'ÉLECTRODE ET GREFFAGE DE L'URÉASE EN MONOCOUCHE

C-II-1 Définition

Nous appellerons *greffage en monocouche* tout greffage d'enzyme qui se fera en une seule étape, sur le support activé; il se forme alors à la surface de l'électrode une couche dont l'épaisseur maximale correspond à la taille d'une molécule d'enzyme.

Par opposition, le *greffage d'enzyme en multicouches* signifiera plusieurs greffages successifs de l'enzyme, chacun ayant lieu après un traitement supplémentaire de l'électrode au glutaraldéhyde. La différence entre ces deux types de greffage est schématisée sur la Figure 39.

C-II-2 Activation de l'électrode par traitement au chlorure de cyanuryle

Après avoir fabriqué l'électrode Pd/PdO suivant le procédé décrit ci-dessus, et testé son aptitude à répondre au pH, on immerge sa partie sensible dans une solution aqueuse de soude 2 M, pendant 15 mn; elle est ensuite séchée sous un flux d'azote pendant 30 mn.

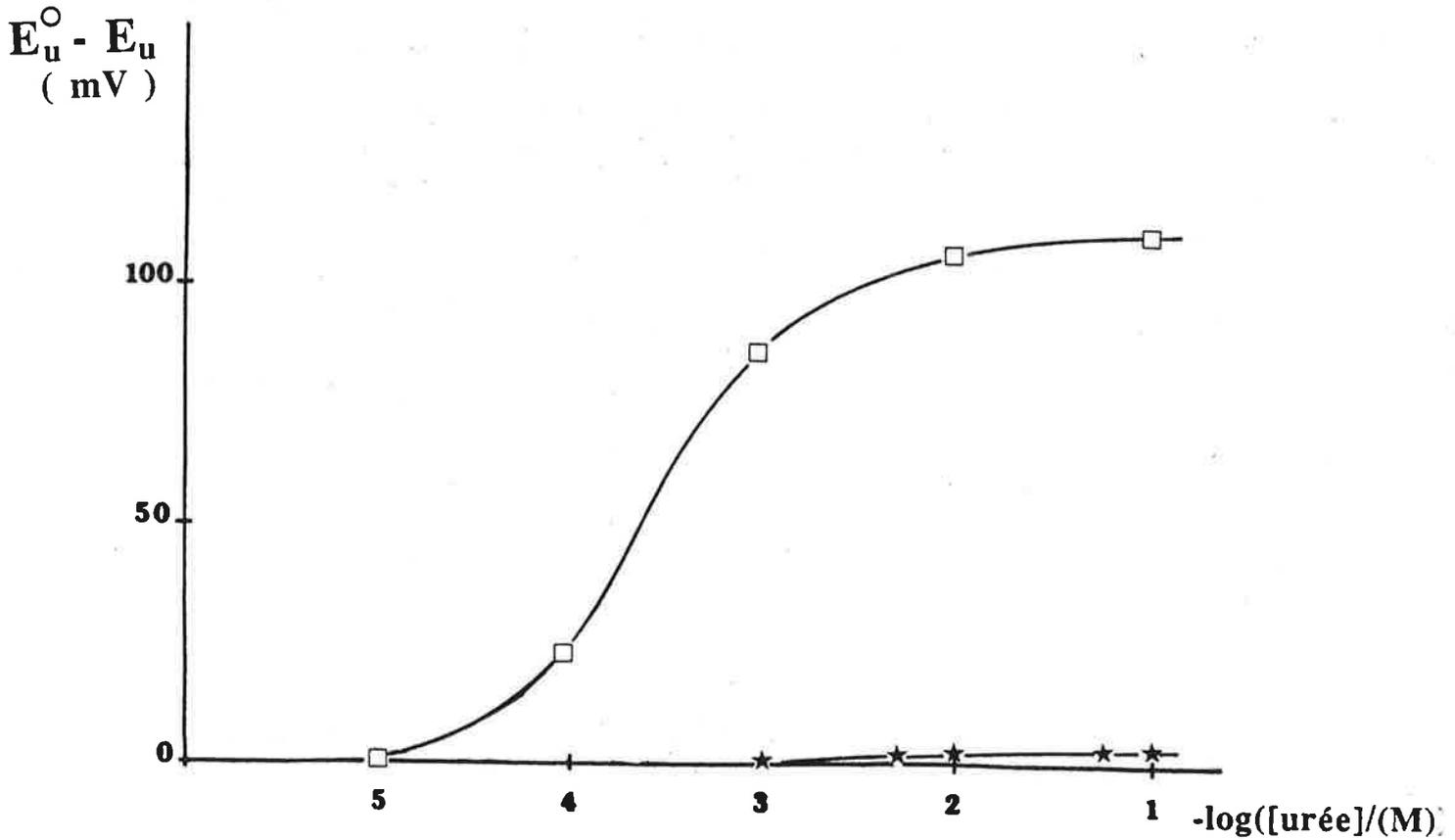


Figure 40 : Courbes d'étalonnage de l'électrode Pd/PdO à uréase immobilisée

□ dépôt d'un gel obtenu à partir d'un mélange de $0,1 \text{ cm}^3$ d'albumine humaine à 350 UI d'uréase, et $0,1 \text{ cm}^3$ de glutaraldéhyde à 2,5 % dans l'eau.

★ interaction d'une solution à 210 UI d'uréase / cm^3 d'une solution tampon phosphate, 10^{-2} M , $\text{pH} = 7,2$, avec l'électrode Pd/PdO activée au chlorure de cyanuryle.

L'action du chlorure de cyanuryle peut alors intervenir: l'extrémité de l'électrode est trempée pendant une heure dans une solution de chlorure de cyanuryle dans l'acétone, à raison de 300 mg dans 10 cm³. L'arrêt de la réaction est imposé par un lavage au tampon phosphate 0,1 M.

Remarque: Ce procédé est adapté de celui utilisé pour l'activation de la poudre d'oxyde de nickel, décrit dans le Chapitre 3 sous le nom de "procédé NiO-3".

C-II-3 Greffage de l'uréase en monocouche

Ce greffage peut intervenir soit immédiatement après l'activation, soit plus tard, en fonction des besoins.

Après lavage au tampon phosphate, l'électrode trempe dans une solution d'uréase à 7 mg dans 1 cm³ de tampon phosphate 0,1 M, pendant toute une nuit, à 4°C. Elle est ensuite rincée abondamment avec du tampon phosphate 0,1 M, avant d'être testée.

C-II-4 Test de l'activité enzymatique de l'électrode

Cette activité est mesurée dans un milieu faiblement tamponné (10⁻³ M en phosphate). Le potentiel est mesuré par rapport à une électrode au calomel saturé. Des quantités croissantes d'urée sont rajoutées dans la solution, de façon à obtenir les concentrations finales suivantes: 10⁻⁴ M, 5.10⁻⁴ M, 10⁻³ M, 5.10⁻³ M, 10⁻² M, 5.10⁻² M, 10⁻¹ M. La solution est thermostattée en permanence, à 25°C; l'allure de la courbe d'étalonnage: $E_u^O - E_u = f([urée])$, est donnée sur la Figure 40.

C-II-5 Résultats et interprétation

Comme on le voit sur la Figure 40, la réponse de l'électrode aux différentes concentrations en urée est très faible, surtout si on la compare à celle obtenue précédemment, après dépôt d'un gel d'uréase.

Cette réponse est si faible qu'on l'a attribuée dans un premier temps à une hydrolyse "spontanée" de l'urée. Cette hypothèse a été écartée après qu'on ait adjoint au système une électrode de pH combinée, pour mesurer l'évolution du pH de la solution. Celui-ci est resté tout

à fait constant et égal à 7,2, pendant toute la durée de l'expérience. Le signal obtenu ne peut donc être attribué qu'à une réaction à la surface de l'électrode, *donc à l'hydrolyse de l'urée catalysée par l'uréase greffée.*

Dans ce cas, pourquoi la réponse de l'électrode a-t-elle une si faible amplitude?

Yacynych [50], qui a travaillé sur l'immobilisation de l'uréase sur l'électrode à Ti-IrO₂, par l'intermédiaire du chlorure de cyanuryle, constate aussi la faible amplitude de la réponse à l'urée, et l'attribue à un blocage des sites actifs de l'oxyde métallique vis-à-vis des ions H⁺, qui rendrait l'électrode moins sensible à ces ions. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse, qui, si elle était vraie, se traduirait par une incapacité de l'électrode Pd/PdO traitée au chlorure de cyanuryle, à répondre correctement au pH. Nous avons donc été amenés à utiliser cette électrode pour mesurer le pH de différentes solutions tamponnées (0,1 M), et nous avons obtenu un tracé $E_U - ECS = f(\text{pH})$, linéaire, avec une pente de 50 mV dans la zone de pH allant de 5 à 9, tout à fait conforme à ce qu'elle était avant le traitement au chlorure de cyanuryle. Le temps de réponse reste de l'ordre de 1 mn. L'hypothèse de Yacynych ne nous semble donc pas expliquer la faible amplitude du signal obtenu.

Nous avons alors émis l'hypothèse suivante, que nous avons cherché à vérifier expérimentalement d'abord, puis par un modèle théorique qui sera exposé au Chapitre 5 :

Hypothèse: la catalyse assurée par l'enzyme est très faible, à cause de la très petite quantité d'uréase greffée en monocouche sur les sites actifs de l'électrode. La production d'OH⁻ résultant de cette catalyse est alors insuffisante pour faire varier le pH de façon notable. Un corollaire de cette hypothèse est que la quantité d'OH⁻ produite étant très faible, le tampon phosphate, même à de faibles concentrations, peut masquer la variation de pH induite par ces ions.

C-III GREFFAGE DE L'URÉASE EN MULTICOUCHES

C-III-1 Mode opératoire

Ce greffage en multicouches a été entrepris pour vérifier l'hypothèse citée ci-dessus: en augmentant la quantité d'enzyme à la surface de l'électrode, on pouvait espérer augmenter l'efficacité de la catalyse, et donc le niveau du signal. Pour ce faire, l'électrode à uréase greffée

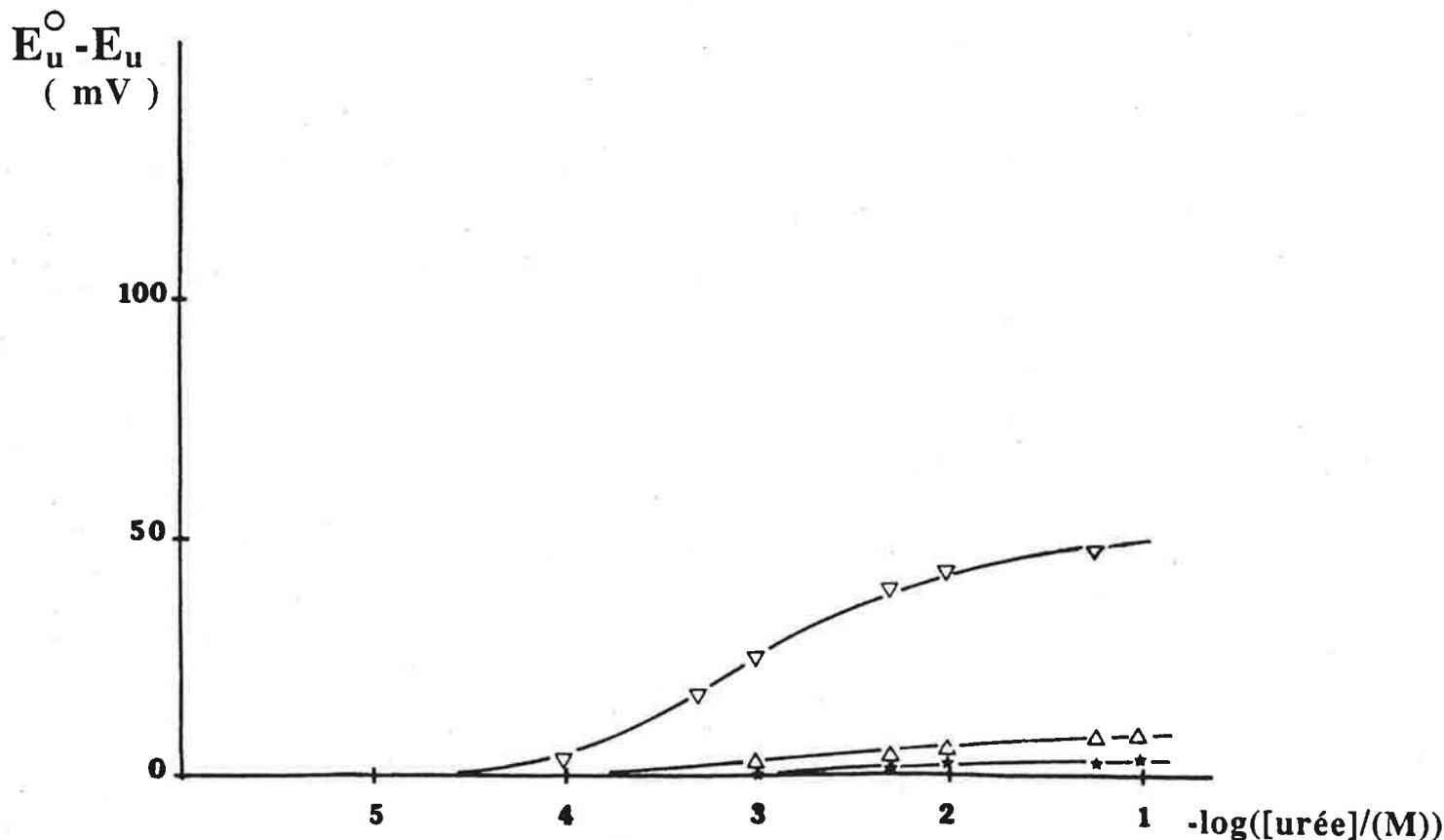


Figure 41 :

Courbes d'étalonnage de l'électrode Pd/PdO à uréase greffée :

★ greffage monocouche obtenu par l'interaction d'une électrode Pd/PdO activée au chlorure de cyanuryle et d'une solution d'uréase à 7 mg par cm^3 de tampon phosphate 0,1 M à pH = 7,2, et à 4°C pendant 12 heures.

Δ greffage d'uréase effectué comme précédemment, suivi de 10 cycles du traitement suivant :

- . glutaraldéhyde à 2,5 % pendant 5 s.
- . séchage à l'azote pendant 1 mn.
- . solution enzymatique à 3 mg d'uréase/ cm^3 de tampon phosphate 0,1 M à pH = 7,2, pendant 5 s.

▽ greffage d'uréase obtenu comme pour ★ , suivi de trois cycles du traitement suivant :

- . glutaraldéhyde à 2,5 % pendant 5 s.
- . séchage à l'azote pendant 1 mn.
- . solution enzymatique à 16 mg d'uréase/ cm^3 de tampon phosphate 0,1 M à pH = 7,2, pendant 5 s.

par l'intermédiaire du chlorure de cyanuryle subit un certain nombre de cycles, chacun de ces cycles pouvant être décomposé comme suit:

- L'électrode à uréase greffée en monocouche est immergée dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5%, pendant 5 secondes.

- Elle est ensuite séchée sous un flux d'azote pendant une minute.

- Le glutaraldéhyde ayant réagi sur la monocouche est alors susceptible de jouer son rôle d'agent pontant avec d'autres molécules enzymatiques: l'électrode est donc trempée dans une solution d'uréase dans du tampon phosphate 0,1M, pendant 5 secondes.

- Un nouveau séchage sous flux d'azote est effectué.

Nous présenterons ici les résultats obtenus avec deux électrodes, dont la multicouche sera obtenue par des voies différentes: la solution enzymatique utilisée est à 3 mg/cm³ pour l'une, et 16 mg/cm³ pour l'autre. La première subit 10 cycles identiques, la seconde en subit 3. Les réponses de ces deux électrodes à l'urée sont résumées sur la Figure 41

C-III-2 Résultats et discussion

a) Séchage à l'azote

Les étapes de séchage à l'azote ont été rajoutées après plusieurs essais où elles n'intervenaient pas. Leur rôle consiste à concentrer la couche de liquide se trouvant à la surface de l'électrode, et favoriser ainsi la réaction de réticulation glutaraldéhyde-enzyme. Le temps de réaction a été nettement réduit par ce procédé.

b) Réponses des électrodes à l'urée

La première constatation qui s'impose concerne l'efficacité d'un greffage en multicouches : l'intensité de la réponse est nettement accrue par rapport à celles obtenues après un simple greffage en monocouche. Ceci confirme l'hypothèse émise ci-dessus: lors d'un greffage en monocouche, la quantité d'enzymes retenue en surface de l'électrode est trop faible pour assurer une catalyse efficace de l'urée, et délivrer une quantité d'OH⁻ suffisante pour faire varier le pH de façon notable.

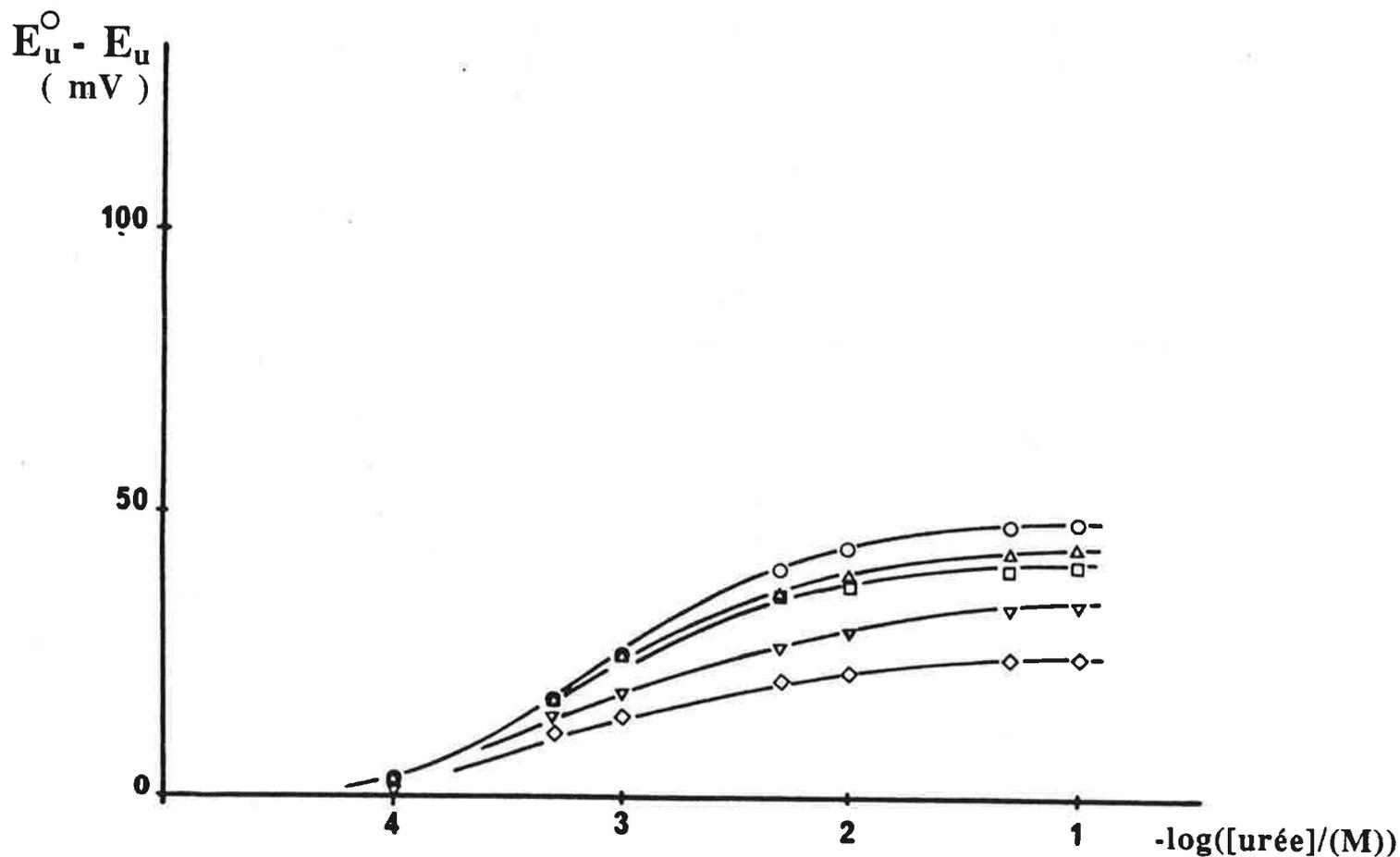


Figure 42 : Evolution en fonction du temps de la courbe d'étalonnage de l'électrode Pd/PdO à uréase greffée en multicouche.

- 1 heure après le greffage
- △ 24 heures après le greffage
- 48 heures après le greffage
- ▽ 5 jours après le greffage
- ◇ 10 jours après le greffage.

La mesure est effectuée dans du tampon phosphate 10^{-3} M à pH = 7,2 et à $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Entre deux essais, l'électrode est conservée dans du tampon 0,1 M à pH = 7,2 et à $T = 4^{\circ}\text{C}$.

En second lieu, on a pu constater qu'une électrode greffée en multicouches ne doit pas être utilisée immédiatement après le greffage. Les fonctions aldéhydes libres, résultant des actions successives du glutaraldéhyde sur la surface de l'électrode, lui confèrent une légère dérive qui doit être le fait d'une oxydation de ce produit au contact de la surface en PdO. Laisser l'électrode au réfrigérateur toute une nuit après le greffage, dans du tampon phosphate 0,1 M, lui permet d'atteindre un état d'équilibre qui élimine la dérive constatée.

D'autre part, l'électrode N°2, qui a été traitée avec les concentrations d'uréase les plus élevées, sur trois cycles seulement, présente une réponse plus forte que l'électrode N°1, qui a subi 10 cycles de greffage, avec une solution cinq fois moins concentrée en uréase. Il en résulte que, pour une même concentration en glutaraldéhyde, il est plus efficace d'augmenter la concentration de la solution enzymatique de greffage, que d'augmenter le nombre de cycles de traitement. Un modèle théorique du comportement de l'électrode greffée en monocouche et multicouche est présenté dans le chapitre 5.

C-III-3 Vieillessement de l'électrode Pd/PdO à uréase greffée en "multicouches"

La Figure 42 rassemble les courbes d'étalonnage obtenues sur dix jours avec une même électrode à uréase, ayant subi trois cycles de greffage. La conservation aux périodes de non-utilisation se fait dans du tampon phosphate 0,1 M, à 4°C (réfrigérateur).

On constate une perte d'activité dans le temps, plus sensible aux fortes concentrations en urée qu'aux faibles. L'allure de la courbe d'étalonnage est cependant la même. Une utilisation sur de longues périodes reste tout à fait envisageable, mais signifie un étalonnage systématique quotidien de l'électrode à enzyme greffée.

CONCLUSION

L'électrode Pd/PdO réalisée a l'avantage d'être miniaturisable, et de pouvoir prendre des conformations s'adaptant aux besoins. Quand on dépose sur son extrémité sensible un gel enzymatique, son comportement se rapproche de celui des électrodes enzymatiques classiques. Il faut cependant être attentif aux interférences éventuelles, dont nous avons présenté un exemple.

Le greffage d'enzyme en monocouche, après activation de la surface de l'électrode au chlorure de cyanure, ne confère à l'électrode qu'une très faible activité enzymatique, qui

est nettement augmentée quand on passe au greffage en multicouches. Le Chapitre 5 qui suit explicite ce résultat par un modèle théorique.

CHAPITRE 5

MODELISATION DE LA REPONSE

D'UNE ELECTRODE

Pd/PdO A ENZYMES IMMOBILISEES

INTRODUCTION

La modélisation du comportement d'une électrode enzymatique a déjà été effectuée [3][111]. Si nous l'avons reprise ici, c'était essentiellement pour expliquer les résultats expérimentaux que nous avons obtenus avec l'électrode Pd/PdO à uréase immobilisée, présentés dans le Chapitre 4; rappelons que nous avons été amenés à conclure qu'une électrode greffée en monocouche avait une activité enzymatique très faible, et inférieure à celle obtenue avec un greffage en multicouche.

Dans le modèle théorique que nous exposons ici, le paramètre que nous avons étudié était l'épaisseur de la membrane enzymatique: nous avons cherché à démontrer que plus cette épaisseur était faible (cas se rapprochant du greffage en monocouche), moins la réponse de l'électrode aux variations de concentrations en substrat était importante. Nous avons ensuite corrélié les courbes obtenues par le calcul avec celles obtenues expérimentalement.

L'uréase est l'enzyme de travail.

A - EQUATIONS DE BASE

On suppose une électrode plane, sur laquelle est déposée une couche enzymatique d'épaisseur e qu'on a schématisée sur la Figure 43. Les équations qui régissent l'évolution de la réaction enzymatique au sein de la membrane résultent d'une part du phénomène de diffusion, d'autre part de la réaction enzymatique elle-même, qui obéit à la loi de Michaelis-Menten. Notons $S(x)$ et $P(x)$ les concentrations en substrat et en produit à une distance x de la surface de l'électrode. Ces équations, appliquées au substrat S et au produit P sont les suivantes:

$$(1) \quad \begin{cases} \text{a-)} & -D_S \frac{d^2 S(x)}{dx^2} + V_m \frac{S(x)}{K_m + S(x)} = 0 \\ \text{b-)} & -D_P \frac{d^2 P(x)}{dx^2} - V_m \frac{S(x)}{K_m + S(x)} = 0 \end{cases} \quad \text{où } 0 \leq x \leq e$$

avec:

D_S = Coefficient de diffusion du substrat au sein de la membrane enzymatique

D_P = Coefficient de diffusion du produit au sein de la membrane enzymatique

V_m = vitesse maximale de la réaction enzymatique à saturation en substrat.

K_m = Constante de Michaelis.

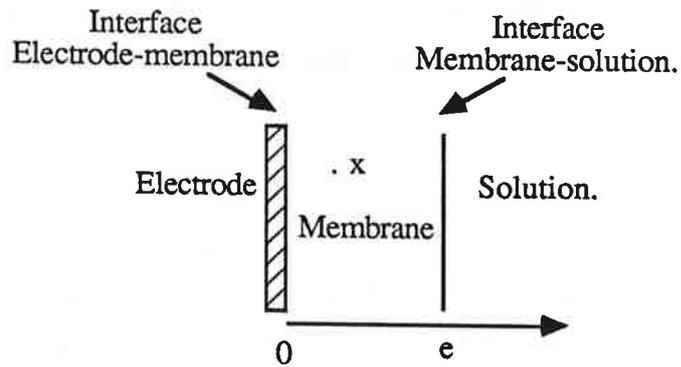


Figure 43 : Schématisation d'une membrane enzymatique

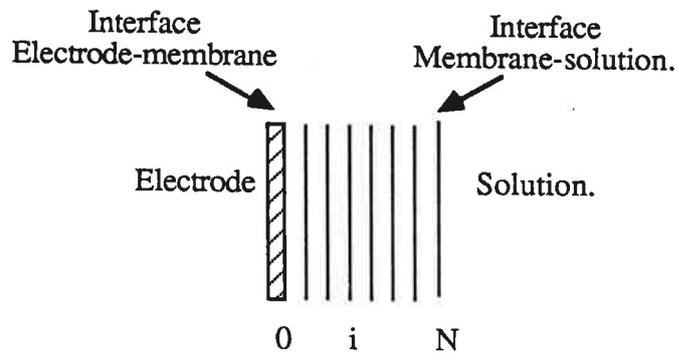


Figure 44 : Schématisation d'une membrane enzymatique discrétisée (découpée en N tranches d'épaisseur e/N)

Les conditions aux limites [111] du système d'équations (1) peuvent être résumées par le système d'équations (2), en supposant qu'à l'interface membrane-solution, la concentration en substrat est S_0 et celle du produit est nulle:

$$(2) \begin{cases} \text{a-)} -D_S \left(\frac{dS}{dx} \right)_{x=0} = 0 & ; & -D_P \left(\frac{dP}{dx} \right)_{x=0} = 0 \\ \text{b-)} S(e) = S_0 & ; & P(e) = 0 \end{cases}$$

Remarque simplificatrice: En sommant les équations (1) a-) et (1) b-), on obtient l'égalité suivante:

$$\frac{d^2}{dx^2} (D_S S(x) + D_P P(x)) = 0$$

$$\text{soit } \frac{d}{dx} (D_S S(x) + D_P P(x)) = \text{Constante}$$

D'après l'équation 2a-) : $\frac{d}{dx} (D_S S(x) + D_P P(x)) = 0$, donc : $D_S S(x) + D_P P(x) = \text{constante}$

$$\text{soit : } D_S S(x) + D_P P(x) = D_S S_0$$

d'où l'équation (3):

$$(3) \quad P(x) = \frac{D_S}{D_P} (S_0 - S(x)).$$

équation qui permet d'obtenir, en tout point de la membrane enzymatique, la valeur de $P(x)$ connaissant celle de $S(x)$.

$$\text{En posant } A = \frac{D_S S_0}{e^2 V_m} \quad \text{et} \quad B = \frac{K_m}{S_0} \quad \text{et} \quad \lambda = \frac{S}{S_0}$$

ainsi que $\chi = x/e$, l'équations (1) a-) est transformé en (4) avec comme conditions aux limites (5):

$$(4) \quad A \frac{d^2 \lambda}{d\chi^2} - \frac{\lambda}{\lambda + B} = 0$$

$$(5) \begin{cases} \text{a-)} \left(\frac{d\lambda}{d\chi} \right)_{\chi=0} = 0 \\ \text{b-)} \lambda(e) = 1 \end{cases}$$

La résolution du système (4), dont les conditions aux limites sont décrites par le système (5), permet d'atteindre λ , donc S et P. Cette résolution peut se faire par différentes méthodes. On a opté dans un premier temps pour la méthode dite de "collocation orthogonale", détaillée par VILLADSEN et coll [112], BIRBAUM et coll [113-116], ainsi que BOSCH et coll [117-118]. Cette méthode a été appliquée avec succès par LIOU et coll. [119] pour modéliser l'adsorption d'enzymes sur une poudre, et par BRADY et coll. [111], pour modéliser la réponse d'une électrode enzymatique. Cette méthode n'a pas été retenue dans notre cas, car les temps de calcul des solutions étaient trop importants par rapport à ceux obtenus avec la méthode itérative proposée par KERNEVEZ [120], que nous explicitons ci-dessous.

B - DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DES DIFFÉRENCES FINIES

La membrane enzymatique schématisée sur la Figure 43 est divisée en N tranches d'épaisseur $1/N$, comme le montre le schéma de la Figure 44. On note λ_i les valeurs de λ aux points i/N . Décrit par ces nouvelles variables, le système (4) devient (6):

$$(6) \quad A \frac{\lambda_{i+1} - 2\lambda_i + \lambda_{i-1}}{\Delta\chi^2} - \frac{\lambda_i}{B + \lambda_i} = 0 \quad \text{avec} \quad 0 < i < N$$

En combinant les équations (5) a-) et (4), on obtient:

$$(7) \quad A \frac{2(\lambda_1 - \lambda_0)}{\Delta\chi^2} - \frac{\lambda_0}{B + \lambda_0} = 0$$

Pour $\chi = 1$, on a la valeur de λ :

$$(8) \quad \lambda_N = 1.$$

La résolution des équations (6) et (7) fait appel à une méthode itérative, qui revient à résoudre les 2 équations (9) et (10):

$$(9) \quad A \frac{\lambda_{i+1}^{k+1} - 2\lambda_i^{k+1} + \lambda_{i-1}^{k+1}}{\Delta\chi^2} = \frac{\lambda_i^k}{B + \lambda_i^k}$$

$$(10) \quad A \frac{2(\lambda_1^{k+1} - \lambda_0^{k+1})}{\Delta\chi^2} = \frac{\lambda_0^k}{B + \lambda_0^k}$$

où λ_i^k est la valeur de λ_i obtenue à la $k^{\text{ième}}$ itération.

On arrête l'itération lorsque l'inégalité suivante est vérifiée:

$$\frac{\left(\sum_{i=0}^{i=N} (\lambda_i^{p+1} - \lambda_i^p)^2 \right)^{1/2}}{\left(\sum_{i=0}^{i=N} (\lambda_i^p)^2 \right)^{1/2}} \leq \varepsilon$$

où ε est une valeur fixée de façon à avoir une précision maximale en un minimum d'itérations.

La résolution de ces équations a été faite à l'aide d'un Hewlett-Packard 86; l'organigramme, ainsi que le programme de résolution sont en Annexe 4. Cette méthode a été choisie car elle a l'avantage de converger rapidement vers la solution cherchée. Les solutions que nous obtenons l'ont été avec $N = 100$; le résultat est atteint au bout de 10 itérations au maximum, avec : $\lambda_i^0 = 0$, pour $i = 0, \dots, N-1$.

Remarques simplificatrices:

- On a choisi $D_S = D_P = D$ pour la résolution des équations.
- On suppose que D reste constant dans tous les cas de figures, en particulier si l'épaisseur de la membrane varie.

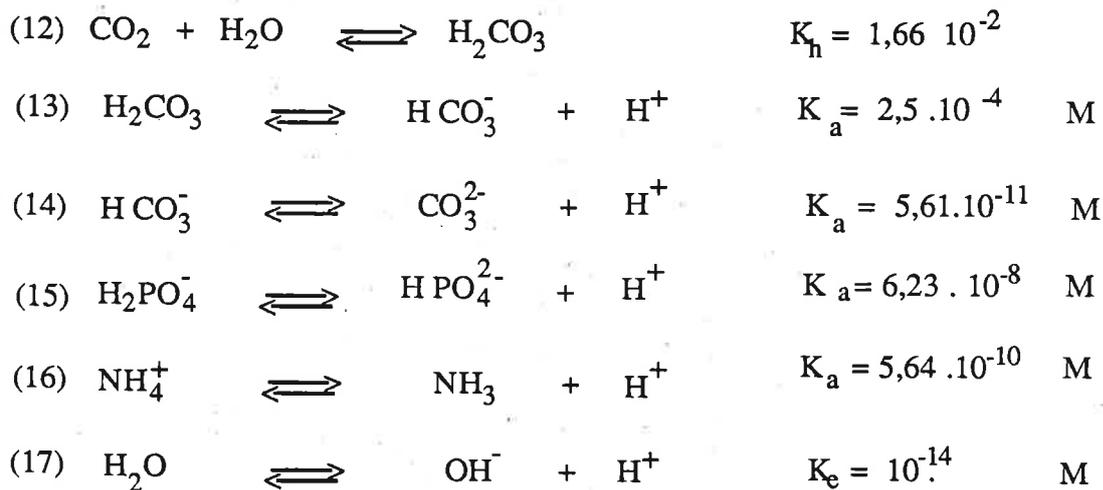
C - CALCUL DE LA REPONSE THÉORIQUE DE L'ELECTRODE

Une fois obtenu le profil de concentration du substrat et du produit au sein de la membrane, et en appliquant l'équation de l'électroneutralité au point $x = 0$ (interface électrode-membrane), on peut obtenir par le calcul la concentration en ions OH^- générés par la réaction enzymatique, et donc la réponse théorique de l'électrode.

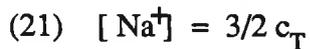
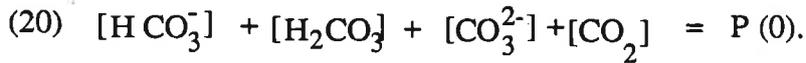
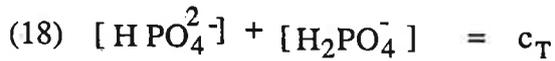
L'équation de l'électroneutralité dans la membrane est la suivante:



Cinq équilibres régissent les concentrations des différentes espèces en présence dans la membrane enzymatique [121-122]:



Le bilan matière, en tout point x de la membrane peut être exprimé par les équations suivantes:



où : c_T est la concentration en tampon phosphate loin de la surface de l'électrode et $P(0)$ la concentration en produit de la réaction enzymatique à l'interface électrode-membrane.

Le gaz carbonique CO_2 intervenant dans les équations ci-dessus représente le gaz dissous dans la solution.

Méthode de résolution: toutes les concentrations intervenant dans l'équation de l'électroneutralité (11) sont exprimées en fonction de la concentration en ions H^+ . On applique ensuite la méthode de Newton-Raphson à l'équation obtenue pour atteindre $[\text{H}^+]$. La convergence est obtenue dans notre cas au bout de 20 itérations au maximum.

D - RESULTATS ET INTERPRETATION

Dans un premier temps, il s'agissait de connaître le profil de concentration en substrat à l'intérieur de la membrane, en fonction de l'épaisseur de celle-ci.

Rappelons que nous avons posé:

$$A = DS_0 / e^2 \cdot V_m, \text{ et } B = K_m / S_0.$$

$$\text{donc } e = (DS_0 / A \cdot V_m)^{1/2}$$

$$\text{d'où il résulte que } e = e_1 (1/AB)^{1/2}, \text{ en posant: } e_1 = (DK_m/V_m)^{1/2}$$

e_1 ayant la dimension d'une longueur.

Les constantes K_m , V_m , et D étant fixes, le tracé de S/K_m , en fonction de e/e_1 revient à connaître le profil de concentration du substrat au sein de la membrane enzymatique.

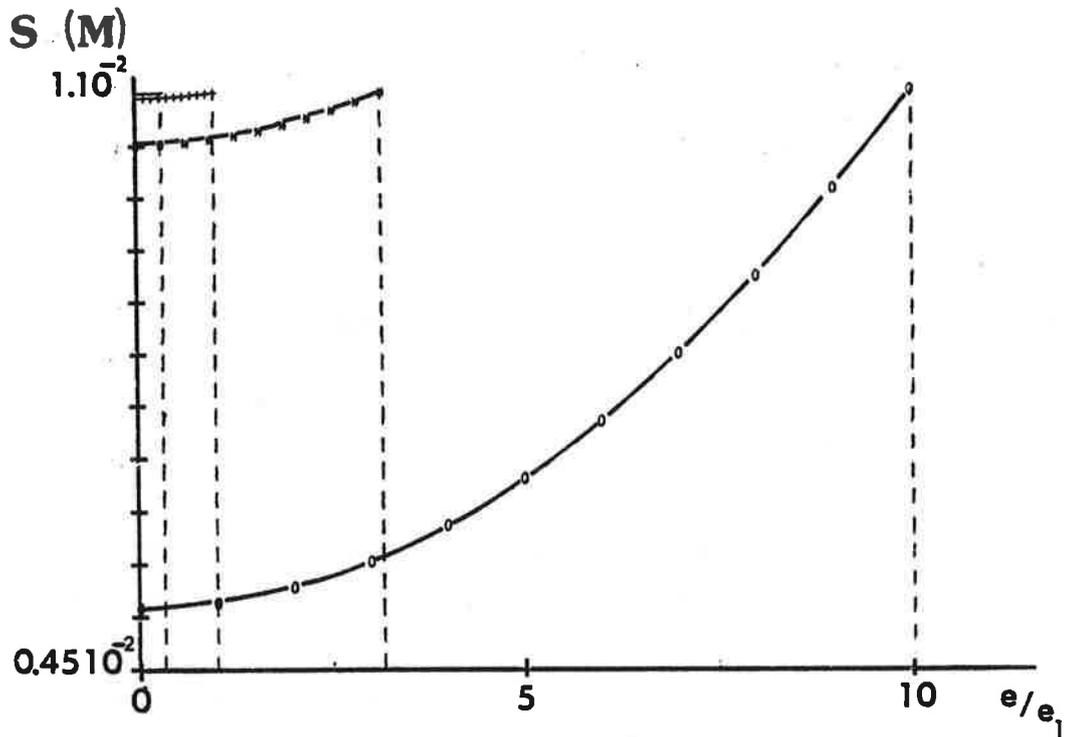


Figure 45 a : Tracé du profil de concentration de S au sein de la membrane enzymatique, en fonction de l'épaisseur de cette membrane. Cas où $S_0 = 10^{-2}$ M

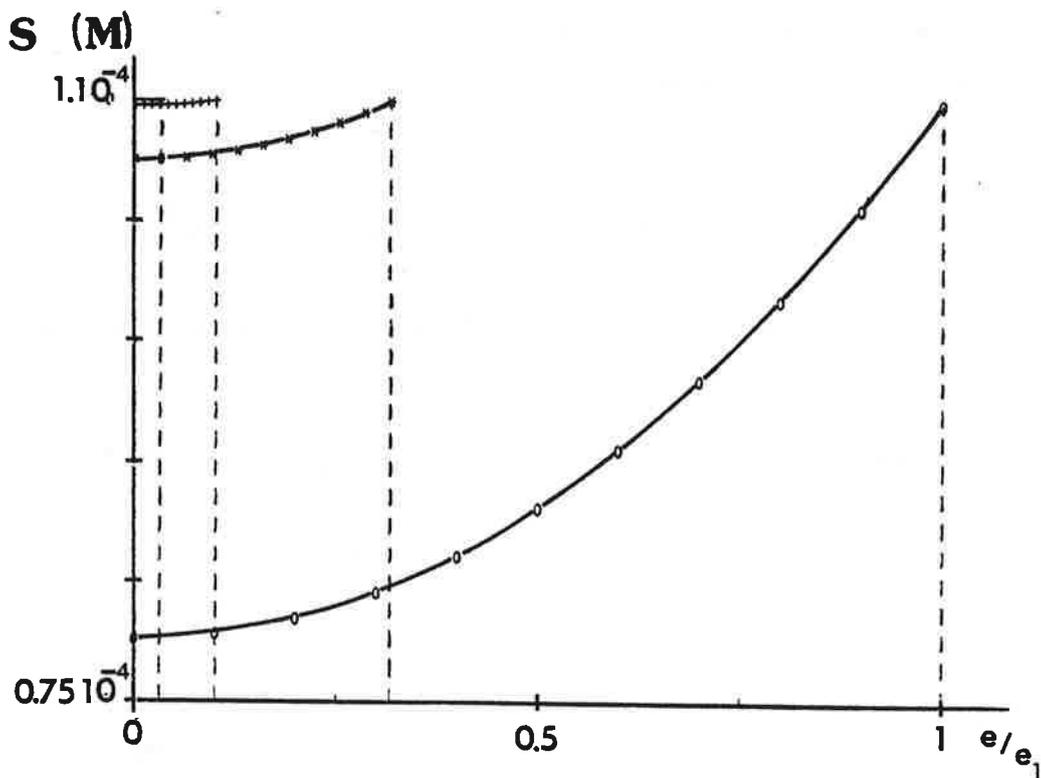


Figure 45 b : Tracé du profil de concentration de S au sein de la membrane enzymatique, en fonction de l'épaisseur de cette membrane. Cas où $S_0 = 10^{-4}$ M

Ce tracé est donné sur les Figures 45 a et 45 b, pour deux valeurs de S_0 différentes: $S_0 = 10^{-2}$ M, et $S_0 = 10^{-4}$ M, la valeur de K_m étant de 10^{-4} M. On constate sur ces figures, que plus l'épaisseur de la membrane enzymatique est grande, plus la concentration en substrat non consommé qui atteint l'interface électrode-membrane est faible. *En d'autres termes, une quantité d'enzyme très faible (liée à la petite épaisseur de la membrane) n'assure que partiellement la transformation du substrat en produit.* Cette conclusion que le calcul nous permet d'apporter, confirme les résultats expérimentaux obtenus avec l'électrode Pd/PdO, à uréase greffée: le signal obtenu avec cette électrode était très faible, même pour les concentrations élevées en substrat. Ceci s'explique donc par le fait qu'une très faible proportion de ce dernier est transformée avant d'atteindre l'interface électrode-membrane.

Connaissant la pente de l'électrode Pd/PdO, le calcul de la concentration en ions H^+ à l'interface électrode-membrane permet d'obtenir les courbes théoriques $E_u^O - E_u = f(\log[S])$. Ce calcul a été effectué de façon à pouvoir être généralisé à d'autres couples que le couple uréase-urée. En effet, le tracé $E_u^O - E_u = f(\log[S])$ a été effectué en faisant varier les paramètres A et B. Une identification paramétrique, à partir des courbes expérimentales obtenues avec l'électrode Pd/PdO à uréase, a permis ensuite de superposer celles-ci avec les tracés théoriques.

Deux cas de figures sont envisagés:

- Le cas du greffage de l'uréase en monocouche ou en multicouche, où n'intervient aucune protéine de charge, avec $e_1 = (DK_m/V_m)^{1/2}$.

- Le cas du gel enzymatique adjoint à l'électrode, pour lequel la vitesse maximale est inférieure à celle du cas précédent, puisque l'enzyme est ici plus diluée; on notera cette vitesse $V_{m,gel}$ avec $V_{m,gel} < V_m$, et $e_1 = (DK_m/V_{m,gel})^{1/2}$.

L'identification paramétrique mène aux conclusions suivantes, issues de la Figure 4:

1-) Dans le cas du greffage:

En multicouche, (électrode N°2):	$A.B = 7$, soit $e = e_1 / 7^{1/2}$.
En multicouche, (électrode N°1):	$A.B = 49$, soit $e = e_1 / 7$.
En monocouche:	$A.B = 100$, soit $e = e_1 / 10$.

L'identification paramétrique nous permet donc de retrouver l'épaisseur relative d'une membrane enzymatique à partir des valeurs de potentiels expérimentales données par l'électrode. On confirme le résultat esquissé dans la partie précédente: plus le nombre de couches de greffage est élevé, meilleure est la sensibilité de l'électrode.

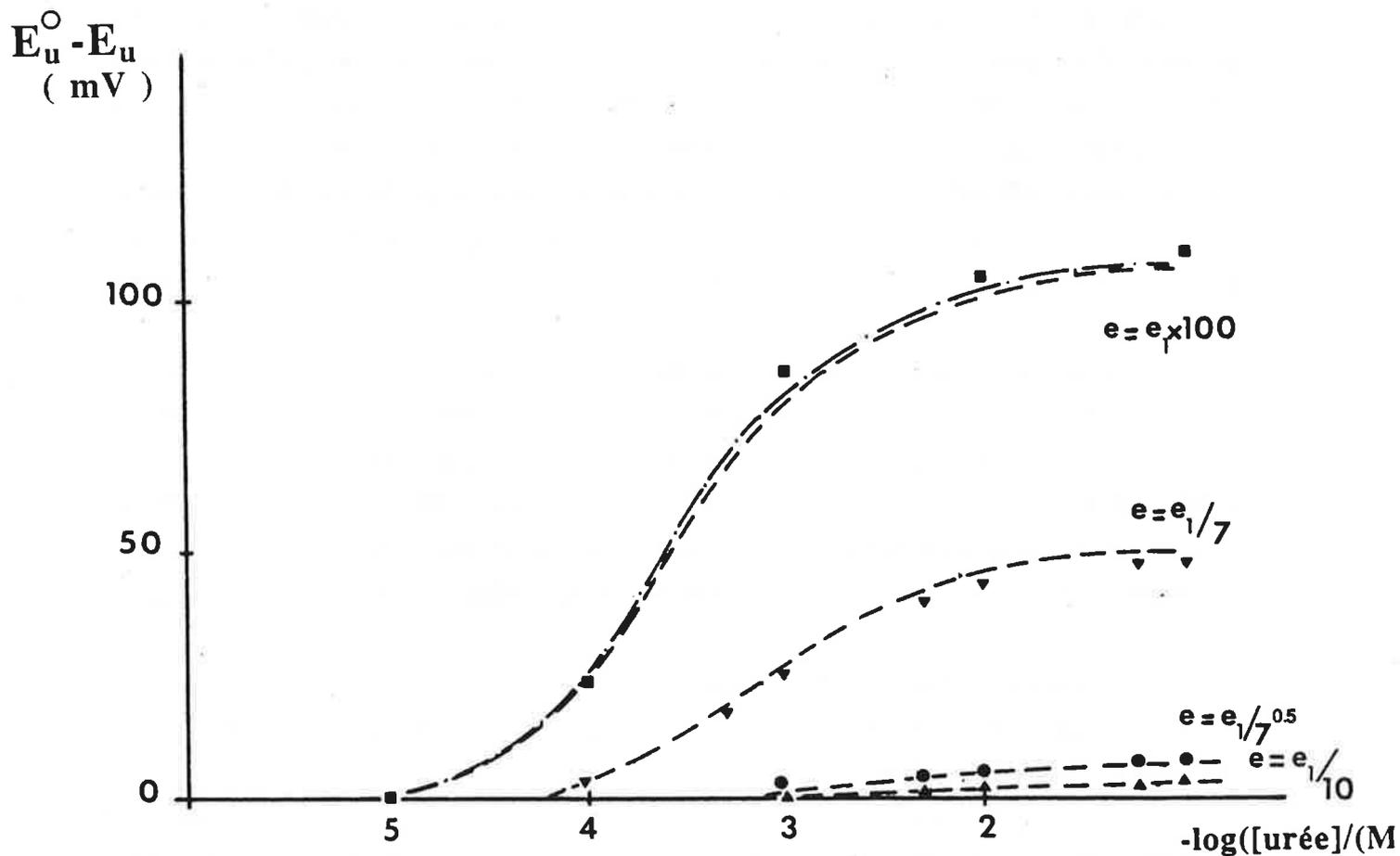


Figure 46 : Courbes d'étalonnage de l'électrode Pd/PdO à uréase greffée: superposition des courbes expérimentales et des courbes calculées.

--- courbes calculées.

— . — "courbe limite" où la concentration en substrat est nulle à l'interface électrode-membrane.

■ gel enzymatique à uréase.

▲ greffage d'uréase en "monocouche".

▼ immobilisation d'uréase en 3 cycles, la solution d'uréase étant concentrée à 16 mg par cm^3 de solution de tampon phosphate 0,1 M.

● immobilisation d'uréase en 10 cycles, la solution d'uréase étant concentrée à 3 mg par cm^3 de solution de tampon phosphate 0,1 M.

2-) Dans le cas du gel:

Dans ce dernier cas, le calcul montre que la courbe expérimentale obtenue correspond au cas limite où la concentration en substrat est toujours nulle à l'interface électrode-membrane, pour des concentrations inférieures à 0,1 M en urée, ceci étant valable pour toute la plage de concentrations étudiée. Le gel présente donc une épaisseur suffisante, et sa concentration en enzyme est suffisamment élevée pour que le substrat soit entièrement consommé avant d'atteindre l'interface électrode-membrane.

CONCLUSION

Le calcul nous amène à confirmer les résultats de l'expérience: l'identification paramétrique nous permet de conclure que, tous les autres paramètres étant maintenus constants, la réponse de l'électrode enzymatique Pd/PdO aux différentes concentrations est directement liée à l'épaisseur de la membrane enzymatique. Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu par FLANAGAN et coll [51], avec l'électrode Sb/Sb₂O₃, pour lequel la réponse obtenue avec cette électrode à uréase greffée en monocouche était du même ordre que celle obtenue avec une électrode à gel enzymatique.

CONCLUSION

L'adsorption d'enzymes sur les poudres d'oxyde de nickel, et oxydes de silicium donne lieu à des activités enzymatiques de ces poudres assez faibles, tendant vers zéro au bout de quelques utilisations, ce qui justifiait entièrement les essais d'activation de ces supports.

Avec l'oxyde de nickel, l'activation à l'aide du chlorure de cyanuryle a été optimisée, et le choix du solvant le plus efficace s'est porté sur le benzène. Nous nous sommes heurtés à des problèmes d'interprétation des résultats obtenus, que nous avons attribué à des réactions parallèles, dont la bibliographie ne fait pas état.

Le greffage d'uréase, et le maintien de l'activité enzymatique de la poudre se sont révélés satisfaisants. On constate une baisse d'activité dans le temps qui est due à une dénaturation de la molécule plus qu'à son relargage. Outre l'utilisation possible en tant que garnissage des réacteurs, l'étude du greffage d'enzymes sur la poudre d'oxyde de nickel avait pour autre objectif la réalisation d'une électrode enzymatique. Cet objectif a été abandonné à cause du mauvais fonctionnement du couple Ni/NiO en tant qu'électrode.

L'activation des poudres d'oxydes de silicium a été effectuée par silanisation. Dans les deux cas, nous avons dégagé un mode de silanisation permettant un greffage d'enzymes plus durable. En ce qui concerne la silice, ce travail sert d'étude de faisabilité pour la réalisation d'un capteur à fibre optique, dont le matériau serait la silice.

En ce qui concerne l'électrode enzymatique à base de Pd/PdO réalisée, nous avons abouti aux conclusions suivantes :

- Le comportement de l'électrode "construite" suivant le protocole décrit dans le Chapitre 4 à partir d'un fil de palladium est satisfaisant.

- Après dépôt du gel à uréase ou butyrylcholinestérase sur son extrémité sensible, son comportement en tant qu'électrode enzymatique est conforme à celui habituellement obtenu avec des électrodes de verre, avec un léger gain en temps de réponse.

- Après activation de l'extrémité sensible de l'électrode à l'aide du chlorure de cyanuryle, le greffage d'uréase en monocouche aboutit à des variations très faibles du potentiel de l'électrode aux différentes concentrations en urée. Ces variations sont plus importantes, et tendent vers la réponse obtenue à l'aide de gel quand on effectue le greffage en multicouches.

- Le modèle théorique du Chapitre 5 nous a permis de confirmer que ce comportement était prévisible. Nous avons en effet démontré que le gel enzymatique correspond au cas limite où le substrat est totalement consommé avant d'atteindre l'interface membrane-électrode. La réponse de l'électrode greffée en monocouche ou en multicouche ne peut qu'être inférieure à celle obtenue par ce cas limite.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **GUILBAULT (G.G.)**, Improved urea electrode, *Anal. Chem.*, 1973, vol. 45, n° 2, p 417-419.
- [2] **DAVIS (G.)**, Advances in biomedical sensor technology : a review of the 1985 patent literature, *Biosensors*, 1986, vol. 2, 101-124.
- [3] **BEAUX (Jacques)**, Etude du comportement des enzymes immobilisées par capteurs enzymatiques - Activités catalytiques et phénomènes d'inhibition. Analyse mathématique et applications analytiques. Thèse d'état : Institut National Polytechnique de Grenoble, 1983, 193 p.
- [4] **GUYONNET (René)**, Etude des interactions entre enzymes immobilisées et inhibiteurs au moyen des radiotraceurs. Application à la réalisation d'électrodes enzymatiques pour le dosage des composés toxiques. Thèse de 3è cycle : Université Claude Bernard de Lyon - Lyon 1, 1978, 147 p.
- [5] **EL YAMANI (Hayat)**, Mesure de la toxicité de polluants par biocapteur - Réalisation d'une électrode à butyrylcholinestérase - Automatisation de la détection de pesticides. Thèse doct-ing. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, 1987, 112 p.
- [6] **TRAN-MINH (C.)**, Immobilized enzyme probes for determining inhibitors, *Ion selective Electrode Rev.*, 1985, n° 7, p. 41-50.
- [7] **BAUM (G.)**, **WARD (F.B.)**, Kinetic analysis of cholinesterase using a choline ester selective electrode, *Clin. Chim. Acta*, 1972, n° 36, p. 405-408.
- [8] **SHINBO (T.)**, **SUGIURA (M.)**, Potentiometric enzyme electrode for lactate, *Anal. Chem.*, 1979, vol. 51, n° 1, p. 100-104.
- [9] **WALTERS (R.R.)**, **MORIARLY (B.E.)**, **BUCT (R.P.)**, Pseudomonas bacterial electrode for determination of L. Histidine, *Anal. Chem.*, 1980, vol. 52, p. 1680-1684.
- [10] **MASCINI (M.)**, **PALLESCHI (G.)**, Determination of creatinine in clinical samples with a creatininase reactor and an ammonia probe, *Anal. Chim. Acta*, 1982, n° 136, p. 69-76.
- [11] **TSUCHIDA (T.)**, **YODA (K.)**, Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum, *Clin. Chem.*, 1983, vol. 29, n° 1, p. 51-55.
- [12] **ARNOLD (M.A.)**, **RECHNITZ (G.A.)**, Comparison of bacterial mitochondrial tissue and enzyme biocatalysts for glutamine selective membrane electrodes, *Anal. Chem.*, 1980, vol. 52, p. 1170-1174.
- [13] **MASCINI (M.)**, **MOSCONE (D.)**, **PALLESCHI (G.)**, Applications in neurological, clinical, pharmaceutical, and dietetic studies of an amperometric choline sensor with immobilized choline oxidase, *Proc. of the 2nd. int. meeting on chemical sensors, Bordeaux-France, July 7-10, 1986*, p. 607-610.
- [14] **BERTRAND (C.)**, **COULET (P.R.)**, **GAUTHERON (D.C.)**, **HILL (H.A.O.)**, Enzyme electrode with collagen immobilized cholesterol oxidase for the microdetermination of free cholesterol, *Anal. letters*, 1979, n° 12, p. 1477-1488.
- [15] **BLAEDEL (W.J.)**, **WANG (J.)**, Mixed immobilized enzyme porous electrode reactor, *Anal. Chem.*, 1980, vol. 52, p. 1426-1429.

- [16] **ALEXANDER (P.W.), JOSEPH (J.P.)** - A coated-metal enzyme electrode for urea determinations, *Anal. Chim. Acta*, 1981, n° 131, p. 103-109.
- [17] **KAMIN (R.A.), WILSON (G.S.)** - Rotating Ring-Disk Enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer, *Anal. Chem.*, 1980, n° 52, p. 1198-1205.
- [18] **LAHODA (J.E.), LIO (C.C.)**, Electrochemical evaluation of glucose oxidase immobilized by different methods., *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, n° 17, p. 413-422.
- [19] **WATSON (L.D.), MAYNARD (P.), CULLEN (D.C.), SETHI (R.S.), BRETTLE (J.), LOWE (C.R.)**, A microelectronic conductimetric biosensor, *Biosensors*, 1987/1988, vol. 3, n° 2, p. 101-115.
- [20] **TROMBERG (B.J.), SEPANIAK (M.J.), VO-DINH (T.), GRIFFIN (G.D.)**, Fiber-Optic Chemical sensors for competitive binding fluoro immuno assay, *Anal. Chem.*, 1987, vol. 59, n° 8, p. 1226-1230.
- [21] **WOLBEIS (O.S.)**, Fiber-Optic probe for kinetic determination of enzymes activities, *Anal. Chem.*, 1986, Vol. 58, n° 13, p. 2874-2876.
- [22] **SAARI (L.A.), SEITZ (R.W.)**, pH sensor based on immobilized fluoresceinamine, 1982, vol. 54, n° 4, p. 821-823.
- [23] **PETERSON (J.I.), GOLDSTEIN (S.R.), FITZGERALD (R.V.), BUCKHOLD (D.K.)**, Fiber optic pH probe for Physiological use, *Anal. Chem.* (1980), Vol. 52, n° 6, p. 864-869.
- [24] **PETERSON (J.I.), VUREK (G.G.)**, Fiber-optic sensors for biomedical applications, *Science*, 1984, vol. 224, n° 46.45, p. 123-127.
- [25] **ARNOLD (M.A.)**, Enzyme-Based fiber optic sensor, *Anal. Chem.*, 1985, vol. 57, n° 2, p. 565-566.
- [26] **NGEH-NGWAINBI (J.), FOLEY (P.H.), JORDAN (J.M.), GUILBAULT (G.G.), PALLESCHI (G.)**, Protein coated piezoelectric crystal detectors, Proc. of the 2nd int. meeting on chemical sensors, Bordeaux - France, July 7-10, 1986, p. 515-518.
- [27] **MONSAN (Pierre)**, Immobilisation d'enzymes à l'aide de glutaraldéhyde ; mécanisme et application à la production de L. Lysine. Thèse d'état : Université Paul Sabatier de Toulouse, 1977, 219 p.
- [28] **DINELLI (D.), MARCONI (W.), MORISI (F.)**, Fiber-entrapped enzymes, *Enzymology*, vol. 1, New-York, ed : Weetal (H.H.), 1975, p. 171-243.
- [29] **ZABORSKY (O.)**, Immobilized Enzymes, Clereland-Ohio : C.R.C. Press, 1974, p. 93-100.
- [30] **GODBOLE (S.S.), KAUL (R.), D'SOUZA (S.F.), NADKARNI (G.B.)**, Immobilization of fumerase by entrapment of rat liver mitochondria in polyacrylamide gel using gamma rays, *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, vol. 25, n° 1, p. 217-224.
- [31] **IMAI (K.), SHIOMI (T.), SATO (K.), FUJISHIMA (A.)**, Preparation of immobilized invertase using poly(vinyl alcohol) membrane, *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, vol. 25, n° 2, p. 613-617.

- [32] HUSAIN (Q.), IQBAL (J.), SALEEMUDDIN (M.), Entrapment of concanavalin A-glycoenzyme complexes in calcium alginate gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, vol. 27, n° 8, p. 1102-1107.
- [33] KUMAKURA (M.), KAETSU (I.), Encapsulation of enzymes by radiation technique, *Biotechnol. letters*, 1984, vol. 6, n° 7, p. 409-412.
- [34] MENGOLI (G.), MUSIANI (M.M.), PELLI (B.), FLEISCHMANN (M.), HILL (I.R.), The effect of Triton on the electropolymerization of phenol ..., *Electrochim. Acta*, 1983, vol. 28, n° 12, p. 1733-1740.
- [35] HERNANDEZ (R.), DIAZ (A.F.), WALTMAN (R.), BARGON (J.), Surface characteristics of thin films prepared by plasma and electrochemical polymerizations, *J. Phys. Chem.*, 1984, n° 88, p. 3333-3337.
- [36] PANDEY (P.C.), MISHRA (A.P.), Conducting Polymer-coated enzyme microsensor for urea, *Analyst*, 1987, vol. 112.
- [37] PREJZA (J.), LUNDSTROM (I.), SKOTHEIM (T.), Electropolymerization of pyrrole in the presence of fluoroborate, *Selective Electrosyntheses*, 1982, Vol. 129, n° 8, p. 1685-1689.
- [38] Mac CALLUM (J.R.), Mac KERRON (D.H.), The electropolymerisation of acrylamide on carbon fibres, *The British Polymer Journal*, 1982, n° 14, p. 14-18.
- [39] DIXON (M.), WEBB (E.C.), Enzyme kinetics, *Enzymes*, London : Longman 2^e edition, 1971, p. 54-166.
- [40] MASCINI (M.), IANELLO (M.), Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzymes to nylon nets, *Anal. Chim. Acta*, 1983,, vol. 146, p. 135-148.
- [41] GOLDSTEIN (L.), LEVY (M.), Kinetics of multilayer immobilized enzyme-filter reactors: behavior of urease-filter reactors in different buffers, *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, vol. 25, n° 6, p. 1485-1499.
- [42] MIYAMA (H.), KAWATA (M.), NOSAKA (Y.), Immobilization of enzyme on dimethyl-aminated nylon gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, vol. 27, n° 10, p. 1403-1410.
- [43] BURDICK (B.A.), SCHAEFFER (J.R.), Co-immobilized coupled enzyme systems on nylon mesh capable of gluconic and pyruvic acid production , *Biotechnol. letters*, 1983, vol. 9, n° 4, p. 253-258.
- [44] BAUM (G.), Enzyme immobilization on macroreticular polystyrene, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, n° 17, p. 253-270.
- [45] IANNIELLO (R.M.), YACYNYCH (A.M.), Immobilized enzyme chemically modified electrode as an amperometric sensor, *Anal. Chem.*, 1981, n° 53, p. 2090-2095.
- [46] JASAITIS (J.J.), RAZUMAS (V.J.), KULYS (J.J.), Amperometric determination of zinc with an apoenzyme-treated graphite electrode, *Anal. Chim. Acta*, 1983, n° 152, p. 271-274.
- [47] CASS (A.E.G.), DAVIS (G.), FRANCIS (G.D.), OTHILL (H.A.), ASTON (W.J.), HIGGINS (I.J.), PLOTKIN (E.V.), SCOTT (L.D.L.),

- TURNER (A.P.F.)**, Ferrocene-Mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, *Anal. Chem.*, 1984, vol. 56, n° 4, p. 667-671.
- [48] **BOURDILLON (C.)**, **BOURGEOIS (J.P.)**, **THOMAS (D.)**, Covalent linkage of glucose oxidase on modified glassy carbon electrodes. Kinetic phenomena, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, vol. 102, n° 12, p. 4231-4235.
- [49] **WIECK (H.J.)**, **HEIDER (G.H.)**, **YACYNYCH (A.M.)**, Chemically modified reticulated vitreous carbon electrode with immobilized enzyme as a detector in flow-injection determination of glucose, *Anal. Chim. Acta*, 1984, n° 158, p. 137-141.
- [50] **IANNIELO (R.M.)**, **YACYNYCH (A.M.)**, Urea sensor based on irridium dioxide electrodes with immobilized urease, *Anal. Chim. Acta*, 1983, n° 146, p. 249-253.
- [51] **FLANAGAN (M.T.)**, **CARROLL (N.J.)**, Thin film antimony-antimony oxide enzyme electrode for penicillin determination, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, n° 28, p. 1093-1099.
- [52] **SZUMINSKY (N.J.)**, **CHEN (A.K.)**, **LIU (C.C.)**, A miniature palladium-palladium oxide enzyme electrode for urea determination, *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, n° 26, p. 642-645.
- [53] **LYNN (M.)**, Inorganic support intermediates : covalent coupling of enzymes on inorganic supports, *Enzymology*, vol. 1, New-York, ed : Weetall (H.H.), 1975, p. 1-48.
- [54] **DAUTARTAS (M.F.)**, **ERANS (J.F.)**, **KUWANA (T.)**, Studies of O-Tolidine attachment to pyrolytic graphite electrodes via cyanuric chloride, *Anal. Chem.*, 1979, vol. 51, n° 1, p. 104-110.
- [55] **SMITH (R.N.)**, The chemistry of carbon-oxygen surface compounds, *Quarterly Reviews*, 1959, n° 13, p. 287-305.
- [56] **IANNIELLO (R.M.)**, **LINDSAY (T.J.)**, **YACYNYCH (A.M.)**, Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes, *Anal. Chem.*, 1982, n° 54, p. 1098-1101.
- [57] **HALLING (P.J.)**, **DUNNILL (P.)**, Improved non porous magnetic supports for immobilized enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, n° 21, p. 393-416.
- [58] **CARAS (S.)**, **JANATA (J.)**, Field effect transistor sensitive to Penicillin, *Anal. Chem.*, 1980, vol. 52, p. 1935-1938.
- [59] **EDDOWES (M.J.)**, **PEDLEY (D.G.)**, **WEBB (B.C.)**, Response of an enzyme-modified pH sensitive ion selective device; Experimental study of a glucose oxidase-modified ion sensitive field effect transistor in buffered and unbuffered aqueous solution, *Sensors and Actuators*, 1985, n° 7, p. 233-244.
- [60] **WINQUIST (F.)**, **LUNDSTRÖM (I.)**, **DANIELSSON (B.)**, Determination of creatinine by an ammonia-sensitive semiconductor structure and immobilized enzymes, *Anal. Chem.*, 1986, vol. 58, p. 145-148.
- [61] **COUPUT (J.P.)**, **CORNUT (B.)**, **QUET (C.)**, pH and fluoride ISFET sensors form chip design to industrial compounds and applications, Proc. of the 2nd. int. meeting on chemical sensors, Bordeaux - France, July 7-10, 1986, p. 447-452.

- [62] COLIN (C.), MANDRAND (B.), MARTELET (C.), JAFFREZIC (N.), Procédé de détection et/ou d'identification d'une substance biologique dans un milieu liquide à l'aide de mesures électriques ..., Brevet, France, N° 86.06315, 1986.
- [63] ROYER (P.G.), The kinetics of immobilized enzymes, *Enzymology*, Vol. 1, New-York, ed : Weetal (H.H.), 1975, p. 49-91.
- [64] ZABORSKY (O.), Immobilized Enzymes, Cleveland-Ohio : C.R.C. Press, 1974, p. 127-142.
- [65] TSUGE (H.), OKADA (T.), Immobilization of yeast pyridoxaminephosphate oxidase to halogenoacetyl polysaccharides, *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, vol. 26, n° 5, p. 412-418.
- [66] COHENFORD (M.A.), SANTORO (P.F.), URBANOWSKI (J.C.), DAIN (J.A.), Effect of immobilization on the physical and kinetics properties of soluble and insoluble trypsin-albumin polymers, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, vol. 28, n° 5, p. 736-740.
- [67] IMAI (K.), SHIOMI (T.), UCHIDA (K.), MIYA (M.), Immobilization of enzyme onto poly(ethylene-vinyl alcohol) membrane, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, vol. 28, n° 2, p. 198-203.
- [68] REDDY (C.R.), REDDY (C.R.), RAGHUNATH (K.), JOSEPH (K.T.), Immobilization of trypsin on alginic acid-poly(glycidyl methacrylate) graft polymer, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, vol. 28, n° 4, p. 609-612.
- [69] NEHETE (P.N.), HEDGE (M.V.), REDDY (L.C.), SHANKAR (V.), Immobilization of amyloglucosidase on polystyrene anion exchange resin. II. Kinetics and stabilities, *Biotechnol. letters*, 1987, vol. 9, n° 9, p. 651-654.
- [70] EL YAMANI (H.), TRAN-MINH (C.), ABDUL (M.), DUPONT (M.), Réalisation d'un ensemble automatisé pour la mesure de la toxicité des eaux de rivière, *Journal français d'hydrologie*, 1987, vol. 18, n° 1, p. 67-75.
- [71] THOMAS (B.H.), Rapid detection system for organophosphates and carbamate insecticides in water, Rapport de "l'Office of Research and monitoring U.S. environmental protection agency", Washington, D.C. 20460, 1972.
- [72] HAWBINS (R.D.), GUNTER (J.M.), Studies on cholinesterases, *Biochem. J.*, 1945, n° 40, p. 192-197.
- [73] DIETZ (A.A.), RUBINSTEIN (H.M.), LUBRANO (T.), Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithio bis (nitrobenzoic acid) procedure, *Clin. Chem.*, 1973, vol. 19, n° 11, p. 1309-1313.
- [74] WEETAL (H.H.), DETAR (C.C.), Covalent attachment of proteins to inorganic supports directly by activation with cyanogen bromide, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, vol. 17, p. 295-297.
- [75] MARKEY (P.E.), GREENFIELD (P.F.), KITTRELL (J.R.), Immobilization of catalase and glucose oxidase on inorganic supports, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, vol. 17, p. 285-289.
- [76] HANSEN (J.J.), THYGESEN (J.C.), WINTHER-NIELSEN (M.), Immobilized enzyme composition and process for the preparation thereof, Brevet européen, n° 0 131 251, 1984.

- [77] HAMILTON (B.K.), GARDNER (C.R.), COLTON (C.K.), Effect of diffusional limitations on Lineweaver. Kurk plots for immobilized enzymes, *AICHE Journal*, 1974, vol. 20, n° 3, p. 503-509.
- [78] NGIAN (K.F.), LIN (S.H.), MARTIN (W.R.B.), Effect of Mass transfer resistance on the Lineweaver-Burk plots for flocculating microorganisms, *Biotechnol. Bioeng.*, 1977, vol. 19, p. 1773-1784.
- [79] SHIEH (W.K.), Theoretical analysis of the effect of mass-transfer resistances on the Lineweaver-Burk plots, *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, vol. 21, p. 503-504.
- [80] SHIEH (W.K.), Intrafloc mass transfer effect on the Lineweaver-Burk plot, *Biotechnol. Bioeng.*, 1982, vol. 24, p. 977-978.
- [81] SHIEH (W.K.), Comments on Webster's remarks on effects of internal diffusion resistances on the Lineweaver-Burk plot, *Biotechnol. Bioeng.*, 1982, vol. 24, p. 979-980.
- [82] WEBSTER (I.A.), The Lineweaver-Burk plot intercept : influence of diffusion reply to N.G. Karanth and W.K. Shieh, *Biotechnol. Bioeng.*, 1982, vol. 24, p. 981-982.
- [83] NEMAT-GORGANI (M.), KARIMIAN (K.), Use of hexadecylfractosil as a hydrophobic carrier for adsorptive immobilization of proteins, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, vol. 28, p. 1037-1043.
- [84] GIANETTO (A.), BERRUTI (F.), KEMPTON (A.G.), Lactose analysis in dilute solution by gas chromatography using silylation, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, vol. 28, p. 1119-1121.
- [85] WOJCIK (A.), LOBARZEWSKI (J.), BLASZCZYMSKA (T.), FIEDUREK (J.), Silica Gels activated by BCl_3 and aliphatic diamines as supports for glucoamylase immobilization, *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, vol. 30, p. 983-986.
- [86] LEVESQUE (G.), SERIS (J.L.), Perfectionnement à l'immobilisation d'enzymes, Brevet européen demandé par Elf Aquitaine, n° 0 199 644, 1986.
- [87] DE JONG (L.P.A.), GROOS (C.C.), VAN DIJK (C.), Inhibition of cholinesterase by organophosphorus compounds in the presence of substrate, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, vol. 227, n° 2, p. 475-478.
- [88] CHESTER (H.M.), JEFFREY (T.L.), Phosphorylation rate constants and esteratic subsite normality employing the fluorescent organophosphate Marenin : a new approach to the study of the acylation mechanism of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 17, n° 2, p. 103-112.
- [89] BARBATO (F.), CAPPELLO (B.), SILIPO (C.), VITTORIA (A.), Inhibition of butyrylcholinesterase by organophosphorous compounds, *Farmacol. Ed. Sci.*, 1982, vol. 37, n° 8, p. 519-536.
- [90] YAMAMUTO (N.), NAGASAWA (Y.), SAWAI (M.), SUDO (T.), TSUBOMURA (H.), Potentiometric investigations of antigen-antibody and enzyme-enzyme inhibitor reactions using chemically modified metal electrodes, *J. Immun. Methods*, 1978, vol. 22, p. 309-317.

- [91] **WEETAL (H.H.), HERSH (L.S.)**, Preparation and characterization of glucose oxidase covalently linked to nickel oxide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, vol. 54, p. 206-300.
- [92] **MUNRO (P.A.), DUNNILL (P.), LILLY (M.D.)**, Non porous magnetic materials as enzyme supports : studies with immobilized chymotrypsin, *Biotechnol. Bioeng.*, 1977, vol. 19, p. 101-124.
- [93] **KOGA (J.), YAMAGUCHI (K.), GONDO (S.)**, Immobilization of alkaline phosphatase on activated alumina particles, *Biotechnol. Bioeng.*, 1984,, vol. 26, p. 100-103.
- [94] **ATKINSON (B.), MARITUNA (F.)**, Enzyme Activity, *Biochemical engineering and biotechnology handbook*, U.S.A., Ed : Nature press, 1983, p. 467-578.
- [95] **CLONIS (Y.D.), STEAD (C.V.), LOWE (C.R.)**, Novel cationic Triazine Dyes for Protein Purification - *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, vol. 30, p. 621-627.
- [96] **GRUBB (W.T.); KING (L.H.)**, Hydrogen ion selective sensor and electrode therefor, Brevet Américain, n° 3 709 7810, 1973.
- [97] **GRUBB (W.T.), KING (L.H.)**, Palladium-Palladium oxide pH electrodes, *Anal. Chem.*, 1980, vol. 52, n° 2, p. 270-273.
- [98] **LAITINEN (H.A.), HSEN (T.M.)**, Chemically treated Tin oxide electrodes responsive to pH and sulfide, *Anal. Chem.*, 1979, vol. 51, n° 9, p. 1550-1552.
- [99] **GUILBAULT (G.G.), NAGY (C.)**, Improved urea electrode, *Anal. Chem.*, 1973, vol. 45, n° 2, p. 417-419.
- [100] **GUILBAULT (G.G.), TARP (M.)**, A specific enzyme electrode for urea, *Anal. Chim. Acta*, 1974, vol. 73, p. 355-365.
- [101] **SCOPES (R.)**, Measurement of enzyme activity, *Protein purification, principles and practice*, New-York, Heildeberg, Berlin, Ed : Springer-Verlag, 1984, p. 213-243.
- [102] **YON (J.)**, *Structure et dynamique conformationnelle de protéines*, Ed : Hermann, 1976, p. 243-260.
- [103] **GUILBAULT (G.G.), IWASE (A.)**, Assay of cholinesterase in an electrode system with an immobilized substrate, *Anal. Chim. Acta*, 1976, vol. 85, p. 295-300.
- [104] **DURAND (P.), DAVID (A.), THOMAS (D.)**, An enzyme electrode for acetylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, vol. 527, p. 277-281.
- [105] **MATEROVA (E.A.), NIKOLSJKAYA (E.B.)**, Ion selective electrodes in the study of cholinesterases, *Russian Chem. Reviews*, 1980, vol. 49, n° 10, p. 953-957.
- [106] **BURK (D.L.), MOYNIHAN (A.)**, Reaction of anodic oxide layers on platinum with methanol, formic acid and hydrazine, *Electrochim. Acta*, 1971, vol. 16, p. 167-171.
- [107] **SANTOS (E.), GIORDANO (M.C.)**, Electrocatalytic oxidation of organic molecules in alkaline solution, *Electrochim. Acta*, 1985, vol. 30, n° 7, p. 871-878.

- [108] GRIMSHAW (J.), Organic electrochemistry - Synthetic aspects, *Electrochemistry*, 1984, vol. 9, p. 222-245.
- [109] WENDT (H.), Electrocatalysis in organic electrochemistry, *Electrochim. Acta*, 1984, vol. 29, n° 11, p. 1513-1525.
- [110] GOODSON (L.H.), JACOBS (W.B.), A rapid detection system for organophosphates in water, Proc. Nat. Conf., **Control hazardous materials spills**, Houston-USA-1972, p. 129-136.
- [111] BRADY (J.E.), CARR (P.W.), Theoretical evaluation of the steady-state response of potentiometric enzyme electrodes, *Anal. Chem.*, 1980, vol. 52, p. 977-980.
- [112] VILLADSEN (J.), MICHELSEN (M.L.), Nonlinear ordinary differential equations, **Solution of differential equation models by polynomial approximation**, N.R. Amundson, Ed : Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1978, p. 198-231.
- [113] BIRNBAUM (I.), LAPIDUS (L.), Studies in approximation methods, I - splines and control via discrete dynamic programming, *Chem. Engng. Sci.*, 1978, vol. 33, p. 415-426.
- [114] BIRNBAUM (I.), LAPIDUS (L.), Studies in approximation methods. II - Initial value ordinary differential equations, *Chem. Engng. Sci.*, 1978, vol. 33, p. 427-441.
- [115] BIRNBAUM (I.), LAPIDUS (L.), Studies in approximation methods. III - Boundary value ordinary differential equations, *Chem. Engng. Sci.*, 1978, vol. 33, p. 443-453.
- [116] BIRNBAUM (I.), LAPIDUS (L.), Studies in approximation methods. IV - Double orthogonal collocation with an infinite domain, *Chem. Engng. Sci.*, 1978, vol. 33, p. 455-462.
- [117] VAN DEN BOSCH (B.), PADMANBHAM (L.), Use of orthogonal collocation methods for the modeling of catalyst particles. I - Analysis of the multiplicity of the solutions, *Chem. Engng. Sci.*, 1974, vol. 29, p. 1217-1225.
- [118] VAN DEN BOSCH (B.), PADMANBHAM (L.), Use of orthogonal collocation methods for the modeling of catalyst particles. II - Analysis of stability, *Chem. Engng. Sci.*, 1974, vol. 29, p. 805-810.
- [119] LIOU (J.K.), ROUSSEAU (I.), Mathematical model for internal pH control in immobilized enzyme particles, *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, vol. 28, p. 1582-1589.
- [120] KERNEVEZ (J.P.), Evolution et contrôle de systèmes biomathématiques. Thèse d'état : Université de Paris VI - Paris, 1972., 212 p.
- [121] WEAST (R.C.), Handbook of Chemistry and Physics, 68th edition, Associate Editors: MELVIN (J.), WILLIAM (H.), C.R.C. Press Inc, Floride, 1987-1988.
- [122] AMIEL (P.), Acides Carboniques-Carbonates, **Nouveau traité de chimie minérale**, Tome IV, P. Pascal, Ed. Masson et Cie, 1968, p. 735-755.

ANNEXES

ANNEXE 1

DOSAGE DES FONCTIONS SILANOLS DES POUDRES D'OXYDES DE SILICIUM

Les groupements silanols qui se trouvent à la surface d'un support solide peuvent être déterminés d'après le schéma réactionnel ci-dessous:



Le protocole est le suivant:

- On prépare une solution saturée en $\text{Ca}(\text{OH})_2$, à 25°C . A partir de cette solution filtrée, on prépare 12 autres solutions à des concentrations échelonnées de 0,6 à 1,0 g de CaO par litre.

- La poudre à doser est placée dans des récipients en polyéthylène, à raison de 1,5 g, sous atmosphère d'azote.

- Après rajout de 50 ml de solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, chaque récipient est agité vigoureusement pendant 5 minutes, puis la mesure de la conductivité de sa solution est effectuée (notée l_1).

Connaissant la conductivité des solutions $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et leur concentration c_0 de départ, la concentration c_1 restant à l'équilibre est obtenue par:

$$c_1 = (l_1 / l_0) \cdot c_0$$

où l_1 et l_0 sont respectivement les conductivités des solutions $\text{Ca}(\text{OH})_2$, de concentrations c_0 et c_1 .

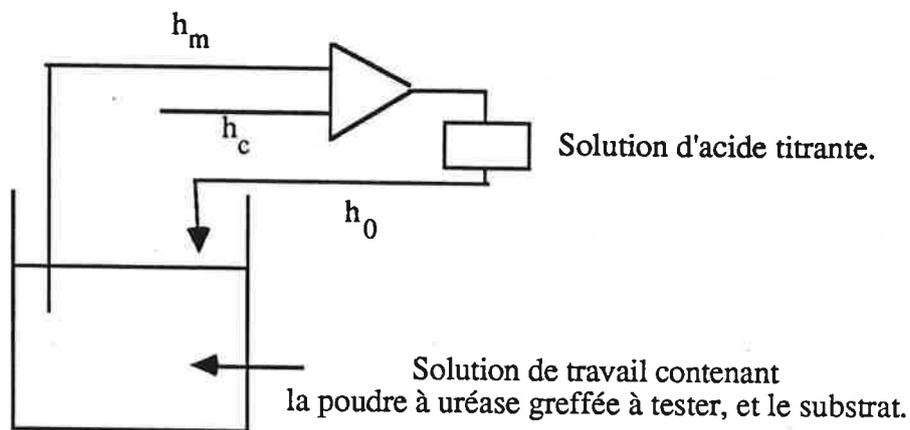
Connaissant c_1 , la quantité de CaO adsorbée à la surface de la poudre peut alors être déterminée. La concentration surfacique en fonction hydroxyles (OH) est égale à la quantité maximale de CaO adsorbée. Cette quantité peut être obtenue en traçant la masse de CaO adsorbée en fonction de c_1 .

Ce protocole est issu du brevet cité dans la référence bibliographique [76].

ANNEXE 2

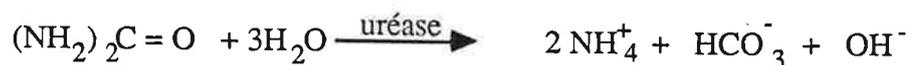
CALCUL DE LA VITESSE APPARENTE, ET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT, POUR UNE POUDRE GREFFÉE, DONT L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE EST MESURÉE AU pH-STAT.

Supposons une poudre sur laquelle on a préalablement greffé de l'uréase; l'activité enzymatique de la poudre peut être mesurée au pH-stat, qu'on peut schématiser comme suit:



Schématisation du pH-stat.

La réaction de dégradation de l'urée par l'uréase est la suivante:



On notera comme suit les différentes variables qui interviennent dans le calcul de la vitesse apparente, V_a , et celui de la concentration en substrat dans la solution à l'instant t , $S(t)$:

$F(t)$ = Débit de la solution titrante à l'instant t

h_0 = concentration en H^+ de la solution titrante

h_m = concentration en H^+ mesuré

h_c = concentration en H^+ de consigne

n_h = nombre de moles de H^+ dans la phase liquide

$n_s(t)$ = Nombre de moles de S dans la phase liquide

$S(0)$ = Concentration en substrat à l'instant 0

$S(t)$ = Concentration en substrat à l'instant t

$V(0)$ = Volume de la phase liquide à l'instant 0

$V(t)$ = Volume de la phase liquide à l'instant t

$V_{react,1}$ = Vitesse de consommation de S due à la réaction enzymatique et à la diffusion vers la phase solide

$V_{react,2}$ = Vitesse de consommation de H^+ due à la réaction enzymatique et à la diffusion vers la phase solide

Le nombre de moles de substrat à l'instant t en solution étant $n_s(t) = S(t) \cdot V(t)$, la variation de la concentration en substrat $S(t)$ fonction du temps devient:

$$\frac{dS(t)}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{n_s(t)}{V(t)} \right) = \frac{1}{V(t)} \frac{d(n_s(t))}{dt} - \frac{n_s(t)}{V(t)^2} \frac{dV(t)}{dt}$$

D'où l'équation (1):

$$(1) \quad \frac{dS(t)}{dt} = V_{react,1} - \frac{S(t)}{V(t)} F(t). \quad \text{où} \quad F(t) = \frac{dV(t)}{dt}$$

La concentration en H^+ de la solution h_m étant maintenue constante et égale à h_c , on peut en déduire l'égalité suivante:

$$\frac{dh_m(t)}{dt} = \frac{1}{V(t)} \frac{dn_h(t)}{dt} - \frac{n_h(t)}{V(t)^2} \frac{dV(t)}{dt} = 0$$

$$\begin{array}{ccc} \longleftrightarrow & & \longleftrightarrow \\ V_{\text{réact},2} + \frac{F(t) h_0}{V(t)} & & \frac{h_m F(t)}{V(t)} \end{array}$$

d'où l'équation (2):

$$(2) \quad \boxed{V_{\text{réact},2} + \frac{F(t)}{V(t)} (h_0 - h_m) = 0}$$

Cette équation permet l'obtention de $V_{\text{réact},2}$. Dans le cas où la concentration en H^+ est uniforme dans toute la solution (i.e. la diffusion de H^+ est grande par rapport à sa vitesse de consommation), la vitesse apparente V_a est alors égale à $V_{\text{réact},2}$.

Dans l'hypothèse de l'état stationnaire, $V_{\text{réact},1} = V_{\text{réact},2}$, on peut déduire des équations (1) et (2) que:

$$\frac{dS(t)}{dt} + \frac{F(t)}{V(t)} (S(t) + h_0 - h_m) = 0$$

d'où :

$$-\int \frac{dS(t)}{S(t) + h_0 - h_m} = \int \frac{F(t)}{V(t)} dt = \int \frac{dV(t)}{V(t)}$$

et:

$$\text{Log} \frac{S(0) + h_0 - h_m}{S(t) + h_0 - h_m} = \text{Log} \frac{V(t)}{V(0)}$$

On obtient donc l'expression de $1/S(t)$:

$$\frac{1}{S(t)} = \frac{1}{\left[\frac{V(0) (S_0 + h_0 - h_m)}{V(t)} - (h_0 - h_m) \right]}$$

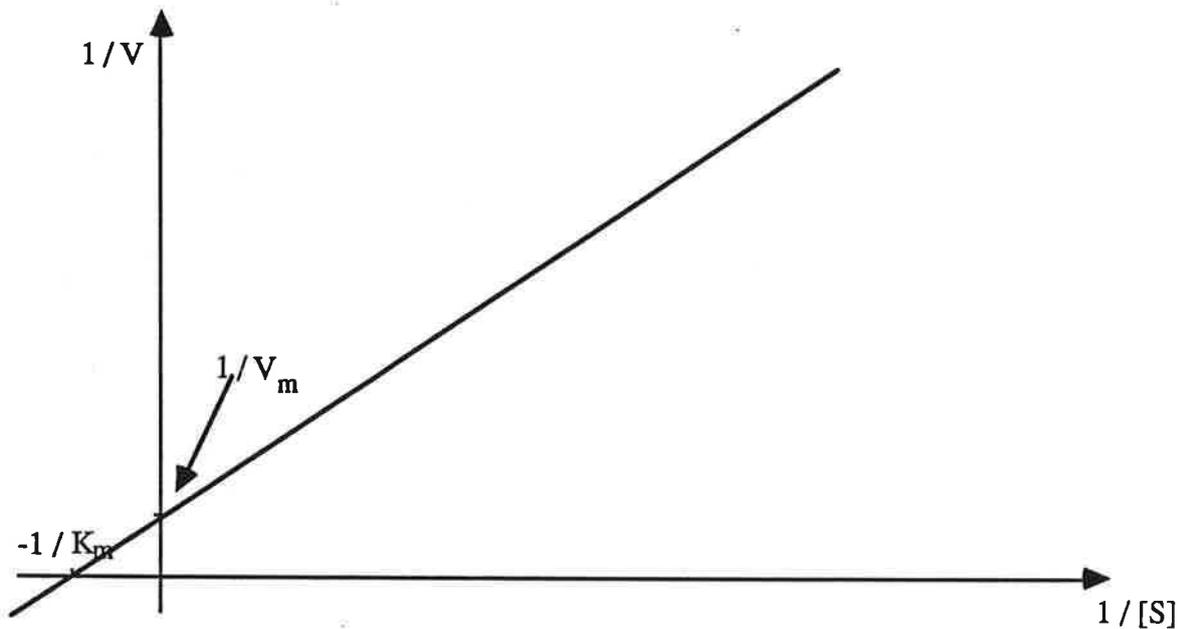
Le tracé de Lineweaver-Burk est obtenu avec : $1/V_a = f(1/S(t))$.

ANNEXE 3

TRANSFORMATION DE LINEWEAVER-BURK

La cinétique d'une réaction enzymatique est régie par l'équation de Michaelis:

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



La transformation de Lineweaver-Burk consiste à tracer $1/V$ en fonction de $1/[S]$.

$$1/V = 1/V_m (1 + K_m/[S])$$

La droite obtenue permet de déterminer les constantes caractéristiques de la réaction:

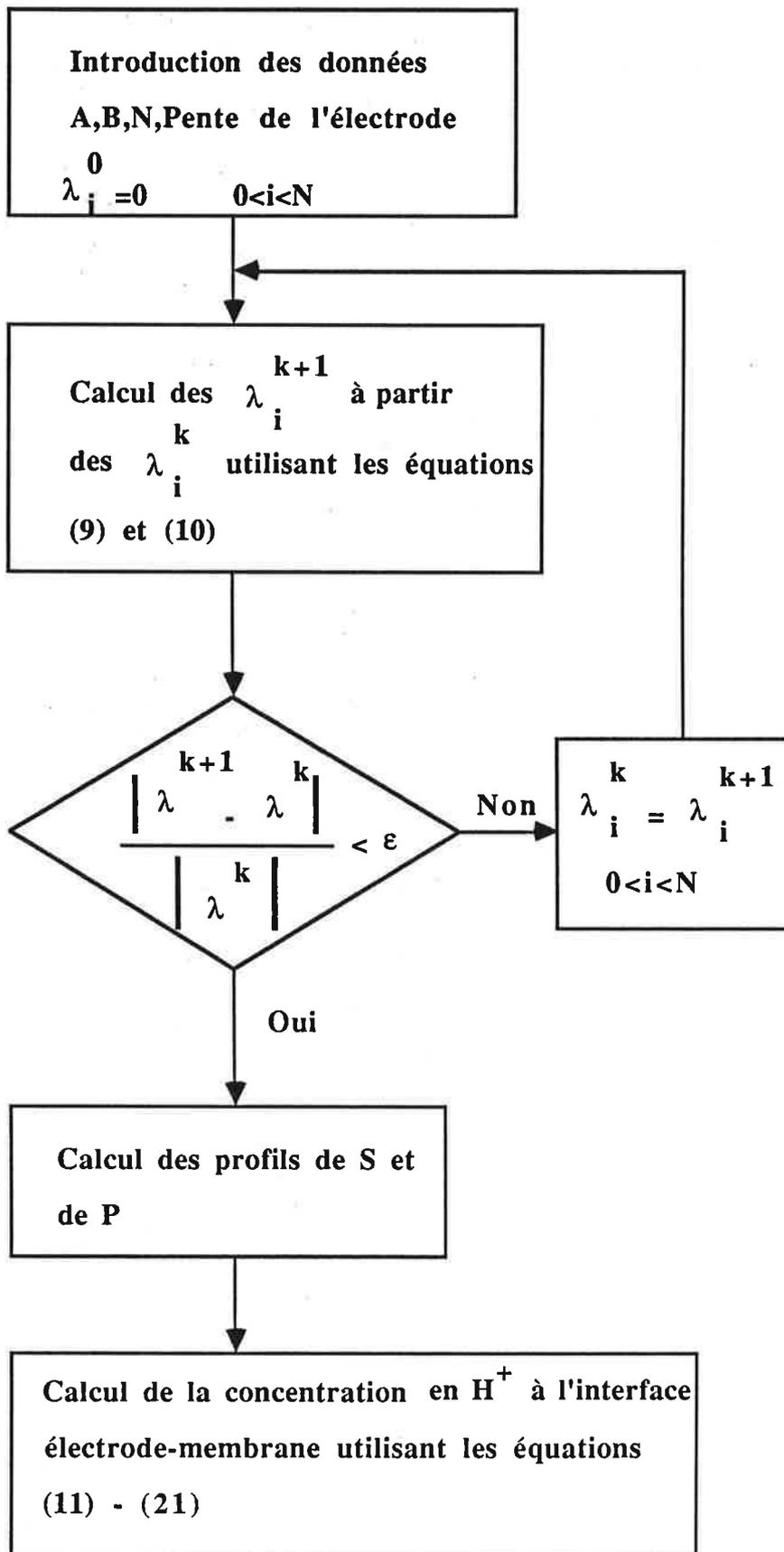
L'intersection avec l'axe des abscisses permet d'accéder à la valeur du K_m

L'intersection avec l'axe des ordonnées permet d'accéder à la valeur du V_m

La pente de la droite est de K_m/V_m

ANNEXE 4

ORGANIGRAMME ET PROGRAMME DE MODELISATION



PROGRAMME DE CALCUL DE LA CONCENTRATION EN UREE AU SEIN D'UNE MEMBRANE
ENZYMATIQUE

```
10 REM Programme de calcul du profil de la concentration en uree
20 REM au sein de la membrane enzymatique
30 DIM M(101,3),X(101),C(101,3),T(101),F(101)
40 DISP "VALEUR DE A" @ INPUT A
50 DISP "VALEUR DE B" @ INPUT B
60 DISP "VALEUR DE Y1" @ INPUT Y1
70 DISP "NOMBRE DE TRANCHES" @ INPUT N
80 DISP "ERREUR MAXI TOLEREE" @ INPUT ERR
90 DISP "NOM DU FICHER" @ INPUT NOM$ @ CREATE NOM$.1
100 ASSIGN# 1 TO NOM$
110 REM ----- INITIALISATION DU CALCUL -----
120 FOR I=1 TO N @ T(I)=0 @ NEXT I
130 T(N+1)=Y1
140 REM ----- REMPLISSAGE DE LA MATRICE M -----
150 C=A*N*N
160 M(1,1)=0 @ M(1,2)=-(2*C) @ M(1,3)=2*C
170 FOR I=2 TO N @ M(I,1)=0 @ M(I,2)=-(2*C) @ M(I,3)=C @ NEXT I
180 M(N+1,1)=0 @ M(N+1,2)=1 @ M(N+1,3)=0
190 REM ----- REMPLISSAGE DE LA MATRICE F -----
200 FOR I=1 TO N+1 @ X(I)=T(I) @ NEXT I
210 FOR I=1 TO N
220 F(I)=Y(I)*(B+X(I))
230 NEXT I @ F(N+1)=Y1
240 REM ----- CALCUL DE X -----
250 FOR I=1 TO N+1 @ FOR J=1 TO 3
260 C(I,J)=M(I,J) @ NEXT J @ NEXT I
270 C(1,3)=C(1,3)/C(1,2) @ F(1)=F(1)/C(1,2) @ C(1,2)=C(1,2)/C(1,2)
280 FOR I=2 TO N
290 C(I,2)=C(I,2)-C(I,1)*C(I-1,3)
300 F(I)=F(I)-C(I,1)*F(I-1)
310 C(I,3)=C(I,3)/C(I,2) @ F(I)=F(I)/C(I,2) @ C(I,2)=C(I,2)/C(I,2) @ NEXT I
320 FOR I=N TO 1 STEP -1
330 T(I)=(F(I)-C(I,3)*T(I+1))/C(I,2) @ NEXT I
340 FOR I=1 TO N+1
350 IF T(I)<0 THEN T(I)=0
360 NEXT I
370 CRIT=0 @ CRIX=0
380 FOR I=1 TO N+1
390 CRIT=CRIT+(T(I)-X(I))*(T(I)-X(I))
400 CRIX=CRIX+T(I)*T(I) @ NEXT I
410 CRIT=CRIT*CRIX @ CRIT=SQR(CRIT)
420 DISP "CRITERE = ",CRIT
430 FOR I=1 TO N+1 @ DISP I,T(I) @ NEXT I
440 IF CRIT<ERR THEN 450 ELSE 200
450 PRINT# 1 : "A=",A
460 PRINT# 1 : "B=",B
470 PRINT# 1 : "Y1=",Y1
480 PRINT# 1 : "CRITERE=",CRIT
490 FOR I=1 TO N+1 STEP 10 @ PRINT# 1 : I,T(I) @ NEXT I
500 END
```

PROGRAMME DE CALCUL DE LA REPONSE DE L'ELECTRODE A UREASE

```
20 REM aux variations de la concentration en uree
30 DISP "NOM DU FICHIER DE STOCK" @ INPUT NOM1$
40 CREATE NOM1$,1 @ ASSIGN# 2 TO NOM1$
50 DISP "CONTINUER (O/N)" @ INPUT CA$
60 IF CA$="N" THEN 430
70 DISP "NOM DU FICHIER" @ INPUT NOM$
80 ASSIGN# 1 TO NOM$
90 READ# 1 ; CA$,A,CA$,B
100 FOR I=1 TO 2 @ READ# 1 ; CA$,CHI@ NEXT I
110 READ# 1 ; I,LDA
120 CT=.01 @ K4=.00000000623 @ K5=.000000000564 @ K2=.000000043
130 K3=5.61E-11 @ KE=1.E-14 @ X0=1.E-14 @ A=.0105*(1-LDA)/B
140 DISP "Concentration de P a la surface =",A
150 WAIT 3000
160 DEF FNF1(X) = CT*K4/(X+K4)
170 DEF FNDF1(X) = -(FNF1(X)+FNF1(X)/(CT*K4))
180 DEF FNF2(X) = 2*A*X/(X+K5)
190 DEF FNDF2(X) = 2*A*K5/((X+K5)*(X+K5))
200 DEF FNF3(X) = A/(1+K3/X+X/K2)
210 DEF FNDF3(X) = ((-(X*X/K2)+K3)*(FNF3(X)+FNF3(X)))/(A*X+X)
220 DEF FNF4(X) = A*K3/(K3+X+X*X/K2)
230 DEF FNDF4(X) = -(FNF4(X)+FNF4(X)*(2*X/K2+1)/(A*K3))
240 DEF FNF5(X) = KE/X
250 DEF FNDF5(X) = -(KE/(X*X))
260 REM -----
270 X=X0 @ X1=X0 @ COMPT=0
280 IF COMPT=0 THEN 300
290 X1=X @ GOTO 310
300 X0=X1 @ X1=X
310 COMPT=0
320 GOSUB 450 @ GOSUB 470
330 X=X-AF/DF
340 ERREUR=ABS (AF/DF)/X0
350 IF ERREUR>.000001 THEN 380
360 DISP "pH = ",-LGT (X)
370 PRINT# 2 ; 1/B,-LGT (X) @ GOTO 50
380 IF X<0 THEN COMPT=COMPT+1 ELSE 410
390 IF COMPT<10 THEN 400 ELSE 420
400 X=X0+.5^COMPT*(X1-X0) @ GOTO 320
410 DISP "X =",X @ GOTO 280
420 DISP "DIVERGENCE"
430 ASSIGN# 1 TO * @ ASSIGN# 2 TO *
440 END
450 AF=FNF1(X)-FNF2(X)+FNF3(X)+2*FNF4(X)+FNF5(X)-X-.5*CT
460 RETURN
470 DF=FNDF1(X)-FNDF2(X)+FNDF3(X)+2*FNDF4(X)+FNDF5(X)-1
480 RETURN
```


A U T O R I S A T I O N de S O U T E N A N C E

VU les dispositions de l'article 15 Titre III de l'arrêté du 5 juillet 1984 relatif aux études doctorales

VU les rapports de présentation de Messieurs

J.D.R. THOMAS, Professeur
J.C. MARTIN, Directeur de recherche CNRS

Monsieur A. ABDUL Malik

est autorisé(e) à présenter une thèse en soutenance en vue de l'obtention du diplôme de DOCTEUR de L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE,* spécialité GENIE DES PROCÉDES

Fait à Grenoble, le 19 Août 1988

* et de l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE des MINES de SAINT-ETIENNE

Le Directeur de l'E.M.S.E.



Le Président de l'INP-G

Georges LESPINARD
Président
de l'Institut National Polytechnique
de Grenoble

A handwritten signature in black ink, written over the printed name and title of Georges Lespinard.

RESUME

La première partie de ce travail concerne le greffage d'enzymes sur l'oxyde de nickel NiO et les oxydes de silicium SiO et SiO₂. Le greffage sur l'oxyde de nickel est obtenu après activation au chlorure de cyanuryle. L'enzyme test est l'uréase. Le greffage sur les oxydes de silicium est effectué en 2 étapes. Les oxydes ont d'abord été silanisés puis l'uréase et la butyrylcholinestérase sont respectivement greffées sur ces oxydes silanisés, par l'intermédiaire du glutaraldéhyde, SiO et SiO₂. Les méthodes de Lineweaver-Burk et Infra-Rouge à Transformée de Fourier sont utilisées pour l'exploitation des expériences, et la détermination des conditions optimales de travail (solvant, temps d'immobilisation,...).

La seconde partie concerne la mise au point d'un biocapteur, basé sur une électrode en palladium/oxyde de palladium. L'uréase et la butyrylcholinestérase ont été immobilisées en surface par réticulation. Le greffage d'uréase en monocouche utilisant le chlorure de cyanuryle est aussi effectué. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux fournis par le greffage en multicouches. Les réponses de l'électrode à uréase greffée en monocouche et en multicouches ont été explicitées à l'aide d'un modèle théorique.

MOTS-CLES : Greffage enzymatique, Silanisation, Oxyde de nickel, Oxydes de silicium, Palladium/Oxydes de palladium, Electrode, Uréase, Butyrylcholinestérase.