



HAL
open science

Etude des propriétés structurales, morphologiques et électrochimiques de couches minces de nanocomposites hybrides de type hydroxyde double lamellaire (HDL) / biomolécules : application aux biocapteurs de polyphénols

Asma Soussou

► **To cite this version:**

Asma Soussou. Etude des propriétés structurales, morphologiques et électrochimiques de couches minces de nanocomposites hybrides de type hydroxyde double lamellaire (HDL) / biomolécules : application aux biocapteurs de polyphénols. Autre. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0302 . tel-01673629

HAL Id: tel-01673629

<https://theses.hal.science/tel-01673629>

Submitted on 31 Dec 2017

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.

THÈSE EN COTUTELLE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

**DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ DE MONASTIR**

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

ÉCOLE DOCTORALE MATÉRIAUX, DISPOSITIFS ET MICROSYSTEMES

Spécialité : PHYSIQUE, LASER, MATIÈRE et NANOSCIENCES

Par **Asma SOUSSOU**

TITRE

**Étude des propriétés structurales, morphologiques et
électrochimiques de couches minces de nanocomposites hybrides
de type hydroxyde double lamellaire (HDL) / biomolécules :
Application aux biocapteurs de polyphénols**

Sous la direction de M^{me} Christine GRAUBY-HEYWANG

et de M. Adel KALBOUSSI

Soutenue le 02/12/2016

Membres du jury :

M ^{me} Touria COHEN-BOUHACINA	Professeur	Président
M ^{me} Nicole JAFFREZIC-RENAULT	DR CNRS Emérite	Rapporteur
M. Adnane ABDELGHANI	Professeur	Rapporteur
M. Zouhair M. BACCAR	MdC-HDR	Examineur
M. Adel KALBOUSSI	Professeur	Directeur de thèse
M ^{me} Christine GRAUBY-HEYWANG	MdC-HDR	Codirectrice de thèse

DÉDICACES

Je dédie ce travail à :

*Mes chers parents : **Mohamed Mansour** et **Najoua** pour tous leurs efforts, leur soutien sans faille, leur amour et leurs encouragements. Je voudrais leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde affectation.*

*Ma grande mère **Latifa** pour son amour et ses prières.*

*Mes sœurs **Souhir**, **Assawer**, **Tayssir** et mon frère **Mohamed Hassan**.*

*Mon oncle **Kamel SOUSSOU** et sa femme **Francine** pour leur soutien, leur amour et leurs encouragements.*

Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire de Microélectronique et Instrumentation (LMI, Faculté des Sciences de Monastir, université de Monastir, Tunisie), le Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA, université de Bordeaux, France) et l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-Chimique (INRAP, Sidi-Thabet, Tunisie). Je remercie les directeurs du LMI, du LOMA et l'ancienne directrice de l'INRAP, respectivement Pr. Kamel BESBES (directeur de recherche), Dr. Jean-Pierre DELVILLE (directeur de recherche) et Pr. Najoua KAMMOUN (directrice de recherche), de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes directeurs de thèse Pr. Adel KALBOUSSI (LMI) et Dr. Christine GRAUBY-HEYWANG (M_dC-H_DR, LOMA) pour la qualité de leur encadrement. Je remercie également Pr. Touria COHEN-BOUHACINA et Dr. Zouhair M. BACCAR pour avoir accepté la responsabilité de co-encadrer ce travail de thèse. Leurs expériences de travail enrichissantes et pleines d'intérêt, leurs compétences pluridisciplinaires, leurs précieux conseils, leur disponibilité et leur soutien m'ont permis de mener à bien cette thèse. Qu'ils trouvent, tous, l'expression de ma profonde reconnaissance pour leurs qualités humaines.

Je tiens à remercier Madame Nicole JAFFREZIC-RENAULT, Directrice de recherche au CNRS à Lyon, et Monsieur Adnane ABDELGHANI, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Mes plus vifs et sincères remerciements vont aussi à :

- Dr Ibtissem GAMMOUDI-ALIBI, membre de l'équipe BIOPHYNA et chargée de projet « cellule de transfert NanoPhyNov » au LOMA, pour sa participation à mon

encadrement dans la partie biocapteur, ses encouragements, ses remarques rigoureuses et ses conseils très enrichissants.

- Dr. Denise MONDIEIG (M^dC-HDR) et Dr. Philippe NEGRIER (ingénieur de recherche) de l'équipe POLYMAT du LOMA et Dr. Haykel GALAI (maître assistant et chercheur) à l'INRAP pour leur disponibilité et leur aide dans la partie caractérisation structurale des HDLs par DRX.

- Mr. Fabien MOROTE (technicien et responsable des instruments de la plateforme NanospectroImagerie) pour son soutien, son aide et ses explications au cours du travail expérimental et technique en AFM, Raman et IR.

- Dr Ndeye Rokhaya FAYE et Marion MATHELIE-GUINET (Doctorante) pour leurs explications, leurs qualités humaines et l'aide qu'elles m'ont apporté.

- Mme Sophie GRANDET, Mme Suzanne BESSUS, Mme Annie COMMARMOND pour le soutien administratif au LOMA et Mme Afef MILI, Mme Nabila et Mme Wacila pour le soutien administratif à la FSM.

- Messieurs Hassan AKRACH, Alain BLUCK, Richard PERRIER et Marc TONDUSSON pour l'informatique.

J'exprime toute ma reconnaissance envers le ministère de l'enseignement supérieur tunisien, le LMI et le LOMA pour leur soutien financier.

Je n'oublie pas de citer les étudiants des laboratoires qui ont pris une grande place pendant mes années de thèse.

Je ne pourrais pas finir sans inclure dans mes remerciements les personnes qui m'ont aidée en dehors des laboratoires : Mr. Zied ALIBI, Mr. Olivier COHEN, Mr. Kamel SOUSSOU et Mme Francine SOUSSOU-LAROUCHE, Mlle Dounia NAIM et toute ma famille et mes amis, qui m'ont toujours soutenue pendant mes années d'études.

Merci à tous.

Titre : Étude des propriétés structurales, morphologiques et électrochimiques de couches minces de nanocomposites hybrides de type hydroxyde double lamellaire (HDL) / biomolécules : Application aux biocapteurs de polyphénols

Résumé :

Les polyphénols sont des bioproduits générés par le métabolisme des végétaux. Récemment, ils ont attiré l'attention par leur impact potentiellement positif sur la santé, en grande partie lié à leur capacité antioxydante. Ils interviennent également dans les arômes de vin, café, thé... et intéressent donc l'industrie agroalimentaire. Le développement de biocapteurs adaptés à ces molécules est donc nécessaire, tout en respectant certains critères (simplicité d'utilisation, rapidité de la mesure, faible coût). Dans le cas des biocapteurs enzymatiques, l'étape déterminante est l'immobilisation de l'enzyme sur la surface du transducteur sans affecter ses performances.

Dans cette thèse nous avons utilisé des matériaux de type « hydroxyde double lamellaires » (HDLs) comme matrice d'immobilisation de la tyrosinase, enzyme reconnaissant spécifiquement les polyphénols, afin de fonctionnaliser la surface d'électrodes d'or sérigraphiées. L'objectif était d'élaborer des microbiocapteurs pour détecter les polyphénols extraits du thé vert.

Les HDLs ont été synthétisés par la méthode de coprécipitation directe, puis caractérisés par différentes méthodes physiques (spectroscopies Raman et infrarouge, diffraction des RX) afin de confirmer leur composition et de définir leur structure cristalline. Puis, des films minces bidimensionnels de HDL de différentes compositions ont été réalisés en faisant varier différents paramètres comme la nature du substrat, la concentration de la solution initiale de HDL et la méthode de dépôt (auto-assemblage « SAM » ou *spin coating*). L'étude morphologique de ces films a été réalisée par microscopie de force atomique (AFM) afin d'optimiser l'état de surface avant l'immobilisation de la tyrosinase. Le greffage de cette dernière a également été étudié par AFM. Enfin, une étude électrochimique (par voltammétrie cyclique et chronoampérométrie) nous a permis de déterminer les caractéristiques analytiques des microbiocapteurs ampérométriques ainsi élaborés. Les résultats ont montré que nos systèmes présentent une grande sensibilité aux polyphénols et sont capables de détecter ces molécules grâce à leur oxydation et aussi à la réduction des composés enzymatiquement générés par la réaction catalytique. Ils sont dynamiques dans une large gamme linéaire de détection (jusqu'à 1000 ng.mL^{-1}) et peuvent également détecter des traces de polyphénols (de m'ordre de quelques pg.mL^{-1}).

Mots clés :

Microbiocapteurs, polyphénols, tyrosinase, hydroxyde double lamellaire (HDL), nanofilms, matrice hôte, fonctionnalisation de surface, nanocomposites hybrides, spin coating, microscopie à force atomique (AFM)

Title: Study of the structural, morphological and electrochemical properties of thin films of hybrid nanocomposites made of layered double hydroxide (LDH) / biomolecules: application to the design of polyphenols biosensors

Abstract:

Polyphenols are in abundance in diet, being present in various fruits or vegetables, but also in tea or wine. Their antioxidant properties attracted an increasing interest of different researchers in the field of medicine and food manufacturers. Consequently, very intensive studies have been conducted to develop efficient polyphenols biosensors, while respecting certain criteria (simplicity of use, speed of measurement, low cost). In the case of enzymatic biosensors, the decisive step is the immobilization of the enzyme on the transducer surface without affecting its performances.

In this thesis, we used layered double hydroxides (LDHs) as a host matrix to immobilize tyrosinase, an enzyme recognizing specifically polyphenols, at the surface of screen printed gold electrodes. Polyphenols used to study the biosensors were extracted from green tea.

LDHs nanosheets were prepared by the co-precipitation method. In a first step, their structural properties were characterized by X-ray powder diffraction, Raman and Infra-Red spectroscopies, confirming crystalline phase and chemical composition of LDHs. In a second step, LDHs-thin films were prepared by self-assembly and spin coating deposition under various experimental conditions (nature and concentration of LDHs ...), and studied by Atomic Force Microscopy (AFM) to obtain information about the surface morphology of the host matrix before enzyme immobilization. The presence of tyrosinase after the immobilization step was also confirmed by AFM. Electrochemical characteristics of the amperometric biosensors, whose design is based on this study, were determined by cyclic voltammetry and chronoamperometry. This study showed that these systems are highly sensitive to polyphenols, detecting them by their oxidation but also by the reduction of compounds enzymatically generated. They exhibit also other very attractive characteristics for the detection of complex mixture of polyphenols: a large dynamic range (up to 1000 ng.mL^{-1}) and a very low detection limit (few pg.mL^{-1}).

Keywords:

Polyphenols micro-biosensor, tyrosinase, Layered double hydroxide (LDH), nanofilms, host matrix, surface fonctionalization, hybrid nanomaterials, spin coating, atomic force microscopy (AFM)

Unités de recherche

Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA), Université de Bordeaux,
UMR CNRS 5798, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France

Laboratoire de Microélectronique et Instrumentation, LR13ES12, Faculté des Sciences de
Monastir - Université de Monastir, avenue de l'Environnement, 5019 Monastir, Tunisie

Groupe de NanoBioIngénierie, Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-
Chimique (INRAP), 2020 Sidi-Thabet, Tunisie

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I. GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS.....	7
I.1. Définition et principe de fonctionnement	7
I.2. Le biorécepteur	9
I.2.1. Les capteurs immunologiques basés sur la reconnaissance anticorps-antigènes	9
I.2.2. Les biocapteurs basés sur l'utilisation d'une molécule d'ADN	10
I.2.3. Les biocapteurs basés sur l'utilisation de cellules ou de bactéries	10
I.2.4. Les capteurs enzymatiques	10
I.3. Les transducteurs	15
I.3.1. Les biocapteurs thermométriques	15
I.3.2. Les biocapteurs à effet piézoélectrique	15
I.3.3. Les biocapteurs optiques	16
I.3.4. Les biocapteurs électrochimiques	17
<i>I.3.4.1. Capteurs ampérométriques</i>	<i>17</i>
<i>I.3.4.2. Capteurs potentiométriques</i>	<i>18</i>
<i>I.3.4.3. Capteurs conductimétriques</i>	<i>19</i>
I.4. Les techniques d'immobilisation des enzymes et les différents matériaux utilisés comme matrices de fixation	20
I.4.1. L'immobilisation physique	22
<i>I.4.1.1. L'adsorption.....</i>	<i>22</i>
<i>I.4.1.2. L'inclusion physique (piégeage)</i>	<i>24</i>
<i>I.4.1.3. La méthode de Langmuir-Blodgett (LB)</i>	<i>25</i>
I.4.2. L'immobilisation chimique	26
<i>I.4.2.1. Le couplage covalent.....</i>	<i>26</i>
<i>I.4.2.2. La réticulation.....</i>	<i>26</i>
I.5. Conclusion	27

II. GÉNÉRALITÉS SUR LES HYDROXYDES DOUBLES LAMELLAIRES (HDLs)	28
II.1. Structure de base et propriétés	28
II.2. Méthodes de synthèse.....	30
II.2.1. La co-précipitation directe	30
II.2.2. L'échange anionique	31
II.2.3. La reconstruction	32
II.2.4. Autres méthodes de synthèse.....	33
<i>II.2.4.1. Méthode hydrothermale.....</i>	<i>33</i>
<i>II.2.4.2. Méthode de « chimie douce »</i>	<i>33</i>
<i>II.2.4.3. Synthèse à la surface d'un support</i>	<i>34</i>
II.3. Propriétés des HDLs	34
II.4. Applications des HDLs	35
II.4.1. Applications en (bio)-catalyse	35
II.4.2. Applications en échange ionique et/ou adsorption	37
II.4.3. Applications en médecine	38
II.4.4. Applications en électrochimie	38
II.5. Conclusion.....	39
III. GÉNÉRALITÉS SUR LES POLYPHÉNOLS ET LA TYROSINASE	40
III.1. Les polyphénols.....	40
III.1.1. Fonctions et problématique	40
III.1.2. Structure générale	40
III.1.3. Sources : exemples du café et du thé.....	43
III.2. La tyrosinase	45
III.2.1. Définition générale.....	45
III.2.2. Les deux types de tyrosinase.....	45
III.2.3. Sources.....	46
III.2.4. Classification et structure de l'enzyme utilisée	47
III.3. Biocapteurs à base de tyrosinase pour la détection de polyphénols	49
IV. CONCLUSION	51
 CHAPITRE 2 : MATERIEL ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.....	 53

I. SYNTHÈSE DES HDLs	54
I.1. Produits chimiques	55
I.2. Méthode de synthèse et paramètres expérimentaux	55
II. CARACTERISATION DES HDLs	56
II.1. Diffraction des rayons X (DRX)	56
II.1.1. Principe de la technique de DRX	57
II.1.2. Montages utilisés	58
II.1.3. Exploitation d'un diagramme de diffraction de RX sur poudre pour résoudre sa structure cristalline	60
<i>II.1.3.1. Affinement des paramètres de maille et de groupe d'espace</i>	<i>61</i>
<i>II.1.3.2. Affinement des positions atomiques</i>	<i>62</i>
II.2. Spectroscopies infrarouge (IR) et Raman	63
II.2.1. La spectroscopie infrarouge	63
<i>II.2.1.1. Principe</i>	<i>63</i>
<i>II.2.1.2. Montage de spectroscopie infrarouge</i>	<i>65</i>
II.2.2. La spectroscopie Raman	66
<i>II.2.2.1. Principe</i>	<i>66</i>
<i>II.2.2.2. Montage de spectroscopie Raman</i>	<i>67</i>
III. ELABORATION DES FILMS MINCES DE HDL PAR AUTOASSEMBLAGE	68
III.1. Méthodes testées	68
III.1.1. Etallement	69
III.1.2. Spin coating	70
III.2. Nature du support	71
III.3. Influence des conditions expérimentales	72
III.3.1. Concentrations des réactifs lors de la synthèse ; concentration en HDL dans la solution utilisée	72
III.3.2. Conditions du spin-coating	73
IV. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES FILMS MINCES DE HDLs PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM)	73
IV.1. Principe général	73
IV.2. Montage de l'AFM	75
IV.3. Les différents modes de fonctionnement de l'AFM	77

IV.3.1. Mode contact	77
<i>IV.3.1.1. Principe</i>	77
<i>IV.3.1.2. Types et origines des images en mode contact</i>	78
<i>IV.3.1.3. Mode spectroscopique</i>	78
<i>IV.3.1.4. Manipulation de grattage en mode contact</i>	80
IV.3.2. Mode contact intermittent (dit aussi mode « tapping »)	81
<i>IV.3.2.1. Principe</i>	81
<i>IV.3.2.2. Types et origines des images en mode « tapping »</i>	82
<i>IV.3.2.3. Mode spectroscopique de force</i>	83
V. IMMOBILISATION DE LA TYROSINASE	84
V.1. Méthodes d'immobilisation et conditions expérimentales	84
V.2. Méthodes d'analyse de l'immobilisation	86
VI. MESURES ELECTROCHIMIQUES	86
VI.1. Principe de la réaction électrochimique	86
VI.2. Voltammétrie cyclique	88
VI.2.1. Principe	88
VI.2.2. Matériel utilisé pour la voltammétrie	90
VI.3. La chronoampérométrie	91
VI.4. Nature des polyphénols utilisés	94
VII. Conclusion	94
CHAPITRE 3 : ETUDE STRUCTURALE ET MORPHOLOGIQUE DES HDLs	95
I. ETUDE STRUCTURALE DES HDLs	96
I.1. Diffraction des RX	96
I.2. Spectroscopies IR et Raman	100
II. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE PAR AFM DES FILMS MINCES D'HDLs	103
II.1. Choix du substrat de référence	103
II.2. Effet de la méthode de dépôt	105
II.2.1. Dépôt par auto-assemblage (SA)	105
<i>II.2.1.1. Effet du rinçage sur les films déposés par SA</i>	<i>107</i>

II.2.1.2. Effet de la concentration de la solution de HDLs sur l'homogénéité des films déposés par SA.....	108
II.2.1.3. Effet de la concentration de la solution de HDLs sur la morphologie et les épaisseurs des couches déposées par SA	112
II.2.2. Dépôt par spin-coating (SC).....	113
II.2.2.1. Effet du rinçage sur les films déposés par SC.....	113
II.2.2.2. Effet de la concentration sur l'homogénéité de la surface des différents films de HDLs.....	115
II.2.2.3. Effet de la concentration de la solution de HDLs sur la morphologie et l'épaisseur des films déposés par SC	122
III. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE PAR AFM DES FILMS MINCES HYBRIDES : HDLs / TYROSINASE	127
III.1. Morphologie des films de tyrosinase déposés directement sur le mica	127
III.2. Morphologie des films de tyrosinase déposés sur les couches de HDLs	131
IV. DISCUSSION SUR LES FILMS DE HDL	133
VI. CONCLUSION	136
CHAPITRE 4 : DETECTION ET QUANTIFICATION DES POLYPHENOLS PAR LE BIOCAPTEUR	137
I. ETUDE DU COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DES HDLs	138
I.1. Comportement électrochimique d'une AuSPE.....	138
I.1.1. Comportement électrochimique de l'AuSPE nue dans le PBS.....	138
I.1.2. Comportement électrochimique de l'AuSPE nue en présence du couple ferricyanure/ferrocyanure.....	139
I.2. Comportement électrochimique de l'AuSPE modifiée par un dépôt de HDL	141
II. BIOCAPTEUR DE POLYPHÉNOLS À BASE DE TYROSINASE IMMOBILISÉE SUR UN FILM MINCE DE HDL	147
II.1. Comportement électrochimique de l'AuSPE modifiée par le film hybride de HDL/ tyrosinase.....	147
II.2. Détection des polyphénols	150
II.2.1. Tests de contrôles pour la détection des polyphénols dans le PBS contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	150
II.2.1.1. Effet de la nature de la CE sur la réponse ampérométrique d'une AuSPE nue en présence de polyphénols	150

II.2.1.2. <i>Comparaison entre les réponses des électrodes modifiées : AuSPE-CCE, AuSPE-CCE/CoAlSO₄, AuSPE-CCE/tyrosinase et AuSPE-CCE/CoAlSO₄/ tyrosinase</i>	152
II.2.1.3. <i>Discussion</i>	155
II.2.2. Détection des polyphénols dans le PBS	156
II.2.2.1. <i>Détection des polyphénols par le biocapteur « AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase »</i> ..	156
II.2.2.1.1. <i>Détection par voltammétrie cyclique</i>	156
II.2.2.1.2. <i>Détection par chronoampérométrie</i>	159
II.2.2.1.3. <i>Détermination de la constante apparente de Michaelis-Menten</i>	162
II.2.2.2. <i>Détection des polyphénols par le biocapteur « AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase»</i> ...	164
II.2.2.2.1. <i>Détection par voltammétrie cyclique</i>	164
II.2.2.2.2. <i>Détection par chronoampérométrie</i>	166
II.2.2.2.3. <i>Détermination de la constant apparente de Michaelis-Menten</i>	168
II.2.2.3. <i>Discussion</i>	169
III. CONCLUSION	173
CONCLUSION GÉNÉRALE	175
Annexes	179
A. Les facteurs représentatifs de la qualité de l’affinement en DRX	179
B. Notions d’électrochimie	180
B1. Transfert et transport de matière	180
B2. Double couche électrique	182
Modèle I : <i>la double couche d’Helmholtz (1879)</i>	184
Modèle II : <i>la double couche de Gouy- Chapman (1913)</i>	184
Modèle III : <i>la double couche de Stern (1924)</i>	184
Modèle IV : <i>la double couche de Grahame (1940)</i>	185
C. Description de la voltammétrie cyclique	185
Références	189

Liste des Figures

Figure I. 1. Schéma de principe d'un biocapteur.....	8
Figure I. 2. Évolution de la vitesse V d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat $[S]$	13
Figure I. 3. Représentations graphiques dites de Lineweaver-Burk (a) et Eadie Hofstee (b).....	13
Figure I. 4. Effet de la température et du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique. Activation par la chaleur (Zone A), dénaturation thermique (zone B) dans le cas de la température.	14
Figure I. 5. Configuration typique d'un capteur conductimétrique.	20
Figure I. 6. Méthodes d'immobilisation d'une enzyme.....	21
Figure I. 7. Schéma de principe de la technique SAM pour le dépôt de molécules organiques sur une surface : la partie « terminal group » assure la liaison de la molécule avec la surface, la partie « spacer unit » sert à l'assemblage de la monocouche et la partie « head group » assure la fonctionnalisation de la surface par immobilisation de la biomolécule.....	23
Figure I. 8. Principe de la technique de LB.....	25
Figure I. 9. Principe de la réticulation au glutaraldéhyde (P = protéine inactive et E =enzyme)	27
Figure I. 10. Schéma de l'empilement dans un HDL. A^n représente les anions, M^{II} les cations divalents et M^{III} les cations trivalents.	29
Figure I. 11. Dispositif expérimental de la synthèse des HDLs par co-précipitation	31
Figure I. 12. Divers domaines d'applications des HDLs	39
Figure I. 13. Structures chimiques de polyphénols.....	41
Figure I. 14. Structures chimiques des flavonoïdes.....	42
Figure I. 15. Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.....	46
Figure I. 16. Structure de la catéchol oxydase	48
Figure I. 17. Vue de l'intérieur du site actif de l'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> (atomes de cuivre en marron clair, atomes d'oxygène en rouge, et acides aminés de type histidines liés aux atomes de cuivre en bleu).	49
Figure I. 18. Représentation schématique du site binucléaire du cuivre	49
Figure II. 1. Schéma de synthèse des HDLs.	56
Figure II. 2. Cliché de Debye-Scherrer ; rapport avec un diagramme de poudre $I=f(2\theta)$	58
Figure II. 3. Schéma d'un diffractomètre à compteur.	59
Figure II. 4. Effet de la force de liaison et de la masse des atomes sur la fréquence de vibration IR .	64
Figure II. 5. Modes vibrationnels dans la molécule d'eau.....	64
Figure II. 6. Schéma de principe d'un appareil de spectroscopie IR.....	65
Figure II. 7. Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie impliqués dans l'absorption infrarouge, la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman.	66
Figure II. 8. Représentation schématique d'un spectromètre Raman	67
Figure II. 9. Schéma de principe d'étalement d'une goutte de solution liquide sur un support solide	69
Figure II. 10. Schéma de principe du procédé de spin coating.	70
Figure II. 11. Photo de mica muscovite.....	72
Figure II. 12. Schématisation du principe de l'AFM et expression de la force d'interaction F en fonction de la distance pointe-surface et du potentiel de Lennard-Jones W ; variation de la force F en fonction de la distance pointe-surface et mise en évidence des régimes de force couverts par les différents modes d'imagerie.	74
Figure II. 13. Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.	76
Figure II. 14. Schémas du mode contact de l'AFM.....	77

Figure II. 15. Courbe de charge/décharge donnant la force entre la pointe et la surface en fonction de la distance z en mode contact : les phases (1), (2) et (3) correspondent à la charge et (4), (5) et (6) correspondent à la décharge.	79
Figure II. 16. Principe de grattage en mode contact.	80
Figure II. 17. Schémas de principe du mode contact intermittent (tapping) de l'AFM.	81
Figure II. 18. Exemple de courbe d'approche-retrait d'amplitude.....	83
Figure II. 19. Protocole d'immobilisation de l'enzyme sur un film de HDL.....	85
Figure II. 20. Réaction d'oxydoréduction et transport du courant dans une chaîne électrochimique. 86	
Figure II. 21. Schéma du transfert de charge et de masse au voisinage de l'électrode.	87
Figure II. 22. a) Forme du potentiel imposé entre les électrodes ET et ER en voltammétrie cyclique. b) Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé.	89
Figure II. 23. Exemple de voltamogramme cyclique.....	89
Figure II. 24. Electrodes sérigraphiées (screen-printed electrodes) des sociétés DropSens et Metrohm.	91
Figure II. 25. Graphe typique du courant mesuré en fonction du temps lors d'un ajout de substrat. .	92
Figure II. 26. Réponse chronoampérométrique typique obtenue pour une électrode de carbone (CPE) et une électrode de carbone modifié par un dimère (CPME) plongées dans une solution de 0.5M de KCl (pH 5.8) contenant de l'acide gallique (GA) à des concentrations variant de 0 M à 4.10^{-4} M (A). Courbes analytiques correspondantes (B)	93
Figure III. 1. Diffractogrammes des différents HDLs synthétisés.....	96
Figure III. 2. Affinement des paramètres de maille des différents HDLs synthétisés.	97
Figure III. 3. Résultat de l'affinement Rietveld (effectué par le logiciel FullProf) du diffractogramme de Zn_2AlCl : les régions correspondant à la présence d'un résidu de NaCl sont exclues.....	99
Figure III. 4. Distribution spatiale des atomes de $Zn_2Al(OH)_6Cl.2H_2O$	100
Figure III. 5. Spectres IR des différents HDLs synthétisés.....	101
Figure III. 6. Spectres Raman des différents HDLs synthétisés.	101
Figure III. 7. Images AFM de topographie (hauteur) en 2D (a) et 3D (b), en mode tapping, de la surface de l'AuSPE de type DropSens (réf. DS250AT).	103
Figure III. 8. Images AFM de topographie ($20\mu m * 20\mu m$) en 3D, en mode tapping, de la surface de l'AuSPE avant (a) et après dépôt du film de HDLs : (b) $NiAlSO_4$, (c) $CoAlSO_4$, (d) Ca_2AlCl , et (e) Zn_2AlCl . Les films sont déposés par auto-assemblage à partir d'une solution de concentration 2.5 mg/mL). La rugosité moyenne (Rms) est indiquée dans chaque cas.	104
Figure III. 9. Images AFM de topographie (en mode Tapping) de mica nu : (a) en 3D et (b) zoom-in ($10\mu m * 10\mu m$) en 2D de la zone indiquée par un carré en blanc dans (a). La marche dans (a) est due au clivage des lamelles formant le mica.....	105
Figure III. 10. (a) Image AFM de hauteur d'un dépôt de $NiAlSO_4$ ($C_{HDL}=2.5$ mg/mL) déposé sur le mica par la méthode SA, (b) une section sur l'agrégat (indiquée en bleu dans (a)).	106
Figure III. 11. Images AFM de hauteur et d'amplitude de différents films de HDLs déposés sur le mica par la méthode SA à partir d'une solution HDL de concentration 2.5 mg/mL	106
Figure III. 12. Images AFM ($10\mu m * 10\mu m$) d'un film de Ca_2AlCl ($C_{HDL} = 1.5$ mg/mL) déposé sur le mica par la méthode SA avant ((a) et (c)) et après rinçage à l'eau ultrapure ((b) (d)).	107
Figure III. 13. Images AFM d'un film de $CoAlSO_4$ ($C_{HDL} = 2.5$ mg.mL ⁻¹) : (a) hauteur ($10 \mu m \times 10 \mu m$); (b) « zoom-in » de ($2 \mu m * 2 \mu m$) dans la zone indiquée par un carré en blanc dans (a) ; (c) profils de hauteur extraits des sections transversales indiquées en (b) et (d) image de phase correspondante à (a).	109
Figure III. 14. Images AFM ($5\mu m * 5\mu m$) de hauteur montrant l'effet de la concentration de la solution de HDLs sur les caractéristiques morphologiques des films déposés sur le mica par la méthode SA.110	

- Figure III. 15.** (a) image AFM de hauteur ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$) d'un film de NiAlCl ($C_{\text{HDL}} = 0.75\ \text{mg.mL}^{-1}$); (b) profil de hauteur extrait de la section transversale indiquée en (a)..... 112
- Figure III. 16.** (a) image AFM de hauteur ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) d'un film de CoAlSO_4 ($C_{\text{HDL}} = 0.75\ \text{mg.mL}^{-1}$); (b) profil de hauteur extrait de la section transversale indiquée en (a)..... 112
- Figure III. 17.** Images AFM de films de CoAlSO_4 ($C_{\text{HDL}} = 2.5\ \text{mg.mL}^{-1}$) déposés par SC avant rinçage ((a) hauteur et (c) amplitude, $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) et après rinçage ((b) hauteur, (d) zoom-in de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ centré sur (b))..... 114
- Figure III. 18.** (a), (c), (e) et (g) Images AFM de topographie de films de CoAlSO_4 , NiAlSO_4 , Ca_2AlCl , et de Zn_2AlCl , respectivement, déposés par SC ($C_{\text{HDL}} = 1.5\ \text{mg/mL}$), et (b), (d), (e) et (h) Images AFM de phase correspondantes avec un zoom-in ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) sur les agrégats indiqués par des carrés blancs sur les images de topographie. 117
- Figure III. 19.** Images AFM de hauteur et de phase des agrégats de Zn_2AlCl (film déposé par SC à partir d'une solution de concentration $1.5\ \text{mg/mL}$). Les étoiles rouges matérialisent les 6 angles de l'hexagone. 118
- Figure III. 20.** Images AFM ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) de topographie des films de CoAlSO_4 (a) et de Ca_2AlCl (b) déposés par SC à partir d'une solution de concentration $0.75\ \text{mg/mL}$, et des films de NiAlSO_4 (c) et de Zn_2AlCl (d) déposés par SC à partir d'une solution de concentration $0.15\ \text{mg/mL}$ 118
- Figure III. 21.** Évolution du Rms en fonction des concentrations ($R_{\text{ms}} = f(C_{\text{HDL}})$) des solutions de HDLs utilisées pour former les films (déposés par SC) de : a) NiAlSO_4 , b) CoAlSO_4 , c) Ca_2AlCl et $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$. Les mesures sont effectuées sur des scans de différentes dimensions ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$; $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$; $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$). e) Comparaison des évolutions du $R_{\text{ms}} = f(C_{\text{HDL}})$ pour les films de quatre HDLs (déposés par SC, scan de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) et f) Comparaison entre les deux méthodes SC et AA en termes de Rms des films déposés à partir d'une concentration initiale de HDL de $0.75\ \text{mg/mL}$ 120
- Figure III. 22.** Effet de la dilution sur les feuillets de HDLs et procédure de reconstruction lors du dépôt du film..... 121
- Figure III. 23.** Images AFM en mode tapping du film de NiAlSO_4 ($C = 1.5\ \text{mg.mL}^{-1}$): (a) « zoom-in » de ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) centré sur l'image de la Figure III.20a, (b) et (c) images de hauteur des zones 1 et 2; (d) et (e) images de phase correspondantes. (f) et (g) profils de hauteur et de phase réalisés le long des sections indiquées en (b); (c), (d) et (e)..... 123
- Figure III. 24.** Détermination de l'épaisseur d'un film de HDL- NiAlSO_4 ($C = 0.1\ \text{mg/mL}$) par une manipulation de grattage en mode contact: état de la surface avant (a) et après (b) grattage (images AFM de hauteur en mode tapping) et c) profil de hauteur correspondant à la section indiquée dans (b). 125
- Figure III. 25.** Détermination des épaisseurs de films de HDL Zn_2AlCl ($C = 0.25\ \text{mg/mL}$ et $0.1\ \text{mg/mL}$) par la manipulation de grattage en mode contact: a) et b) état des surfaces avant le grattage, c) et d) état des surfaces après le grattage, et e) et f) profils de hauteur correspondant aux sections indiquées dans (c) et (d). 126
- Figure III. 26.** Images AFM de hauteur (mode tapping) d'un film de tyrosinase déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration $0.1\ \text{mg/mL}$: a) scan de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, b) scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, c) profil de hauteur le long de la section indiquée par un trait blanc dans (b)..... 128
- Figure III. 27.** Images AFM de topographie (mode tapping) de la tyrosinase déposée sur le mica à partir d'une solution de concentration $0.5\ \text{mg/mL}$: a) premier scan de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ b) profil de hauteur réalisé le long de la section indiquée par un trait blanc dans (a). 129
- Figure III. 28.** Images AFM de topographie (mode tapping) d'un film de tyrosinase déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration $1.5\ \text{mg/mL}$: a) scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, b) scan de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, c) image de phase correspondante à (b). 129
- Figure III. 29.** Images AFM de topographie (mode tapping) d'un film de tyrosinase déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration $2\ \text{mg/mL}$: a) scan de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, b) scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$

μm (« zoom-in » de la zone indiquée par un carré dans (a)), c) scan de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ dans une zone éloignée des agrégats, d) image de phase correspondante à (c).....	130
Figure III. 30. Images AFM de topographie (mode tapping, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) de films de : a) CoAlSO_4 déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration 0.75mg/mL , b) tyrosinase déposée sur le mica à partir d'une solution de concentration 1.5mg/mL , c) tyrosinase déposée sur le film de HDL présenté en (a), et d), e) et f) images de phase correspondant aux « zoom-in » de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ indiqués par des carrés blancs.	132
Figure III. 31. Particules de différents HDLs observés par microscopie électronique.	133
Figure III. 32. Comparaison de nos images AFM avec des images SEM de films de HDLs.	134
Figure III. 33. Modèles possibles d'orientation des particules de HDL selon [X. Guo, 2010].	135
Figure IV. 1. Voltamogramme obtenu dans le cas de l' AuSPE nue (vs Ag/AgCl) plongée dans le PBS ($10\ \text{mM}$, $0.137\ \text{M NaCl}$, $\text{pH } 7.4$) en balayant la gamme de potentiels $[-0.4\text{V} ; 0.6\text{V}]$ à la vitesse de balayage de $50\ \text{mV/s}$	139
Figure IV. 2. Voltamogramme obtenu avec une AuSPE nue plongée dans une solution de PBS ($10\ \text{mM}$, $0.137\ \text{M NaCl}$, $\text{pH } 7.4$) contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($3\ \text{mM}$). La vitesse de balayage est égale à $50\ \text{mV/s}$	140
Figure IV. 3. Influence de la vitesse de balayage sur l'évolution du voltamogrammes de l' AuSPE plongée dans du PBS ($10\ \text{mM}$, $0.137\ \text{M NaCl}$, $\text{pH } 7.4$) contenant le couple de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($3\ \text{mM}$).	141
Figure IV. 4. Voltamogrammes cycliques des AuSPEs avant et après modification de leur surface par le dépôt de différentes solutions de HDL à des concentrations variant entre 0.25 et $2.50\ \text{mg/mL}$: a) NiAlSO_4 , b) CoAlSO_4 , c) Ca_2AlCl , d) Zn_2AlCl . L'électrolyte est le PBS 10mM contenant le couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	143
Figure IV. 5. Effet de la concentration de la solution de HDLs déposée sur l' AuSPE sur les pics d'oxydation (a) et de réduction (b).....	143
Figure IV. 6. Voltamogrammes cycliques de différents AuSPE avant (a) et après modification de leur surface par le dépôt des différentes solutions de HDL à une concentration de $0.75\ \text{mg/mL}$: b) Ca_2AlCl et Zn_2AlCl , c) CoAlSO_4 , et d) NiAlSO_4 . L'électrolyte est le PBS. La vitesse de balayage est de $50\ \text{mV/s}$	145
Figure IV. 7. a) Effet de la vitesse de balayage sur les voltamogrammes d'une AuSPE recouverte par un film de CoAlSO_4 et plongée dans une solution de PBS ; et b) représentation de l'intensité I_{ox} du pic d'oxydation (à $E=0.45\text{V}$) en fonction de $v^{1/2}$. Les barres d'erreurs représentées sur la droite correspondent à trois mesures.	146
Figure IV. 8. Voltamogrammes cycliques de l' AuSPE nue; de l' AuSPE modifiée par le dépôt des films de HDL ($C=0.75\text{mg/mL}$) NiAlSO_4 (a), CoAlSO_4 (b), Ca_2AlCl (c) et Zn_2AlCl (d), puis par l'immobilisation de la tyrosinase (Tyr) sur les films de HDL. Les expériences sont effectuées dans une solution de PBS ($10\ \text{mM}$, $0.137\ \text{M}$ de NaCl , $\text{pH } 7.4$) avec couple rédox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($3\ \text{mM}$) à température ambiante.....	148
Figure IV. 9. Réponse voltampérométrique des électrodes AuSPE-CCE (a) et AuSPE-PtCE (b) aux ajouts successifs d'une solution de polyphénols à une concentration finale comprise entre 0.1 et $2000.0\ \text{ng.mL}^{-1}$ dans le PBS contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$; (c et d) Courbes de calibration, au potentiel appliqué $E_a=0.38\text{V}$. Les barres d'erreurs représentées sur la droite correspondent à cinq mesures.....	151
Figure IV. 10. Voltammogrammes cycliques de l' AuSPE-CCE (a), l' $\text{AuSPE-CCE}/\text{CoAlSO}_4$ (b), l' $\text{AuSPE-CCE}/\text{tyrosinase}$ (c) et de l' $\text{AuSPE-CCE}/\text{CoAlSO}_4/\text{tyrosinase}$ (d) obtenus après les ajouts de polyphénols à une concentration finale comprise entre 0.1 et $2000.0\ \text{ng.mL}^{-1}$ dans le PBS avec le couple rédox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	153
Figure IV. 11. (a) Zoom sur le pic d'oxydation à $0.38\ \text{V}$ correspondant au biocapteur $\text{AuSPE-CCE}/\text{CoAlSO}_4/\text{tyrosinase}$; (b) courbe de calibration à température ambiante, l'électrolyte étant le PBS	

(10 mM, pH=7.4) avec le couple rédox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.....	154
Figure IV. 12. a) Réponse voltampérométrique du biocapteur « AuSPE/CoAlSO ₄ /tyrosinase » aux ajouts successifs de polyphénols pour une concentration finale comprise entre 0.01 et 1000.00 ng.mL ⁻¹ dans le PBS ; b) et c) zooms sur les pics de réduction à -0.25 V et d'oxydation à +0.20 V ; e) et f) courbes de calibration correspondantes.	157
Figure IV. 13. Étude de la durée de vie du biocapteur « AuSPE/CoAlSO ₄ /tyrosinase » et effet des conditions de stockage : a) dans le PBS, b) dans l'eau. Les sensibilités correspondent à un potentiel appliqué E= 0.20 V.	159
Figure IV. 14. a) Réponse chronoampérométrique (à -0.25V) du système AuSPE/CoAlSO ₄ /tyrosinase aux ajouts successifs de polyphénols à des concentrations variant de 0.01 ng.mL ⁻¹ à 2000 ng.mL ⁻¹ dans le PBS ; b) Courbe d'étalonnage.	160
Figure IV. 15. Variation de l'inverse du carré du courant en fonction du temps après injection de 0.5 ng/mL de polyphénols.....	161
Figure IV. 16. Graphe de $1/\alpha_c = f([\text{polyphénols}]^2)$ dans le cas du biocapteur AuSPE/CoAlSO ₄ /tyrosinase. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.	161
Figure IV. 17. a) Graphe de $I=f([\text{polyphénols}])$, b) représentation de Lineweaver et Burk de la réaction de dégradation des polyphénols par l'enzyme immobilisée sur le biocapteur AuSPE/CoAlSO ₄ . Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.....	163
Figure IV. 18. a) Réponse voltampérométrique du biocapteur AuSPE/NiAlSO ₄ /tyrosinase aux ajouts successifs de polyphénols comprise entre 0.01 et 1000.00 ng.mL ⁻¹ dans le PBS ; b) et c) zooms sur les pics de réduction à -0.20 V et d'oxydation à +0.20 V ; e) et f) courbes de calibration correspondantes.	165
Figure IV. 19. Étude de la durée de vie du biocapteur « AuSPE/NiAlSO ₄ /tyrosinase » dans le PBS. Les sensibilités correspondent à un potentiel appliqué E= 0.20 V.	166
Figure IV. 20. a) Réponse chronoampérométrique (à E = -0.20 V) du capteur AuSPE/NiAlSO ₄ /tyrosinase suite aux ajouts successifs de polyphénols à des concentrations entre [0.01-1000 ng/mL] dans le PBS. b) Courbe d'étalonnage.	167
Figure IV. 21. Graphe de $1/\alpha_c = f([\text{polyphénols}]^2)$ dans le cas du capteur AuSPE/NiAlSO ₄ /tyrosinase. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.....	168
Figure IV. 22. a) Graphe de $I=f([\text{polyphénols}])$, b) représentation de Lineweaver et Burk de la réaction de dégradation des polyphénols par l'enzyme immobilisée sur le biocapteur AuSPE/NiAlSO ₄ . Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.....	169
Figure IV. 23. Schéma du rôle des cations métalliques divalents des HDLs (Co ou Ni) dans le fonctionnement du biocapteur.	170
Figure B. 1. Représentation schématique de l'égalité des flux à la surface de l'électrode [F. Bedioui, 1999].....	181
Figure B. 2. Répartition des charges dans un système anode-cathode et variation du potentiel électrique E(x).	183
Figure B. 3. Répartition des charges et variation du potentiel E au niveau de la double couche électrique au voisinage d'une électrode en métal plongée dans un électrolyte : les modèles d'Helmholtz (a), Gouy- Chapman (b), Stern (c) et Grahame (d).	183
Figure C. 1. Différentes allures des voltampérogrammes cycliques selon la rapidité du système.....	185

Liste des Tableaux

Tableau I. 1. Exemples d'enzymes utilisées dans différents types de biocapteurs	11
Tableau I. 2. Principe de fonctionnement des trois générations de capteurs ampérométriques.....	18
Tableau I. 3. Les différentes matrices utilisées pour l'adsorption des biomolécules.....	22
Tableau I. 4. Immobilisation d'enzymes par des HDLs pour des applications dans le domaine des biocapteurs	37
Tableau I. 5. Les structures chimiques des stéréoisomères de catéchine extrait du thé vert	44
Tableau I. 6. Les différentes appellations de la tyrosinase [IUB]	47
Tableau II. 1. Les différents biocapteurs élaborés en utilisant les HDLs synthétisés dans le groupe « NanoBioIngénierie » de l'INRAP en Tunisie	55
Tableau II. 2. Distances interréticulaires pour les systèmes cristallographiques correspondant aux structures des HDLs	58
Tableau II. 3. Informations sur le produit « Tyrosinase EC 1.14.18.1 »	84
Tableau III. 1. Résultats de la caractérisation par diffraction des RX.....	98
Tableau III. 2. Les différents paramètres résultant de l'affinement Rietveld.	99
Tableau III. 3. Attribution des modes de vibration (exprimés dans le tableau en cm^{-1}) observés dans les spectres IR et Raman des HDLs synthétisés pour cette étude.....	102
Tableau III. 4. Dimensions moyennes (longueur L, largeur l, hauteur h) des agrégats et rugosités moyennes (pour des scans de $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$) des films de HDLs obtenus à partir de différentes concentrations et déposés par la méthode SA.	111
Tableau III. 5. Rugosité moyenne (nm) des différentes surfaces de films de HDL déposés à partir d'une solution de concentration 1.5 mg/ mL par les méthodes SA et SC avant et après l'étape de rinçage à l'eau ultrapure.....	115
Tableau III. 6. Dimensions moyennes (longueur L, largeur l, hauteur h) des agrégats et rugosités moyennes (pour des scans de $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$) des films de HDLs obtenus à partir de différentes concentrations déposés par la méthode SC.....	119
Tableau III. 7. Épaisseurs des films de HDL déterminées après grattage.	126
Tableau IV. 1. Les potentiels redox standards des métaux Cobalt et Nickel.....	145
Tableau IV. 2. Évolution des potentiels et courants des pics redox du système $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ suite aux différentes modifications de l'AuSPE.....	148
Tableau IV. 3. Performances du biocapteur « AuSPE/CoAlSO ₄ /tyrosinase ».....	158
Tableau IV. 4. Performances du biocapteur « AuSPE/NiAlSO ₄ /tyrosinase ».....	164
Tableau IV. 5. Caractéristiques analytiques des biocapteurs de composants phénoliques à base de tyrosinase décrits dans la littérature et celles obtenues pour nos biocapteurs élaborés (le calcul est basé sur une masse molaire moyenne des polyphénols de 415 g.mol^{-1} et sur une surface sensible de 12.6 mm^2).....	171

INTRODUCTION GENERALE

Les polyphénols forment une catégorie de molécules organiques largement présente comme métabolites secondaires¹ dans le règne végétal. Récemment, ils ont attiré l'attention par leur impact potentiellement positif sur la santé et ont été largement exploités par les industries agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques [J. M. de Mello Andrade et coll., 2014 ; K.S. Bhullar et coll., 2015]. Ils sont présents dans la plupart des produits de consommation d'origine végétale et influencent directement leur qualité (couleur, arôme, et texture). C'est en particulier le cas des fruits et légumes mais également de produits transformés comme le chocolat, le thé, le café et le vin rouge. Des études épidémiologiques montrent qu'une alimentation riche en produits végétaux semble prémunir contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers [A. Scalbert et coll., 2002 ; Q.V. Vuonga et coll., 2014]. Cet effet protecteur serait dû à certaines molécules contenues dans les fruits et légumes dont les polyphénols sont les principaux représentants. Il s'avère donc nécessaire de pouvoir détecter rapidement cette famille de molécules, dans le cadre d'analyses agroalimentaires, pharmaceutiques ou environnementales par exemple. Néanmoins, le coût élevé et les temps de rotation lents des méthodes photométriques et chromatographiques conventionnelles imposent un besoin de techniques analytiques plus rapides. Pour répondre à ce besoin, le développement d'un détecteur simple d'utilisation, peu coûteux (accessible), jetable et fortement sensible aux polyphénols, devient de plus en plus urgent.

Par conséquent, des études très intensives ont été réalisées pour développer des méthodes innovantes de détection complétant les méthodes plus courantes basées sur des analyses chimiques. Une solution particulièrement intéressante consiste à développer des biocapteurs capables de reconnaître sélectivement une famille de molécules, comme celle des polyphénols. Leur principe repose sur la « transformation » d'une interaction biochimique ou d'une réaction métabolique en un signal mesurable [J. H. T. Luong et coll., 2008]. Cela impose l'immobilisation d'un biorécepteur sur la surface active du capteur (enzyme, anticorps, cellule ...) et la présence d'un transducteur assurant la génération du signal (variable selon la nature électrochimique, optique, thermique ... du transducteur). De tels

¹ On oppose le métabolisme secondaire au métabolisme primaire, ce dernier assurant la croissance et le développement de l'organisme. Parmi les métabolites primaires, on trouve les acides aminés, les sucres, les lipides et acides nucléiques.

systèmes présentent différents avantages très intéressants tels que leur simplicité de fonctionnement, leur réponse rapide, leur sélectivité, leur faible coût, ...

De nombreux biocapteurs ont été développés pour détecter et doser les polyphénols en utilisant différentes enzymes reconnaissant spécifiquement cette famille de molécules, telles que la polyphénol-oxydase ou la tyrosinase [K. S. Abhijith et coll., 2007 ; V. Carralero Sanz et coll., 2004], la laccase [S.A.S.S. Gomes et coll., 2003], et la peroxydase [L. Dornelles Mello et coll., 2005]. Parmi ces derniers, les biocapteurs basés sur la tyrosinase sont les plus couramment utilisés pour révéler les composés phénoliques dans les produits alimentaires [M. Cortina-Puig et coll., 2010], grâce au rôle de catalyseur que joue cette enzyme dans la réaction d'oxydation de monophénols et o-diphénols en quinones en présence d'oxygène [K.R.S. Sambasiva Rao et coll., 2013].

Dans ce contexte, l'immobilisation des enzymes sur des supports solides est une étape cruciale dans l'élaboration des capteurs enzymatiques. Après son immobilisation, l'enzyme doit en effet conserver sa conformation native pour préserver son activité [C. Mateo et coll., 2007]. De plus son orientation à la surface du capteur doit conserver l'accessibilité du site actif reconnaissant la molécule détectée [R. A. Sheldon et coll., 2007]. Le choix d'une matrice hôte appropriée est donc essentiel pour assurer un couplage enzyme-matrice optimal afin de prolonger la durée de vie de l'enzyme, et donc celle du capteur, dans une optique de rentabilité économique.

Différentes méthodes ont déjà été proposées pour l'immobilisation des enzymes sur divers supports [N. Gupta et coll., 2006 ; D. Shan et coll., 2003 ; Z. M. Baccar et coll., 2009]. Elles peuvent être classées sous deux grands principes : l'immobilisation physique (par adsorption, inclusion physique, ou transfert à partir d'une interface air-eau par la méthode de Langmuir-Blodgett) ou l'immobilisation chimique (par confinement, couplage covalent ou réticulation). Selon les cas, différentes interactions sont mises en jeu : électrostatique, Van der Waals, hydrophile-hydrophobe (dans le cas de la méthode Langmuir-Blodgett), liaisons hydrogène... ; différents supports peuvent également être utilisés : polymère conducteur ou non, membrane semi-perméable, support solide ...

Parmi les différentes stratégies possibles, les Hydroxydes Double Lamellaire (HDLs) sont des candidats prometteurs, car ils présentent plusieurs caractéristiques avantageuses dans le développement de biomatériaux hybrides. Il s'agit d'argiles anioniques bidimensionnelles, organisées en feuillets dont l'organisation découle de celle de la brucite $Mg(OH)_2$. Dans un

HDL, une partie des cations divalents M^{II} est remplacée par des cations trivalents M^{III} générant un excédent de charges positives, contrebalancées par des anions A^{n-} intercalés entre les feuillets. Des molécules d'eau sont également présentes entre ces feuillets. La formule générale des HDLs est donc $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x(OH)_2]^{x+} A^{n-}_{x/n}(H_2O)_y$, la nature des cations et des anions et leur proportion relative étant modifiables, d'où une grande diversité de composition des HDL. L'intérêt accordé à ces matériaux se justifie par leur abondance naturelle, leur capacité d'échange, leur porosité et leur biocompatibilité [C. Chouteau, 2004]. Ces matériaux sont de très bonnes matrices d'immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs électrochimiques. De plus dans le contexte des capteurs, des études ont montré la présence d'interactions spécifiques entre des hémoprotéines² ou enzymes et ces argiles cationiques, qui favorisent le transfert direct d'électrons entre l'électrode du capteur et le site actif de la biomolécule [C. Chouteau, 2004 ; M. Temani et coll., 2014].

Dans ce travail, nous avons donc mis à profit les propriétés des HDL pour immobiliser la tyrosinase, afin de développer un biocapteur ampérométrique pour la détection des polyphénols.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une revue bibliographique où nous introduirons tout d'abord des généralités sur les capteurs et biocapteurs, en détaillant entre autres le principe de fonctionnement des biocapteurs ampérométriques. Ensuite nous décrirons les propriétés structurales des argiles cationiques et des HDL, et leur utilisation comme matrices d'immobilisation de protéines et d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs.

Enfin, nous justifierons le choix de la tyrosinase pour l'élaboration de notre biocapteur de polyphénols.

Le deuxième chapitre sera dédié à la description des méthodes et techniques expérimentales utilisées au cours de cette thèse. Après avoir décrit la méthode de synthèse des HDL et les analyses faites pour vérifier leur structure en poudre (diffraction des rayons X DRX, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR et spectroscopie Raman), nous expliquerons la procédure de formation des films HDL nécessaires à l'immobilisation de la tyrosinase ainsi que la procédure suivie pour cette immobilisation. Nous décrirons en particulier le principe de la microscopie de force atomique ou AFM, méthode utilisée pour caractériser les films de HDL et déterminer les conditions expérimentales optimales de

² Protéine contenant un hème (cofacteur contenant un métal, généralement du fer).

réalisation de ces films. Finalement nous introduirons les techniques de détection électrochimiques utilisées.

Les résultats des caractérisations structurales et morphologiques des HDL seront présentés dans le troisième chapitre. Nous présenterons également les résultats obtenus lors de la caractérisation des films par AFM. L'immobilisation de la tyrosinase sur les films de HDL sera démontrée et le biocapteur élaboré sera décrit en détails.

Enfin, les caractéristiques électrochimiques du biocapteur finalisé seront présentées dans le dernier chapitre. Nous y présenterons les mesures et les analyses faites pour valider les performances de notre biocapteur.

Nous terminerons par les conclusions et perspectives.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce premier chapitre a pour objectif de rappeler des généralités sur les biocapteurs (en particulier ceux dont le récepteur est enzymatique), et d'introduire également le principe de fonctionnement des biocapteurs ampérométriques. Nous aborderons ensuite les méthodes d'immobilisation des enzymes, en nous attachant particulièrement aux cas où l'enzyme est immobilisée dans une matrice d'hydroxydes doubles lamellaires (HDLs).

Dans une seconde partie, nous présenterons les HDLs (propriétés, applications, méthodes de synthèse). Nous finirons ce chapitre en présentant les polyphénols et la tyrosinase, enzyme retenue dans le cas de notre biocapteur.

I. GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS

I.1. Définition et principe de fonctionnement

Les premiers biocapteurs ont vu le jour dans les années 1960, avec les travaux de Clark et Lyon [L.C. Clark et coll., 1962], ou Updicke et Hicks [S. J. Updicke et G. P. Hicks, 1967]. Ces derniers ont ainsi développé un capteur pour le dosage du glucose, basé sur l'immobilisation physique d'une enzyme, la glucose oxydase, à la surface d'un transducteur électrochimique (fonctionnalisé par un gel). L'appareil était encombrant avec une électrode de la taille d'une sonde de pH et reliée à un potentiostat connecté à un ancien enregistreur.

Par la suite, des efforts considérables ont été effectués pour mettre au point d'autres biocapteurs dans le but de réaliser des dosages rapides, sensibles et spécifiques. A la fin des années 1980, la société MediSense a commercialisé la première bandelette de test de glucose (de la taille d'une carte de crédit) composée d'une électrode imprimée (*screen printed electrode*) avec une couche d'enzyme et un médiateur immobilisés sur l'anode. Même s'ils n'étaient pas précis (> 15% en écart-type), ces dispositifs ont donné un moyen aux diabétiques de s'auto-surveiller et réguler leur glycémie [K. Warriner et coll., 2014]. Les capteurs ont continué à progresser et sont devenus de plus en plus miniaturisés, ne nécessitant que de petits volumes de substrat et présentant un intérêt dans des domaines variés (médical, agroalimentaire ou environnemental).

Les études actuelles sont concentrées principalement sur la recherche de nouveaux matériaux d'immobilisation des biomolécules qui n'altèrent pas leur activité et permettent de prolonger la durée de vie du biocapteur.

Un biocapteur est un dispositif analytique capable de transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il est formé par un composant biologique appelé "biorécepteur" et un "transducteur" représentant le mode de détection [C. Tran-Minh, 1991].

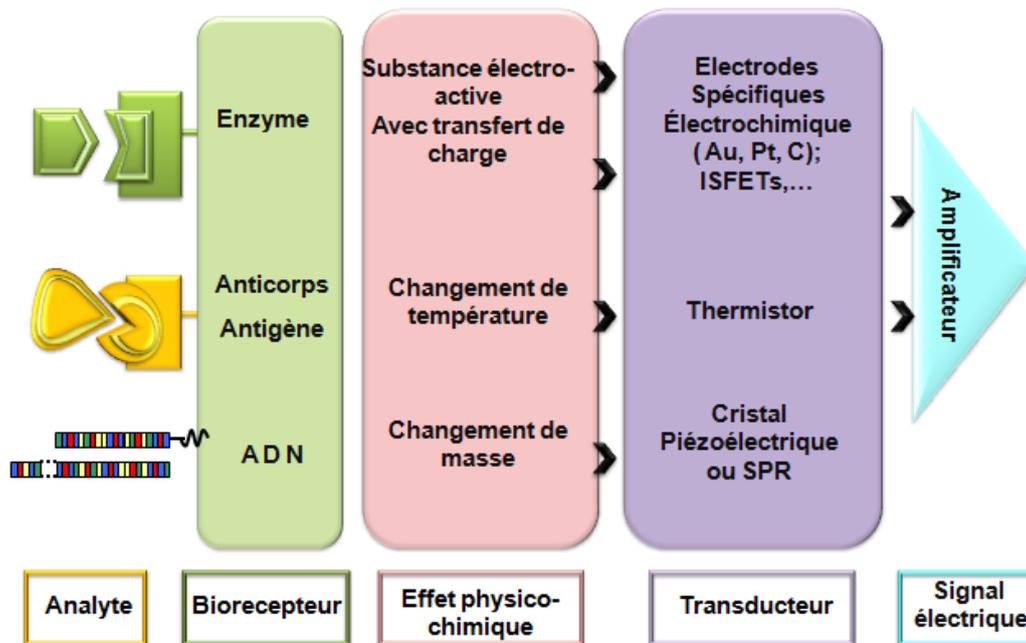


Figure I. 1 Schéma de principe d'un biocapteur.

La Figure I.1 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur. Il en existe deux types :

- Les biocapteurs dits "biocapteurs d'affinité" sont fondés sur de simples interactions entre l'objet à détecter ou analyte et le biorécepteur (cas par exemple d'une interaction anticorps-antigène ou récepteur-hormone). L'analyte à détecter n'est pas détruit.
- Les biocapteurs dits "biocapteurs métaboliques" reposent, eux, sur une réaction spécifique entre la molécule à détecter et le biorécepteur. La molécule est alors dégradée, et on suit soit la diminution de la concentration de l'analyte, soit la formation de produits [M. Comtat et A. Bergel, 1997].

La nature du biorécepteur est donc variable selon les cas (enzymes, anticorps, organites cellulaires, cellules, tissus...). Dans tous les cas, on observe des changements de propriétés physiques ou chimiques des substrats, convertis en signaux électriques mesurables grâce à un transducteur à interface fonctionnalisée. Enfin, les signaux électriques sont amplifiés et traités par des circuits électroniques.

La fonction qui relie la variation de la mesurande³ (ici la variation du processus biochimique)

³ La mesurande est la grandeur que l'on veut mesurer (Vocabulaire International de Métrologie, VIM).

au signal de sortie est régie par les lois physiques ou électrochimiques sur lesquelles le fonctionnement du capteur est basé. Cette fonction dépend également de la conception du biocapteur (géométrie, dimension, nature du matériau qui le compose) et des conditions expérimentales (température, pression, environnement ...). La courbe représentative de cette variation est dite courbe d'étalonnage (ou de calibration) du capteur. Afin de simplifier le traitement et l'exploitation du signal de sortie du capteur ainsi que son utilisation pour le grand public, sa conception et la nature des matériaux utilisés permettent généralement d'établir une courbe d'étalonnage linéaire, dans un domaine le plus large possible appelé domaine de linéarité du capteur.

En dehors du domaine de linéarité, les performances d'un capteur sont définies par ses caractéristiques métrologiques qui sont principalement :

- La sensibilité : rapport entre la variation du signal de sortie du capteur et la grandeur physique provoquant cette variation ;
- La sélectivité : un capteur est dit sélectif s'il mesure une seule grandeur ;
- La reproductibilité : aptitude d'un capteur à donner des signaux semblables lors de l'application répétée d'une même grandeur ;
- La limite de détection : plus petite variation de la grandeur appliquée à un capteur qui crée une variation significative du signal de sortie.

I.2. Le biorécepteur

Ce composant constitue l'élément sensible assurant la reconnaissance. Selon l'entité détectée, on rencontre plusieurs types de capteurs biologiques : les capteurs immunologiques, les biopuces, les capteurs cellulaires/bactériologiques et les capteurs enzymatiques. Le biorécepteur de chacun de ces biocapteurs est respectivement un anticorps, une ou plusieurs séquences d'ADN⁴, une cellule (ou bactérie) et une enzyme.

Nous détaillerons plus particulièrement le cas des enzymes comme biorécepteur, notre capteur étant lui-même de nature enzymatique.

I.2.1. Les capteurs immunologiques basés sur la reconnaissance anticorps-antigènes

Un anticorps est une protéine du système immunitaire apte de reconnaître de manière spécifi-

⁴ ADN : acide désoxyribonucléique

que un agent pathogène afin qu'il soit neutralisé. La reconnaissance a lieu au niveau du site actif de l'anticorps interagissant spécifiquement avec l'antigène, macromolécule marqueur de l'agent pathogène. Contrairement au cas de la biocatalyse⁵, le couplage immunologique n'induit ni synthèse de produit de réaction ni consommation de substrat [H. Barhoumi, 2006]. Dans le cas d'un biocapteur, l'anticorps est immobilisé sur la surface sensible, son site de fixation devant être accessible à l'antigène en solution. L'interaction anticorps-antigène induit la variation d'un signal physique variable selon la nature du capteur :

- Un signal optique, dans le cas par exemple d'un anticorps marqué à l'aide d'une sonde fluorescente [T. Geng et coll., 2004] ;
- Un signal piézoélectrique, dans le cas où une augmentation de masse est détectée à la surface du capteur [S. Babacan et coll., 2000] ;
- Un signal électrochimique, telle une variation de pH [Y. Iwayanagi, 2015].

I.2.2. Les biocapteurs basés sur l'utilisation d'une molécule d'ADN

L'ADN est une biomolécule qui présente un grand intérêt biologique : au niveau cellulaire elle consigne l'information nécessaire pour la synthèse des protéines. Dans un domaine plus appliqué, elle est particulièrement utile dans l'analyse génétique. La propriété d'un monobrin d'ADN à s'hybrider avec une séquence complémentaire est à la base des biocapteurs de type biopuce, permettant d'analyser le niveau d'expression de gènes et de détecter un agent pathogène, un gène ou une substance toxique. Ceci permet de réaliser des milliers d'analyses génétiques en parallèle, que ce soit dans le domaine du diagnostic, du génotypage, pharmacogénétique ou de l'analyse globale de l'expression des gènes [C. Chouteau, 2004].

I.2.3. Les biocapteurs basés sur l'utilisation de cellules ou de bactéries

Parmi les biorécepteurs utilisés pour la conception de biocapteurs, on trouve aussi des microorganismes ou des cellules entières. La détection de l'entité est de type enzymatique, l'avantage de la cellule étant de maintenir l'enzyme dans un environnement optimisé et d'améliorer sa stabilité par rapport à la même enzyme purifiée. [M. Tolba et coll., 2012 ; S. Yagur-Kroll et coll., 2015 ; E. Canbay et coll., 2015].

I.2.4. Les capteurs enzymatiques

Les enzymes sont des protéines indispensables aux réactions métaboliques puisqu'elles cataly-

⁵ La biocatalyse peut être définie comme l'accélération d'une réaction biochimique par une enzyme (biocatalyseur) qui n'est pas modifiée dans sa composition et sa concentration lorsque la réaction s'achève.

sent ces réactions en abaissant leur énergie d'activation (enthalpie libre d'activation) [Y. Duvault-Herrera et coll., 1990]. La reconnaissance du substrat est une réaction très spécifique. La grande variété des enzymes a permis le développement de nombreux biocapteurs reconnaissant différents substrats, les réactions impliquées étant généralement relativement simples (hydrolyse, oxydoréduction, décarboxylation ...). Notons que dans certains cas, la molécule détectée n'est pas un substrat au sens strict, mais un inhibiteur de l'activité enzymatique⁶. Le tableau I.1 présente quelques exemples.

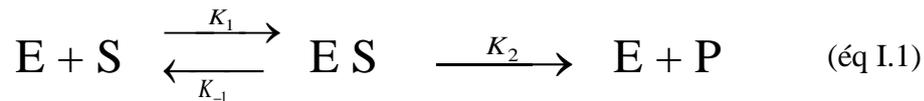
Biocapteur enzymatique à base de	Exemples de molécules détectées		Références
Cholinestérase, phosphatase alcaline, phosphatase acide, acylase, lipase, chymotrypsine, tyrosinase	Insecticides ou pesticides	Malathion, acéphate, carbamate, organophosphoré, triazines	[C. S. Pundir et coll., 2012] [P. Raghu et coll., 2014] [T. Liu et coll., 2011] [L. Campanella et coll., 2005]
Tyrosinase, acétolactate synthase, peroxydase	Herbicides	Chlorsulfuron, sulfonilurées et triazines	[Y. Nangia et coll., 2012] [C. Védrine et coll., 2003] [T. M. Anh et coll., 2004]
Aldéhyde déshydrogénase, tyrosinase	Fongicides	Dithiocarbamates	[T. Noguer et coll., 1999] [J. R. Roede et coll., 2014]
Peroxydase, invertase, phosphatase alcaline cholinestérase, glycérol-3-phosphate déshydrogénase, β -Galactosidase, L-lactate déshydrogénase, leucine aminopeptidase, uréase, L-glycérophosphate oxydase, pyruvate oxydase, L-lactate glucose oxydase.	Métaux lourds	Cadmium, cuivre, mercure, plomb	[D. Ogończyk et coll., 2005] [D. B.-Kestwal et coll., 2008] [S.M.Z. Hossain et coll., 2011] [M. E. Ghica et coll., 2013] [N. Tekaya et coll., 2013-2014] [M. Moyo et coll., 2014] [B. Silwana et coll., 2014] [H. Kaur et coll., 2014] [O. Syshchuk et coll., 2015]

Tableau I. 1. Exemples d'enzymes utilisées dans différents types de biocapteurs

⁶ Un inhibiteur enzymatique est une substance qui, en se liant à une enzyme, en diminue l'activité. Un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place, ou provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive.

Nous allons dans les paragraphes suivants rappeler quelques points sur la cinétique enzymatique.

La réaction catalysée par une enzyme se déroule en deux étapes, selon le modèle de S. L. Michaelis et M. Menten [I. B. Assaker, 2009] : une première relative à la formation d'un composé intermédiaire de type complexe enzyme-substrat, et une seconde correspondant à la transformation du complexe en produit(s) avec régénération de l'enzyme. Le mécanisme réactionnel est résumé dans l'équation I.1 :



où E est l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le produit issu de la transformation du complexe. K_1 , K_{-1} et K_2 sont les constantes de vitesse de chaque étape du processus.

L'évolution de la concentration du complexe ES au cours du temps est donnée par l'équation I.2 :

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES] \quad (\text{éq I.2})$$

En supposant qu'un état quasi-stationnaire est atteint (ES disparaissant aussi vite qu'il apparaît), on a donc :

$$[ES] = \frac{K_1[E][S]}{K_{-1} + K_2} = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (\text{éq I.3})$$

$$\text{en posant : } K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (\text{éq I.4})$$

Cette constante, dite « constante de Michaelis-Menten », est caractéristique de la réaction enzymatique. Elle correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale V_{\max} . Une valeur élevée du K_M indique que l'enzyme a une faible affinité par son substrat.

Quant à la vitesse maximale, elle peut s'exprimer à partir de la concentration totale en enzyme selon la relation :

$$V_{\max} = K_2 \times [E]_t \quad (\text{éq I.5})$$

La vitesse de la réaction évolue en fonction de la concentration en substrat, en augmentant dans un premier temps de manière linéaire avec cette dernière. A plus forte concentration en substrat, la vitesse atteint sa valeur maximale quand toutes les molécules d'enzyme sont liées au substrat (Figure I.2).

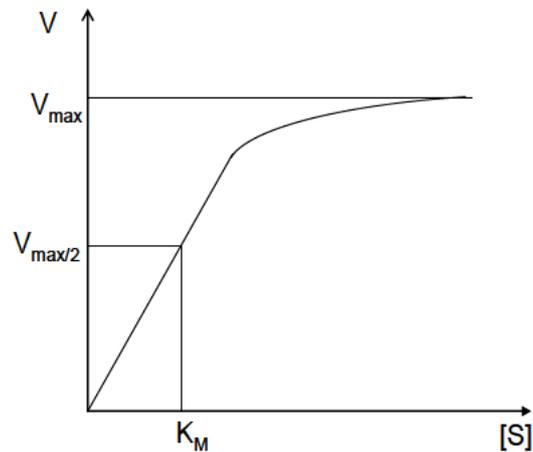


Figure I. 2. Évolution de la vitesse V d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat $[S]$ [I. B. Assaker, 2009].

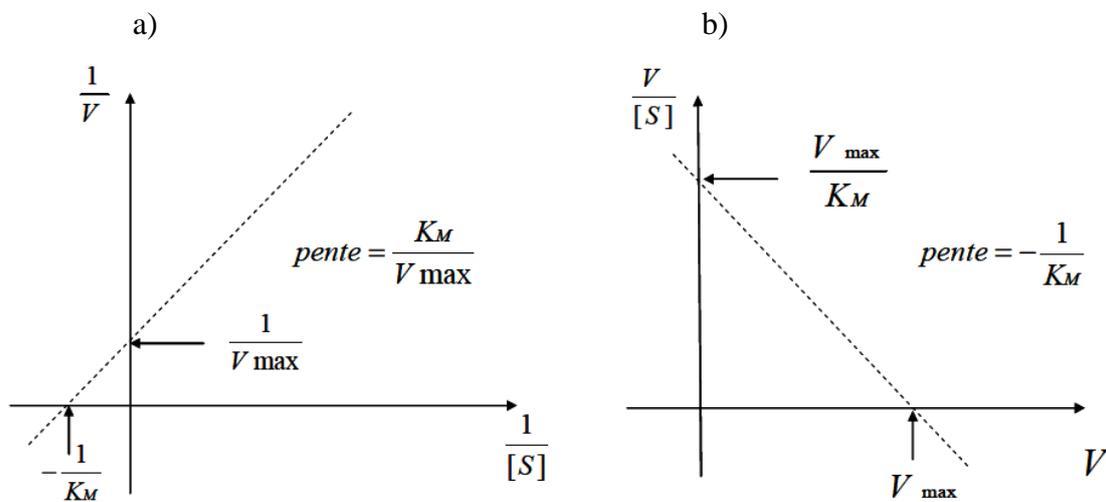


Figure I. 3. Représentations graphiques dites de Lineweaver-Burk (a) et Eadie Hofstee (b) [I. B. Assaker, 2009].

Deux représentations graphiques linéaires permettent de définir les valeurs de V_{\max} et K_M :

- celle de Lineweaver et Burk :
$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{éq I.6})$$

- celle d'Eadie et Hofstee :
$$\frac{V}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_M} - \frac{V}{K_M} \quad (\text{éq I.7})$$

Elles sont toutes deux représentées dans la Figure I.3.

Comme les équations précédentes l'indiquent, la cinétique enzymatique dépend directement des paramètres suivants : la concentration totale de l'enzyme (éq I.5) et la concentration du substrat (Figure I.2). Mais elle peut également dépendre de la concentration du produit ou de celle du complexe EP, par un effet inhibiteur lié au fait que le produit empêche le site actif de fonctionner correctement. De plus, comme pour toute protéine, les conditions expérimentales sont cruciales. Les enzymes sont ainsi caractérisées par une température optimale et un pH optimal de fonctionnement. Une température trop élevée conduit à une dénaturation de l'enzyme avec perte de sa structure tridimensionnelle et donc de ses propriétés catalytiques (Figure I.4a). Quant au pH (Figure I.4b), il peut modifier l'état d'ionisation de certains acides aminés, ce qui induit un changement de structure de l'enzyme. Ces deux paramètres doivent donc être contrôlés strictement.

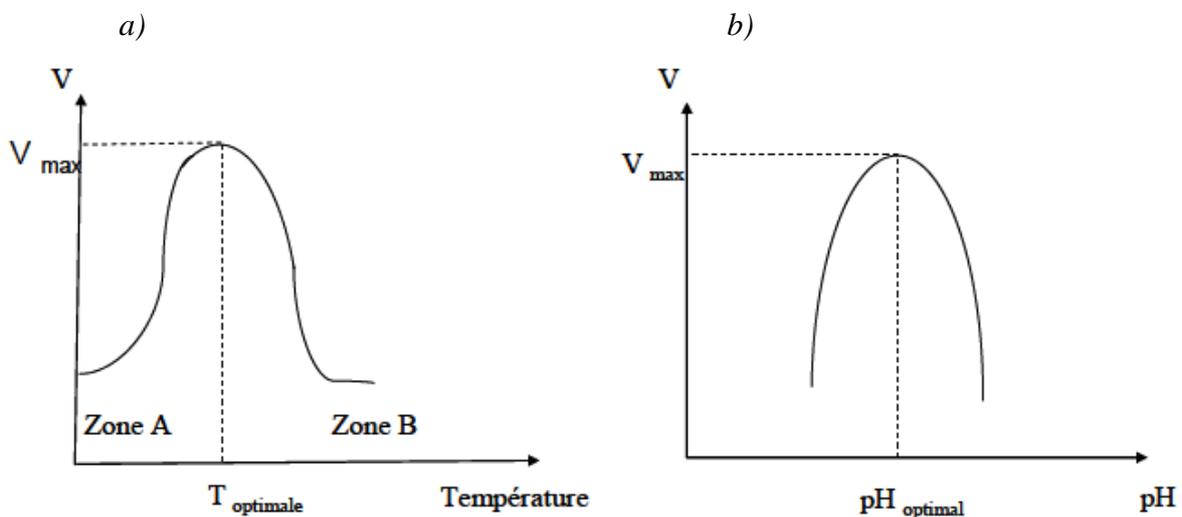


Figure I. 4. Effet de la température et du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique. Activation par la chaleur (Zone A), dénaturation thermique (zone B) dans le cas de la température [I. B. Assaker, 2009].

Bien que les enzymes constituent des outils performants dans le domaine des biocapteurs, leur utilisation présente également quelques inconvénients :

- les enzymes doivent être purifiées, ce qui entraîne généralement des coûts relativement élevés ;

- certaines souffrent d'un manque de stabilité au cours du temps, ou dans des conditions expérimentales données ;
- elles doivent être convenablement immobilisées sur la surface sensible du biocapteur, leur site actif étant accessible.

Il faut donc bien choisir la technique de greffage, afin de limiter les pertes de matière et d'augmenter la durée de vie du capteur.

I.3. Les transducteurs

Le transducteur est l'élément physique qui sert à « décoder » la modification biochimique issue de l'interaction analyte-biorécepteur pour la traduire en un signal électrique. Le type de transducteur est choisi en fonction de cette modification. La compatibilité entre l'élément biologique et le transducteur permet d'obtenir un signal facilement exploitable avec un minimum de bruit de fond. Plus le bruit de fond est faible, plus il assure un seuil de détection bas, améliorant ainsi les performances du biocapteur [C. Tran-Minh, 1991].

Dans notre étude nous nous intéressons aux biocapteurs enzymatiques (voir paragraphe I.2.). Selon le type de transducteur et la réponse générée, les biocapteurs enzymatiques sont classés dans les principales catégories suivantes [R. Bendoula, 2005].

I.3.1. Les biocapteurs thermométriques

Ces capteurs appelés aussi capteurs enthalpimétriques sont destinés à quantifier la concentration d'un produit par la variation d'enthalpie associée à la réaction enzymatique, qu'elle soit exo ou endothermique. Pour ce type de biocapteur, il n'est donc pas nécessaire de mesurer le produit de la réaction, seule la chaleur dégagée ou absorbée au cours de la réaction étant utilisée dans la mesure. La variation de température correspondante est déterminée par un microcalorimètre (thermistor).

I.3.2. Les biocapteurs à effet piézoélectrique

Un échantillon de type cristal piézoélectrique (cas du quartz par exemple) se polarise électriquement lorsqu'il est soumis à une contrainte de compression. A l'inverse, une tension électrique appliquée aux bornes d'un matériau piézoélectrique induit une déformation du cristal. Si le champ électrique est alternatif, le cristal vibre et une onde acoustique est générée au sein du matériau [N. Barié et M. Rapp, 2001]. Quand le quartz est inséré dans un circuit électronique approprié, la vibration peut être entretenue et le circuit mis en résonance.

Les biocapteurs à effet piézoélectrique sont sensibles aux variations de masse à la surface du cristal. En général, le capteur est un cristal de quartz résonnant sur lequel sont déposées de part et d'autre des couches métalliques (argent, or ou aluminium) sur lesquelles on superpose une couche contenant le biorécepteur. Toute modification de la masse à la surface du détecteur (liée par exemple à l'adsorption de l'analyte) entraîne une modification de la fréquence de résonance : on obtient alors un système appelé microbalance à quartz [J. Rickert et coll., 1997 ; K. A. Marx, 2003 ; X. Guo et coll., 2012 ; Y. K. Kim et coll., 2015].

I.3.3. Les biocapteurs optiques

Différents paramètres optiques peuvent être exploités dans le cas des biocapteurs :

- L'interaction ou la réaction métabolique peuvent modifier les propriétés d'absorption ou d'émission de fluorescence du biorécepteur [Z. Zhang, 2014 ; E. Descrovi et coll., 2015 ; Y.-S. Sun et coll., 2014]. Certains capteurs font appel au phénomène de réflexion totale interne (montage de type TIRF pour *Total Internal Reflection Fluorescence* [A. N. Asanov et coll., 1998]) pour mettre en évidence ces modifications. La fluorescence est par ailleurs actuellement une méthode de référence pour la mesure d'interactions biomoléculaires, de par sa sensibilité.
- La résonance des plasmons de surface⁷ ou SPR peut également être exploitée [K. M. Mayer et J. H. Hafner, 2011 ; P. Zijlstra et coll., 2012 ; C.-T. Yang, 2015]. Dans ce cas, le biorécepteur est fixé sur une surface métallique (de l'or par exemple), cette dernière étant éclairée en conditions de réflexion totale interne. La génération d'une onde plasmon dans le milieu au contact de la surface sert de sonde. La lumière réfléchie est envoyée sur un détecteur, l'angle de résonance des plasmons de surface dépendant de l'indice de réfraction du milieu au contact de la surface, lui-même lié au fait que des molécules sont liées ou pas au récepteur [W. M. Mullet et coll., 2000]. D'une manière générale, la SPR est une méthode avantageuse, car elle ne fait pas appel à un quelconque marquage des molécules.
- L'ellipsométrie peut être mise également à contribution : il s'agit ici de mesurer les variations d'amplitude et de phase d'une lumière polarisée, lors de sa réflexion à l'interface entre deux milieux transparents d'indices de réfraction différents, donnant ainsi accès aux variations de ces indices [G.M.Willems et coll., 2002]. Le montage mis en

⁷ Le plasmon de surface est une onde générée à l'interface d'un métal avec un milieu diélectrique, parallèlement à la surface éclairée, et dont l'intensité décroît de manière exponentielle quand on s'éloigne de l'interface.

œuvre est complexe, mais la sensibilité de cette méthode est meilleure que celle de la SPR [H. N. Daghestani, 2010].

Enfin différentes stratégies peuvent être appliquées pour guider l'onde : sondes à fibres optiques (pour l'excitation et le transfert de l'information au détecteur), guide d'onde diélectrique⁸ [W.A.Challener et coll., 2000], interféromètre de Mach-Zehnder⁹ [M.Weisser et coll., 1999], miroir résonnant¹⁰ [P.E. Buckle et coll., 1993]...

I.3.4. Les biocapteurs électrochimiques

Les capteurs électrochimiques reposent sur la notion d'oxydo-réduction, et incluent donc une ou plusieurs électrodes. Ils sont classés selon leur mode de transduction : potentiométrique (potentiel d'électrode, transistor à effet de champ) [C.K.Yeung et coll., 2001], conductométriques [T.A.Sergeyeva et coll., 1998] ou ampérométrique [M.A.Lopez et coll., 1998].

Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus.

I.3.4.1. Capteurs ampérométriques

Ces capteurs sont basés sur la mesure du courant dans la cellule électrochimique à un potentiel imposé, ce courant évoluant en fonction de la concentration du produit détecté, généré par le processus d'oxydoréduction.

Trois générations de capteurs ampérométriques se sont succédées. Leur principe est détaillé dans le Tableau I.2. [A. T. Mai, 2002 ; S. Borgmann et coll., 2011]:

	Principe et intérêts	Références
1^{ère} génération	L'analyte enzymatiquement généré est directement oxydé ou réduit au niveau de l'électrode. Le médiateur rédox naturel (le dioxygène) assure le transfère d'électrons entre l'électrode et l'enzyme.	[L.C. Clark et coll., 1962]

⁸Système de confinement d'une onde électromagnétique (ou acoustique) se propageant par réflexions successives, comme dans une fibre optique.

⁹Dans cet interféromètre, le guide comporte deux bras, l'un étant fonctionnalisé, l'autre pas. Ce dernier sert donc de référence. La lumière se propage dans les deux bras pour ensuite être recombinaée à la sortie du guide, ce qui provoque des interférences, dont l'analyse fournit des informations sur l'épaisseur de la couche liée au bras fonctionnalisé et sur son indice de réfraction.

¹⁰Système couplant la lumière incidente à travers un prisme de haut indice, plutôt que par une surface métallique.

<p>2^{ème} génération</p>	<p>Les médiateurs redox artificiels, en solution ou immobilisés, peuvent connecter électriquement l'enzyme à l'électrode par auto-échanges d'électrons et abaisser le potentiel de détection des espèces électroactives.</p> <p>Exemples de médiateurs redox artificiels: ferrocène, quinones, ferricyanure, phénazine-méthosulfate, tétrathiafulvalène (TTF), tétracyanoquinodiméthane (TCNQ)</p>	<p>[A.E.G. Cass et coll., 1984]</p> <p>[A.P.F. Turner et coll., 1987]</p> <p>[C. M. Silveira et coll., 2013], [S.A.P. Noi et coll., 2015], [G. Volpe et coll., 2014], [L.-G. Zamfir et coll., 2013], [A. Heller et coll., 1992], [A. Koide et coll., 1999], [I. Pankratove, 1995], [A. Walcarius, 1998]</p>
<p>3^{ème} génération</p>	<p>Dans ce cas, le transfert électronique est direct (sans médiateurs) entre l'enzyme et l'électrode. La concentration de l'analyte peut être mesurée à des potentiels d'électrode proches du potentiel standard de l'enzyme ce qui empêche l'oxydation d'espèces interférentes.</p>	<p>[W. Schuhmann et coll., 1993] [T. Lötzbeyer et coll., 1996]</p> <p>[J. Wang, 2008]</p>

Tableau I. 2. Principe de fonctionnement des trois générations de capteurs ampérométriques.

I.3.4.2. Capteurs potentiométriques

La potentiométrie est une méthode électrochimique qui consiste à mesurer la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence à un courant fixe imposé (nul ou pas). À l'aide de l'équation de Nernst du potentiel (équation I.8), on peut donc en déduire la concentration de l'analyte à doser :

$$E_p = E_{ox>red}^0 + \frac{RT}{nF} * \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (\text{éq I.8})$$

où E_p représente le potentiel du couple redox mesuré; $E^\circ_{\text{ox/red}}$ le potentiel normal standard du couple redox; R la constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$); $a_{\text{ox}}/a_{\text{red}}$ le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état réduit; T la température absolue en Kelvin.

On distingue deux types de biocapteur potentiométrique :

- Le premier est formé par une électrode de travail de type *Ion Selective Electrode* (ISE) sur laquelle est fixé un biorécepteur, et une électrode de référence (une électrode au calomel par exemple) [R. De Marco et coll., 2007]. Cette ISE convertit l'activité d'un ion spécifique, contenue dans la cellule de mesure, en un potentiel électrique. À titre d'exemple, Z. Chen et coll. ont utilisé un fil de cobalt comme ISE pour la détection potentiométrique du phosphate, en se référant à une électrode de Ag/ AgCl [Z. Chen et coll., 1997].
- Le deuxième emploie un transistor à effet de champ (*FET : Field Effect Transistor*) [M. Mascini et coll., 1983 ; D.G. Hafeman et coll., 1988], ce dispositif mesurant la conductivité dans un matériau semiconducteur au moyen d'un champ électrique. Son électrode ou « grille » est modifiée pour obtenir un ISFET (*Ion Sensitive Field Effect Transistor*), sensible à la présence d'ions. La fixation d'une enzyme sur la surface permet de concevoir des systèmes de type ENFET (*Enzyme Field Effect Transistor*). C'est par exemple le cas du biocapteur permettant de détecter de faibles concentrations d'un acaricide¹¹, le trichlorfon, au moyen de la butyrylcholine estérase [A. T. Mai, 2002 ; J.-M. Chovelon, 1991].

1.3.4.3. Capteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique qui permet de mesurer les variations (par consommation ou production) d'espèces chargées dans une solution, générées par exemple au cours des réactions enzymatiques.

La conductance d'une solution ionique est donnée par l'équation I.9;

$$G = \gamma \cdot \frac{A}{\lambda} \quad (\text{éq I.9})$$

où la constante γ (en $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) est la conductance ou conductivité spécifique caractéristique d'un produit, A est la surface des électrodes dans la cellule de mesure (cm^2) et λ est la distance interélectrodes (cm).

¹¹ Acaricide : substance ayant la propriété de tuer les acariens.

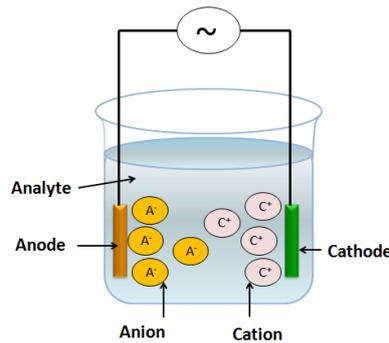


Figure I. 5. Configuration typique d'un capteur conductimétrique.

Les deux électrodes plongées dans la solution jouent le rôle d'anode et cathode. Les charges opposées dans la solution se séparent pour migrer aux pôles appropriés, les positives vers la cathode et les négatives vers l'anode (Figure I.5). La conductance de l'électrolyte présent peut être mesurée après étalonnage à l'aide d'un électrolyte de conductivité connue.

Différentes technologies ont été développées pour fabriquer ces microélectrodes. Watson et coll. [L.D. Watson, 1987-88] ont proposé une méthode basée sur l'utilisation d'électrodes interdigitales formées par un mélange multi-métal (Ti, Pt, Au) déposé sous vide sur un substrat de SiO₂. Plusieurs chercheurs ont ensuite repris ce procédé pour l'améliorer. À titre d'exemple, O.O. Soldatkin et coll. [O.O. Soldatkin et coll., 2012] ont développé un système de microélectrodes interdigitales planes formées par une paire de couches minces déposées sur un coussin en céramique. Ils ont ensuite immobilisé sur la surface trois types d'enzyme hydrolysant des polysaccharides ou convertissant des monosaccharides (l'invertase, la mutarotase et la glucose-oxydase) pour assurer une détermination sélective d'ions de métaux lourds (Hg²⁺ et Ag⁺) inhibant le fonctionnement enzymatique.

I.4. Les techniques d'immobilisation des enzymes et les différents matériaux utilisés comme matrices de fixation

Nous allons dans le paragraphe suivant aborder les techniques d'immobilisation d'une enzyme sur un support solide.

D'une manière générale, l'immobilisation du biorécepteur sur la surface du transducteur est une étape cruciale dans la conception d'un biocapteur. En effet, le but principal est de fonctionnaliser l'électrode par la fixation de l'élément biologique à sa surface afin de réaliser un système sensible à l'espèce dosée. Certaines conditions doivent donc être respectées :

- l'activité de l'enzyme ou les propriétés biologiques de la biomolécule doivent être maintenues ;
- l'accessibilité du substrat au biorécepteur doit être garantie. L'orientation du biorécepteur doit donc être adéquate et le substrat doit également pouvoir pénétrer facilement dans la couche sensible et diffuser jusqu'à l'élément de reconnaissance ;
- la libération du substrat biologique et/ou du produit de la réaction par la biomolécule immobilisée ne doit pas être bloquée.

Les matériaux utilisés comme matrices de support pour immobiliser les enzymes peuvent être de types organiques, inorganiques ou autres. Ils sont choisis selon leur capacité à immobiliser l'enzyme, leur stabilité mécanique et chimique, leur coût, et leurs caractéristiques physico-chimiques (réactivité, présence de charge, nature des liaisons mises en jeu, porosité, ...) influençant potentiellement l'immobilisation.

De nombreux procédés ont été ou sont en cours d'élaboration. Ils reposent sur deux grands principes : l'immobilisation physique (adsorption, inclusion physique, méthode de Langmuir-Blodgett) ou l'immobilisation chimique (confinement, couplage covalent, réticulation) (Figure I.6). Nous allons les décrire brièvement dans les paragraphes suivants.

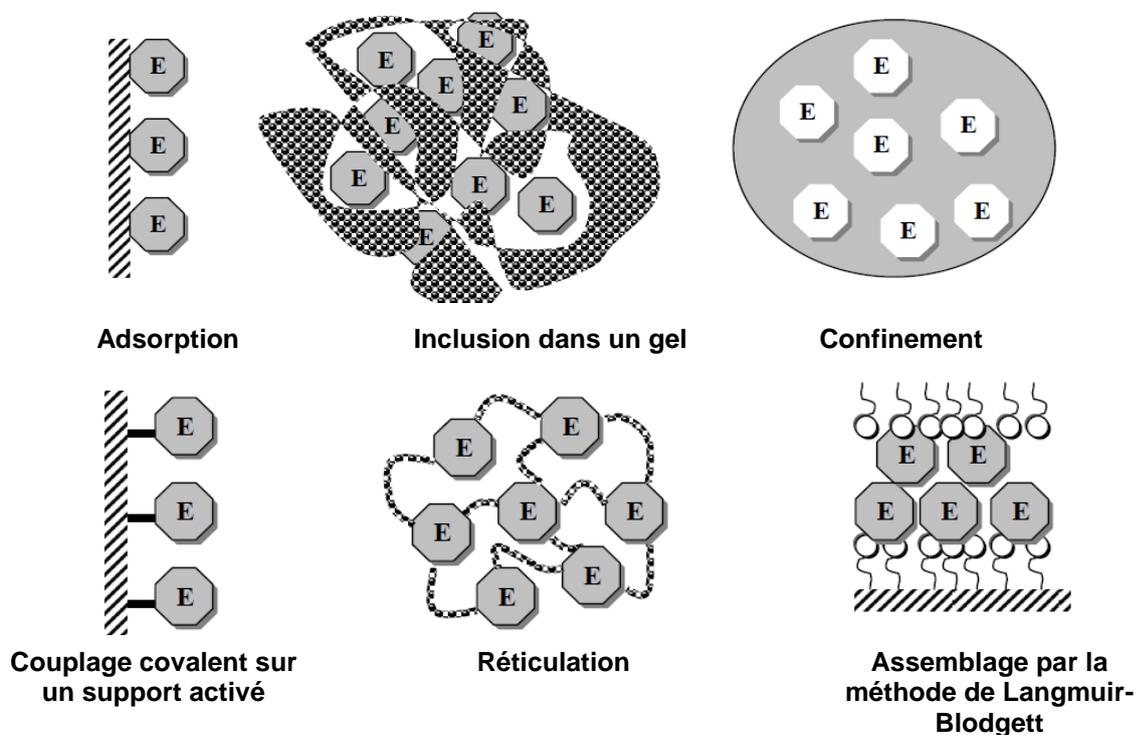


Figure I. 6. Méthodes d'immobilisation d'une enzyme [H. Barhoumi, 2006]

I.4.1. L'immobilisation physique

I.4.1.1. L'adsorption

L'immobilisation du biorécepteur par adsorption sur la surface du transducteur (que ce soit une surface solide ou des nanoparticules) met en jeu des interactions non covalentes multiples: électrostatiques, Van der Waals ou liaisons hydrogènes. Cette méthode assure l'ancrage de l'entité biologique en altérant le moins ses propriétés. Néanmoins, la biomolécule peut subir un changement de conformation ou une dénaturation lors du processus d'adsorption. En outre, des variations locales du microenvironnement entourant le biorécepteur (pH, force ionique, température de l'analyte au niveau de la double couche d'Helmholtz¹²) peuvent induire sa désorption [M. Albareda-Sirvent et coll., 2000].

Le Tableau I.3 récapitule les différents types de matrice utilisés pour l'immobilisation par adsorption :

Supports/ matrices utilisé(e)s		Références
Les supports organiques	Polyosides: acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate	[S. K. Mocellini et coll., 2011 ; S. Nartker et coll., 2015 ; A. Boujakhrou et coll., 2015 ; S. Li et coll., 2015 ; R. M. Kestwal et coll., 2015; X. Wang et coll., 2012]
	Polymères: polystyrène, polyéthylène, résines échangeuses d'ions	[M. L. Palacio et coll., 2012 ; Y. Xia et coll., 2012 ; N. Peerboom et coll., 2015]
Les supports inorganiques (support minéraux)	Argiles, hydroxides doubles lamellaires, verre poreux et silice poreuse	[N. An et coll., 2015 ; B. Demir et coll., 2013 ; L. Ren et coll., 2001; S. Aisawa et coll., 2001 ; Z.M. Baccar et coll., 2012 ; Z. Zhou et coll., 2013]
Autres supports	Nylon, céramique, charbon actif	[E. Farahmand et coll., 2015 ; T. C. Canevari et coll., 2011 ; P. R. Coulet et coll., 2006]

Tableau I. 3. Les différentes matrices utilisées pour l'adsorption de biomolécules.

¹² Ce modèle décrit la variation du potentiel électrique au voisinage d'une surface, et tient un grand rôle dans l'explication du comportement de surfaces mises en contact avec des solutions (voir le chapitre 2.VI.1.1).

De nombreuses recherches portent sur le développement de méthodes innovantes d'immobilisation en utilisant la chimie douce (dans des conditions ambiantes et sans apport énergétique) comme les hybrides organo-minéraux présentant des liaisons intermoléculaires fortes. Le biorécepteur peut ainsi s'auto-assembler¹³ directement sur la surface d'un film mince constitué d'un tel matériau, s'il présente une réactivité avec ses groupements fonctionnels, ou à travers une monocouche intermédiaire (*Self Assembled Monolayer*) en cas d'absence de réactivité. La technique d'auto-assemblage SAM (Figure I.7) consiste alors à former une monocouche de molécules organiques par chimisorption¹⁴ sur la surface d'un substrat. Ces molécules comportent un pôle pour la fixation au substrat et un pôle pour interagir avec la biomolécule à immobiliser [W. Schuhmann, 2002 ; M. Dribek, 2010 ; Y. Miao et coll., 2013 ; Z.-P. Han et coll., 2013].

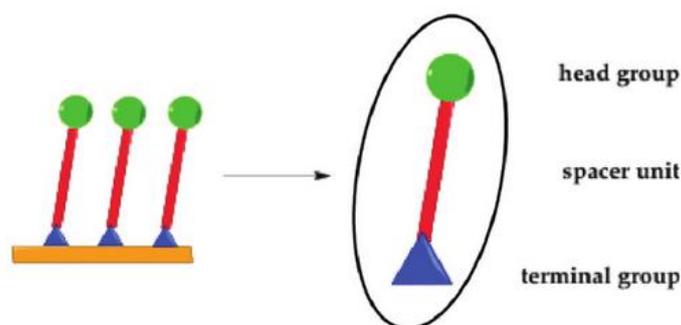


Figure I. 7. Schéma de principe de la technique SAM pour le dépôt de molécules organiques sur une surface : la partie « terminal group » assure la liaison de la molécule avec la surface, la partie « spacer unit » sert à l'assemblage de la monocouche et la partie « head group » assure la fonctionnalisation de la surface par immobilisation de la biomolécule [T. A. Gschneidner, 2015].

Par exemple, D. O. Demirkol et coll. a immobilisé la glucose oxydase (GOx) sur une monocouche de calixarènes (contenant des groupements thiol, Calix-SH) auto-assemblée sur une surface d'or, par l'intermédiaire du 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) activant les groupes hydroxyles du Calix-SH pour y fixer l'enzyme [D. O. Demirkol et coll., 2014].

¹³ L'auto-assemblage moléculaire se base sur le pouvoir de molécules simples à former, par elles-mêmes sans participation ou assistance extérieure, des liaisons intra ou intermoléculaires et créer des structures généralement ordonnées.

¹⁴ On parle de la chimisorption (ou d'adsorption chimique) si l'adsorbat se lie à la surface par des liaisons chimiques mettant en jeu des énergies de liaison importantes (du type liaisons covalentes, ioniques ou métalliques).

I.4.1.2. L'inclusion physique (piégeage)

La biomolécule est incorporée dans les pores d'un gel organique (polymère conducteur ou non conducteur) ou inorganique (argile), ou dans une membrane semi-perméable. Ces pores doivent être assez grands pour permettre la diffusion libre des substrats jusqu'au site actif tout en piégeant la biomolécule dans la maille de la matrice hôte. La biomolécule piégée reste dépendante de son microenvironnement local (pH, force ionique) et peut donc perdre son activité en se dénaturant. Cette technique est limitée par la taille des pores qui peut aussi favoriser le relargage des biomolécules de petite taille et de faible poids moléculaire [H. Barhoumi, 2006].

Des matériaux multiples, préparés par la voie sol-gel¹⁵, ont été utilisés comme matrices de piégeage pour les enzymes comme le polyacrylamide, les fibres de polyacétate de cellulose, l'alginate, l'amidon, etc. Ces matériaux forment un gel autour des biomolécules en respectant leurs formes. En effet, les précurseurs moléculaires du gel peuvent s'adsorber et polymériser à la surface des biomolécules pour former un réseau inorganique, organique ou hybride autour de celles-ci. Cette méthode permet de préparer, par exemple, des matériaux optiquement transparents, ou des matériaux multifonctionnels par co-inclusion de divers composants chimiques comme des polymères conducteurs ou des modificateurs redox, et par conséquent de jouer sur les propriétés du matériau pour diversifier les applications.

J. P. Chen et coll. ont ainsi utilisé une poudre sol-gel de type organique-inorganique hybride préparée par polymérisation catalysée par un acide de tétraméthoxysilane (TMOS) et l'alkyltriméthoxysilane, pour piéger la lipase de *Candida rugosa* ; leur but était de catalyser des réactions d'estérification entre l'éthanol et l'acide butyrique dans l'hexane [J. P. Chen et coll., 2003]. Hao-Min Huang et coll. ont élaboré un biocapteur de glucose en piégeant la glucose oxydase (GOx) dans un réseau tridimensionnel constitué de chitosane et d'orthosilicate de tétraéthyle [H. M. Huang et coll., 2013]. P. Raghu et coll. ont, eux, fabriqué un biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation de l'acétylcholinestérase (AChE) sur

¹⁵ Le procédé sol-gel se résume en une succession de réactions chimiques simples à une température proche de la température ambiante. Les particules solides synthétisées sont de très petites tailles et forment un réseau tridimensionnel par des liaisons de Van der Waals. Lorsque les précurseurs sont mis en présence d'eau, l'hydrolyse de certains groupes chimiques intervient tout d'abord, puis la condensation des produits hydrolysés conduit à la gélification du système. Le vieillissement du gel fait intervenir des modifications physico-chimiques importantes selon 3 processus, dits de :

- polymérisation (le réseau vitreux se renforce au fur et à mesure que de nouvelles liaisons chimiques se constituent) ;
- mûrissement (processus de dissolution et de reprécipitation) ;
- transformation de phase ou synérèse.

un film de silice. Ce biocapteur a été utilisé pour la détection de deux composés organophosphorés : le méthyle parathion (MP) et l'acéphate [P. Raghu et coll., 2012].

I.4.1.3. La méthode de Langmuir-Blodgett (LB)

Cette technique consiste à construire des films sur un substrat plan (Figure I.8) composés par une ou plusieurs monocouches formées par un arrangement contrôlé et ordonné de molécules amphiphiles¹⁶ [T.F. Schmidt et coll., 2008]. Ces films créent une matrice inerte dans laquelle l'enzyme peut être soit emprisonnée entre deux monocouches successives, soit adsorbée à la surface d'une monocouche.

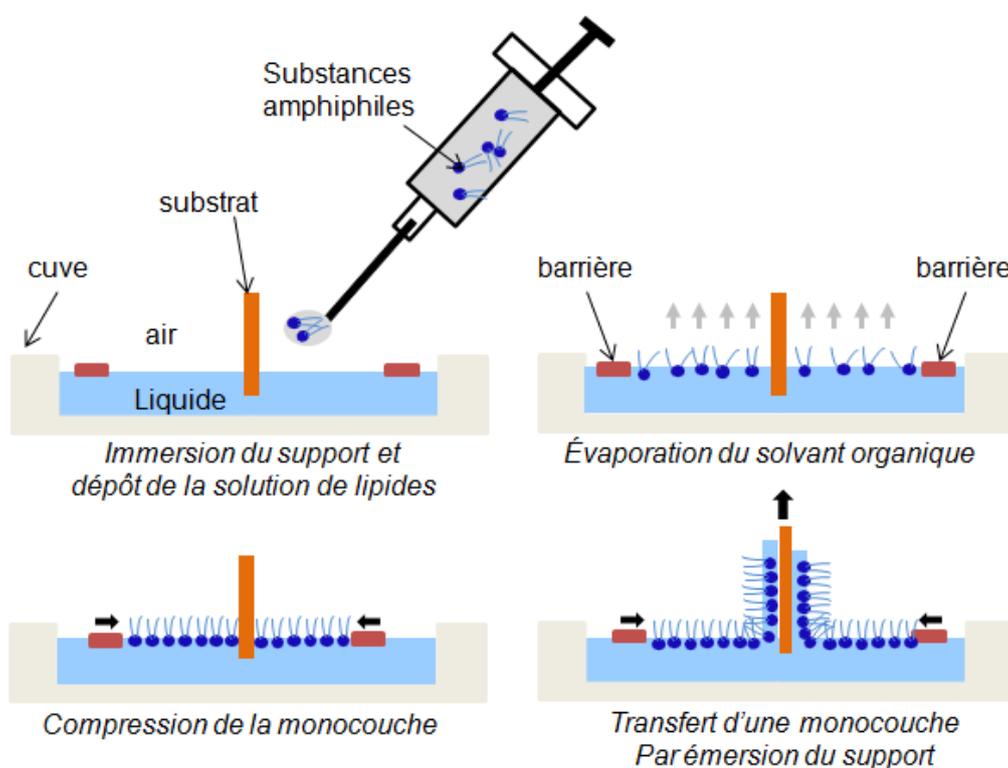


Figure I. 8. Principe de la technique de LB [N. R. Faye, 2014]

La Figure I.8 décrit des différentes étapes suivies pour la réalisation de ces films, en utilisant une cuve de Langmuir. Cette dernière, remplie d'une phase aqueuse dont la composition peut être ajustée (ions, pH, ...), comporte deux barrières dont le déplacement est contrôlé par un ordinateur, ainsi qu'un tensiomètre permettant de mesurer les variations de tension superficielle de l'interface air-phase aqueuse. Le substrat est préalablement plongé dans la

¹⁶ Une espèce chimique (que ce soit une molécule ou un ion) est dite amphiphile lorsqu'elle possède à la fois un pôle hydrophile (un groupe ayant une affinité pour l'eau et tendance à s'y solubiliser) et un pôle hydrophobe (un groupe insoluble dans l'eau, mais soluble dans un solvant organique)

phase aqueuse, s'il est hydrophile, puis les molécules amphiphiles solubilisées dans un solvant organique, sont étalées à l'interface. Après évaporation du solvant les molécules sont comprimées à l'interface air-phase aqueuse par rapprochement des barrières formant une monocouche de plus en plus dense.

Quand la pression de surface¹⁷ choisie est atteinte, cette dernière est maintenue constante et le substrat est sorti de la phase aqueuse, emportant avec lui une monocouche dite film de Langmuir-Blodgett. Dans les cas les plus simples, des monocouches peuvent être à nouveau transférées sur le substrat par immersions et émergences successives.

Cette stratégie a été utilisée pour la réalisation de plusieurs capteurs électrochimiques enzymatiques telles que les capteurs à base de peroxydase du raifort, glucose oxydase, acétylcholinestérase, uréase ou tyrosinase, pour détecter diverses substances telles que l'acide phytique, le peroxyde d'hydrogène, le glucose, la choline, l'urée et les phénols [R.M. Iost et coll., 2011].

I.4.2. L'immobilisation chimique

I.4.2.1. Le couplage covalent

Le couplage covalent peut être utilisé pour permettre l'immobilisation sur une matrice ou directement sur une surface d'un transducteur. Cette méthode consiste à traiter ces surfaces à l'aide de réactifs appropriés et d'agents de couplage, inertes vis-à-vis de la réaction enzymatique. Elle est basée sur la réaction entre un groupement fonctionnel du ligand (non essentiel pour son activité catalytique) et des groupements réactifs de la surface solide. Parmi les agents activateurs, on peut citer les carbodiimides [L. Liu et coll., 2013], le bromure de cyanogène [G. S. Bang et coll., 2013], les sels de diazonium [K. Guo et coll., 2013], les isocyanates, les thiols [K. Minami, 2012] et les argiles [C. Mousty et coll., 2004].

Cette technique d'immobilisation permet d'avoir des liaisons stables mais elle souffre du choix très réduit des surfaces de transducteur [H. Barhoumi, 2006].

I.4.2.2. La réticulation

La réticulation est basée sur l'utilisation d'agents de réticulation, molécules polyfonctionnelles. Le plus connu est le glutaraldéhyde qui réagit avec les groupements

¹⁷ La pression de surface est définie comme la différence entre la tension de surface en présence du film et celle de l'interface air-phase aqueuse « nue ».

« amine » des protéines pour former des pontages covalents « protéine- protéine » (*cross-linking*) créant ainsi des réseaux insolubles et rigides (Figure I.9).

Les biomolécules peuvent ainsi se coupler entre elles [I. Braakman et coll., 2013] ou à d'autres protéines inactives. Les biomolécules immobilisées sont stables mais la rigidité de leur structure tridimensionnelle finale et l'encombrement stérique causent des barrières de diffusion, ce qui peut engendrer un temps de réponse plus élevé du biocapteur.

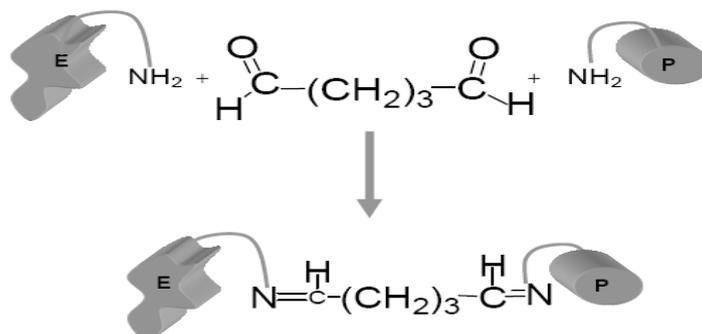


Figure I. 9. Principe de la réticulation au glutaraldéhyde (P = protéine inactive et E =enzyme) [H. Barhoumi, 2006]

Parmi les biocapteurs les plus récents construits sur ce principe, on peut citer: le biocapteur de glucose de Wei Wang et coll. reposant sur l'immobilisation de la glucose oxydase sur des réseaux de nanotubes de dioxyde de titane [W. Wang et coll., 2014], le biocapteur d'acétylcholine de Elif Aynaci et coll. réalisé à partir de l'acétylcholinestérase et la choline oxydase immobilisées sur un film de polypyrrole-polyvinylsulphonate [E. Aynaci et coll., 2014], et le biocapteur de composés phénoliques de Yousheng Zou et coll. formé à partir de la tyrosinase immobilisée sur un film de nanocristaux de diamant dopé au bore [Y. Zou et coll., 2015].

I.5. Conclusion

Malgré le coût relativement important des enzymes, le développement et la commercialisation de nombreux biocapteurs enzymatiques continuent de connaître un essor considérable. Chaque type de biocapteur comporte à la fois des points forts et des points faibles. Les biocapteurs électrochimiques à base d'enzyme sont souvent assez aisés à fabriquer en les comparant avec les autres types de biocapteurs. Pour contrôler l'état de fixation des enzymes sur les électrodes et leurs performances (sensibilité, domaine de réponse linéaire, sélectivité,

reproductibilité, limite de détection), il est nécessaire d'étudier à la fois les détections ampérométrique et potentiométrique. Cependant, le manque de stabilité dans le temps et la difficulté de fabrication sont les problèmes les plus souvent cités, affectant la qualité de la détection.

Le choix de la matrice hôte est déterminant par rapport à l'immobilisation de l'espèce biologique et des performances du biocapteur. Les matrices les plus utilisées sont les polymères, les sol-gels de silice et les argiles cationiques ou anioniques également appelées hydroxydes doubles lamellaires. Nous allons aborder ces dernières dans le paragraphe suivant. Les recherches actuelles sont orientées vers la création et l'amélioration des matrices d'immobilisation déposées sur le transducteur ou vers le greffage covalent de la molécule directement sur le transducteur.

II. GÉNÉRALITÉS SUR LES HYDROXYDES DOUBLES LAMELLAIRES (HDLs)

Depuis la fin des années 1960, les hydroxydes doubles lamellaires (HDLs) ont beaucoup attiré l'attention par leurs propriétés d'échange anionique ou électronique, et leurs propriétés magnétiques. Les recherches actuelles visent essentiellement à la préparation de nouveaux composés, la mise en œuvre de nouvelles méthodes de préparation et de nouvelles applications. Nous allons dans le paragraphe suivant aborder leurs structure et méthodes de synthèse ainsi que quelques domaines d'application.

II.1. Structure de base et propriétés

La structure des HDLs découle de celle de la brucite ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) qui se présente comme une superposition de feuillets plans d'octaèdres $\text{Mg}(\text{OH})_6$ dont la cohésion est assurée par des liaisons hydrogène. Les octaèdres sont liés entre eux par leurs arêtes et chaque ion hydroxyle est partagé entre trois octaèdres [J. Wang et coll., 2004]. Les HDLs sont composés, eux, de feuillets de métaux divalents et trivalents, séparés par des espaces interfeuillets où s'intercalent des contre-ions (les anions) et des molécules d'eau pour assurer la neutralité globale de la structure (Figure I.10).

Une combinaison complexe d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogène dans l'espace interfeuillelet assure la cohésion entre deux feuillets successifs. Ces liaisons se

modifient constamment dans le temps, donnant aux interfeuillets une structure désordonnée, le désordre étant essentiellement lié à la présence de molécules d'eau. Il est donc généralement difficile de donner une description structurale du domaine interfeuillet. Cependant, dans le cas des HDLs formés par des anions simples ($A^{n-} = \text{Cl}^-$ ou CO_3^{2-} par exemple), les anions occupent des sites bien définis [S. A. Solin e coll., 1996 ; M. Khaldi et coll., 1998]. Les groupes hydroxyles adjacents aux cations trivalents sont eux caractérisés par leur polarisation importante et ils interagissent beaucoup avec les anions dans les interfeuillets ; cette forte interaction est vraisemblablement à l'origine des capacités limitées de gonflement des HDLs.

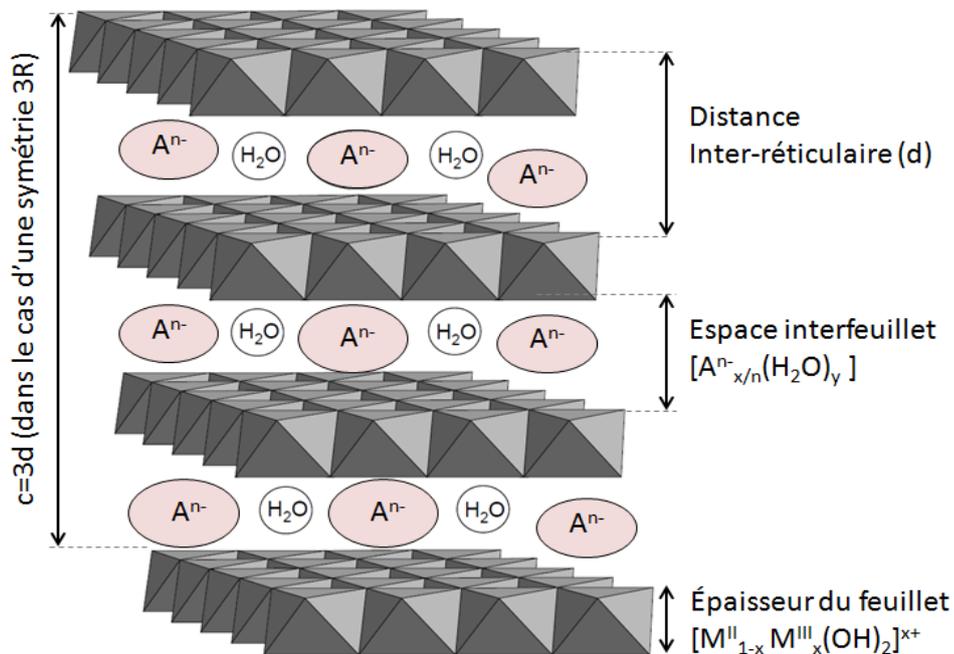


Figure I. 10. Schéma de l'empilement dans un HDL. A^{n-} représente les anions, M^{II} les cations divalents et M^{III} les cations trivalents.

La formule générale de ce type de matériau est $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x(\text{OH})_2]^{x+} A^{n-x/n}(\text{H}_2\text{O})_y$. Non seulement la nature et les proportions relatives des cations divalents et trivalents dans les feuillets sont modifiables, mais aussi la nature des anions intercalés dans les inter-feuillets ce qui conduit à une grande diversité d'HDLs. Dans la formule :

- M^{II} représente les cations métalliques divalents (exemples : Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , ...);
- M^{III} représente les cations métalliques trivalents (exemples : Al^{3+} , Cr^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} , ...);

- A^{n-} représente les anions (exemples: Cl^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Br^- , I^- , NO_3^- , ClO_4^- , ...);
- $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x(OH)_2]^{x+}$ représente la composition du feuillet;
- $A^{n-}_{x/n}(H_2O)_y$ représente la composition de l'inter-feuillet.

II.2. Méthodes de synthèse

Dans les années 1930, Feitknecht a réalisé la synthèse des premiers HDLs en précipitant une solution aqueuse diluée de sels métalliques avec une base [W. Feitknecht et coll., 1935 ; W. Feitknecht, 1942]. Le développement des recherches a ensuite amélioré cette synthèse et donné naissance à différentes méthodes [Ch. Vaysse, 2001 ; E. Géraud, 2006]. Les trois méthodes les plus connues actuellement sont la co-précipitation directe, l'échange anionique (les plus utilisées) et la reconstruction. De nouvelles méthodes sont également apparues telles que la méthode hydrothermale, la méthode de «chimie douce», la synthèse à la surface d'un support et l'électrosynthèse.

II.2.1. La co-précipitation directe

La co-précipitation consiste à provoquer la précipitation simultanée des cations métalliques par ajout d'une espèce basique (NaOH, KOH) à une solution de sels métalliques correspondants (divalents et trivalents) pris en proportions adéquates pour avoir un rapport M^{II}/M^{III} fixé (Figure I.11).

Les meilleurs résultats sont obtenus en maintenant la température et le pH à des valeurs constantes pendant toute la durée de la synthèse pour permettre la coprécipitation des deux sels métalliques sous forme d'une phase homogène d'hydroxydes. La valeur du pH dépend de la nature des cations métalliques utilisés. Afin d'éviter la formation d'une phase d'ions carbonate intercalés, il est préférable que la préparation se fasse sous atmosphère exempte de CO_2 (généralement sous un flux d'azote). Cette méthode permet aussi de choisir la nature de l'anion à intercaler lors de la formation du matériau.

En dehors de la température et du pH, la vitesse d'ajout des sels et l'agitation influencent les propriétés des HDLs synthétisés.

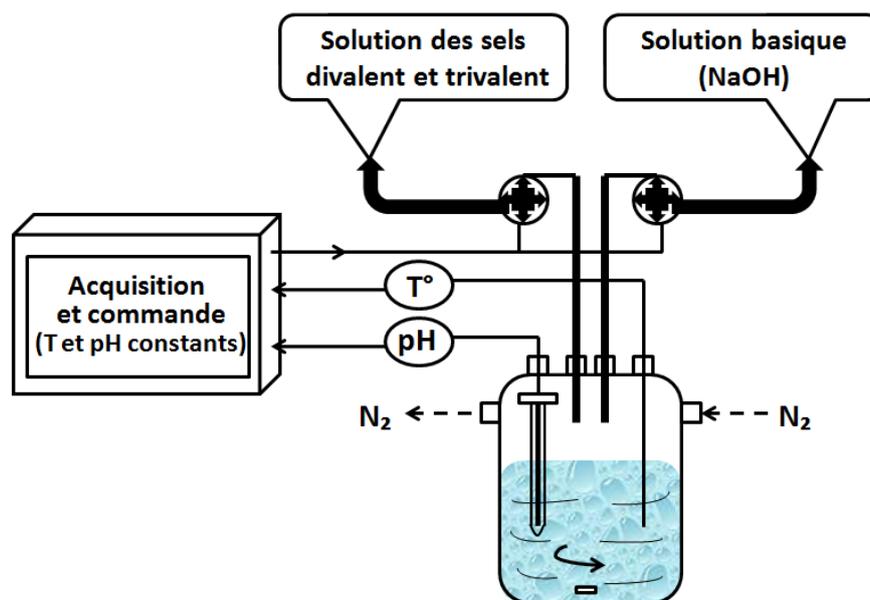


Figure I. 11. *Dispositif expérimental de la synthèse des HDLs par co-précipitation* [inspirée de K. Charradi et coll., 2010]

A titre d'exemples, on peut citer [G. Mascolo et coll., 2015] :

- La synthèse directe d'HDL-MgAl à partir de mélanges de MgO et de xérogel d'alumine en milieu aqueux ;
- La synthèse directe d'HDL-LiAl à partir de xérogel d'alumine dissoute et de LiOH.H₂O ;
- La synthèse directe d'HDL-CaAl à partir d'un mélange de CaO fraîchement calciné¹⁸ et de xérogel d'alumine ;
- La synthèse d'HDL-MgAl avec intercalation d'anions OH⁻ à partir d'un mélange d'hydroxydes de magnésium et d'aluminium en milieu aqueux.

Malheureusement, la complexation des métaux présents dans la solution limite (pour certains HDLs) l'utilisation de cette méthode de synthèse. La préparation se fait alors par d'autres voies telles que l'échange anionique.

II.2.2. L'échange anionique

Cette méthode repose sur le principe d'une réaction topotactique, en opposition à une réaction chimique classique en solution. Une réaction chimique conduit généralement à la disparition du composé initial et à l'apparition du produit de la réaction formé à partir des "briques" libérée dans la solution. Une réaction topotactique se produit, elle, entre deux composés ayant

¹⁸ La calcination est une opération consistant à chauffer intensément dans une enceinte fermée un corps inerte, afin de le décomposer ou d'obtenir des réactions chimiques.

une structure cristalline proche, sans qu'il y ait de bouleversements importants de cette structure.

Dans le cas des HDLs, la structure iono-covalente des feuillets est ainsi conservée, alors que les liaisons plus faibles anions/feuillets sont cassées. Cependant, tous les anions ne sont pas équivalents en termes de capacité d'échange. Les anions nitrates (NO_3^-), présentant une affinité plus faible par les feuillets métalliques, s'échangent plus facilement que les ions chlorure (Cl^-) ou carbonate (CO_3^{2-}) [Ch. Vaysse, 2001 ; E. Géraud, 2006].

De nombreux ions organiques et inorganiques ont été ainsi incorporés par cette méthode dans des HDLs : carboxylates [J. Zhang et coll., 2004], phosphonates [G.R. Williams et coll., 2006], naproxen [M. Wei et coll., 2004], dérivés de β -cyclodextrine [J.H. Choy et coll., 2004], sulfonates [Y. Feng et coll., 2006], ions phosphate [M. Badreddine et coll., 1999], ions complexes métalliques [R. Rojas et coll., 2009].

II.2.3. La reconstruction

Les HDLs se caractérisent par leur pouvoir de se régénérer après calcination et formation d'oxydes mixtes. On parle alors de l'effet mémoire des HDLs. En effet, quand l'anion est détruit dans le domaine de température de calcination, il peut être remplacé par un autre anion. On peut ainsi citer :

- le remplacement d'ions CO_3^{2-} par Cl^- dans un HDL de ZnCrCO_3 pour former le ZnCr-Cl [H.P. Boehn et coll., 1977] ;
- la synthèse d'HDL de CdCrCl à partir de CdO et CrCl_3 [E. Zhou et coll., 1999] ;
- la synthèse d'HDL de MgAlCO_3 à partir du mélange MgO et Al_2O_3 [T. Stanimirova et coll., 2003] ;
- l'intercalation d'acides aminés et de peptides dans le HDL MgAl [H. Nakayama et coll., 2014] ;
- l'intercalation d'ions Eu^{3+} dans le HDL MgAl [Y. Zhao et coll., 2012] ;
- la synthèse de l'oxyde mixte ZnGaAl issu de la calcination de ZnAl [J. Prince et coll., 2015].

Après calcination, les propriétés du HDL régénéré ne sont pas toujours réversibles, le changement de la structure cristallographique du HDL initial étant possible. A titre d'exemple, la structure octaédrique que forme le cation Al^{2+} dans le HDL se transforme en structure tétraédrique après calcination [G. Mascolo et coll., 2015]. Pour cette raison, selon P.

Kowalik le terme « reconstruction » devrait être utilisé uniquement lorsque la réaction du HDL calciné permet de récupérer à la fois la structure et la composition de l'ex-HDL [P. Kowalik et coll., 2013].

II.2.4. Autres méthodes de synthèse

II.2.4.1. Méthode hydrothermale

Cette méthode consiste à utiliser des oxydes ou hydroxydes insolubles (hydroxydes de calcium et d'aluminium par exemple) comme source de cations pour interagir avec un sel fournissant l'anion à intercaler [G. Renaudin et coll., 2004]. Ce dernier a une très faible affinité vis-à-vis des HDLs et n'entre en rivalité dans ces conditions qu'avec l'ion hydroxyde OH⁻ [G. Renaudin et coll., 2000].

Cette méthode a été utilisée pour synthétiser des microsphères poreuses de HDL de type ZnAl en employant l'hexaméthylènetétramine comme agent de précipitation, le dodécyl benzène sulfonate de sodium (SDBS) comme agent tensio-actif et le tartrate de sodium, le citrate de sodium et le salicylate de sodium (SS) en tant qu'agents directeurs de structure. Les résultats de la caractérisation des microsphères synthétisées indiquent que le HDL-ZnAl/ SDBS modifié est caractérisé par une variété de morphologies et de volumes des pores [Y. Sun et coll., 2014].

II.2.4.2. Méthode de « chimie douce »

L'idée d'utiliser la « chimie douce » comme méthode pour la synthèse des HDLs a été proposée par Delmas et coll., dans les années 1990 [L. Demourgues-Guerlou et coll., 1993 ; K.S. Han et coll., 1996], afin de remédier à certains problèmes de cristallinité et de composition chimique du produit.

Cette chimie est dite douce car elle est écologique et respectueuse de l'environnement. Elle est fondée sur des réactions de polymérisation minérale réalisée à des températures peu élevées, à partir de précurseurs moléculaires tels que des sels métalliques ou des alcoxydes métalliques, dans des milieux aqueux ou hydro-alcooliques. Cette chimie des matériaux hybrides exploite toute la souplesse et la versatilité offerte par la chimie moléculaire et supramoléculaire [C. Sanchez et coll., 2010].

Des HDLs à base de nickel de type $[\text{Ni}_{1-x} \text{Co}_x(\text{OH})_2] \text{X}_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$, incorporant des anions X^{n-} de petite taille (CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , OH^-) ou de grande taille (anions métavanadates) ont été synthétisés. Cependant, la méthode de chimie douce ne s'applique que pour former un nombre limité d'HDLs car elle nécessite des cations métalliques avec une configuration 3d, ayant plusieurs états d'oxydation, et un composé initial lamellaire pour réaliser l'intercalation des anions [I. B. Assaker, 2009].

II.2.4.3. Synthèse à la surface d'un support

Certains HDLs peuvent être formés *via* une réaction chimique qui se produit à la surface d'un support. On aboutit ainsi à des composés fonctionnels parfaitement dispersés utilisables tels quels ou comme supports pour d'autres composés. Ainsi, la synthèse des HDLs CoAl-CO_3 , NiAl-CO_3 ou ZnAl-CO_3 à la surface d'alumines $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ou $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (sous forme de particules ou de films anodiques) a été réalisée en faisant réagir partiellement ces alumines avec des solutions contenant des ions Co^{2+} , Ni^{2+} ou Zn^{2+} sous forme d'un complexe aminé. Ce dernier donne à la solution un pH légèrement alcalin [J.L. Paulhiac et coll., 1993].

II.3. Propriétés des HDLs

Les HDLs constituent une famille de matériaux aux propriétés chimiques et physicochimiques uniques [I. B. Assaker, 2009 ; B. Li et coll., 2004 ; G. Mascolo et coll., 2015 ; J. H. Choy et coll., 2007]:

- Les HDLs ont des propriétés physico-chimiques et morphologiques modulables, qui dépendent de leur mode de synthèse. Leur diversité dépend de la nature des cations métalliques et des anions intercalés ;
- L'interfeuille permet l'insertion d'anions simples, d'oxo-anions, de polyoxo-anions, de complexes métalliques (porphyrines, phthalocyanines), d'anions organiques, de polymères chargés négativement ou de molécules très variées ;
- L'absence de toxicité de ces matériaux facilite leur manipulation ;
- Ils ont de grandes capacités d'échange anionique (comprises entre 200 et 400 meq/100g) qui dépendent de la nature de l'anion présent dans l'interfeuille et de la densité de charge des feuillets. Plus la densité de charge du feuillet est élevée, plus la réaction d'échange est difficile ;

- Ils possèdent une surface spécifique¹⁹ élevée (> 100 m²/g) et peuvent former, après traitement thermique, des phases spinelles²⁰ très recherchées dans le domaine catalytique ;
- Grâce à leur effet mémoire, ils sont capables de reconstruire la structure lamellaire envisagée quand le produit calciné est en contact avec des solutions aqueuses contenant les anions à intercaler (voir II.2.3.) [G. Mascolo et coll., 2015] ;
- Les HDLs ont une bonne affinité avec les biomolécules et apparaissent comme des matrices privilégiées pour l'immobilisation de différentes enzymes qui présentent dans la majorité des cas des points isoélectriques bas et des charges de surface globalement négatives.

De manière générale, les HDLs permettent une chimie d'intercalation très riche vis-à-vis des molécules inorganique et organiques, et des biomolécules. Un choix approprié d'intercalants pourra donc apporter de nouvelles fonctionnalités aux HDLs (catalyse, électro-activité, conduction, coloration, bioactivité).

II.4. Applications des HDLs

Les propriétés des HDLs décrites précédemment expliquent leur utilisation dans différents domaines d'application.

II.4.1. Applications en (bio)-catalyse

Les HDLs peuvent jouer le rôle de catalyseurs fiables, stables et réutilisables pour certaines synthèses chimiques comme la cyanoéthylation d'alcools catalysée par l'hydrotalcite Mg-Al [P. Kumbhar, 1998]. Des HDLs de type M-Al-CO₃ (avec M = Mg, Ni, Cr, Co, Mn) ont aussi été utilisés comme support de catalyse [F. Li et X. Duan, 2006]. Les propriétés physico-chimiques des HDLs permettent (après traitement thermique) d'obtenir une grande surface spécifique ainsi que des espèces spinelles très recherchées dans le domaine catalytique. Des essais ont notamment concerné la synthèse de biodiesels [D. G. Cantrell et coll., 2005]. D'une

¹⁹ La surface spécifique représente la surface totale par unité de masse du produit accessible aux atomes et aux molécules extérieurs. Il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise.

²⁰ La structure des spinelles est basée sur l'empilement 3C (coordinence en carbone) et les deux types de cavités, octaédrique et tétraédrique, sont occupés à la fois, mais partiellement. La formule générale des spinelles est X₂YO₄ : on distingue les spinelles « normales » (N) et « inverses » (I), selon que les deux cations X occupent deux octaèdres ou un octaèdre et un tétraèdre - le cation Y allant dans la cavité laissée libre par X.

manière générale, les HDLs présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour des applications électro-analytiques [Tonelli et coll., 2013].

Ces matériaux sont également intéressants comme matrices d'immobilisation d'enzymes. Le Tableau I.4 donne quelques exemples tirés de la littérature scientifique pour des applications dans l'élaboration des biocapteurs.

HDL	Enzyme	Méthode	Référence
ZnCr-Cl	GOD	Adsorption	[D.Shan et coll., 2003]
ZnAl-Cl			[S.Cosnier et coll., 2006]
ZnAl-Cl			[D.Shan et coll., 2006]
MgAl-FcSO ₃			[M.Colombari et coll., 2007]
MgAl-FcSO ₂			
FcMeOH/ZnAl-Cl			[D.Shan et coll., 2007]
ZnCr-FcPSO ₃			[C. Mousty et coll., 2009]
ZnAl-Cl/Chitosan			[Q. Shi et coll., 2008]
NiAl-NO ₃			[E. Scavetta et coll., 2008]
NiAl-NO ₃			Electro-déposition
ZnAl-Glut-GA		Greffage	[C. Forano et coll., 2006]
ZnCr-ABTS	HRP/GOD	Adsorption	[D. Shan et coll., 2006]
NiAl-NO ₃	HRP	Adsorption	[X. Chen et coll., 2008]
ZnCr -ABTS	HRP/catalase	Adsorption	[H. Chen et coll., 2008]
ZnAl-Cl	PPO	Adsorption	[D. Shan et coll., 2003]
			[D. Shan et coll., 2004]
ZnAl-Cl/Chitosan			[Q. Fan et coll., 2007]
ZnAl-Cl	PPO/ AcP	Adsorption	[S. Cosnier et coll, 2006]
ZnCr-ABTS	Laccase	Adsorption	[C. Mousty et coll., 2007]
ZnCr -AQS	NiR	Adsorption	[H. Chen et coll., 2007]
ZnAl-Cl	AIP	Adsorption	[E.Geraud et coll., 2008]
MgAl-Cl		Coprécipitation	[C. Mousty et coll., 2008]
ZnAl-Cl	Uréase	Adsorption	[V.De Melo et coll., 2002]
		Délamination/ Reconstruction	[H.Barhoumi et coll., 2005- 2006]
		Coprécipitation	[S.Vial et coll., 2006-2008]

ZnAl-Cl MgAl-Cl	Trypsine	Adsorption Coprécipitation	[H.Mansouri et coll., 2009]
MgAl-NO ₃	PGA	Calcination/ Reconstruction	[L. Ren et coll., 2001]
MgAl-Glutamate		Greffage	[L. Ren et coll., 2002]
ZnAl-NO ₃ ZnAl-DDS	Lipase	Adsorption	[MBA.Rahman et coll., 2004]
MgAl-NO ₃ MgAl-DDS			[MBA.Rahman et coll., 2004]
NiAl-NO ₃			[MBA.Rahman et coll., 2004]
MgAl-NO ₃			[F.Yagiz et coll., 2007]
MgAl-NO ₃			[Z.Hong-Yang et coll., 2009]
MgAl -lactate	Lipase	Adsorption	[Z.An et coll., 2009]
MgAl-NO ₃	Broméline	Calcination/ Reconstruction	[W.Shi et coll., 2007]
ZnAl-Azelate	LOX	Adsorption	[R.Morales Borges et coll., 2009]
ZnAl-Cl	Chymotrypsine	Adsorption	[C.Forano et coll., 2006]
MgAl- NO ₃ /PAAAm	CA	Adsorption	[Y.T.Zhang et coll., 2009]

Abréviations : ABTS : 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate, AcP : acid phosphatase, AIP : alcaline phosphatase, CA : carbonique anhydrase, DDS : dodécylsulfonate, Fc : ferrocene, GOD : glucose oxydase, HRP, peroxydase de raifort, LOX : lipoxygénase, NiR : nitrite réductase, PAA-Aam : poly(acrylic) acide-co-acrylamide, PGA : pénicilline G acylase, PPO : polyphénols oxydase ou tyrosinase.

Tableau I. 4. Immobilisation d'enzymes par des HDLs pour des applications dans le domaine des biocapteurs [K.Charradi, 2010].

II.4.2. Applications en échange ionique et/ou adsorption

Les HDLs ont la capacité de piéger, soit des espèces chargées négativement comme les oxo-anions (NO³⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, SeO₃²⁻, CrO₄²⁻, Cr₂O₇²⁻) [L. Chatelet et coll., 1996 ; J. Das et coll., 2002] ou les anions simples (halogène :F, Cl, Br, I) [P. M. S. Monk et coll., 1994], soit des espèces chargées positivement comme des cations métalliques ou des métaux lourds (Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺) [A. Tsyganok et coll., 2006 ; M.R. Pérez et coll., 2006] par adsorption en surface et/ou par échange anionique. Ceci est rendu possible grâce à leur surface spécifique

élevée et à la flexibilité de l'espace interfeuille. Les HDLs sont ainsi utilisables pour des applications de dépollution des sols [M. Park et coll., 2004] ou des eaux [X. Liang et coll., 2013], ou comme tamis moléculaires et stabilisateurs [L. Dussault, 2005].

II.4.3. Applications en médecine

Certains HDLs sont depuis longtemps utilisés comme agents anti-inflammatoires [P. Grubel et coll., 1997 ; M. Del Arco et coll., 2004] et comme agents chélateurs des ions phosphate dans le fluide gastro-intestinal afin de prévenir l'hyperphosphatémie [A. Ookubo et coll., 1992]. Plus récemment, grâce à leur biocompatibilité, certains HDLs comme l'hydrotalcite ont été incorporés dans des formulations pharmaceutiques en tant que matrices de molécules pharmaceutiques, comme l'anti-inflammatoire fenbufen [B. Li et coll., 2004] ou une molécule utilisée dans le traitement de l'ostéoporose [H. Nakayama et coll., 2003]. Dans ces applications, les HDLs participent non seulement dans la préservation des molécules pharmaceutiques lors de leur stockage mais aussi dans le contrôle de leur libération dans l'organisme [I.B. Assaker, 2009].

En outre, l'intercalation des vitamines A (acide rétinoïque), C (acide ascorbique) et E (tocophérol) dans des HDLs à base de Zn-Al par la méthode de coprécipitation, leur permet d'acquérir une stabilité vis-à-vis de la lumière, de la chaleur et de l'oxygène [J.-H. Choy et coll., 2007].

Enfin, les HDLs comme l'hydrocalumite de carbonate et l'hydrotalcite présentent aussi des propriétés antiacides [C. F. Linares et coll., 2016] et antipeptine [D. H. Kima et coll., 2008].

II.4.4. Applications en électrochimie

De nombreuses études se sont concentrées sur l'utilisation des HDLs en tant qu'électrolytes et conducteurs protoniques et il a été mis en évidence que ces matériaux possèdent une conduction protonique élevée [A. DeRoy et coll., 1985-89 ; M. Lal et coll., 1981].

Les HDLs ont de bonnes performances dans la conduction ionique qui peuvent être attribuées aux échanges protoniques entre les feuillets hydroxylés et les molécules d'eau interfoliaires et à la mobilité des anions insérés. Ils sont donc intéressants comme support pour des électrodes modifiées [K. Itaya et coll., 1987 ; S. Therias et coll., 1995] et ont été, entre autres, utilisés dans la conception d'un capteur de gaz [S. Morandi et coll., 2006].

II.5. Conclusion

En conclusion, la coprécipitation directe demeure une des meilleures méthodes de synthèse des HDLs, rapide, simple, et peu coûteuse.

Les HDLs sont utilisés dans différents domaines d'application (résumés dans la Figure.I.12) grâce à leurs propriétés variées, leur faible coût, leur souplesse, leur capacité de recyclage, leur faible toxicité et leur surface spécifique élevée.

Pour ces raisons, ils constituent une grande tendance dans le domaine de l'électrochimie et la biocatalyse où ils rivalisent avec d'autres matériaux utilisés pour la fonctionnalisation des électrodes et l'immobilisation des enzymes.

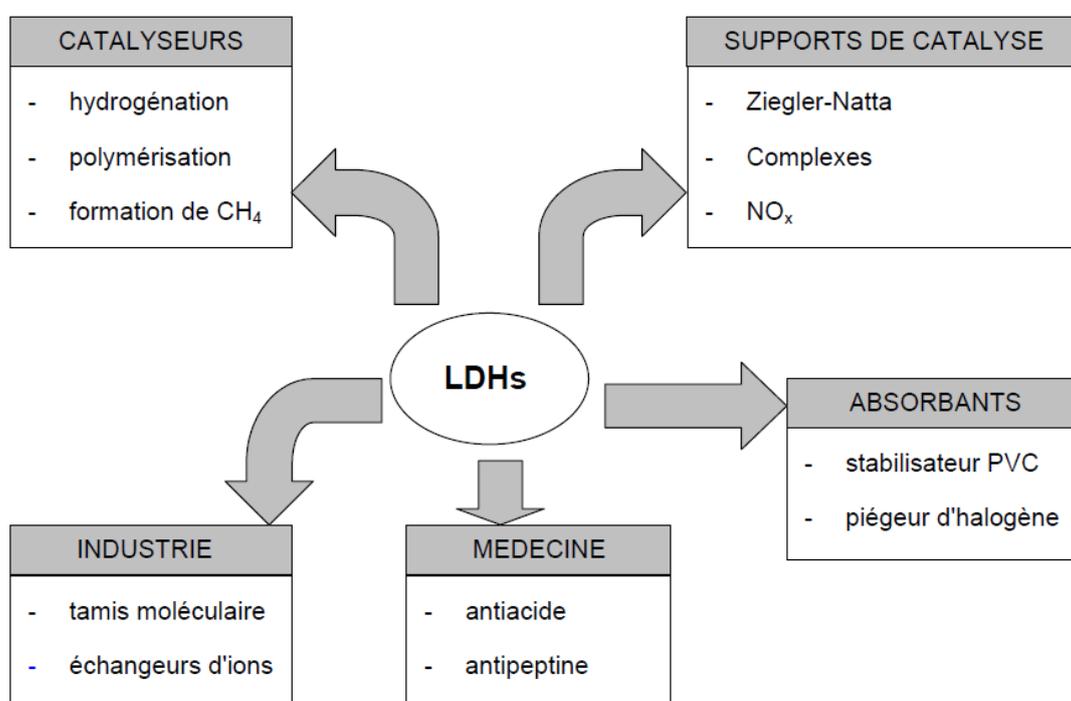


Figure I. 12. Divers domaines d'applications des HDLs [C. Vaysse, 2001]

C'est pourquoi, nous avons choisi ce type de matériau pour fonctionnaliser notre électrode de travail et immobiliser notre enzyme, la tyrosinase, afin de développer un biocapteur pour la détection des polyphénols. Nous allons dans la dernière partie de ce chapitre aborder la structure des polyphénols en nous concentrant sur le cas des polyphénols de thé utilisés dans cette thèse, ainsi que la structure et le fonctionnement de la tyrosinase.

III. GÉNÉRALITÉS SUR LES POLYPHÉNOLS ET LA TYROSINASE

III.1. Les polyphénols

III.1.1. Fonctions et problématique

Les polyphénols sont des molécules générées par le métabolisme des végétaux. Ils sont impliqués dans leur résistance aux infections microbiennes et virales, ou aux mauvaises conditions climatiques [H. Gouzi, 2014]. En tant que constituants des végétaux, ils sont logiquement présents dans les aliments d'origine végétale.

Dans un contexte agroalimentaire, ces molécules influencent directement la qualité des légumes (couleur, arôme, et texture) ou le parfum de différentes boissons telles que le café, le thé, les jus de fruits et le vin [C. Manach et coll., 2004].

Depuis de nombreuses années, les polyphénols attirent également l'attention du fait de leur impact positif sur la santé humaine (leurs propriétés bénéfiques ont également été démontrées chez l'animal, comme le lapin par exemple [A. Brenes et coll., 2016 ; A. Scalbert et coll., 2005]). Ils ont ainsi des vertus anti-oxydantes, anti-fongiques, anti-inflammatoires ou anti-cancérigènes, et des propriétés protectrices vis-à-vis du système cardiovasculaire [J. M. de Mello Andrade et coll., 2014 ; K.S. Bhullar et H.P.V. Rupasinghe, 2015].

Pour ces raisons, la famille des polyphénols présente un grand intérêt dans différents domaines, agroalimentaires, pharmaceutiques ou environnementales [A. Scalbert et coll., 2002 ; Q.V. Vuonga et coll., 2014], ce qui implique d'élaborer des méthodes de détection et d'analyse rapides et efficaces.

Dans ce contexte, le coût élevé et les temps de rotation lents des méthodes photométriques et chromatographiques conventionnelles imposent le développement de techniques analytiques plus rapides. Pour répondre à ce besoin, le développement d'un détecteur simple à utiliser, peu coûteux, jetable (accessible) et fortement sensible aux polyphénols, devient de plus en plus urgent, ce qui motive cette étude.

III.1.2. Structure générale

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques hydrosolubles caractérisées par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ils peuvent être classés en différents

groupes en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des groupements se liant à ces derniers.

On peut citer par exemple (Figures I.13 et I.14) [A. Scalbert et coll., 2002 ; C. Manach et coll., 2004] :

- les tanins (*hydroxybenzoic acids & hydroxycinnamic acids*) ;
- les flavonoïdes (*flavonoids*) regroupant les flavones (dont la quercétine, flavonoïde le plus étudié), les flavonones, les flavanols (dont les catéchines) et les anthocyanines ;
- les stilbènes (*stilbenes*) (cas du resvératrol, polyphénol connu par son utilisation en cosmétique) ;
- les lignanes (*lignans*).

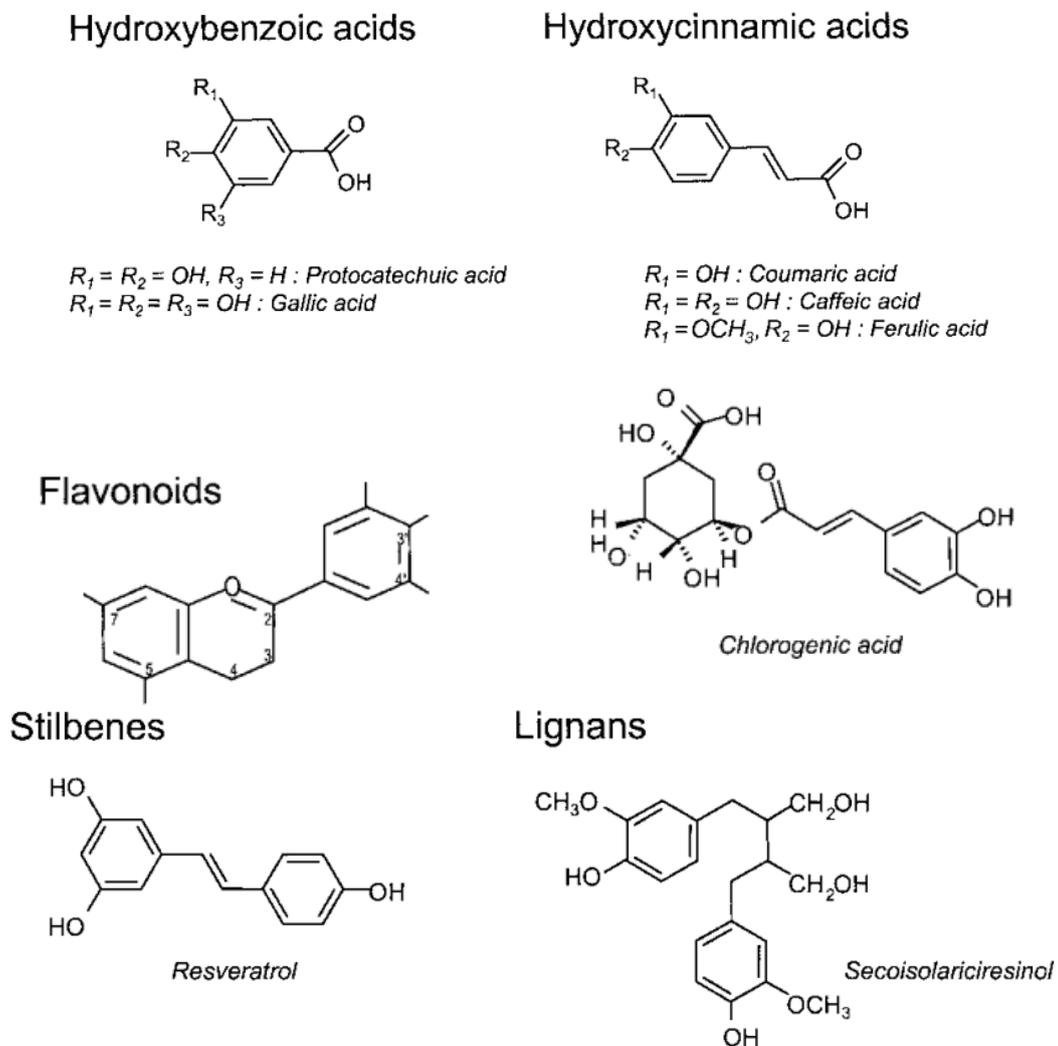


Figure I. 13. Structures chimiques de polyphénols [C. Manach et coll., 2004].

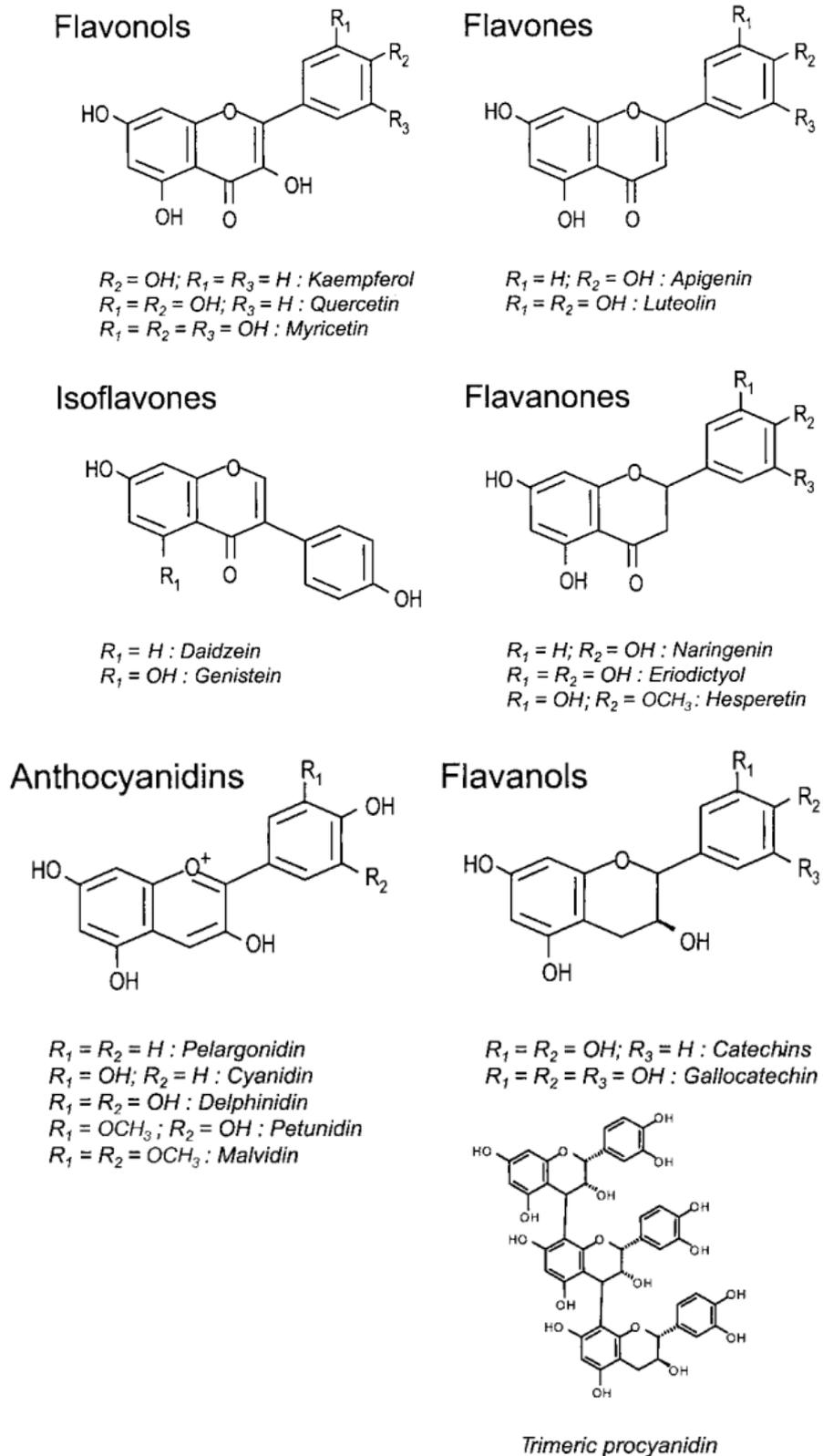


Figure I. 14. Structures chimiques des flavonoïdes [C. Manach et coll., 2004].

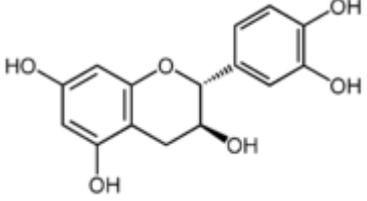
III.1.3. Sources : exemples du café et du thé

Les principales sources alimentaires de polyphénols sont le café (36,9%), le thé (33,6 %), le chocolat (10,4 %), le vin (7,2 %) et les fruits (6,7 %), suivi des oléagineux, du soja et de la bière²¹.

La composition en polyphénols varie d'une source à une autre. Par exemple, la pulpe fraîche de café contient surtout des acides hydroxycinnamiques (14 g/kg) et des procyanidines (20 g/kg) ; ces derniers ont une structure homogène, basée essentiellement sur la (-)-épicatéchine, et relativement peu polymérisée. L'exposition à l'air (oxydation) affecte peu les acides hydroxycinnamiques contrairement aux catéchines et aux procyanidines [M.A. Ramirez-Coronel et coll., 2004 ; E. R. Prata et coll., 2007].

Dans le cas du thé, les principaux composés phénoliques appartiennent à la famille de la catéchine, également connu sous le nom flavan-3-ol, constituant jusqu'à 30 % du poids de matière solide du thé, tandis que d'autres flavonols sont également présents (jusqu'à 4%) [P. A. Kilmartin et coll., 2003]. En raison de la présence de deux carbones asymétriques, la catéchine existe sous 4 formes stéréoisomériques qui sont présentées dans le Tableau I.5 [J. J. Dalluge et coll., 2000 ; Y. S. Lin et coll., 2003 ; P. A. Kilmartin et coll., 2003]. Le thé contient aussi des dérivés de catéchine et de la caféine [S. T. Saito e coll., 2006].

Nous détaillerons ici le cas du thé car les polyphénols utilisés dans cette étude sont extraits du thé vert. Les molécules présentes dans le Tableau I.5 sont donc représentatives du mélange de polyphénols utilisé, même si la composition des polyphénols varie d'un thé à un autre, selon le traitement ou les conditions de stockage [S. T. Saito et coll., 2006 ; S. Nadifiyine et coll., 2013].

Nom	Configuration	Structure chimique	Masse molaire
(+)-catéchine C	(2R, 3S)		290 g/mol (formule brute : C ₁₅ H ₁₄ O ₆)

²¹ Il s'agit des pourcentages en masse.

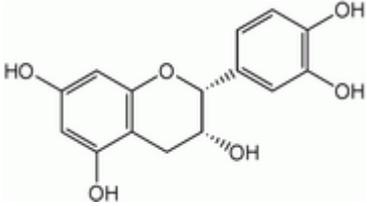
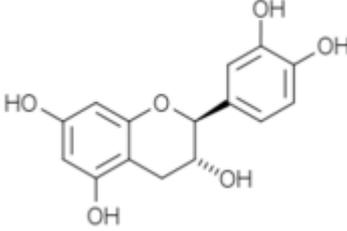
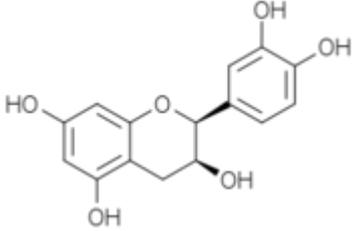
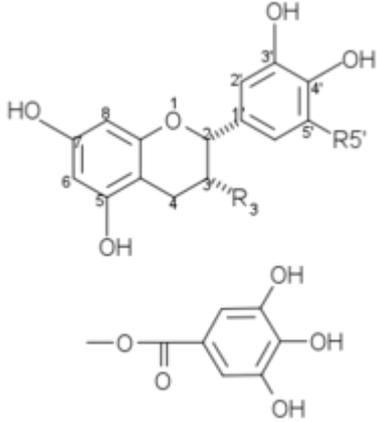
(-)-épicatéchine EC	(2R, 3R)		290 g/mol
(-)-catéchine	(2S, 3R)		290 g/mol
(+) -épicatéchine	(2S, 3S)		290 g/mol
(-)-épigallocatechine 3-gallate EGCG	(2, 3- <i>cis</i>)	 <p>G groupe galloyl R₃ = G et R'₅ = OH</p>	458 g/mol (Formule brute C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁)
(-)-épigallocatechine EGC	(2, 3- <i>cis</i>)	Même formule avec R ₃ = OH et R' ₅ = OH	306 g/mol (Formule brute C ₁₅ H ₁₄ O ₇)
(-)-épicatéchine 3- gallate ECG	(2, 3- <i>cis</i>)	Même formule avec R ₃ = G et R' ₅ = H	442g/mol (Formule brute C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀)

Tableau I. 5. Les structures chimiques des stéréoisomères de catéchine extrait du thé vert

Dans cette étude, le choix du thé vert comme source de polyphénols est justifié par l'intérêt très important qu'ils présentent dans les domaines de la santé et de l'environnement [S.T.Saito et coll., 2006]. En effet:

- ils sont des agents de chimio-prévention efficaces ;
- ils interviennent dans l'amélioration de l'activité de l'insuline ;
- ils sont utilisés comme antimicrobiens et immunostimulants ;
- ils ont des capacités anti-inflammatoires, un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires et les lésions ischémiques cérébrales.

III.2. La tyrosinase

III.2.1. Définition générale

La tyrosinase est une enzyme catalysant l'oxydation des phénols (comme la tyrosine d'où elle tire son nom, la L-tyrosine étant le monophénol majeur dans le règne animal), contenant du cuivre comme cofacteur. Il s'agit donc d'une métallo-enzyme.

La tyrosinase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que des extraits de ce champignon catalysaient l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes [J. Zawistowski et coll., 1991 ; J.R. Whitaker et coll., 1995 ; L. Vámos-Vigyázó et coll., 1981].

III.2.2. Les deux types de tyrosinase

Il existe deux types de tyrosinase, définis par leur activité enzymatique et classés dans les catégories EC 1.14.18.1 et EC 1.10.3.1 par l'Union Internationale de la Biochimie (IUB).

- EC 1.14.18.1 ou monophénol monoxygénase. Cette enzyme présente deux activités [L. Vámos-Vigyázó, 1981 ; W.Q. Sun et coll., 1992]:

- L'activité monophénolase ou crésolase ou hydroxylase catalysant l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Elle est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons.

- L'activité diphénolase ou catécholase ou oxydase : il s'agit de l'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène. Les *o*-quinones sont des composés

fortement réactifs. Ils peuvent soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge, appelé mélanine²², soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés.

➤ EC 1.10.3.1 ou catécholoxydase. Cette catégorie ne présente que l'activité catécholase [H. Gouzi, 2014].

Ces activités sont décrites dans la Figure I.15.

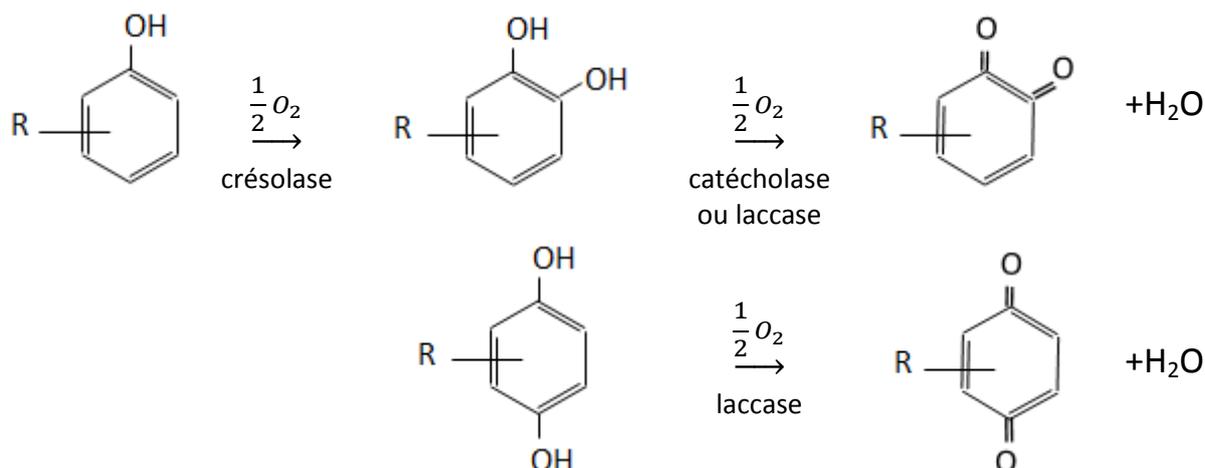


Figure I. 15. Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases [H. Gouzi, 2007].

III.2.3. Sources

La tyrosinase est une enzyme très répandue :

- Chez les végétaux : banane [M.M. Sojo et coll., 1998], pomme de terre [C. Marri et coll., 2003], épinards [J.H. Golbeck et coll., 1981], artichaut [E. Ziyan et coll., 2003], poire [E. Ziyan et coll., 2004], coing [H. Yağar et coll., 2002], pêche [T.C. Wong et coll., 1971], abricot [T. Chevalier et coll., 1999], feuilles de tabac [C. Shi et coll., 2002], cerise [V.B. Kumar Anil et coll., 2008] ...

- Chez les mycètes, plus communément appelés champignons (se distinguant des végétaux par le fait qu'ils sont incapables d'effectuer la photosynthèse) comme les truffes [M. Miranda et coll., 1992-96 ; O. Zarivi et coll., 2003] et autres champignons [H.W. Duckworth et coll., 1970 ; G. Papa et coll., 1994 ; H. Gouzi et coll., 2007] ...

²² Les mélanines sont parmi les principaux pigments biologiques impliqués dans la coloration de la peau, des cheveux et des yeux.

- Chez les animaux. On note que chez l'homme la mutation de la tyrosinase provoque l'albinisme [M. B. Dolinska et coll., 20014] car cette enzyme catalyse normalement la production de mélanine par oxydation à partir de la tyrosine.

La tyrosinase étant largement répandue dans le monde vivant, elle est connue sous différentes appellations résumées dans le Tableau I.6 :

<u>EC 1.14.18.1</u> monophénol monoxygénase	<u>EC 1.10.3.1</u> catécholoxydase
- phénolase	- diphénoloxydase
- monophénol oxydase	- o-diphénolase
- crésolase	- phénolase
- monophénoloxydase	- polyphénol-oxydase (PPO)
- tyrosine-dopa oxydase (DihyrOxyPhénylAlanine)	- tyrosinase
- monophénol monoxydase	- pyrocatéchol-oxydase
- dihydroxyphénylalanine: oxygène oxydoréductase	- catécholase
- N-acetyl-6-hydroxytryptophan oxydase	- o-diphénol: oxygène oxydoréductase
- monophénol, dihydroxy-L- phénylalanine oxygène oxydoréductase	- o-diphénol oxydoréductase
- diphénol: O ₂ oxydoréductase	
- phénol oxydase	

Tableau I. 6. Les différentes appellations de la tyrosinase [IUB]

III.2.4. Classification et structure de l'enzyme utilisée

L'enzyme utilisée dans ce travail de thèse est la tyrosinase extraite du champignon *Agaricus bisporus* appartenant à la catégorie EC1.14.18.1, donc présentant les activités crésolase et catécholase.

C'est une enzyme oligomérique (composée de plusieurs sous-unités) de forme globalement globulaire de 569 acides aminés [S. J. Yin et coll., 2011] ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa (119.5 kDa déterminé par électrophorèse) [J.P. Gillespie et coll., 1991 ; E. Ionita et coll., 2014]. En solution aqueuse, elle présente une association en tétramère (deux

monomères H et deux monomère L) formant une structure de type « H_2L_2 ». Cependant la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition L_2H [E. Ionita et coll., 2014].

La structure secondaire de la tyrosinase est principalement α -hélicoïdale, le cœur de l'enzyme étant constitué par deux atomes de cuivre (site actif catalytique) entourés par quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7 ; Figure I.16) [H. Decker, 2000-2004 ; K. Haghbeen et coll., 2004 ; H. Gouzi et coll., 2014]. Ce cœur central est entouré par d'autres hélices, α_1 et α_4 , et plusieurs coudes β (Figure I.16) [W. T. Ismaya et coll., 2011].

La Figure I.17 montre une vue de l'intérieur du site actif de l'hémocyanine de « *Limulus polyphemus* »²³ obtenue par modélisation moléculaire. Ce site présente une organisation similaire à celle de la tyrosinase d'« *Agaricus bisporus* », caractérisée par 4 atomes de cuivre groupés par paires. Ces atomes forment le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. D'autres protéines comme la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine ont une organisation similaire [H. Gouzi et coll., 2014].

Une présentation schématique de la structure chimique de l'environnement de site binucléaire du cuivre est présentée dans la Figure I.18.

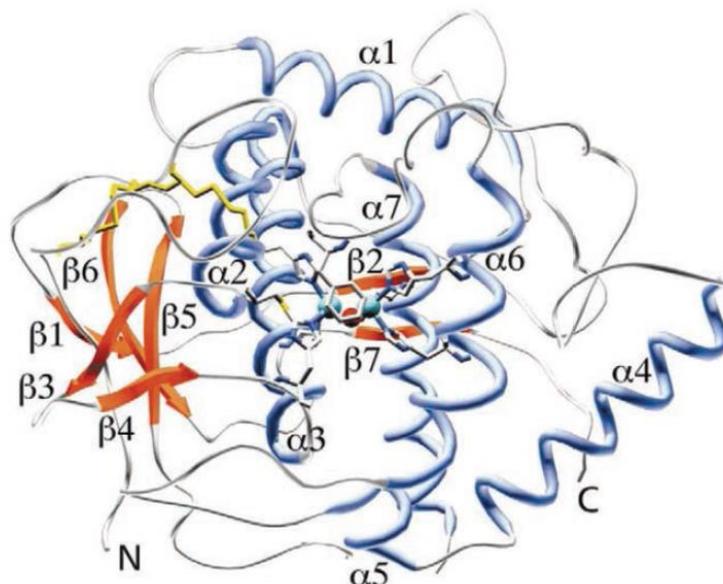


Figure I. 16. Structure de la catéchol oxydase [H. Gouzi et coll., 2014]
(les atomes sont colorés selon leurs natures : carbone en gris, l'azote en bleu, soufre en jaune, oxygène en rouge et cuivre en cyan)

²³ Le « *Limulus polyphemus* » est un arthropode chélicérate marin qui fait partie de la famille des crabes.

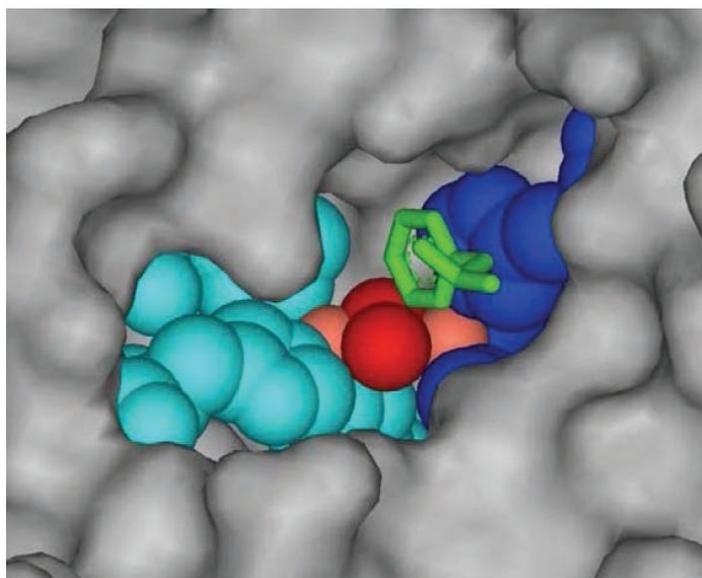


Figure I. 17. *Vue de l'intérieur du site actif de l'hémocyanine de Limulus polyphemus (atomes de cuivre en marron clair, atomes d'oxygène en rouge, et acides aminés de type histidines liés aux atomes de cuivre en bleu).* [H. Gouzi et coll., 2014]

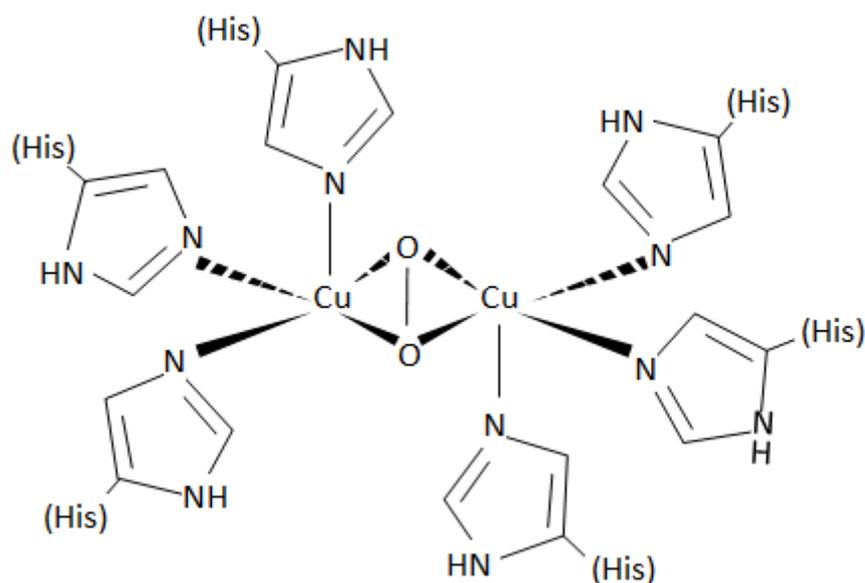


Figure I. 18. *Représentation schématique du site binucléaire du cuivre* [I. Tetik et coll., 2015].

III.3. Biocapteurs à base de tyrosinase pour la détection de polyphénols

Il existe différentes méthodes électrochimiques de détection des polyphénols, enzymatiques au non. Par exemple les phénols sont oxydés à la surface d'électrodes de Pt/Au en milieu acide [P.I. Iotov et coll., 1998]. Cependant les produits de cette oxydation forment par

polymérisation un dépôt « goudronneux » salissant la surface de l'électrode. Les HDLs sont utilisés pour fonctionnaliser la surface d'électrodes d'ITO, sous la forme de couches alternées de HDL de Cobalt-pholocyane et MgAl. De telles électrodes montrent d'excellentes propriétés catalytiques vis-à-vis de différents polyphénols [J. Han et coll., 2011]. Cependant la fonctionnalisation de la surface des électrodes par une enzyme reste la méthode de prédilection assurant en particulier la spécificité de la réaction d'oxydoréduction.

Comme nous l'avons vu, la tyrosinase est une enzyme parfaitement adaptée à ce genre de problématique, de part les réactions qu'elle est capable de catalyser, bien que ce ne soit la seule option possible. La superoxyde dismutase, la laccase ou la peroxydase du radis noir sont également d'excellents candidats [L. Campanella et coll., 2003 ; S. Korkut et coll., 2008].

Dans le cas de la tyrosinase, différentes approches ont été testées pour l'immobiliser à la surface d'électrodes :

- films composites sol-gel de silice [B. Wang et coll., 2000] ou matrices sol-gel à base de titane [J. Kochana et coll. 2015] ;
- diamants dopés [H. Notsu et coll., 2002 ; N. Zehani et coll., 2015] ;
- nanoparticules d'or [V. Carralero Sanz et coll., 2004] ou nanoparticules de FeO₃ traitées par une chitosane²⁴ [S. Wang et coll., 2008] ;
- nanofibres de carbone-polyaniline [J. Zhang et coll., 2009] ;
- sels de diazonium [M. Cortina-Puig et coll., 2010].

Comme nous l'avons vu précédemment, les HDLs sont une alternative simple à mettre en œuvre et peu coûteuse pour l'immobilisation d'enzyme [C. Mousty et V. Prévot, 2013]. Différentes enzymes ont ainsi fait l'objet d'études comme l'uréase, l'acétylcholinestérase et la cholestérol oxydase [Z.M. Baccar et coll., 2009 ; M. Temani, et coll., 2014]. Dans le cas de la tyrosinase, plusieurs HDLs ont déjà été testés, tels que :

- des matériaux hybrides formés par l'association de HDLs et chitosane [E. Han et coll., 2007] ;
- un HDL MgAlCO₃ [R. Han et coll., 2012] ;
- un HDL ZnAl pour la détection de cyanide [D. Shan et coll., 2004] ;
- un HDL Mg₂AlCl pour la détection de l'activité de la transbelotase [M.S.-P. Lopez et coll., 2010].

²⁴ Chitosane : dérivé principal de la chitosine présent dans l'exosquelette de certains arthropodes

Cependant, à notre connaissance, des études comparatives menées sur différents HDLs en parallèle ne sont pas disponibles dans le cas de la tyrosinase alors que des études de ce type ont été publiées dans le cas de l'acétylcholinestérase ou de la phosphatase alcaline [C Mousty et coll., 2008]. Dans le cas de l'acétylcholinestérase, la conclusion principale de l'étude est que l'activité de l'enzyme est modulée par la composition des HDLs, certains d'entre eux inhibant fortement l'enzyme. Dans le cas de la phosphatase alcaline, la nature basique du HDL MgAl augmente la stabilité de l'enzyme vis-à-vis du pH.

On peut donc supposer que la nature chimique des HDLs peut influencer l'activité et ou la stabilité de la tyrosinase d'autant plus qu'une étude a montré par ailleurs que les ions cobalt et nickel auraient un effet activateur sur la tyrosinase en solution contrairement au zinc ayant un effet inhibiteur [J.R. Jara et coll., 1990].

Enfin, les biocapteurs basés sur la tyrosinase permettent de détecter de nombreuses molécules : l'œstrogène [M. Cortina-Puig et coll., 2010 ; J. Kochana et coll., 2015], le bisphénol A [H. Yin et coll., 2010 ; N. Zehani et coll., 2015], le crésol [H. Xue et coll., 2002 ; J. Abdullah et coll., 2006], la dopamine [K. Min et coll., 2009] ...

Cependant l'application des ces biocapteurs n'est pas limitée aux molécules purifiées, certains capteurs ayant fait leurs preuves dans le cas de mélanges complexes de polyphénols issus de différents thé [M. Cortina-Puig et coll., 2010 ; K. S. Abhijith et coll., 2007 ; S. T. Saito et coll., 2006].

Lors de l'analyse de nos résultats, nous les comparerons en priorité avec ceux des études réalisées avec des mélanges complexes analogues.

IV. CONCLUSION

De nos jours, de nombreuses recherches sont orientées vers la création et l'amélioration de matrices d'immobilisation des enzymes pour améliorer le fonctionnement des biocapteurs électrochimiques enzymatiques.

Parmi les matériaux utilisés, les HDLs sont des candidats prometteurs. Ce type d'argile peut être synthétisé par différentes méthodes, la coprécipitation directe demeurant la méthode la plus répandue. Ayant suivi cette méthode, nous donnerons dans le chapitre II les détails de

synthèse des HDLs ainsi que ceux concernant la fabrication des films minces de HDLs utilisés dans ce travail de thèse.

Quant au choix de l'enzyme, la tyrosinase est adaptée, comme nous l'avons vu, à la problématique de détection des polyphénols. Notre choix s'est porté sur les polyphénols de thé dans le cadre d'applications potentielles en agroalimentaire par exemple.

Les méthodes de caractérisation permettant le contrôle des différentes étapes de construction du biocapteur et de son fonctionnement seront présentées dans une seconde partie du chapitre II.

**CHAPITRE 2 : MATERIEL ET TECHNIQUES
EXPÉRIMENTALES**

Dans ce chapitre, l'objectif est de présenter la méthode simple que nous avons développée pour le traitement de surface et la fonctionnalisation d'électrodes commerciales en vue d'applications de type biocapteurs en milieu liquide. Pour cela, nous allons d'abord introduire la synthèse de nanoparticules de type Hydroxyle Double Lamellaires (HDLs) par co-précipitation à pH et à température constants, les HDLs utilisés dans ce travail étant NiAlSO_4 , CoAlSO_4 , Ca_2AlCl et Zn_2AlCl . Nous allons exposer ensuite l'approche adoptée pour l'activation, la fonctionnalisation et la caractérisation des surfaces d'électrodes par dépôt de couches minces de ces nanomatériaux. La dernière partie de ce chapitre portera sur l'immobilisation de la tyrosinase, enzyme utilisée dans ce travail pour la détection et le dosage ultérieur des polyphénols.

I. SYNTHÈSE DES HDLs

Le groupe de *NanoBioIngénierie* de l'INRAP en Tunisie s'est focalisé depuis 2005 sur la synthèse et l'étude des nanoparticules composites de type HDLs pour des applications de type biocapteurs. Différents HDLs ont été ainsi synthétisés par la méthode de coprécipitation tels que : NiAlSO_4 , CoAlSO_4 , Ca_2AlCl , Zn_2AlCl , Mg_2AlCO_3 , Mg_3AlCO_3 , Mg_4FeCl , NiFeSO_4 et CoFeSO_4 . Ces nanomatériaux ont été caractérisés par différentes techniques d'analyse structurale et/ou morphologique (DRX, MEB, AFM), et analyse de surface (AFM, FTIR, Raman,...) et ont servi de matrices hôtes pour l'immobilisation de diverses protéines, enzymes ou autres molécules biologiques, comme le résume le Tableau II.1:

HDL	Protéine/biomolécule utilisées	Molécule détectée	Références
NiAlSO_4	Anti-MMR « Macrophage Mannose Receptor »	Récepteurs MMR	[M. Hammami, A. Soussou et coll., 2015]
Mg_2AlCO_3	Cholestérol oxydase	Cholestérol	[M. Temani et coll., 2014]
Mg_2AlCO_3 et Mg_3AlCO_3	ADN	Séquences longues d'ADN simple brin	[Z. M. Baccar et coll., 2012]
Mg_2AlCO_3 , Mg_4FeCl , Ca_2AlCl	Diamine oxydase	Histamine	[Z. M. Baccar et coll., 2011]
CoAlSO_4 , NiFeSO_4 , CoFeSO_4 , NiAlSO_4	Acétylcholinestérase	Acétylcholine	[S. Hidouri et coll., 2011]

Mg_2AlCO_3	Horseradish peroxidase (HRP)	Péroxyde d'hydrogène	[Z. M. Baccar et I. Hafaïedh, 2011]
$CoAlSO_4$ et $NiAlSO_4$	Phosphatases	Toxines (microcystine, acide okadaïque)	[S. Hidouri et coll., 2010]
Mg_2AlCO_3 , Mg_3AlCO_3 , Zn_2AlCl et Ca_2AlCl	Anti-caséine bêta	Urée	[Z. M. Baccar, S. Hidouri et coll., 2009]
Mg_2AlCO_3 , Mg_3AlCO_3 , Zn_2AlCl et Zn_3AlCl	Uréase	Urée	[Z. M. Baccar, D. Caballero et coll., 2009]

Tableau II. 1. Les différents biocapteurs élaborés en utilisant les HDLs synthétisés dans le groupe « NanoBioIngénierie » de l'INRAP en Tunisie.

I.1. Produits chimiques

Dans les cas des HDLs $NiAlSO_4$, $CoAlSO_4$, Ca_2AlCl et Zn_2AlCl , les solutions des sels métalliques divalents et trivalents ($NiCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, Na_2SO_4 , $AlCl_3$) et les solutions basiques de $NaOH$ et $NaCO_3$ ont été achetées chez Sigma-Aldrich (France). L'eau ultrapure (Milli-Q) a été utilisée comme solvant pendant la synthèse et l'étape de purification.

I.2. Méthode de synthèse et paramètres expérimentaux

La méthode de synthèse repose sur la coprécipitation de sels métalliques. Pour provoquer la précipitation des cations métalliques divalents et trivalents, on ajoute goutte à goutte simultanément selon le rapport volumique adéquat la solution de sel métallique divalent (0.1M, $ZnCl_2$ ou $CoCl_2$ ou $NiCl_2$ ou $CaCl_2$) à celle du sel métallique trivalent (0.1M, $AlCl_3$) à une température maintenue constante (25°C pour Ca_2AlCl et Zn_2AlCl , et 65°C pour $NiAlSO_4$ et $CoAlSO_4$) sous forte agitation (1000 rpm pour Zn_2AlCl , et 1250 rpm pour $NiAlSO_4$, $CoAlSO_4$ et Ca_2AlCl) pendant plus d'une heure [Z. M. Baccar et coll., 2009-2011-2012 ; S. Hidouri et coll., 2011 ; M. Temani et coll., 2014]. Le pH est maintenu constant (pH=8 pour Zn_2AlCl , pH=11 pour $CoAlSO_4$ et $NiAlSO_4$, et pH=11.5 pour Ca_2AlCl) par l'ajout d'un mélange fortement basique, à base de $NaOH$ (2M) et selon la nature des cations métalliques utilisés et des contre ions à intercaler dans l'espace inter feuillet (Na_2SO_4 (0.25 M) ou $NaCO_3$ (0.5M)). Afin d'éviter la formation d'une phase d'ions carbonate intercalés, la synthèse est réalisée sous un flux d'azote (voir les Figures I.10 et II.1).

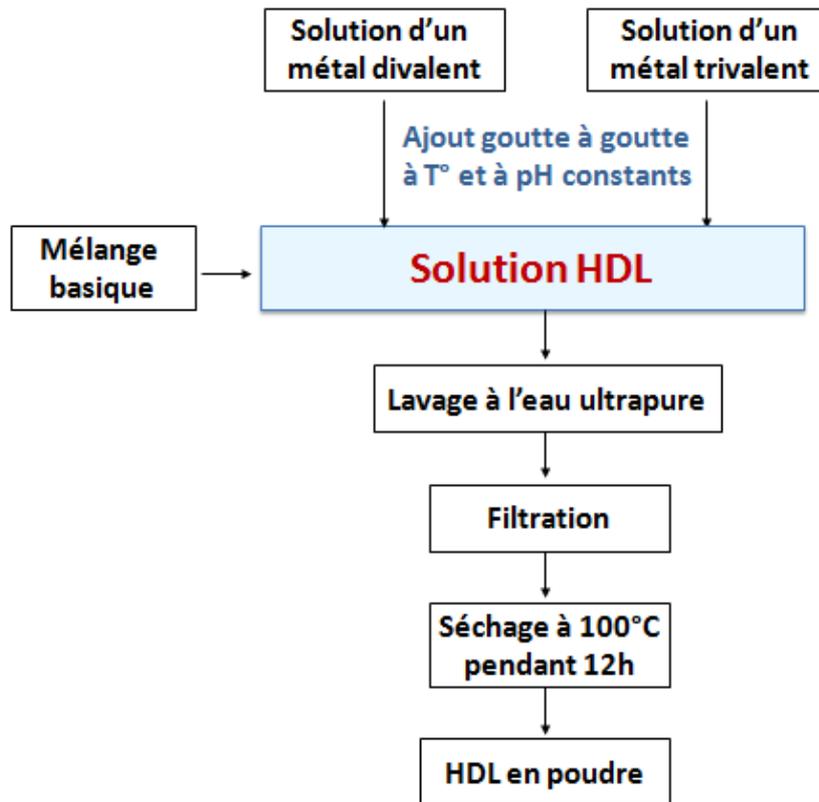


Figure II. 1. Schéma de synthèse des HDLs.

Après précipitation, le produit final est lavé avec de l'eau Milli-Q, filtré, séché pendant 12-24 heures à 100 ° C. Finalement la poudre obtenue est broyée avant caractérisation de la structure et des phases du produit final obtenu.

Plusieurs études montrent qu'une variation de la concentration des sels métalliques précurseurs utilisés pour la synthèse des HDLs peut impacter sa composition, et donc sa structure et celle de film formé par la suite [Y. Park et coll., 2015 ; I. Sorar et coll., 2009]. Dans notre cas, les paramètres qui conditionnent la synthèse des HDLs ont déjà été optimisés par le groupe « *NanoBioEngineering* » à l'INRAP [Z. M. Baccar et coll., 2011 ; S. Hidouri et coll., 2011 ; Z. M. Baccar et coll., 2012].

II. CARACTERISATION DES HDLs

II.1. Diffraction des rayons X (DRX)

Les diffractogrammes de la plupart des HDLs se caractérisent par des pics de diffraction larges et asymétriques à cause de leur faible cristallinité [Ch. Vaysse, 2001], ce qui ne permet

pas une résolution très précise de la structure cristalline. Cependant, des informations sur la structure des feuillets et de l'espace interfeuille des HDLs peuvent tout de même être obtenues à l'aide de la technique de DRX.

II.1.1. Principe de la technique de DRX

La base de la méthode de DRX est l'interaction de la matière avec un rayonnement X de longueur d'onde λ de l'ordre de l'Å : cette λ étant de l'ordre des distances interatomiques de l'échantillon, les atomes réémettent une partie du faisceau incident dans des directions de l'espace spécifiques de la structure de l'échantillon, si ce dernier est un cristal ordonné [P. Gravereau, 2012].

Considérons plus précisément une poudre, ou échantillon polycristallin, composée d'une multitude de petits grains d'orientations aléatoires les uns par rapport aux autres, chaque grain pouvant également contenir des domaines nommés cristallites. Pour une famille de plans (hkl) donnée, il existe donc toujours parmi ces cristallites un certain nombre qui présentent une orientation compatible avec celle du faisceau incident de RX arrivant avec une incidence θ_{hkl} . Pour que la diffraction soit observée, il faut que les ondes diffractées par les différents plans soient en phase (ou que la différence de marche des rayons rencontrant ces plans soit égale à un nombre entier). Ce raisonnement conduit à la relation de Bragg :

$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = p\lambda \quad (\text{éq II.1})$$

où d_{hkl} est la distance interréticulaire, θ_{hkl} est l'angle suivant lequel la diffraction est observée, λ est la longueur d'onde du rayonnement, et p un entier relatif.

Schématiquement, si on peut mesurer l'angle θ caractérisant la diffraction et si on connaît la longueur d'onde du rayonnement incident, on peut donc obtenir la distance inter-réticulaire (Tableau II.2).

Systèmes cristallographiques	Distances réticulaires
Hexagonal, trigonal : $\mathbf{a=b \neq c ; \alpha=\beta=90^\circ}$ $\mathbf{\gamma=120^\circ}$	$d_{hkl} = \frac{1}{\sqrt{\frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + k^2 + hk}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}}}$

Réseau rhomboédrique : $a=b=c$; $\alpha=\beta=\gamma$	$d_{hkl} = \frac{a \sqrt{1-3\cos^2\alpha+2\cos^3\alpha}}{\sin\alpha \sqrt{h^2+k^2+l^2+2(kl+lh+hk)\frac{\cos\alpha(\cos\alpha-1)}{\sin^2\alpha}}}$
Monoclinique : $a \neq b \neq c$; $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta \neq 90^\circ$	$d_{hkl} = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{a^2 \cdot \sin^2\beta} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2 \cdot \sin^2\beta} - 2 \frac{hl \cdot \cos\beta}{ac \cdot \sin^2\beta}}}$

Tableau II. 2. Distances interréticulaires pour les systèmes cristallographiques correspondants aux structures des HDLs [P. Gravereau, 2012]

Du fait de la loi de Bragg, l'ensemble des faisceaux réfléchis pour une même distance interréticulaire à l'intérieur des différents microcristaux formera alors un cône d'ouverture 2θ centré sur le faisceau de RX incident, à l'origine de cercles, ou anneaux de Debye sur le détecteur. Ces anneaux définissent les positions des raies dans le diffractogramme (Figure II.2) donnant l'intensité du rayonnement diffracté selon la valeur de θ .

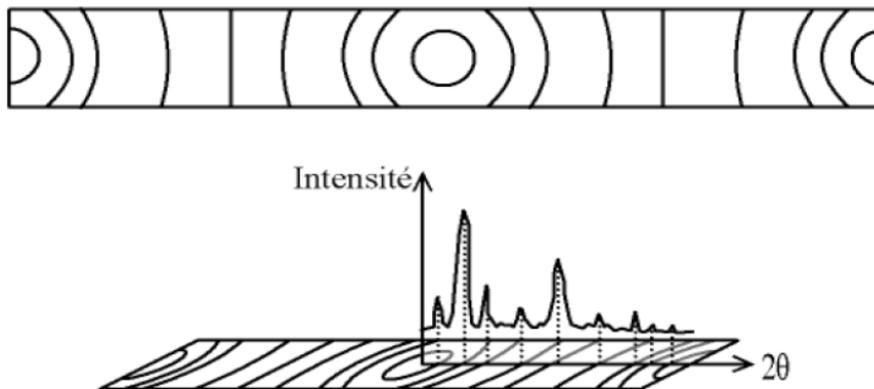


Figure II. 2. Cliché de Debye-Scherrer ; rapport avec un diagramme de poudre $I=f(2\theta)$ [D. A. Skoog, 2003]

II.1.2. Montages utilisés

La caractérisation structurale de HDLs par DRX a été commencée à l'INRAP (Tunisie) puis effectuée aussi au LOMA de Bordeaux à partir de fin 2013. Deux montages ont donc été utilisés.

➤ En Tunisie

Les diffractogrammes de poudres de HDLs ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre de type X'Pert Pro (PANalytical, Almelo, Pays-Bas). Le faisceau de RX monochromatique est produit par une anticathode de cuivre ($\lambda_{K\alpha_1} = 0.15405\text{nm}$; à 40 kV et 30 mA) en mode de balayage continu.

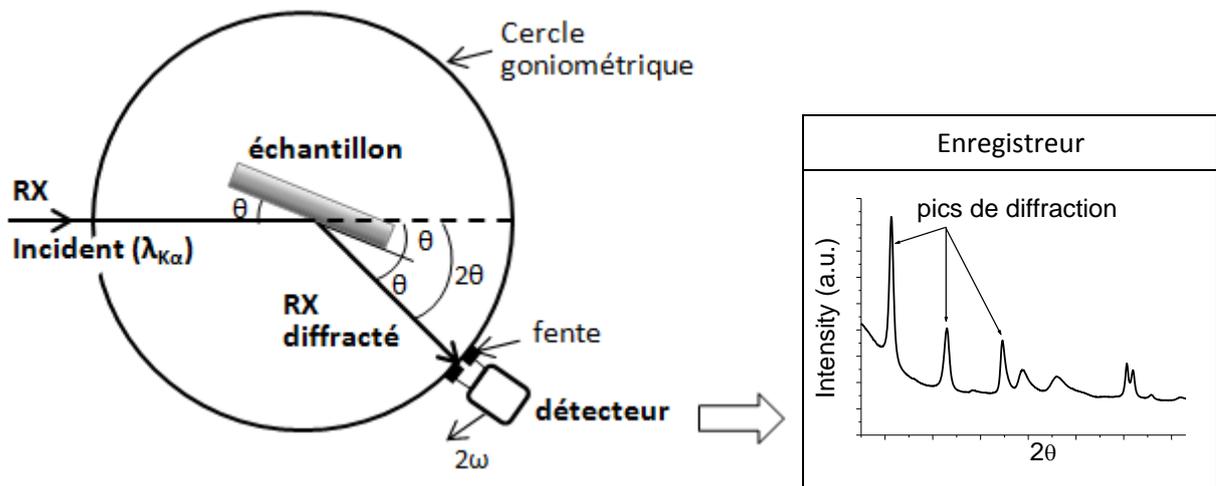


Figure II. 3. Schéma d'un diffractomètre à compteur.

Le rayonnement émis est défini par un système de fentes et de fenêtres situées avant et après l'échantillon (Figure II.3). Ce dernier est étalé sous forme de poudre polycristalline (15 mg) sur une lame de verre qui tourne d'un mouvement uniforme autour d'un axe situé dans son plan (cercle goniométrique), permettant ainsi d'augmenter le nombre d'orientations possibles des plans réticulaires. Les cristallites étant orientés au hasard, il y aura toujours une famille de plans donnant lieu à la diffraction, de telle sorte que l'on obtiendra simultanément tous les faisceaux susceptibles de diffracter : ces faisceaux forment des cônes de demi-angle au sommet 2θ . Un détecteur ou compteur (Geiger Müller ou compteur à scintillation) mesure l'intensité du rayonnement X diffracté dans certaines directions. Il tourne autour du même axe mais à une vitesse double de celle de l'échantillon. Pour un angle d'incidence θ , l'angle mesuré par le déplacement du compteur sera donc 2θ . Un diaphragme à couteau permet d'éliminer l'effet parasite du faisceau incident des petits angles ($2\theta < 10^\circ$). L'enregistrement réalisé est la courbe de l'intensité des rayons X diffractés en fonction des angles de diffraction.

➤ En France

Un diffractomètre à compteur courbe Inel CPS 120 a été utilisé pour la caractérisation cristallographique. Le faisceau de RX monochromatique est formé par la raie $K_{\alpha 1}$ du cuivre ($\lambda_{K_{\alpha 1}} = 0.15405\text{nm}$). La focalisation sur le compteur est assurée par un monochromateur en quartz courbe. Le générateur de puissance est réglé à 1.0 kW (40 kV et 25 mA).

La poudre à analyser est introduite dans un tube de Lindemann monté sur une tige en téflon. L'ensemble est placé sur un goniomètre permettant d'ajuster l'échantillon en rotation et en translation afin que ce dernier soit bien centré sur le faisceau de RX. L'échantillon est animé d'un mouvement de rotation autour de son axe pour minimiser les orientations préférentielles. Les photons X diffractés sont collectés simultanément sur 120° (avec des marches angulaires de 0.029°) à l'aide d'un compteur courbe multicanal (4096 canaux) par ionisation de gaz (mélange argon-éthane sous pression). Une feuille de fer de 0.2 mm d'épaisseur est intercalée entre l'échantillon et le détecteur dans le prolongement du faisceau direct afin d'éviter que celui-ci ne détériore le détecteur tout en permettant la mesure de sa position pour les calibrations. Ce dispositif permet de "masquer" le faisceau direct et d'autoriser l'acquisition de pics de diffraction aux très petits angles ($2\theta = 1-2^\circ$). Les valeurs des canaux sont converties en valeurs d'angle en utilisant les réflexions d'un calibrant, mélange de $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{F}_{14}$ [G. Courbion et G. Ferey, 1988] et de bécénate d'argent. [T. C. Huang et coll., 1993].

II.1.3. Exploitation d'un diagramme de diffraction de RX sur poudre pour résoudre sa structure cristalline

L'enregistrement d'un diagramme de diffraction X nous permet d'obtenir comme données brutes une courbe en deux dimensions donnant le nombre de photons X reçus par le détecteur en fonction de sa position sur le cercle de diffraction (Figure II.2).

L'allure de cette courbe dépend en premier lieu de l'échantillon en question et plus particulièrement de :

- la quantité de matière diffractante ;
- la taille des grains : afin d'éviter les problèmes de micro-absorption et d'extinction, il est nécessaire de travailler avec une poudre homogène ayant des grains de petite taille [G. Caglioti et coll., 1958]. Pour un échantillon moyennement absorbant, on travaille en général avec des grains de taille inférieure ou égale à $10\ \mu\text{m}$.

- l'orientation des grains : une distribution non aléatoire des orientations des grains donne lieu à des orientations préférentielles qui se manifestent par le renforcement de certaines familles de raies de diffraction.

La taille des cristallites peut être évaluée à partir de la formule de Scherrer qui relie la largeur des pics de diffraction (ou des anneaux de Debye-Scherrer) à la taille des cristallites :

$$L = \frac{k \cdot \lambda}{\cos \theta \cdot \Delta(2\theta)} \quad (\text{éq II.2})$$

où L est la taille des cristallites ;

θ est l'angle de diffraction ;

$\Delta(2\theta)$ est la largeur de pic à mi-hauteur ;

et k est un facteur de forme sans dimension qui a une valeur typique d'environ 0.9.

Afin de trouver les dimensions de la maille élémentaire et ses éléments de symétrie (groupe d'espace), la position, l'orientation, et la conformation de la (des) molécule(s) à l'intérieur de cette maille élémentaire, un travail important d'interprétation reste à accomplir. Dans notre cas, nous avons utilisé des logiciels de recherche directe, nécessitant uniquement les positions angulaires d'un certain nombre de réflexions (de 20 à 30) provenant du spectre de diffraction de poudre de la phase solide considérée. Au cours de ce travail de thèse, deux logiciels ont été essentiellement utilisés : DICVOL [A. Boulfif et coll., 1991] et CheckGroup, ces derniers étant contenus dans l'application « WinPLOTR²⁵ » du logiciel de simulation FullProf [L. Akselrud et coll., 2014 ; X. Cui et coll., 2015].

II.1.3.1. Affinement des paramètres de maille et de groupe d'espace

Une première étape d'affinement conduit à déterminer les paramètres de maille et de groupe d'espace ainsi que les fonctions de profil des pics et le décalage de zéro.

Cette méthode, appelée aussi « *pattern matching* », a été appliquée à l'aide du programme FullProf et a comme objectif de maximiser l'accord entre le spectre calculé à partir des paramètres de maille et du groupe d'espace déterminés, et le spectre expérimental.

Le nombre de coups observés à chaque pas angulaire i du diagramme est modélisé par :

²⁵ WinPLOTR : outils et interface graphiques pour FullProf

$$y_{calc_i} = y_{b_i} + \sum_{k=k_1}^{k_2} I_k \Omega_{k_i} \quad (\text{éq II.3})$$

où y_{b_i} représente le bruit du fond au pas i (*background*), $\Omega_{k_i} = \Omega(2\theta_k - 2\theta_i)$ est la fonction décrivant le profil expérimental et I_k est l'intensité intégrée de la raie k .

Le test statistique de l'ajustement noté χ^2 ou g.o.f (*goodness of fit*) doit tendre vers 1 pour un affinement réussi.

$$\chi^2 = \left(\frac{R_{wp}}{R_{exp}} \right)^2 = \frac{M}{N - P + C} \quad (\text{éq II.4})$$

où $N-P+C$ est le nombre de degré de liberté ;

N est le nombre d'observations indépendantes ;

P est le nombre de paramètres ajustés ;

C est le nombre de contraintes entre ces paramètres ;

M est la fonction à minimiser ;

R_{wp} et R_{exp} sont les facteurs représentatifs de la qualité de l'affinement (voir annexe A).

La première étape de l'affinement est la précision du fond continu par :

- soit la création d'un "fichier de fond continu" expérimental pour des valeurs de (2θ) réparties sur tout le diffractogramme et des interpolations linéaires pour les valeurs intermédiaires ;
- soit l'utilisation d'une expression analytique empirique.

La précision dans le traçage du fond continu permettra de se rendre compte de la pertinence de nos résultats, c'est-à-dire de l'importance de l'écart entre le diagramme de diffraction X enregistré et le diagramme généré par notre modèle structural. Ce premier affinement est une étape nécessaire permettant ensuite de mener un affinement de structure dans de bonnes conditions.

Dans une seconde étape, on doit affiner les différents paramètres qui interviennent dans l'ajustement de la position, l'intensité et la forme des pics de diffraction.

II.1.3.2. Affinement des positions atomiques

La méthode Rietveld [H. M. Rietveld, 1967-1969] utilise les résultats trouvés par l'affinement de « *pattern matching* » pour simuler la structure cristallographique en 3D de l'empilement moléculaire constituant la poudre étudiée. Les paramètres structuraux (groupe d'espace,

positions atomiques, taux d'occupation des atomes sur les sites cristallographiques...) doivent être connus avec le plus de précision possible.

L'affinement Rietveld consiste lui aussi à maximiser l'accord entre spectres calculés et mesurés, en tenant compte des intensités des réflexions de Bragg. Celles-ci sont liées par définition à la structure, donc à la position et au taux d'occupation de chaque atome dans la maille, mais dépendent également de facteurs expérimentaux, tels que l'agitation thermique (de chaque atome ou bien globale) et des orientations préférentielles.

II.2. Spectroscopies infrarouge (IR) et Raman

Les Spectroscopies IR et Raman fournissent toutes les deux des informations sur les modes de vibrations moléculaires (elles sont d'ailleurs souvent regroupées sous les termes de « spectroscopies vibrationnelles »). Les règles de sélection de ces deux méthodes spectroscopiques (voir plus loin) étant différentes, elles sont souvent utilisées conjointement pour obtenir une signature vibrationnelle complète du système étudié. Par ailleurs, les bandes observées sur les spectres IR et Raman renseignent également souvent non seulement sur le système moléculaire étudié, mais aussi sur son environnement : la position des bandes et leurs intensités relatives sont souvent des sources précieuses d'information. C'est la raison pour laquelle ces méthodes sont largement répandues dans les laboratoires de recherche, d'autant plus qu'elles sont applicables à des systèmes variés : matériaux inorganiques comme les HDLs, semi-conducteurs, polymères, systèmes biologiques ... Elles sont également exploitées dans le domaine industriel et la police scientifique (drogues explosifs, peintures ...).

II.2.1. La spectroscopie infrarouge

II.2.1.1. Principe

En se basant sur des calculs de mécanique classique où la molécule est décrite comme un système d'oscillateurs, chaque mode est caractérisé par une fréquence d'absorption ν donnée par une expression du type :

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{k \frac{m_1 + m_2}{m_1 m_2}} \quad (\text{éq II.5})$$

où m_1 et m_2 sont les masses des deux atomes, liés par une liaison assimilée à un ressort de constante de raideur k et c est la célérité de la lumière dans le vide. La constante de raideur dépend fortement de la structure de la liaison comme le montre la Figure II.4 où les

fréquences (exprimées en cm^{-1}) varient par exemple pour deux atomes équivalents selon que la liaison est simple, double ou triple.

Force de liaison croissante						Masse atomique croissante				
sp	sp ²	sp ³								
≡C-H	=C-H	C-H	C≡C	C=C	C-C	C-H	C-C	C-O	C-Cl	C-Br
3300	3100	2900	2150	1650	1200	3000	1200	1100	800	550

← Fréquence croissante (cm^{-1}) →

Figure II. 4. Effet de la force de liaison et de la masse des atomes sur la fréquence de vibration IR [D. Bertrand et coll., 2006]

La spectroscopie IR est basée sur l'absorption d'un rayonnement IR par le système moléculaire sondé c'est-à-dire la transition entre deux niveaux vibrationnels. Seules les vibrations caractérisées par une variation du moment dipolaire le long de la vibration lors de l'absorption sont actives en IR. Par conséquent, la vibration de liaisons polarisées donnera lieu à des bandes intenses, alors que les bandes de liaisons non-polarisées seront peu ou pas visibles [J. Mbinze Kindenge, 2014].

Différents modes de vibration peuvent être observés dans un spectre IR :

- des modes d'élongation où les atomes s'approchent ou s'éloignent l'un de l'autre le long d'une liaison. Dans le cas de molécules polyatomiques, on peut avoir des combinaisons de ces vibrations donnant lieu à des élongations symétriques ou asymétriques ;
- des modes de torsion ou de flexion caractérisés par des vibrations des angles entre les liaisons.

Le cas d'une molécule « simple » comme celle de l'eau est présenté dans la Figure II.5. On comprend mieux les difficultés d'interprétation d'un spectre vibrationnel dans le cas d'un système plus complexe.

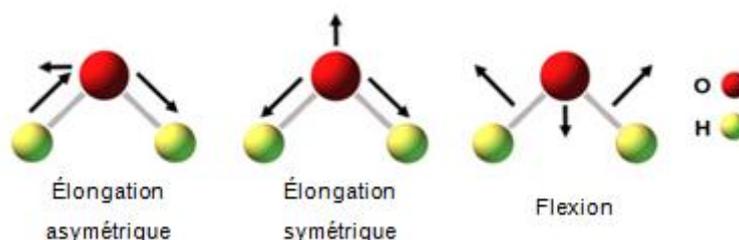


Figure II. 5. Modes vibrationnels dans la molécule d'eau [H. Clenet, 2009].

II.2.1.2. Montage de spectroscopie infrarouge

La Figure II.6 présente le schéma de principe d'un spectromètre IR typique.

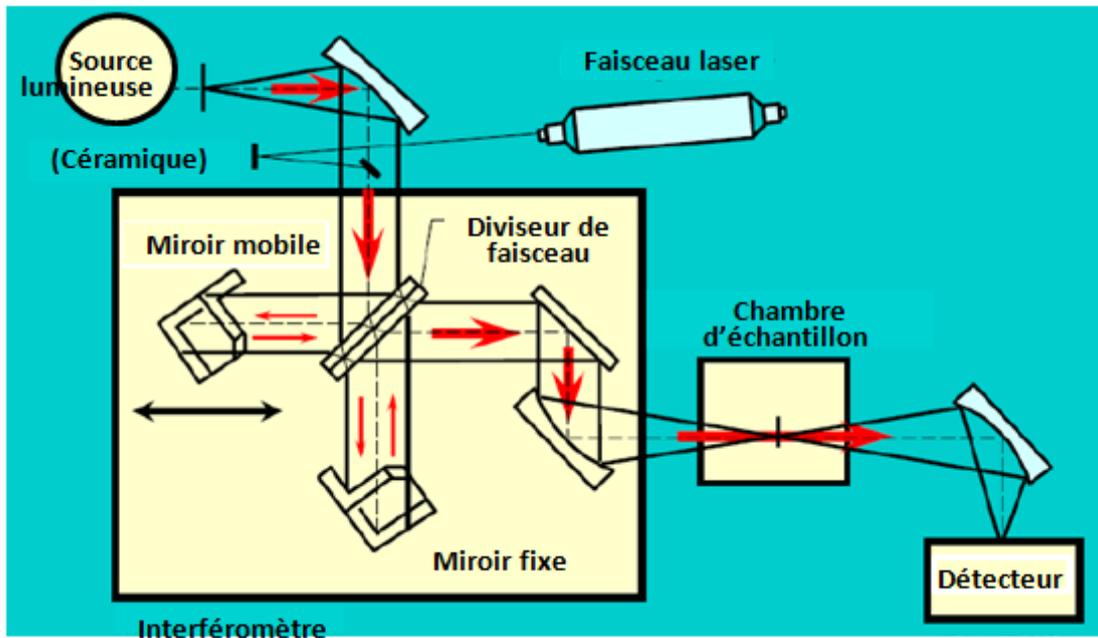


Figure II. 6. Schéma de principe d'un appareil de spectroscopie IR [P. Lévêque, 2007].

Ce dernier est composé des parties suivantes :

- une source lumineuse émettant un spectre large dans le domaine IR ;
- un interféromètre de Michelson vers lequel le faisceau issu de la source est dirigé. Cet interféromètre est constitué d'un ensemble de miroirs et d'une lame dichroïque²⁶. L'un des deux miroirs est fixe tandis que l'autre est déplacé de manière à faire varier le trajet parcouru par la lumière, ce qui conduit par chaque longueur d'onde à des interférences destructives ou constructives : au fur et à mesure que le miroir se déplace, chaque longueur d'onde se trouve donc périodiquement bloquée ou transmise par l'interféromètre, en direction de la chambre contenant l'échantillon. Un laser He-Ne complète ce dispositif permettant de repérer avec précision la position du miroir mobile ;
- un détecteur pour la détection du rayonnement IR après son interaction avec l'échantillon ;
- enfin un ordinateur qui contrôle l'interféromètre, et le détecteur. Il permet également de convertir les données brutes (l'« interférogramme », c'est-à-dire la lumière absorbée en fonction de la position du miroir) en données directement exploitables (lumière absorbée en fonction de la longueur d'onde). Ce procédé requiert un traitement de données

²⁶ Un filtre dichroïque est un filtre dont les propriétés de transmission et de réflexion dépendent fortement de la longueur d'onde. La plupart ont une longueur d'onde de travail située entre 450 et 1800 nanomètres.

par transformée de Fourier, qui donne son nom à cette technique (spectroscopie IR par transformée de Fourier ou FTIR).

Dans ce travail de thèse les spectres IR des HDLs (en poudre) ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer en mode réflexion dans la gamme $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Les spectres présentés dans ce manuscrit résultent de l'addition de 10 spectres réalisés de manière indépendante.

II.2.2. La spectroscopie Raman

II.2.2.1. Principe

La spectroscopie Raman (du nom de Sir C.V. Raman, prix Nobel de physique en 1930) est une spectrométrie optique mettant en évidence les vibrations selon une règle de sélection différente de celle de la spectroscopie IR. Son principe repose sur le phénomène de diffusion inélastique de la lumière par les molécules. Les photons constituant la lumière diffusée par les molécules se divisent en photons dit Rayleigh (Figure II.7), largement majoritaires, dont l'énergie $h\nu$ est égale à celle de l'excitation $h\nu_0$ (diffusion élastique) et en photons Raman, beaucoup moins nombreux, dont l'énergie est modifiée par les transitions vibrationnelles moléculaires : $h\nu_0 - h\nu_{\text{vib}}$ (photons Raman Stokes) et $h\nu_0 + h\nu_{\text{vib}}$ (photons Raman anti-Stokes). La composante Raman Stokes est la plus intense car elle correspond à un niveau vibrationnel initial plus bas (donc plus probable en termes de population) [D. R. Neuville et coll., 2014; C. Neumann et coll., 2015].

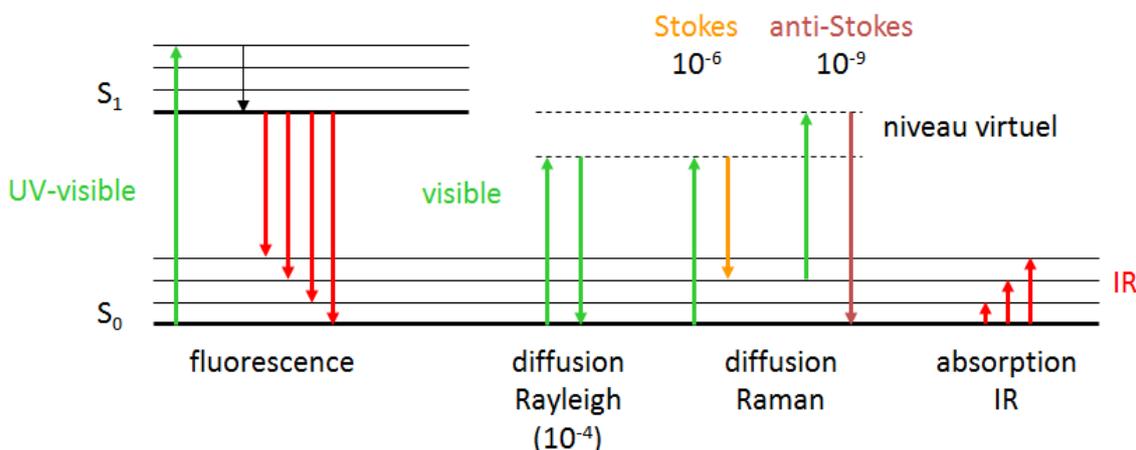


Figure II. 7. Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie impliqués dans l'absorption infrarouge, la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman.

La longueur d'onde incidente ne correspond pas obligatoirement au saut entre deux niveaux électroniques de la molécule. Cette dernière passe donc par un état virtuel transitoire (Figure II.7). On parle de diffusion Raman de résonance quand la longueur d'onde excitatrice est située dans la bande d'absorption électronique du système moléculaire sondé.

Comme déjà indiqué, la règle de sélection en spectroscopie Raman est différente de celle de l'IR. L'étude en mécanique classique de l'interaction matière-rayonnement montre qu'une vibration est active en Raman si le tenseur de polarisabilité varie. De manière générale, la spectroscopie Raman est mieux adaptée aux modes de vibration des groupes chimiques apolaires, la spectroscopie IR donnant plus d'informations sur les modes polaires.

II.2.2.2. Montage de spectroscopie Raman

Les éléments de base formant un spectromètre Raman sont représentés sur la Figure II.8 :

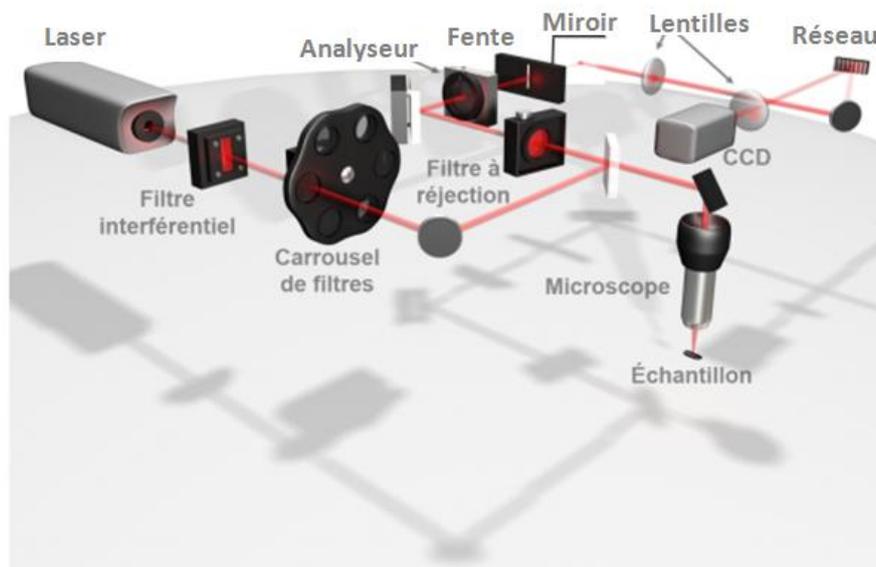


Figure II. 8. Représentation schématique d'un spectromètre Raman [J. Vermette, 2008]

Ce dernier est composé des parties suivantes :

- une source laser émettant une radiation monochromatique et un pré-monochromateur ou filtre interférentiel (situé juste après le laser) pour éliminer les raies parasites plasma se trouvant au voisinage de la raie laser excitatrice ;
- un microscope qui focalise le spot laser incident sur la surface de l'échantillon, via l'objectif approprié, puis dirige les photons diffusés vers le spectromètre. Un polariseur

placé à l'entrée du microscope fixe la polarisation incidente tandis qu'un analyseur permet de fixer la polarisation de l'onde diffusée ;

- un filtre holographique utilisé pour séparer le signal Raman du signal Rayleigh, ce dernier étant beaucoup plus intense que le signal d'intérêt;
- un analyseur recevant les photons diffusés. Les photons diffusés entrent dans le monochromateur par une fente (ou trou confocal) permettant de localiser spatialement la lumière. Un miroir prismatique dirige ensuite les photons sur un réseau holographique, dispersant les photons selon leur longueur d'onde (le choix du nombre de traits étant fonction de la longueur d'onde incidente). Chaque radiation est ensuite focalisée par une lentille sur le détecteur. Certains appareillages disposent de plusieurs monochromateurs, dans le but d'améliorer la résolution spectrale et le taux de réjection (c'est à dire la capacité à éliminer la raie Rayleigh).
- Le détecteur fournit finalement les données sur l'échantillon qui sont ensuite traitées informatiquement. Il existe deux types de détecteurs sur le marché : CCD ou InGaAs selon la gamme de longueurs d'onde que l'on souhaite analyser.

Dans ce travail de thèse les spectres Raman de HDLs ont été enregistrés dans la gamme spectrale $2500\text{-}50\text{ cm}^{-1}$, en utilisant un microscope Raman Thermo-Scientific-DXR (avec une profondeur confocale de $1.7\text{ }\mu\text{m}$ et une résolution spatiale de 540 nm), à une longueur d'onde d'excitation de 532 nm . Les spectres Raman présentés ont été obtenus par addition d'au moins trois spectres obtenus avec un temps d'acquisition de 5 à 7 secondes chacun.

III. ELABORATION DES FILMS MINCES DE HDL PAR AUTOASSEMBLAGE

III.1.Méthodes testées

Le terme général d' « auto-assemblage direct » (ou DSA pour *Direct Self - Assembly*) fait référence aux caractéristiques de certains matériaux possédant la capacité de s'organiser naturellement sous forme d'objets à l'échelle nanométrique. Ces propriétés inédites ont été utilisées pour la conception de matériaux moléculaires fonctionnels ouvrant de nouvelles perspectives dans la fabrication de nanostructures [T. A. Gschneidner et coll., 2015 ; X. Wang, Y. Li et coll., 2016]. Cette technique se basant sur l'évaporation du solvant solubilisant le matériau s'est développée selon deux procédés distincts pour la fabrication de réseaux nano-structurés: la croissance directe d'objets et la structuration de réseaux matriciels.

- La première méthode se fait par pulvérisation cathodique²⁷ ou encore par dépôt chimique en phase vapeur (*CVD* pour *Chemical Vapor Deposition*). Le choix de support est crucial pour réussir la croissance et dépend directement du matériau à déposer. En effet, les énergies libres des surfaces (adsorbat-substrat) influencent directement le mode de croissance (couche par couche, en îlots ...), qui peut conduire à différentes morphologies [C. Brigouleix, 2004].
- La fabrication de nano-objets par formation de réseaux matriciels est réalisée par structuration d'espèces hybrides²⁸ sous forme de film, par croissance électrochimique de matrice [I. Gualandi et coll., 2015] ou encore par élaboration de film mince auto-organisé [O. Parlak et coll., 2013 ; N. T. Dinh et coll., 2016].

Les protocoles les plus simples pour l'auto-organisation rapide des adsorbats sont : l'étalement, le revêtement par centrifugation (SC pour *spin-coating*,) et le revêtement par immersion (*dip-coating*) utilisé souvent dans la technique d'auto-assemblage électrostatique couche par couche (LbL ESA par « *Layer by Layer Electrostatic Self-Assembly* ») [X. Wang et coll., 2016 ; Z. Liu et coll., 2016]. Dans le cadre de ce travail, nous avons testé les deux premières méthodes.

III.1.1. Etalement

Cette méthode (Figure II.9) est très simple puisqu'il suffit de déposer soigneusement, près de la surface pour éviter les effets de la chute du liquide [C. Josserand et coll., 2016], une goutte de la solution d'un volume et d'une concentration appropriés.

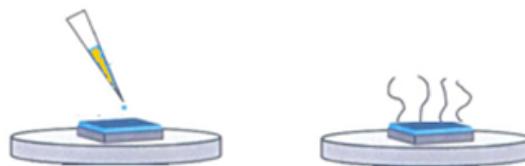


Figure II. 9. Schéma de principe d'étalement d'une goutte de solution liquide sur un support solide

²⁷ La pulvérisation cathodique (ou *sputtering*) est une méthode de dépôt de couche mince qui se base sur la synthèse de plusieurs matériaux à partir de la condensation d'une vapeur métallique issue d'une source solide (cible) sur un substrat.

²⁸ Un hybride est le résultat d'un mélange intime entre des composantes *a priori* antagonistes. Dans notre contexte, le terme « espèce hybride » veut dire que le matériau contient simultanément des composantes organiques et des composantes minérales. Ces hybrides sont donc des nanocomposites organo-minéraux ou bio-minéraux.

Dans notre cas, une goutte d'une solution de HDL (solubilisé dans l'eau ultrapure à une concentration comprise entre 0.25 et 2.00 mg.mL⁻¹, à environ 10-15 µL par cm²) est déposée sur la surface du support (surface de l'électrode à fonctionnaliser ou mica, voir plus loin) et laissée à sécher pendant 20 à 25 min dans un dessiccateur. La surface est ensuite rincée avec de l'eau ultrapure avant d'être utilisée.

III.1.2. Spin coating

En raison de sa simplicité et de sa rapidité, le procédé par *spin coating* constitue une alternative avantageuse aux méthodes d'immersion ou d'étalement. Le principe est illustré sur la Figure II.10. Un volume donné d'une solution concentrée du matériau, base du futur film, est déposé sur la surface du substrat lui-même placé sur un plateau tournant à vitesse élevée. La force centrifuge étale la goutte uniformément sur la surface lorsque la rotation est activée.



Figure II. 10. Schéma de principe du procédé de spin coating.

Bien que la phase d'étalement soit terminée après quelques secondes, la rotation est encore entretenue afin d'assurer l'éjection du solvant aux extrémités du support et d'atteindre ainsi l'épaisseur désirée. Cette phase dure quelques dizaines de secondes. Le temps de construction d'un film est ainsi réduit de manière significative par rapport aux deux autres méthodes, le temps de dépôt d'une couche étant en moyenne d'environ 80 s. Le solvant utilisé est généralement volatil et participe à la formation du film par son évaporation. Une fois la rotation terminée, un film est obtenu dont les caractéristiques dépendent :

- de la vitesse de rotation ;
- de la viscosité de la solution²⁹, elle-même fonction de sa concentration en molécules déposées et du choix du solvant ;
- de la volatilité du solvant.

²⁹ La viscosité (du latin viscum, gui) peut être définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière. La viscosité se manifeste chaque fois que les couches voisines d'un même fluide sont en mouvement relatif, c'est à dire lorsqu'il s'établit un gradient de vitesse.

Dans cette étude, nous avons appliqué la méthode de *spin coating* pour le dépôt de films de HDL sur du mica ou à la surface de l'électrode à fonctionnaliser, en faisant varier la vitesse, l'accélération et le temps de rotation :

- 500 rpm pendant 10 s ;
- 3000 rpm pendant 30 s ;
- Accélération de 1000 rpm/ s.

Afin de pouvoir comparer les films obtenus avec ceux obtenus par simple étalement, les autres conditions expérimentales sont conservées à l'identique : HDL solubilisé dans l'eau à une concentration comprise entre 0.25 et 2.00 mg/ml, volume de 10 μ l/cm², rinçage et séchage dans les mêmes conditions.

III.2. Nature du support

Le choix du matériau et des dimensions des supports dépend directement de la nature du film déposé, des techniques de caractérisation employées et des applications envisagées. Les supports les plus utilisés pour la construction de films minces formés par des multicouches sont souvent des surfaces planes ou des particules colloïdales. Les films sont déposés sur des lames de verre [C. Cho et coll., 2015], de silice [C. Mousty et coll., 2015], de quartz [C. Goujon et coll., 2015], de mica [A. Fujimori et coll., 2015 ; J. Demel et coll., 2015], de silicium [A. Vlad et coll., 2015] ou encore sur des supports métalliques d'or [D. Wang et coll., 2015].

Dans notre cas, les solutions de HDLs ont été déposées, en premier lieu, à la surface des électrodes pour les fonctionnaliser. Les électrodes utilisées sont des électrodes sérigraphiées en or jetables (voir le paragraphe V.3.3 et la Figure II.25). Cependant, nous montrerons plus loin que les électrodes ne constituent pas une surface appropriée pour visualiser la morphologie des films de HDL par AFM car elles sont trop rugueuses. Nous nous sommes donc tournés vers un autre substrat, le mica pour cette étude morphologique. Ce substrat présente en effet des caractéristiques intéressantes dans un tel contexte:

- il s'agit d'un matériau facilement clivable révélant une surface propre et pratiquement sans défaut ;

- sa rugosité moyenne (Rms)³⁰ est très faible de l'ordre de 0.3 nm, n'interférant donc pas avec les mesures en AFM ;
- il s'agit d'un isolant électrique ayant une surface hydrophile.



Figure II. 11. *Photo de mica muscovite*

Nous avons utilisé le mica muscovite (référence 71853-01, société *Electron Microscopy Sciences*) se présentant sous la forme de feuilles facilement clivables (Figure II.11).

III.3. Influence des conditions expérimentales

La morphologie des films de HDL dépend des conditions expérimentales au moment du dépôt. Parmi les paramètres pertinents on peut citer la méthode de dépôt en elle-même, mais aussi la composition du HDL (et donc les concentrations en réactifs lors de la synthèse), sa concentration, la température ...

III.3.1. Concentrations des réactifs lors de la synthèse ; concentration en HDL dans la solution utilisée

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe traitant de la synthèse des HDLs, les paramètres expérimentaux utilisés lors de la synthèse impactent la structure des HDLs et donc celles des films élaborés à partir de ces HDLs. À titre d'exemple, I. Sorar et coll. (2009) ont étudié l'influence de la concentration du précurseur $ZnCl_2$ entre 0.3 et 0.6 M sur les propriétés structurales des films de ZnO, une concentration supérieure du précurseur entraînant la formation de grains plus importants, et des films de rugosité de surface plus élevée.

Dans notre cas, nous n'avons pas fait varier les conditions de synthèse d'un HDL donné, mais nous avons étudié l'effet de la concentration croissante de la solution de HDL sur la morphologie des films. A. B. Kashyout et coll. (2010) ont par exemple montré que la rugosité

³⁰ Le terme « Rms » représente la rugosité moyenne quadratique de la surface, abréviation associée à « *Root Mean Square* ».

des films de ZnO réalisés par *spin-coating* augmente avec la concentration de 3.9 nm pour une concentration de 0.2 M à 6.3 nm à 0.4 M. De même le diamètre moyen des grains passe de 40 à 60 nm. S. Chakraborty et coll. (2015) ont synthétisé des nanoparticules HDLs de type Cu-Al par la méthode de co-précipitation pour étudier leur dispersion dans l'eau afin de former des nanofluides homogènes. En augmentant la concentration de HDL dans la gamme de 0.25-1.25% (pourcentage volumique par rapport à l'eau), la taille des clusters croit entre 86 et 126 nm, et la conductivité thermique s'améliore (de l'ordre de 16% pour une concentration de 0.8% de HDL).

III.3.2. Conditions du spin-coating

Dans le cadre de cette technique la vitesse de rotation, le temps de rotation et celui de relaxation sont susceptibles de modifier la morphologie des films. Ainsi D. T. Toolan et coll. (2013) ont montré qu'une augmentation de la vitesse de rotation de 1500 et 5500 rpm diminue la taille et la distance entre les domaines obtenus dans le cas des films de polystyrène/poly(méthyl-méthacrylate). F. Zhang et coll. (2008), eux, ont utilisé la méthode de *spin-coating* pour élaborer des films de HDL de type MgAl synthétisé par la méthode de coprécipitation. Après étalement d'une goutte de la solution de HDL sur le substrat, l'échantillon a été placé sur le plateau de la tournette et deux cycles successifs de rotation ont été appliqués : 600 rpm pendant 10 s et 1500 rpm pendant 30 s. En répétant le dépôt plusieurs fois (de 1 à 10 fois), ils ont obtenu des films (orientés selon l'axe z perpendiculaire à la surface du substrat) ayant une épaisseur de 60 nm pour une couche et 1.1µm pour 10 couches. Ils ont utilisé ces films pour des applications dans la protection contre la corrosion.

IV. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES FILMS MINCES DE HDLs PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM)

IV.1. Principe général

La microscopie de force atomique (AFM) est une technique de caractérisation de surface, permettant d'accéder non seulement à sa topographie, mais aussi à ses propriétés viscoélastiques et nanotribologiques, l'échantillon pouvant être exposé à l'air ou en milieu liquide. Son principe repose sur le balayage³¹ de la surface par une sonde de dimensions

³¹ Dans la suite de ce document, le terme « balayage » sera parfois remplacé par le terme « scan ».

nanométriques (nano-pointe solidaire d'un microlevier) et la mesure de la force d'interaction entre l'extrémité de cette sonde et la surface d'un échantillon (Figure II.12).

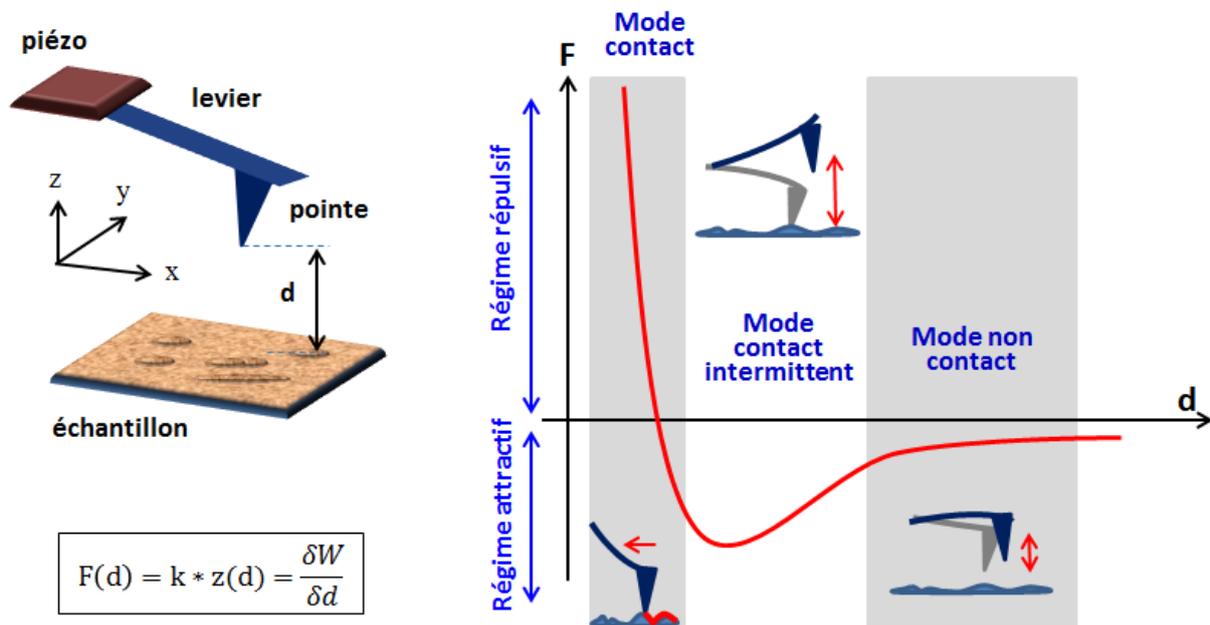


Figure II. 12. Schématisation du principe de l'AFM et expression de la force d'interaction F en fonction de la distance pointe-surface et du potentiel de Lennard-Jones W ; variation de la force F en fonction de la distance pointe-surface et mise en évidence des régimes de force couverts par les différents modes d'imagerie.

Quand la sonde balaie l'échantillon, les interactions pointe-surface provoquent une déflexion du levier selon l'axe z . L'enregistrement des variations de cette grandeur permet de reconstituer l'image AFM. La Figure II.12 décrit les différents modes d'imagerie en AFM (détaillés plus loin) selon la gamme de valeur de la force en fonction de la distance pointe-échantillon.

Lorsqu'on travaille à l'air, les forces principales mises en jeu entre la pointe et la surface sondée sont :

- Les forces de répulsion à courte portée, dues à la répulsion des nuages électroniques. Leur norme est inversement proportionnelle à la distance interatomique r^n (avec $n \geq 9$ et $r \sim 1 \text{ \AA}$) ;
- Les forces de rappel liées à l'élasticité de la surface;
- Les forces dipôle-dipôle de Van der Waals, d'une portée de 1 à 10 nm ;
- Les forces électrostatiques de longue portée: leur intensité est fortement liée au milieu. Elles sont très importantes dans l'air ou quand la surface étudiée est isolante piégeant des charges de manière plus ou moins importante. Elles sont par contre

écranées en milieu liquide, en particulier s'il est tamponné ou contient des ions³². La norme de ces forces est proportionnelle à q_1q_2/r^2 où q_1 et q_2 sont les charges coulombiennes et r est la distance entre les charges ($\sim 1 \text{ \AA} \leq r \leq \sim 100 \text{ \AA}$);

- Les forces capillaires attractives dans l'air, d'une portée d'environ 10 nm ;
- Les forces d'adhésion moléculaire à plus ou moins longue portée.

La somme de ces contributions attractives et répulsives est à l'origine d'un potentiel de Lennard-Jones : $W(d) = 4\varepsilon [(\frac{\sigma}{d})^{12} - (\frac{\sigma}{d})^6]$ où σ est la distance d'équilibre interatomique et ε est l'énergie potentielle à la distance d'équilibre [L. Nony, 2000].

IV.2. Montage de l'AFM

La Figure II.13 présente le schéma de principe typique d'un microscope AFM. Ce dernier est composé des parties suivantes :

➤ Un faisceau laser associé à un miroir et une photodiode : ce faisceau envoyé sur l'extrémité du levier est réfléchi vers un miroir, lui-même réfléchissant le faisceau en direction d'une cellule photoélectrique constituée par quatre photodiodes. Les déflexions du levier induisent des déviations du faisceau laser réfléchi, ce qui se traduit par des différences d'éclairement entre les photodiodes, converties en différence de tension puis en unités de longueur après calibration. Les déflexions du levier sont plus importantes à son extrémité, aussi est il important d'optimiser le réglage du faisceau afin d'obtenir une sensibilité maximale.

➤ La sonde formée par la pointe (généralement en silicium) fixée au levier (généralement en silicium ou en nitrure de silicium): il s'agit de l'élément clé de l'AFM car elle interagit directement avec l'échantillon. Le levier est souple et peut se déformer lorsque la pointe subit les forces de très faible intensité appliquées par l'échantillon. Le choix de la pointe et du levier (composition, taille, forme, constante de raideur) est défini selon le type d'échantillon à analyser et le mode de fonctionnement d'AFM utilisé.

➤ Le socle sur lequel le substrat (généralement le mica) est fixé au moyen d'un morceau de scotch double-face. Ce socle est au contact d'un cristal piézoélectrique.

³²La présence d'ions dans la solution et de charges sur le levier crée ce qu'on appelle « la double couche électrique », voir plus loin.

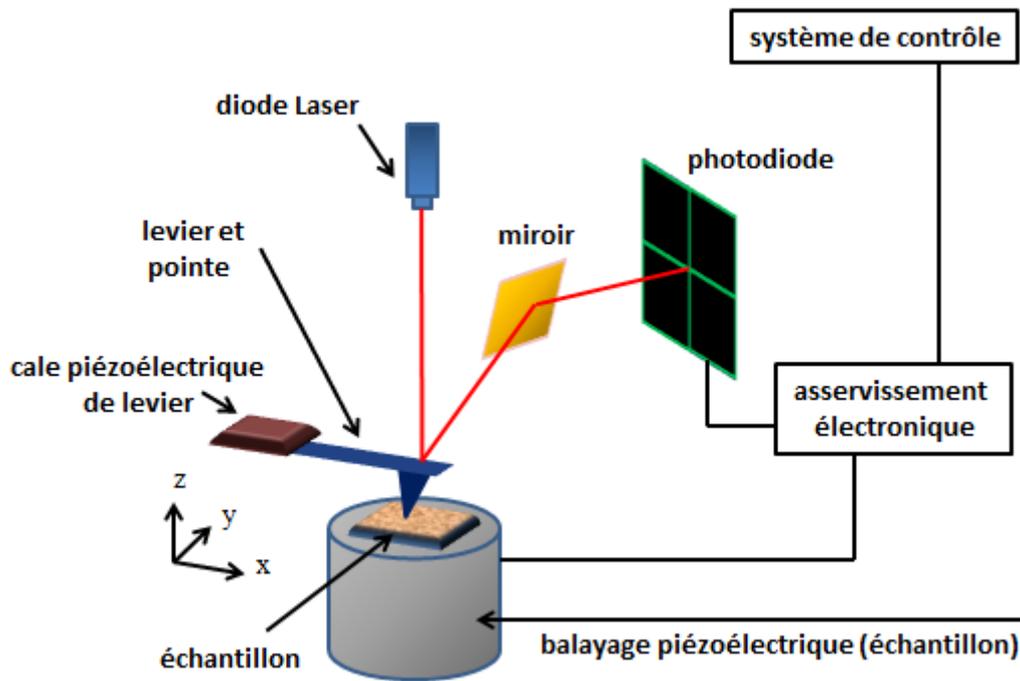


Figure II. 13. Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

➤ La céramique piézoélectrique de positionnement : c'est le système de déplacement vertical (z) ou de balayage dans le plan horizontal (x,y) du support de l'échantillon. Ces variations sont enregistrées pour permettre une représentation en trois dimensions de la surface analysée.

➤ La boucle d'asservissement : l'acquisition des données ne s'effectue pas de manière directe mais par asservissement de la position de la pointe à une valeur de déflexion de référence appelée *set-point*. Si la valeur de déflexion du levier mesurée est différente du *set-point*, le système électronique applique des tensions aux céramiques piézoélectriques commandant les déplacements de la pointe. Ces tensions entraînent la contraction ou la dilatation des céramiques, le but étant de ramener la valeur de la déflexion instantanée à la valeur de référence. On parle d'asservissement ou de boucle de rétroaction. La réponse des céramiques piézoélectriques étant en première approximation linéaire en tension, la topographie de l'échantillon est obtenue en enregistrant les tensions qu'il faut appliquer aux céramiques piézoélectriques pour ramener la valeur instantanée à la valeur de référence.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le microscope AFM Multi-mode Nanoscope 3, développé par la société Veeco-Bruker (France). Deux types de pointes, livrées par la même société (Bruker), ont été utilisées : le modèle NCLVA-A ($f_0= 130-250$ kHz, $k=48$ N/m) en antimoine dopé avec le silicium pour le mode tapping et le modèle SNL-10 ($f_0= 65$ kHz,

$k=0.35 \text{ N/m}$) en silicium (le levier étant, lui, en nitrure de silicium) pour le mode contact.

IV.3. Les différents modes de fonctionnement de l'AFM

Selon la direction de balayage, on distingue deux modes de fonctionnement en AFM :

- En balayant le plan horizontal (x,y) de l'échantillon, on travaille en mode d'imagerie, le but étant de réaliser une image de la surface. Il existe trois modes d'imagerie principaux : mode contact, mode intermittent et mode non-contact.
- En balayant l'axe z vertical à (x, y) fixes, on travaille en mode spectroscopique, afin d'obtenir des informations sur la force d'interaction, par le biais de courbes dites d'approche-retrait.

Dans ce paragraphe, nous n'introduisons que les deux modes d'imagerie utilisés dans ce travail de thèse (le mode contact et le mode intermittent) en détaillant en parallèle les modes spectroscopiques correspondants.

IV.3.1. Mode contact

IV.3.1.1. Principe

Le principe de ce mode est illustré dans la Figure II.14. Ce mode est caractérisé par un contact permanent entre la pointe et la surface de l'échantillon, au risque de l'endommager. Par contre, c'est avec ce mode qu'est obtenue la résolution atomique.

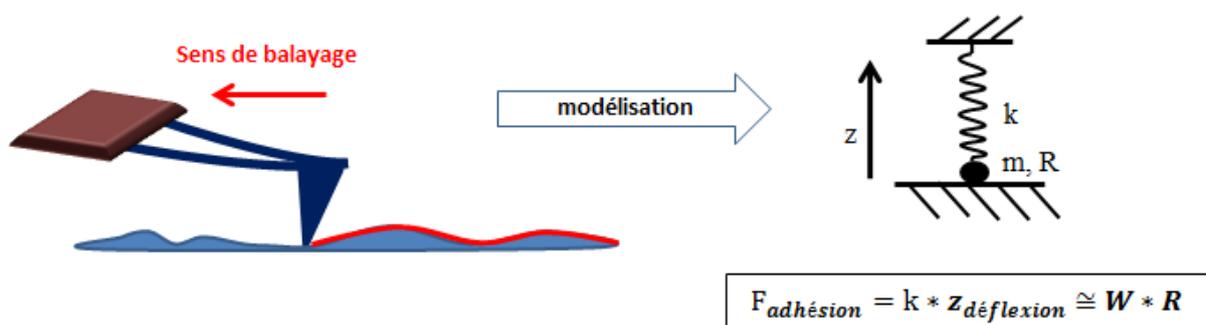


Figure II. 14. Schémas du mode contact de l'AFM.

Les principales forces mises en jeu entre la pointe et la surface sont des forces répulsives à très courte portée, adhésion et friction (Figure II.12).

IV.3.1.2. Types et origines des images en mode contact

En mode contact, différentes variantes sont possibles : le mode hauteur, le mode force, le mode friction (frottement) et le mode déflexion.

Le mode hauteur, ou mode à force constante, est le plus couramment utilisé. La déflexion du levier est maintenue constante par la boucle d'asservissement. Les lignes d'équiforces sont donc interprétées comme la topographie de l'échantillon : le contraste de l'image est dû uniquement au déplacement en z de la céramique piézoélectrique.

Le mode force, ou mode à hauteur constante : la hauteur de l'échantillon est maintenue constante et la déflexion du levier est enregistrée. Ce mode donne également des informations topographiques mais il introduit une limite dans le choix de l'échantillon : il doit être très peu rugueux de manière à ce que la pointe puisse balayer la surface sans que celle-ci soit endommagée. Ici le contraste de l'image est uniquement dû aux variations locales de forces.

Le mode friction : en mode contact, le balayage de la pointe sur la surface fait intervenir des forces de friction, correspondant au frottement et/ou à l'adhésion de la pointe sur l'échantillon. La détection de ces forces est possible à partir de la mesure des déflexions latérales du bras de levier lorsqu'on balaie la surface perpendiculairement à l'axe du levier. Ces déflexions latérales sont mesurées par la différence de signal entre les parties gauche et droite des photodétecteurs.

Le mode déflexion : en mode contact, il est possible de mesurer la déflexion du levier en fonction du déplacement oscillant en z de l'échantillon par rapport à la pointe, permettant l'obtention d'une courbe de force donnant la variation de cette force en fonction de la distance entre la pointe et la surface. D'un point de vue pratique, l'obtention d'une telle courbe se fait en appliquant une tension à la céramique piézoélectrique, qui s'étend jusqu'au contact puis se rétracte, approchant et éloignant l'échantillon de la pointe. En contrôlant l'amplitude et la fréquence de la tension, on fait varier la distance parcourue par la pointe et sa vitesse d'oscillation en z. La déflexion z du levier est reliée à la force d'adhésion F par l'expression : $F = k z$ où k est la constante de raideur du levier (Figure II.13).

IV.3.1.3. Mode spectroscopique

L'étude de la déflexion du levier en fonction du déplacement en z de l'échantillon donne une courbe dite « courbe de charge/décharge » (Figure II.15), qui renseigne sur les forces d'adhésion et la raideur de l'échantillon.

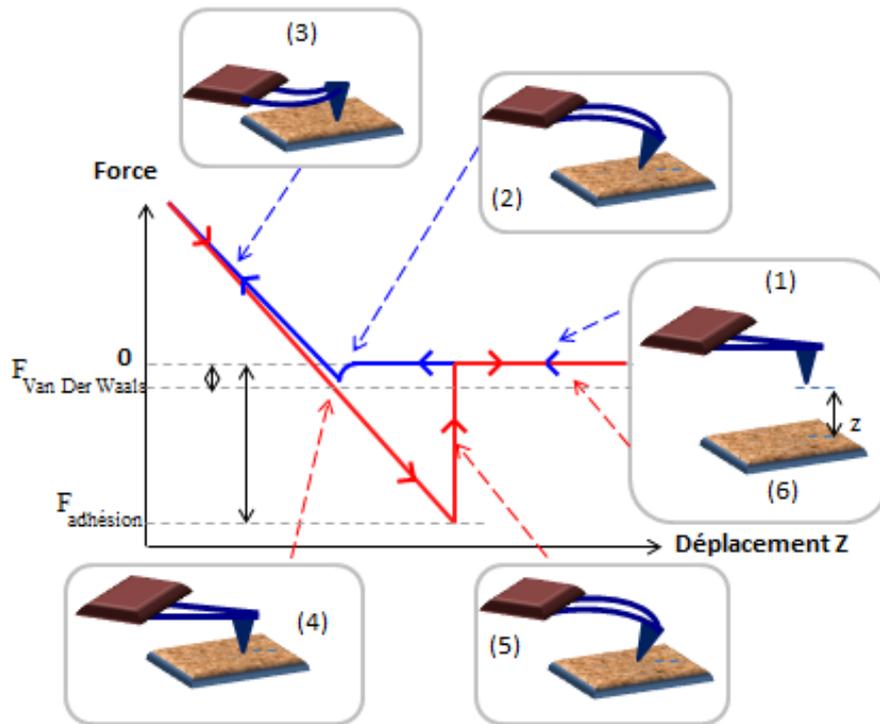


Figure II. 15. Courbe de charge/décharge donnant la force entre la pointe et la surface en fonction de la distance z en mode contact : les phases (1), (2) et (3) correspondent à la charge et (4), (5) et (6) correspondent à la décharge.

- *Courbe aller (charge)*: les forces existant entre la pointe et la surface sont très faibles voire nulles loin de la surface. Par conséquent la déflexion du levier est nulle (étape 1 sur la Figure II.15). A l'approche du contact, l'interaction pointe-surface apparaît et elle est attractive, ce qui entraîne une faible déflexion du levier qui n'est parfois pas détectable, en particulier lorsque celui-ci est très raide (étape 2). Lorsque la surface entre en contact avec la pointe, le sens de la déviation du levier s'inverse (devient positif) et augmente linéairement (étape 3) quand la pointe entre dans la surface.
- *Courbe retour (décharge)*: le mouvement de l'échantillon est inversé. Le système pointe-échantillon se décharge en passant par une phase (4) où la distance entre l'échantillon et la pointe s'annule et donc le levier n'est pas dévié. Quand l'échantillon continue à s'éloigner, la pointe reste au contact de la surface de l'échantillon grâce aux forces d'adhésion. Dans la phase (5) la force élastique du levier l'emporte sur la force d'adhésion. Enfin, le levier revient dans son état initial (6 équivalent à 1).

Ces courbes de charge/décharge permettent de fixer le point de fonctionnement de l'expérience, en particulier la force imposée au niveau du contact et avec laquelle les images topographiques et/ou mécaniques seront enregistrées. Elles fournissent des informations sur la

raideur effective de l'échantillon à partir de la pente (s) de la droite dans la phase (3) ($k_{\text{éch}} = k_p \cdot s / (1-s)$) [A. Boulbitch, 2000] ainsi que sur son énergie de surface à partir de la mesure de $F_{\text{adhésion}}$. La force imposée est, elle, déduite à partir de la loi de Hooke.

IV.3.1.4. Manipulation de grattage en mode contact

La méthode de grattage, décrite par Lobo et coll. [R. F. M. Lobo, 1999], est utilisée pour déterminer l'épaisseur du matériau déposé sur le mica (ici la couche d'HDL). Il s'agit ici d'utiliser la pointe comme un râteau qui débarrasse localement la surface de cette couche. Un profil de hauteur réalisé entre la surface nue du substrat et une zone intacte du film permet alors de déterminer l'épaisseur cherchée (Figure II.16).

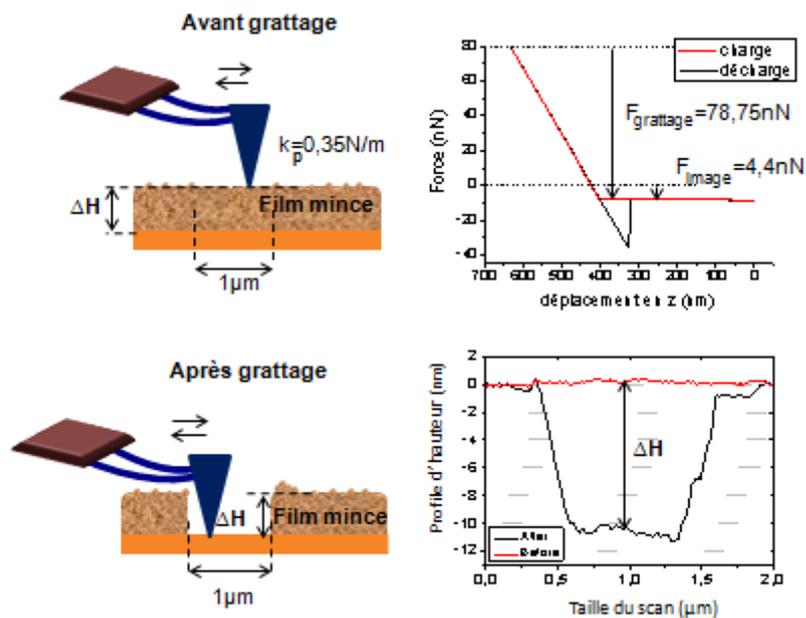


Figure II. 16. Principe de grattage en mode contact.

Il faut donc appliquer une force très supérieure à celle choisie comme point de fonctionnement en mode d'imagerie : typiquement dans notre cas $F_{\text{grattage}} = 78.75 \text{ nN}$ et $F_{\text{image}} = 4.40 \text{ nN}$. Des expériences de grattage sur le substrat de référence nu (mica) montrent que le substrat ne subit pas d'abrasion par la pointe. Pratiquement, le secteur choisi (d'une surface de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) est parcouru à plusieurs reprises en augmentant la force appliquée sur la pointe et la vitesse de balayage. Après le grattage du film de HDL, un *zoom-out* contenant le secteur érodé est effectué dans le mode contact. L'épaisseur du film est estimée à l'aide d'une section tracée au niveau du trou.

IV.3.2. Mode contact intermittent (dit aussi mode « tapping »)

IV.3.2.1. Principe

En mode contact intermittent (ou *tapping*), une tension $V = V_0 \sin(2\pi f_0 t)$ excite une petite céramique piézoélectrique supportant le levier. Celui-ci oscille alors à sa fréquence de résonance mécanique avec une amplitude libre A_1 et un déphasage libre φ_1 quand la pointe est loin de la surface (Figure II.17). La fréquence de travail f est légèrement inférieure à la fréquence propre f_0 du levier, pour garantir un fonctionnement proche d'un oscillateur harmonique amorti forcé dans un champ extérieur $F(z)$.

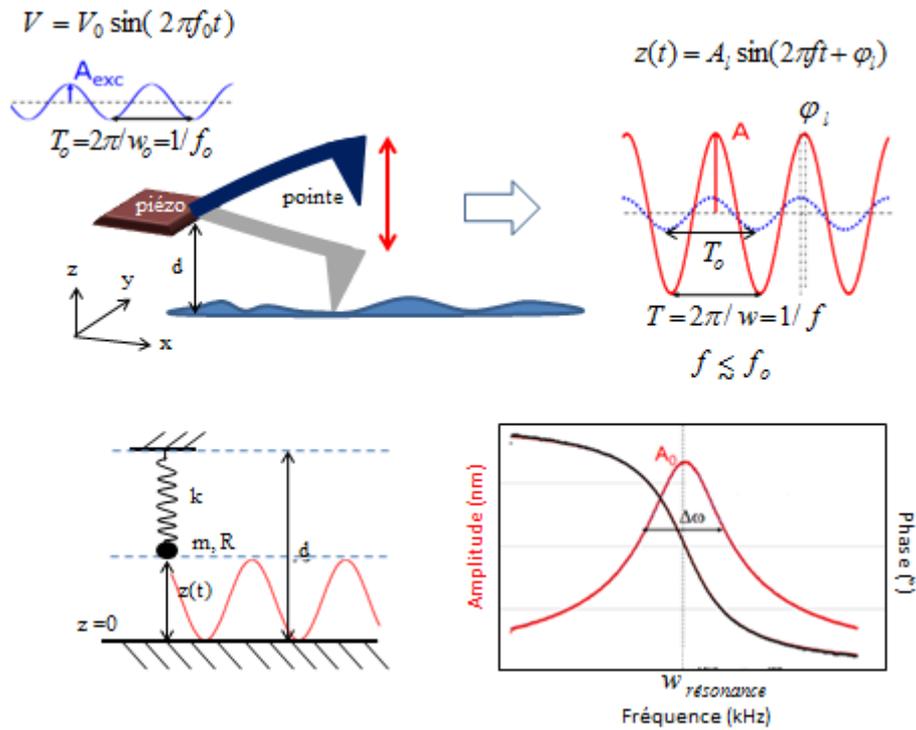


Figure II. 17. Schémas de principe du mode contact intermittent (*tapping*) de l'AFM.

L'équation du mouvement de cet oscillateur est alors du type :

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} = k(Z_p - z) - \xi \frac{dz}{dt} + F(z) \quad (\text{éq II.6})$$

où z représente la hauteur de la pointe ; $Z_p = Z_0 + E \cos(\omega t)$ est la hauteur de la céramique piézoélectrique ; ξ est le coefficient de frottement, et m et k représentent la masse et la constante de raideur du levier, respectivement.

La résolution de cette équation (II.6) décrite dans [L. Nony, 2000] nous permet de déterminer:

- L'état stationnaire de l'oscillateur (à un temps long) : $z(t) = A(\omega)\cos(\omega t + \varphi(\omega))$;
- La sensibilité (ou facteur de qualité) Q du levier définie par :

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\omega} = \frac{f}{\Delta f_0} = \frac{m\omega_0}{\xi} \quad \text{avec} \quad \omega_0^2 = \frac{k}{m} \quad (\text{éq II.7})$$

où ω_0 et f_0 représentent la pulsation et la fréquence propres du levier ;

$\Delta\omega_0$ et Δf_0 représentent la largeur de la bande passante de la résonance du système en pulsation et en fréquence ;

- L'expression de l'amplitude :

$$A(\omega) = \frac{A_{exc}\omega^2}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \beta^2\omega^2}} \quad (\text{éq II.8})$$

où A_{exc} est l'amplitude d'excitation et β est une constante ;

- L'expression de la phase :

$$\tan(\varphi) = \frac{\beta\omega}{\omega^2 - \omega_0^2}. \quad (\text{éq II.9})$$

L'avantage du mode « tapping » réside dans le fait que le contact de la pointe avec la surface de l'échantillon est périodique et très court, limitant ainsi l'usure et/ou la pollution de la pointe et surtout la perturbation et/ou la modification de la surface de l'échantillon. Dans ces conditions (oscillation de grande amplitude, soit un contact périodique et court), le balayage de la surface par la pointe permet d'obtenir une bonne résolution latérale du fait de la faible force latérale. Ce mode est donc particulièrement bien adapté pour la visualisation d'échantillons fragiles tels que les matériaux mous et les matériaux biologiques (enzymes...).

IV.3.2.2. Types et origines des images en mode « tapping »

Les données résultant du mode « tapping » sont l'image de hauteur, l'image d'amplitude et l'image de phase :

Image de hauteur dite « image topographique » : en maintenant l'amplitude d'oscillation constante à l'aide du système d'asservissement, on enregistre les déplacements de la céramique piézoélectrique suivant z ce qui permet d'obtenir une image dite de « hauteur ». Le contraste est topographique.

Image d'amplitude ou « d'erreur » : le contraste d'amplitude est aussi topographique. Il dépend de la variation d'altitude suivant la direction de balayage. Cette variation de l'amplitude d'oscillation est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le

déplacement en z , pour conserver l'amplitude constante et ainsi suivre la morphologie de la surface permettant de révéler les variations abruptes de faible amplitude.

Image de phase : la pointe oscille en déphasage avec la céramique piézoélectrique. Ce déphasage change quand la pointe rencontre des régions de propriétés de surface différentes ; l'enregistrement du déphasage donne un contraste caractéristique de l'adhésion et/ou de l'élasticité, selon la nature de l'échantillon. De plus, même sur un échantillon homogène, le signal obtenu permet souvent d'obtenir une meilleure résolution morphologique que sur les images de hauteur et d'amplitude.

IV.3.2.3. Mode spectroscopique de force

Une courbe d'approche-retrait représente l'évolution de l'amplitude A et de la phase ϕ de l'oscillateur en fonction de la position du tube piézo-électrique lors d'un aller-retour selon l'axe z en un point (x, y) de la surface. La Figure II.18 montre un exemple de courbe d'approche-retrait.

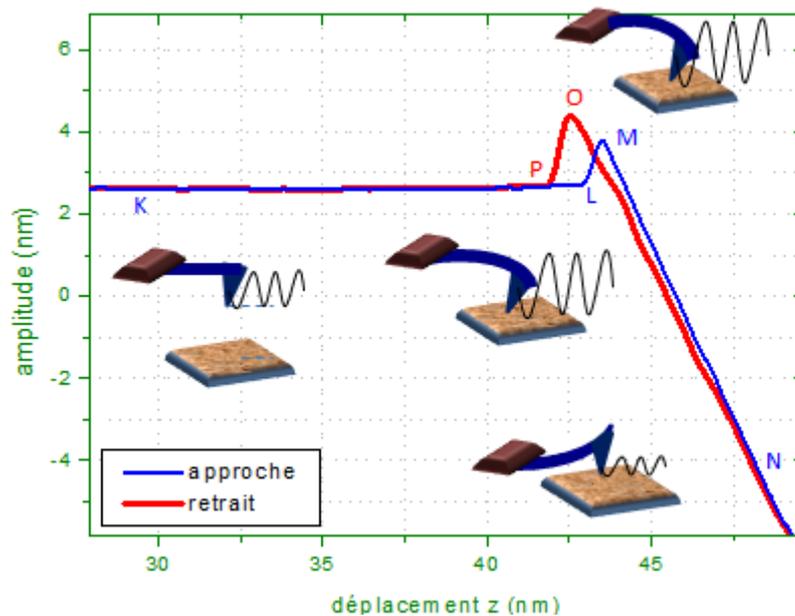


Figure II. 18. Exemple de courbe d'approche-retrait d'amplitude

Loin de la surface (point K), l'interaction pointe-surface est trop faible pour influencer l'amplitude. L'amplitude reste alors à sa valeur libre. L'approche de l'échantillon entraîne un saut d'amplitude dû aux interactions de van der Waals (points L-M). Le contact de l'échantillon réduit l'amplitude suite à l'augmentation des interactions répulsives (points M-N). Au retrait, on observe l'hystérésis d'amplitude (points O-P puis K) liée aux forces

d'adhésion entre la pointe et la surface. Dans un milieu liquide, ces forces sont écartées à cause de la constante diélectrique de l'eau et, par conséquent, on n'observe quasiment pas de saut d'amplitude et d'hystérésis au retrait [L. Nony, 2000].

Les courbes d'approche/retrait permettent de fixer le point de fonctionnement de l'expérience, en particulier l'amplitude d'oscillation du levier. Elles permettent d'accéder aux propriétés physiques locales de l'échantillon (adhésion par exemple) et contiennent l'information permettant de déterminer les origines physiques du contraste, par exemple.

V. IMMOBILISATION DE LA TYROSINASE

V.1. Méthodes d'immobilisation et conditions expérimentales

L'enzyme qui a été utilisée dans ce travail de thèse est la tyrosinase extraite du champignon « *Agaricus bisporus* » [D. Kertez et coll., 1965]. Elle appartient à la catégorie EC 1.14.18.1 définie par l'IUBMB (activités crésolase et catécholase, voir le chapitre 1). Elle est commercialisée chez Sigma-Aldrich (France) sous la référence T3824, avec une activité ≥ 1000 unités/mg de solide³³.

La tyrosinase est solubilisée dans un tampon PBS ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH= 6.6) à une concentration de 1.5 mg/mL, aliquotée et stockée au congélateur.

Un résumé des propriétés du produit est donné dans le Tableau II.3.

Poids moléculaire	119.5 kDa défini par électrophorèse
Point isoélectrique³⁴ (pI)	4.7–5.5
pH optimum	6–7
Activité	1.000 unités/mg de solide
Stockage et stabilité	Stockage du produit à -20 °C pour moins de 5% de perte d'activité par année. Stockage du produit à 37 °C \Rightarrow 40–60% de perte d'activité par semaine.

Tableau II. 3. Informations sur le produit « Tyrosinase EC 1.14.18.1 » [Sigma-Aldrich, Product information]

³³ Une unité entraîne une augmentation de l'absorbance de 0,001 par minute à 280 nm (pH 6,5 ; température de 25 °C, cellule de 1 cm) dans un mélange réactionnel de 3 mL de volume contenant de la L-tyrosine (substrat de la tyrosinase).

³⁴ pI : pH au niveau duquel la protéine est globalement neutre.

L'immobilisation de la tyrosinase sur le substrat, qu'il s'agisse du mica pour une étude par AFM ou de l'électrode pour l'analyse électrochimique, nécessite tout d'abord de réaliser le film de HDL suivant le protocole déjà décrit dans ce chapitre (paragraphe III).

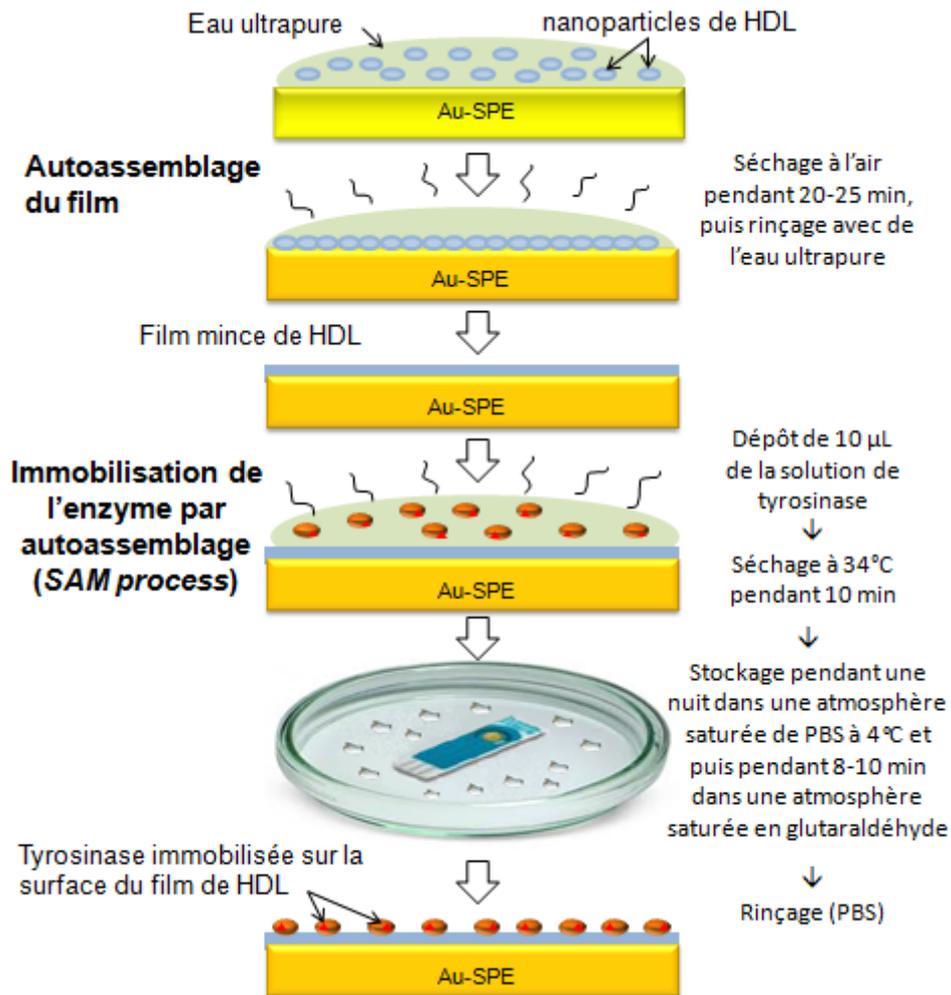


Figure II. 19. *Protocole d'immobilisation de l'enzyme sur un film de HDL.*

Brièvement, la solution aqueuse de HDL est homogénéisée par agitation rapide au vortex. Un volume suffisant pour couvrir la surface du substrat solide (électrode ou mica) sans déborder est prélevé et déposé (Figure II.19).

L'ensemble est ensuite placé dans un incubateur pour être séché à l'abri de la poussière, puis rincé à l'eau ultra pure pour éliminer les nanoparticules de HDL en excès.

La seconde étape consiste à déposer un faible volume (10 μ L) d'une solution de 1.5 mg/mL de tyrosinase solubilisée dans du PBS physiologique sur la surface fonctionnalisée par le film de HDL. Après incubation à 37 °C pendant 10 min, l'échantillon est stocké pendant toute une

nuit dans une atmosphère saturée en PBS à 4 °C, puis placé pendant 8 min dans une atmosphère saturée en glutaraldéhyde afin de réticuler l'enzyme immobilisée. Enfin, il est rincé soigneusement avec du PBS pour éliminer les molécules d'enzymes non liées.

V.2. Méthodes d'analyse de l'immobilisation

Pour s'assurer de l'ancrage de l'enzyme et de son fonctionnement à la surface de la couche mince de HDL, nous avons utilisé l'AFM (à l'air et en milieu liquide) et l'analyse électrochimique (voltammétrie cyclique et chronoampérométrie). Cette dernière est décrite dans les paragraphes suivants.

VI. MESURES ELECTROCHIMIQUES

VI.1. Principe de la réaction électrochimique

Les réactions électrochimiques ont lieu à l'interface de deux systèmes conducteurs, l'un électronique (une électrode) et l'autre ionique (la solution), lors d'un transfert de charge sous la forme d'un ou plusieurs électrons. Lors de ce transfert, on assiste à une transformation chimique : l'oxydoréduction (Figure II.20).

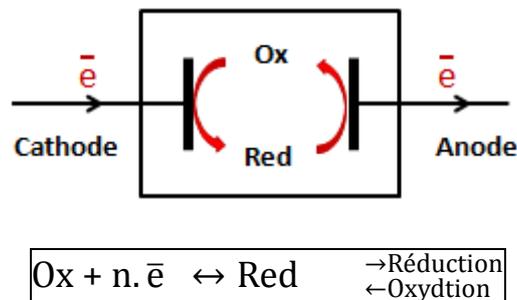


Figure II. 20. Réaction d'oxydoréduction et transport du courant dans une chaîne électrochimique.

Cette réaction résulte, en général, d'une combinaison d'étapes élémentaires [B. Torbiero, 2006]. On peut distinguer deux types de phénomènes (Figure II.21):

- le transport des espèces entre solution et électrode ;
- le processus se déroulant sur ou au voisinage immédiat de l'électrode se décomposant en:

- des transferts de charge (souvent en plusieurs étapes quand il y a plusieurs électrons échangés) ;
- des réactions chimiques associées (complexation, transfert de proton, etc...) ;
- des phénomènes de surface (adsorption, croissance de couche cristalline, etc...).

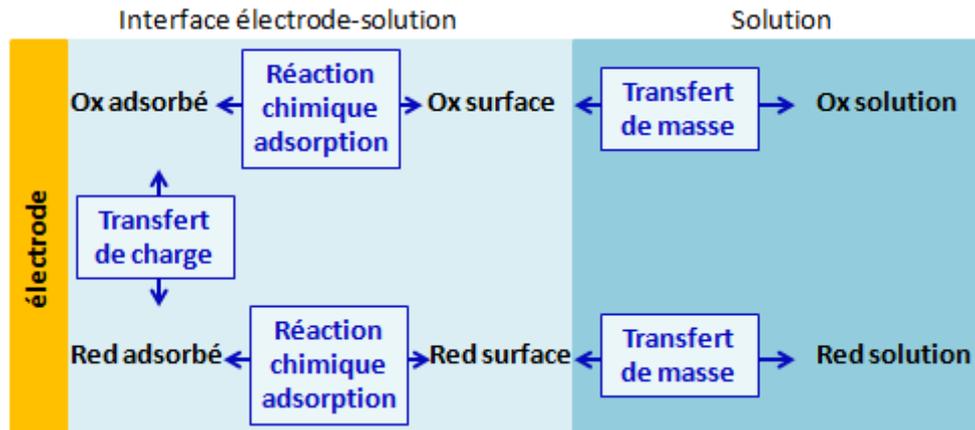


Figure II. 21. Schéma du transfert de charge et de masse au voisinage de l'électrode.

Le phénomène limitant la vitesse peut être n'importe lequel de ces processus élémentaires. En pratique, deux situations présentent une importance particulière :

- le transfert de matière par diffusion est lent devant le transfert de charge, il est donc cinétiquement limitant ;
- ou le transfert de charge est lent donc cinétiquement limitant.

Plus de détails sur les notions de transport de la matière et de réaction de transfert électronique sont présentés dans l'annexe (B).

La variation du potentiel électrique aux abords de la surface de l'électrode est décrite par le modèle de la double couche électrique d' Helmholtz [M. J. Bedzyk, 1990] (annexe B).

Le potentiel d'équilibre de la solution est défini par la loi de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Ox]_{x=0}}{[Red]_{x=0}} \right) \quad (\text{éq II.10})$$

Où :

- E_0 est le potentiel standard du couple Red/Ox ;
- $[Ox]_{x=0}$ et $[Red]_{x=0}$ sont les concentrations des deux composés (oxydant et réducteur) au niveau de la surface de l'électrode de travail ;
- n est le nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction ;

- R est la constante des gaz parfaits ($R = 8.3144621 \text{ J. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) ;
- T est la température absolue de kelvin ;
- F est la constante de Faraday ($1 \text{ F} = 96\,485 \text{ C. mol}^{-1}$) ;

A température ambiante ($25 \text{ }^\circ\text{C} = 298.15 \text{ K}$), on a $(RT/F) = 0.059\text{V}$.

La réaction d'oxydoréduction s'accompagne de modifications des états physico-chimiques des éléments présents dans la solution (dépôt métallique, formation d'espèces radicalaires, réactions chimiques couplées...). Ces changements peuvent être mesurés à l'aide de différentes méthodes telles que la voltammétrie cyclique, la chronoampérométrie, la spectroscopie d'impédance ...

VI.2. Voltammétrie cyclique [P. T. Kissinger et coll., 1983]

VI.2.1. Principe

La voltammétrie est une technique d'électroanalyse basée sur un montage à trois électrodes : une électrode de référence (ER), une électrode de travail (ET) et une électrode auxiliaire (ou contre électrode, CE). En appliquant une variation contrôlée de potentiel entre l'ER et l'ET, la réduction ou l'oxydation des composés présents en solution au voisinage de l'ET induisent un flux de courant mesuré entre l'ET et la CE (Figure II.22.b). Un électrolyte support³⁵ est habituellement ajouté à la solution afin d'assurer une conductivité suffisante.

Le mot cyclique vient du fait que l'intervalle de potentiels appliqué au système suit une variation périodique au cours du temps (Figure II.22.a). La période est formée par deux scans linéaires, un direct (ascendant) et un inverse (descendant), suivant l'équation : $E(t) = E_{start} \pm vt$, dans laquelle v est la vitesse de balayage de potentiel et E_{start} est le potentiel initial choisi pour qu'aucune réaction n'ait lieu. Ceci signifie que, par exemple, les espèces formées par oxydation lors du premier balayage (direct) peuvent être réduites lors du second balayage (inverse). Le générateur permettant de maintenir constant le potentiel de l'ET est appelé potentiostat (Figure II.22.b).

³⁵ Appelé aussi électrolyte indifférent : c'est un composé ionique qui s'ajoute à la solution à une concentration élevée, par comparaison avec la concentration des espèces électroactives, pour augmenter la conductivité de la solution sans réagir aux électrodes dans les conditions expérimentales données. Il rend le flux de migration des espèces électroactives (qui réagissent aux électrodes) négligeable par rapport aux flux de diffusion et de convection.

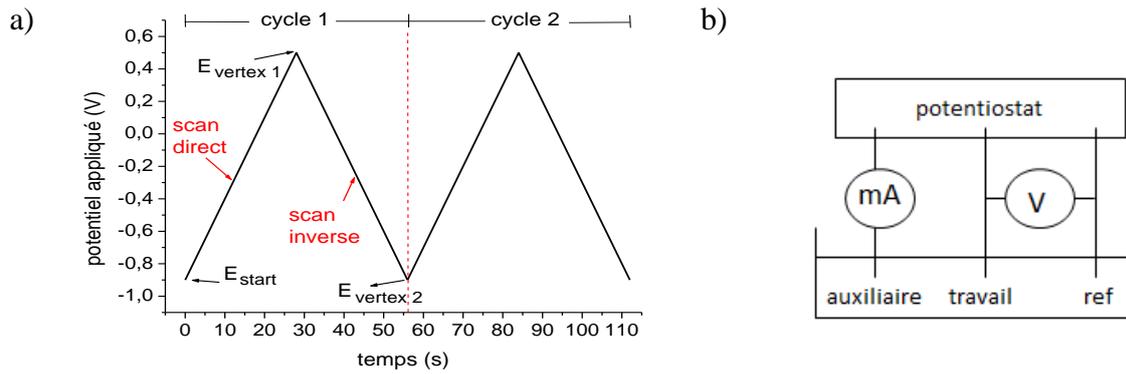


Figure II. 22. a) Forme du potentiel imposé entre les électrodes ET et ER en voltammétrie cyclique. b) Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé.

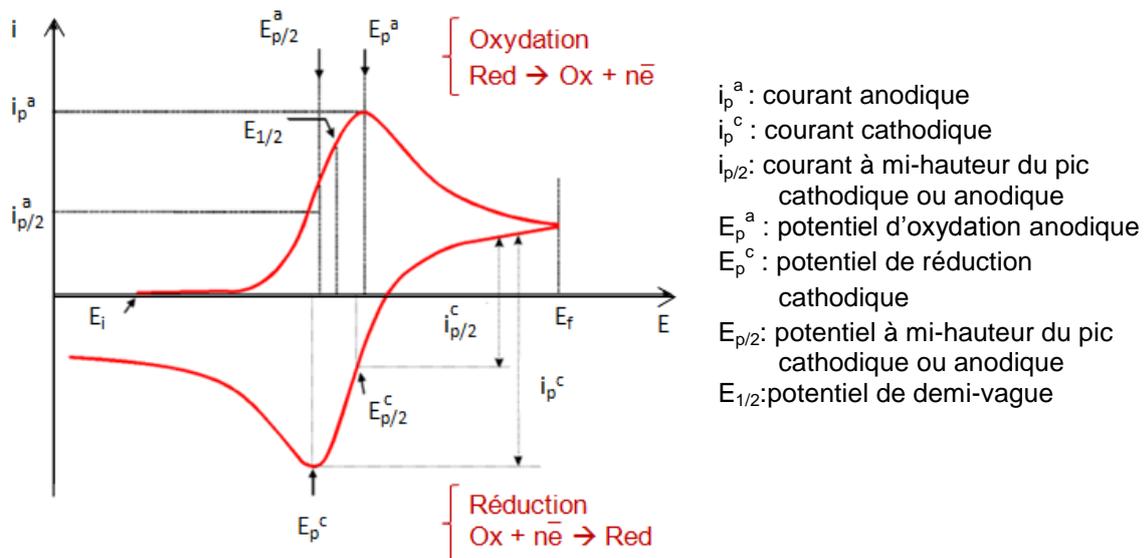


Figure II. 23. Exemple de voltamogramme cyclique [B. Torbiero, 2006].

Les données de sortie sont tracées sous la forme de courbes d'intensité (i) en fonction du potentiel (E), appelées voltamogrammes cycliques ou voltampérogrammes (Figure II.23). Dans le cas qui nous intéresse (régime de diffusion pure), la caractéristique de $i=f(E)$ « aller » est différente de la caractéristique « retour » car entre l'aller et le retour, la couche de diffusion a été modifiée dans sa composition [B. Torbiero, 2006].

La réaction électrochimique commence en imposant une surtension ($E-E_{eq}$) au système rendant le potentiel d'électrode différent du potentiel d'équilibre (E_{eq}). Cela provoque une évolution du système plus ou moins rapide (voir Annexe C) tendant au rétablissement d'un nouvel état d'équilibre. Ainsi :

- si $E > E_{eq}$, le potentiel E imposé et le rapport des concentrations des espèces $[Ox]_{x=0}$ et $[Red]_{x=0}$ va augmenter, le réducteur passant à l'état oxydé par la réaction d'oxydation

$\text{Red} \rightarrow \text{Ox} + n\text{e}$; cela se réalise par le transfert d'électrons dans le sens (solution \rightarrow électrode), qui est alors appelée anode.

- si $E < E_{\text{eq}}$, le potentiel E imposé et le rapport des concentrations au contact de l'électrode $[\text{Ox}]_{x=0}$ et $[\text{Red}]_{x=0}$ va diminuer, une partie de l'oxydant se réduisant selon $\text{Ox} + n\text{e} \rightarrow \text{Red}$; les électrons sont apportés par l'électrode (vers la solution), alors appelée cathode.

Les réactions d'oxydation et de réduction figurent sur le voltamogramme (Figure II.23) sous la forme de pics caractérisés par un potentiel de pic anodique E_p^a et cathodique E_p^c , un potentiel à mi-hauteur du pic $E_{p/2}$ anodique et cathodique, et un potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ qui a une valeur proche de celle de E^0 [E.Gileadi, 1993, C. Christophe, 2010].

VI.2.2. Matériel utilisé pour la voltammétrie

En Tunisie, les mesures de voltammétrie cyclique et celles de chronoampérométrie sont effectuées à l'aide d'un analyseur d'impédance à interface électrochimique portable appelé « CompactStat ». Ce potentiostat est contrôlé via un logiciel soft polyvalent et intuitif appelé « Ivium ». Ce dernier permet le contrôle de l'instrument, la gestion et l'analyse des données.

En France, les mesures de voltammétrie cyclique sont effectuées à l'aide d'un potentiostat « PSTAT mini 910 » contrôlé via le logiciel soft « PSTAT software 1.1 » commercialisé par la société Metrohm (France).

Deux types de systèmes d'électrodes sérigraphiées (*Screen Printed Electrodes SPE*) ont été utilisés (Figure II.24):

- Les électrodes en or jetables de chez DropSens (France), réf. DS250AT. Le substrat de l'électrode est en céramique, de dimensions 33.0 x 10.0 x 0.5 mm (longueur, largeur, épaisseur, respectivement). Les contacts électriques sont en argent. La cellule électrochimique est composée d'une ET en or (disque de 4 mm de diamètre), d'une CE en platine et d'une ER en argent.

- Des électrodes en platine et en or (Réf. $\Omega 61208210$ et $\Omega 61208510$) de la société Metrohm (France) ont également été utilisées. La CE est en carbone et l'ER est en argent. Ces électrodes ont les mêmes dimensions que celles de DropSens mais les fils de connexion électrique (en argent) sont plus longs (21 mm pour les électrodes de Metrohm et 16 mm pour celles de DropSens).

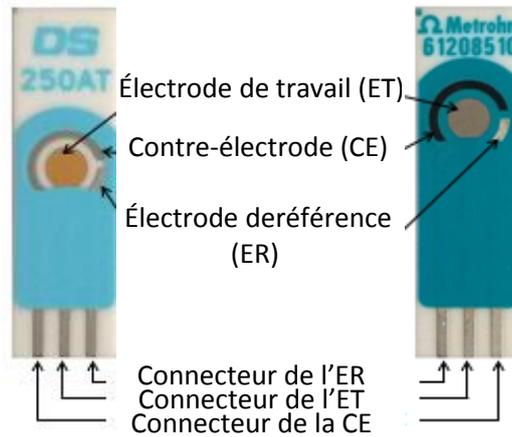


Figure II. 24. *Electrodes sérigraphiées (screen-printed electrodes) des sociétés DropSens et Metrohm.*

L'électrolyte support utilisé est suivant les cas le PBS (*phosphate buffer saline*, 10 mM, 0.137M NaCl, pH 7.4) ou le couple de potassium hexacyanoferrate (III)/ potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate ($K_3Fe(NC)_6$ et $K_4Fe(NC)_6 \cdot 3H_2O$).

Nous avons choisi une électrode de travail en or car ce métal est inerte et inattaquables au contact d'un système oxydo-réducteur. Le métal de l'électrode ne sert que d'échangeur d'électrons. Les SPEs conviennent pour des détections utilisant des micro-volumes, permettant de développer des capteurs spécifiques.

VI.3. La chronoampérométrie

Lors de la réaction électrochimique, deux processus sont cinétiquement en compétition : le transport de la matière et la réaction de transfert électronique (voir l'annexe B).

En régime de diffusion naturelle pure (sans convection, voir l'annexe B), la variation continue du potentiel d'électrode rend complexe l'interprétation des réponses du courant en fonction du temps $I = f(t)$. Il apparaît donc plus simple d'opérer en fixant l'une des deux grandeurs, soit le potentiel E , soit l'intensité de courant I . Dans le premier cas, à potentiel fixe, la variation $I = f(t)$ conduit à la mise en œuvre de la technique appelée chronoampérométrie. Dans le second cas, le suivi de la variation spontanée de E suite à l'imposition d'une densité de courant j fixe conduit à la mise en œuvre de la technique appelée chronopotentiométrie.

Dans ce travail de thèse on a utilisé la chronoampérométrie pour vérifier la détection des polyphénols et pour calculer le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive dominante au cours de la réaction électrochimique.

Le courant d'oxydation, par exemple, peut s'exprimer en fonction du coefficient de diffusion (D_{ox}) selon l'expression suivante connue sous le nom d'équation de Cottrell [F. G. Cottrell, 1902] (voir annexe B):

$$I_{ox}(t) = nFS J_{ox}(0, t) = nFS C_{ox}^0 \sqrt{\frac{D_{ox}}{\pi t}} \quad (\text{éq. II.11})$$

D'un point de vue pratique, dans un premier temps, on enregistre la courbe de $I(t)$ reproduite en Figure II.25.

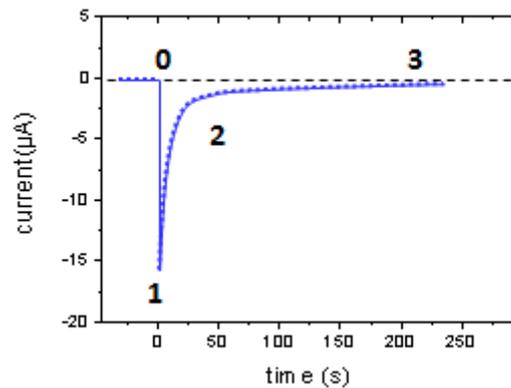


Figure II. 25. Graphe typique du courant mesuré en fonction du temps lors d'un ajout de substrat.

Avant le saut, l'intensité mesurée est nulle, donc aucune réaction chimique n'a lieu (étape 0). Après l'ajout de la solution (étape 1, $t=0$ s), un saut de courant dû à une réaction d'oxydation au niveau de l'électrode est enregistré. Cette intensité décroît rapidement en valeur absolue (étape 2) au cours du temps pour revenir à une valeur nulle (étape 3): la vitesse de réaction est donc limitée par le transport de matière et plus précisément par la diffusion (si la vitesse était limitée par la convection, l'intensité tendrait vers une valeur non nulle, aux ions près).

En général, en diminuant les concentrations en espèce électroactive et en répétant à chaque fois la mesure de $I(t)$, les limites des sauts de courant changent sur des temps de plus en plus courts puis forment des motifs en forme de marches qui se recouvrent. En effet, plus la concentration est faible, plus l'intensité est petite (exemple de la détection de l'acide gallique en Figure II.26).

Pour accéder aux paramètres analytiques (gamme dynamique linéaire ou *linear dynamic range* « *LDR* », sensibilité ou *calibration sensibility* « *S* » et limite de détection ou *limit of detection* « *LOD* ») on trace la courbe donnant le courant en fonction de la concentration en

substrat injectée. Sur une certaine gamme de concentration, cette courbe peut être représentée par un *fit* linéaire (Figure II.26B), d'où on peut extraire les paramètres caractérisant le capteur.

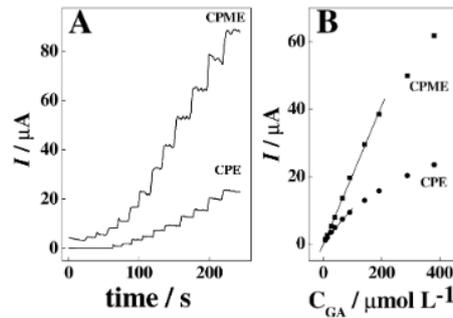


Figure II. 26. Réponse chronoampérométrique typique obtenue pour une électrode de carbone (CPE) et une électrode de carbone modifiée par un dimère (CPME) plongées dans une solution de 0.5M de KCl (pH 5.8) contenant de l'acide gallique (GA) à des concentrations variant de 0 M à $4 \cdot 10^{-4}$ M (A). Courbes analytiques correspondantes (B) [P. A. Raymundo-Pereira et coll., 2015].

Pour calculer le coefficient de diffusion, on trace la courbe correspondant à $f(t)$ définie par l'équation suivante [F. Maquere, 2002] :

$$f(t) = \frac{a}{i(t)^2} \quad (\text{éq. II.14})$$

avec :

$$a = \frac{(nFS)^2}{\pi}$$

La courbe de f en fonction du temps obtenue est une droite au voisinage du saut. Son coefficient directeur α_c peut être calculé à l'aide de l'outil de modélisation linéaire sachant que:

$$\alpha_c = \frac{1}{C_{Ox}^0 \cdot 2 D_{Ox}}. \quad (\text{éq. II.15})$$

Parfois le bruit de fond devient du même ordre de grandeur que le signal et augmente le phénomène de brouillage de la courbe en faisant se chevaucher ses marches. Ceci peut être dû à la sensibilité de la carte d'acquisition du matériel. Si la carte n'est pas de bonne sensibilité elle ne peut pas rendre compte de la valeur exacte de l'intensité, et renvoie une valeur arrondie, qui reste donc constante un certain temps. Mais en traçant l'inverse de l'intensité au carré, ces phénomènes sont amplifiés.

Pour trouver le coefficient de diffusion de l'espèce réduite en solution, il suffit de tracer la droite $\frac{1}{\alpha_c}$ en fonction de C_{Ox}^0 et de calculer sa pente.

VI.4. Nature des polyphénols utilisés

Les polyphénols utilisés dans cette étude pour valider la conception de nos capteurs sont extraits du thé vert et commercialisés par MP Biomedicals LLC (France, numéro de catalogue 193756, Lot: M2612). Ce produit est en fait un mélange de différents dérivés (décrits dans le chapitre 1 - III.1), contenant des catéchines à environ 83%. Dans ces catéchines les EGCG représentent environ 51%. Le produit compte également environ 1% de caféine. Les polyphénols sont purs à 99.61%.

Les polyphénols en poudre sont solubilisés tout d'abord dans l'eau ultrapure pour préparer une solution mère de concentration 1mg/mL. A partir de cette solution, des dilutions à des concentrations entre 0.01 ng/mL et 2000 ng/mL sont préparées.

Dans le chapitre 4, nous aurons besoin de comparer les performances de nos capteurs avec ceux déjà décrits dans la littérature. Cela implique de pouvoir exprimer par exemple les concentrations de polyphénols en M, donc de connaître la masse molaire moyenne de notre mélange de polyphénols. Cette dernière repose sur la composition du thé vert en ses différents constituants et sur leurs masses molaires respectives.

Nous nous sommes basés sur les analyses de la composition de différents thés verts, décrites par Friedman [M. Friedman, 2006], et plus particulièrement sur 23 d'entre elles (pour lesquelles les informations étaient les plus détaillées). Après obtention des pourcentages moyens des différentes molécules à partir de ces 23 thés, nous estimons la masse molaire moyenne de nos polyphénols à environ 415 g/mol. Cette valeur nous servira donc de référence pour convertir les concentrations de polyphénols de mg/mL en M.

VII. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les matériaux utilisés ainsi que la méthode de synthèse des HDLs et les différentes étapes qui entrent en jeu lors de l'élaboration du biocapteur. Par la suite, nous avons défini les principes de chaque technique utilisée pour la caractérisation de notre biocapteur. Les chapitres suivants résument les principaux résultats obtenus.

**CHAPITRE 3 : ETUDE STRUCTURALE ET
MORPHOLOGIQUE DES HDLs**

Dans une première partie de ce chapitre, nous présenterons les différents résultats obtenus par diffraction des RX, et spectroscopies IR et Raman pour la caractérisation structurale des poudres de HDLs synthétisés. Une deuxième partie sera dédiée aux propriétés morphologiques des couches minces formées à partir de ces nanocomposites. Dans la dernière partie, l'immobilisation de la tyrosinase sur ces films et une description de l'état final des nouvelles couches formées seront présentées.

I. ETUDE STRUCTURALE DES HDLs

I.1. Diffraction des RX

Les diffractogrammes de RX (Figure III.1) des matériaux synthétisés par la méthode de coprécipitation directe décrite précédemment sont caractéristiques d'un HDL [R. Mostarih et coll., 2006, A. C. Vieira et coll., 2009 ; K. Charradi et coll., 2010 ; R. E. Johnsen et coll., 2010 ; X. Fan et coll., 2013]. Ils présentent en effet les pics caractéristiques (003, 006, 012, 110 et 113) des HDLs purs.

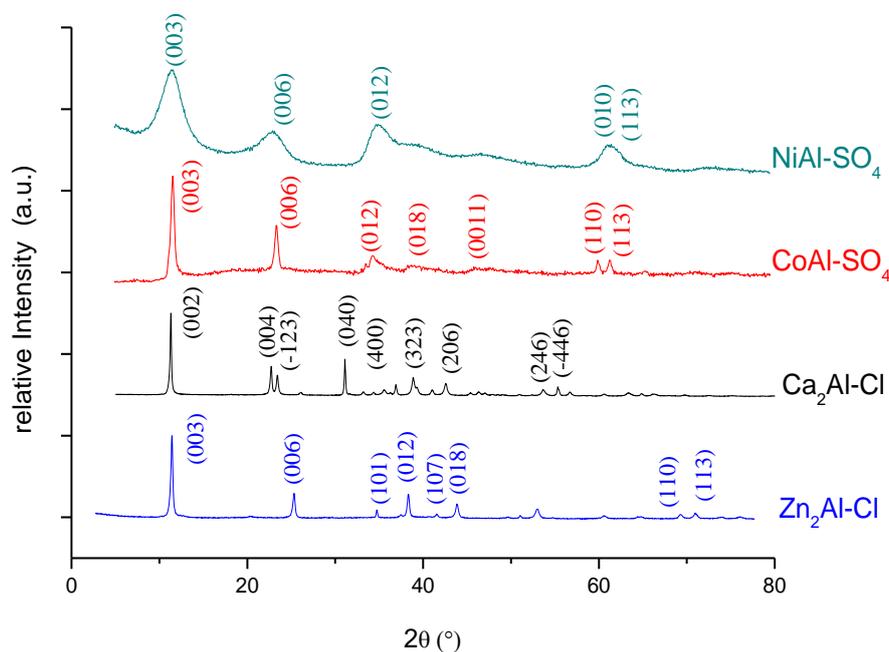


Figure III. 1. *Diffractogrammes des différents HDLs synthétisés*

Dans un premier temps, un affinement de type « *pattern matching* » (Figure III.2) fait par le simulateur FullProf suggère la présence d'un réseau hexagonal avec une symétrie rhomboédrique.

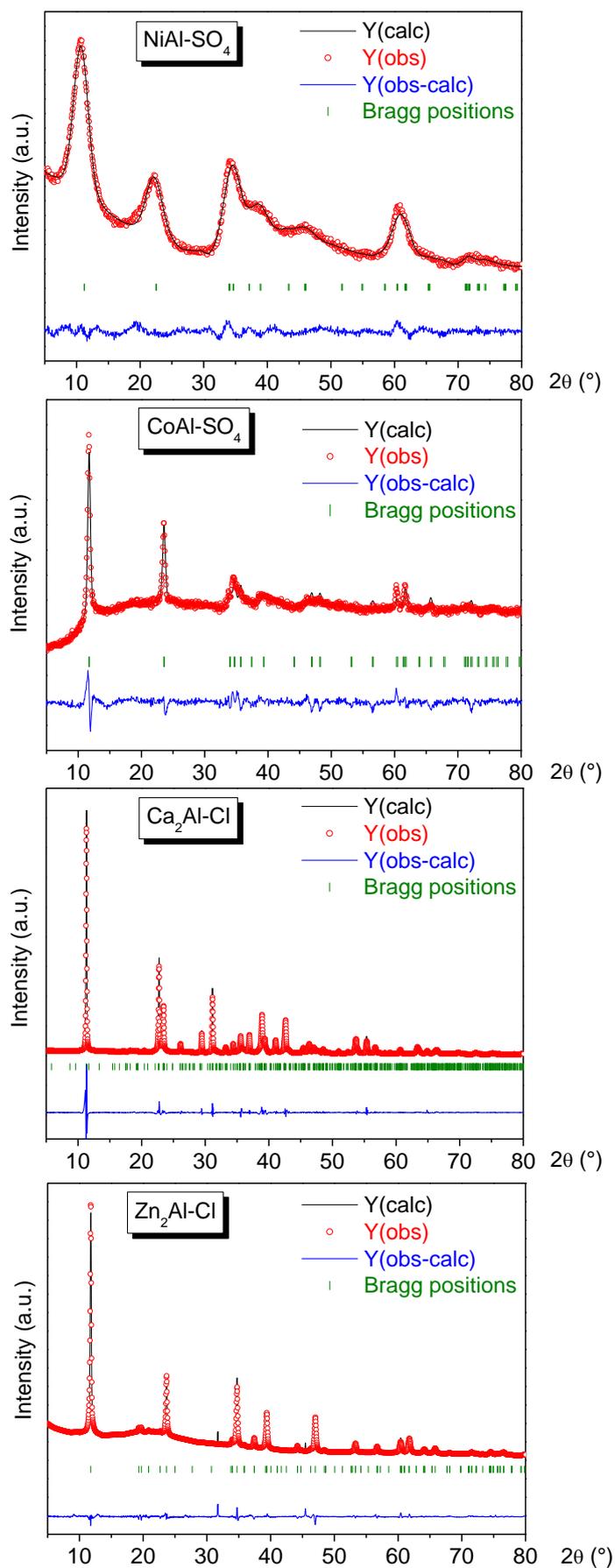


Figure III. 2. Affinement des paramètres de maille des différents HDLs synthétisés.

Ce logiciel permet par ailleurs de déterminer les paramètres de maille présentés dans le Tableau III.1. Les distances interréticulaires (d) sont calculées à partir de la raie principale (003) à l'aide des équations présentées dans le chapitre II (Tableau II.1). Les tailles des cristallites sont calculées à partir de la formule de Scherrer (éq II.2). Les pics larges constituant les diffractogrammes de NiAlSO₄ et CoAlSO₄ (Figure III.1) justifient les dimensions plus réduites des cristallites constituant ces poudres.

HDL	a (Å)	b (Å)	c (Å)	d (Å)	Taille de cristallites (nm)	Groupe d'espace
NiAl-SO ₄	3.08	3.08	23.10	7.5	17-21	R $\bar{3}$ m rhomboédrique
CoAl-SO ₄	3.06	3.06	22.64	7.6	20-28	R $\bar{3}$ m rhomboédrique
Ca ₂ Al-Cl	3.04	3.04	23.90	7.8	38-49	R $\bar{3}$ m rhomboédrique
Zn ₂ Al-Cl	3.06	3.06	22.53	7.6	40-50	R $\bar{3}$ m rhomboédrique

Tableau III. 1. Résultats de la caractérisation par diffraction des RX

Dans un second temps, un affinement des positions atomiques a été effectué pour tous les HDLs. La méthode Rietveld ne peut malheureusement pas donner un résultat exact dans le cas de ces diffractogrammes à cause du nombre réduit de pics et de leurs largeurs qui multiplient les paramètres à affiner. Ces diffractogrammes peuvent donc correspondre à plusieurs systèmes cristallographiques ce qui multiplie le pourcentage d'erreur. Cependant, parmi ces groupes, le groupe d'espace R $\bar{3}$ m est le seul groupe qui présente un nombre fini de positions de Bragg coïncidant avec les pics des diffractogrammes des HDLs après affinement. Il représente donc a priori le groupe d'espace de la structure cristalline de nos HDLs.

Le résultat de l'affinement Rietveld a donné une formule de type $\mathcal{M}^{\text{II}}_2 \text{Al} (\text{OH})_6 \mathcal{A}.2\text{H}_2\text{O}$ pour tous les HDLs (où \mathcal{M}^{II} représente les cations métalliques Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ ou Ca²⁺ et \mathcal{A} représente les anions Cl⁻ ou SO₄²⁻).

A titre d'exemple, le résultat de l'affinement Rietveld de diffractogramme de Zn₂AlCl est reporté dans la Figure III.3 et le Tableau III.2. La formule correspondante trouvée est (Zn₂Al(OH)₆.Cl.2H₂O). Les paramètres trouvés par affinement Rietveld diffèrent légèrement de ceux publiés par J. Pison et coll. [2008]. Notre diffractogramme contient deux pics supplémentaires qui apparaissent à $2\theta = 31.62^\circ$ et $2\theta = 45.47^\circ$ (régions exclues sur la courbe d'affinement Y(calc), les pics sont indiqués par des flèches sur la Figure III.3). Ces

pics sont spécifiques du NaCl. Ceci peut être expliqué par le fait que notre poudre Zn_2AlCl contient des traces de NaCl, utilisé dans le procédé de synthèse (voir Chapitre II : I).

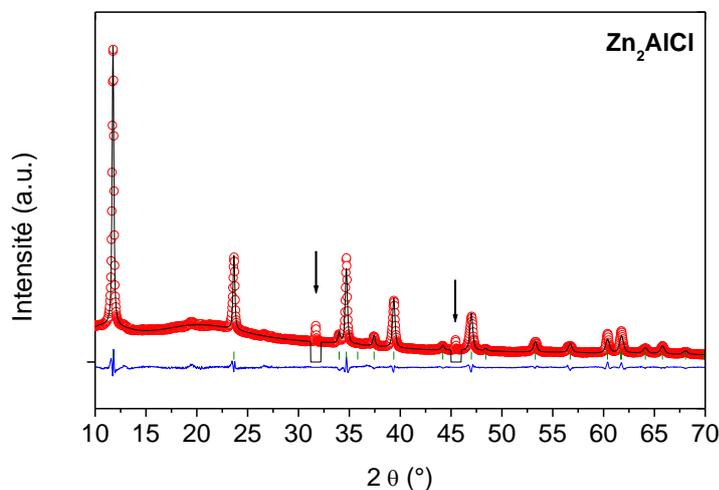


Figure III. 3. Résultat de l'affinement Rietveld (effectué par le logiciel FullProf) du diffractogramme de Zn_2AlCl : les régions correspondant à la présence d'un résidu de NaCl sont exclues.



Groupe d'espace	$R\bar{3}m$					
Paramètres de maille	a = 3.062 Å, c = 22.535 Å, d = 7.6 Å					
$\lambda(Cu K_{\alpha 1})$	1.5406 Å					
R_{wp}	20.6 %					
R_{Bragg}	17.1 %					
atome	site	Facteur d'occupation	x	y	z	$B_{iso}(\text{Å}^2)$
Al	3a	0.3333	0.00	0.00	0.00	0.5
Zn	3a	0.6666	0.00	0.00	0.00	0.5
OH	6c	1.0000	0.00	0.00	0.38	0.5
Cl	18g	0.0644	0.19	0.00	0.50	0.5
O _w	36 i	0.0194	0.29	0.50	0.50	0.5

Tableau III. 2. Les différents paramètres résultant de l'affinement Rietveld.

La structure 3D du Zn_2AlCl (présentée dans la Figure III.4) est formée par des octaèdres organisés en feuillets, dont le centre peut être occupé par des cations Zn^{2+} ou Al^{3+} (situés dans le site 3a, avec des facteurs d'occupation 2/3 et 1/3 respectivement), et les sommets sont occupés par des anions OH^- . Dans l'espace interfeuillets, des molécules d'eau et anions chlorure sont présents.

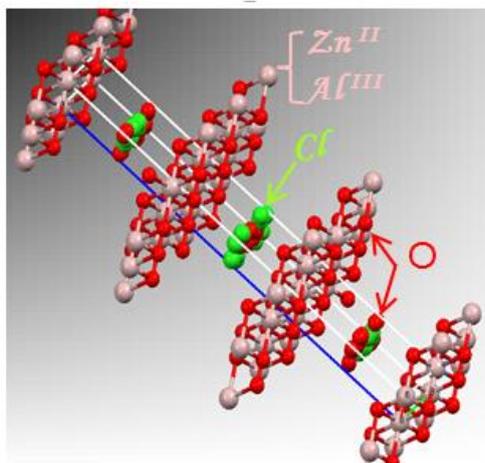


Figure III. 4. *Distribution spatiale des atomes de $Zn_2Al(OH)_6Cl \cdot 2H_2O$.*

On peut retrouver les configurations 3D des autres HDLs en remplaçant dans la Figure III.4 :

- Les cations Zn^{2+} par des cations Ca^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} (Ca_2AlCl , $NiAlSO_4$ et $CoAlSO_4$ respectivement) ;
- Les anions Cl^- par des groupes SO_4^{2-} ($NiAlSO_4$ et $CoAlSO_4$).

La maille peut être décrite par l'empilement le long de l'axe c des feuillets décalés par une distance d égale à $c/3$.

En conclusion la technique de diffraction des RX nous permet non seulement de valider la composition des HDLs obtenus, mais aussi de les caractériser d'un point de vue cristallographique.

I.2. Spectroscopies IR et Raman

La Figure III.5 montre les spectres IR des quatre HDLs synthétisés dans cette étude. Les modes de vibration peuvent être répartis en plusieurs catégories :

- Des modes liés à la présence de molécules d'eau dans les couches entre les feuillets ;
- Des modes liés aux composants présents dans les feuillets, leurs interactions avec les molécules d'eau et leur nature influençant les fréquences auxquelles ces modes apparaissent ;

- Des modes liés à la présence d'ions carbonate, présents du fait de l'adsorption de molécules de CO_2 sur les HDLs.

Le Tableau III.3 présente les attributions de ces bandes, basées sur celles déjà réalisées dans le cas de différents HDLs. Ces attributions permettent de conforter les résultats obtenus précédemment par DRX.

Afin de préciser ces résultats, les spectres Raman des HDLs ont également été réalisés (Figure III.6). Des bandes apportent des informations complémentaires (Tableau III.3), sans qu'elles soient cependant toutes attribuées, compte tenu des connaissances actuelles et de la complexité des structures étudiées.

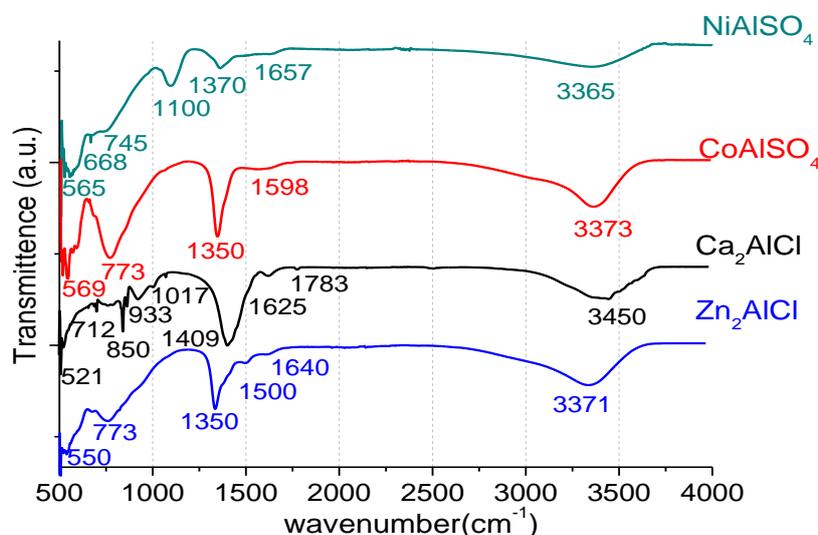


Figure III. 5. Spectres IR des différents HDLs synthétisés.

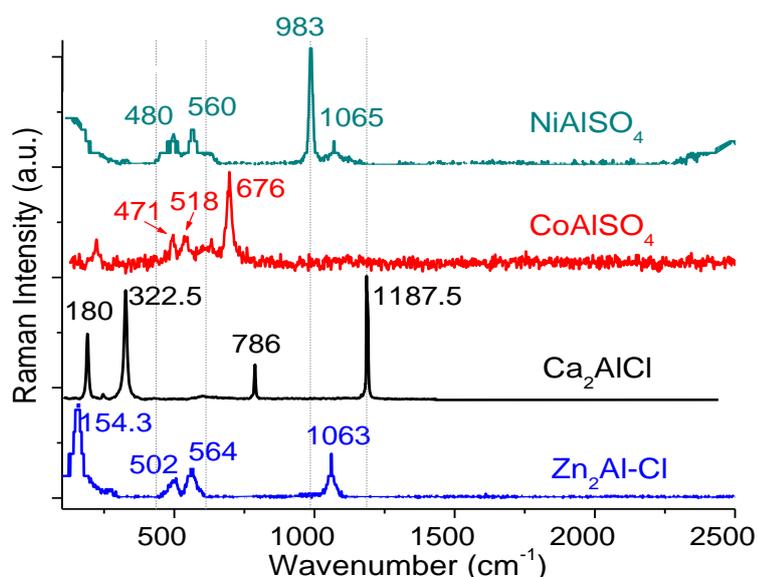


Figure III. 6. Spectres Raman des différents HDLs synthétisés.

Spectr.	NiAlSO ₄	CoAlSO ₄	Ca ₂ AlCl	Zn ₂ AlCl	Attribution
IR	3365	3373	3450	3371	Molécules d'eau dans les couches interfeuilletés liées par des liaisons hydrogène + liaisons métal-OH
IR	-	2950	-	2950	Mode <i>bridging</i> carbonate-eau
IR	1657	1598	1625	1640	Mode <i>bending</i> des molécules d'eau dans les couches interfeuilletés (eau coordonnée si le mode est au dessus de 1640 cm ⁻¹ , peu liée si le mode est en dessous de 1630 cm ⁻¹ [A.C.Vieira et coll., 2009])
IR	1370	1350	1370	1350	Ions carbonate dans la couche interfeuilletés
IR	745	773	773	773	Mode de translation des groupes hydroxyle influencés par les ions Al trivalents + mode de vibration du réseau
IR	668	600	668	686	Épaulement dû à la présence d'ions carbonate
IR	565	569	541	550	Mode de translation des groupes hydroxyle influencés par les ions Al trivalents + mode de vibration du réseau
Raman	480				Vibration symétrique Al-OH
Raman	560				Vibration symétrique Al-OH
Raman	983				Ions sulfate
Raman	1065			1063	<i>Stretching</i> symétrique des ions carbonate (contamination a priori faible car aucune bande n'est observée à 1390 cm ⁻¹)
Raman		471			Ions sulfate
Raman		676			Ions sulfate
Raman				564	Vibration Al-OH

Tableau III. 3. Attribution des modes de vibration (exprimés dans le tableau en cm⁻¹) observés dans les spectres IR et Raman des HDLs synthétisés pour cette étude [S. Kannan et coll., 1992, J.T.Kloprogge et R.L Frost, 1999 ; V. Vchirawongkwin et B.M.Rode, 2007 ; A.C.Vieira et coll., 2009 ; D.V. Radziuk et coll., 2011].

Les spectroscopies IR et Raman permettent donc de valider la composition des HDLs, de manière complémentaire à la DRX. Nous pouvons donc maintenant aborder la réalisation des films de HDL et leur étude par AFM.

II. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE PAR AFM DES FILMS MINCES D'HDLs

Lors de l'étude d'un traitement physicochimique de la surface d'un substrat, pour une application de type biocapteur ou autre, il est particulièrement important de connaître l'état de la surface du substrat de référence, l'électrode de travail par exemple, avant et après avoir effectué les différentes étapes du traitement. Dans le cas de nos biocapteurs, cette étude comparative permet de corrélérer l'impact des modifications de l'état de surface et l'efficacité (ou pas) de la réaction électrochimique qui a lieu. L'AFM est une méthode pertinente, en particulier dans le cas des HDLs, bien que clairement sous-exploitée.

II.1. Choix du substrat de référence

Dans un premier temps, nous avons étudié la morphologie de la surface de l'électrode de travail en or sérigraphiée (AuSPE) que nous utilisons pour notre biocapteur, avant et après le dépôt des films de HDLs.

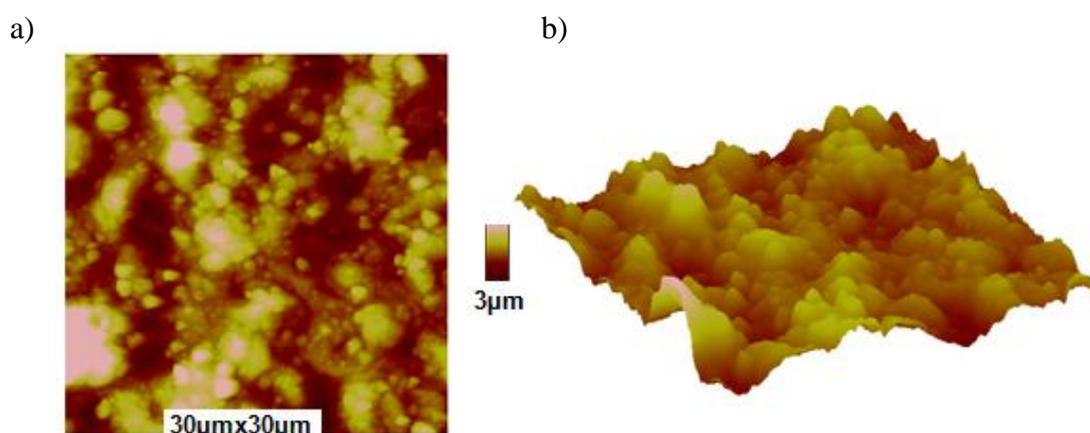


Figure III. 7. Images AFM de topographie (hauteur) en 2D (a) et 3D (b), en mode tapping, de la surface de l'AuSPE de type DropSens (réf. DS250AT).

La surface de l'électrode d'or nue (Figure III.7) est rugueuse. La rugosité moyenne (définie par le Rms) est de l'ordre de 500 nm, mais la surface est en fait très hétérogène avec des Rms

compris entre 300 et 600 nm selon les zones sondées et pour plusieurs échantillons.

Dans le cas des électrodes recouvertes par un film de HDL (Figure III.8), la rugosité moyenne reste du même ordre de grandeur (entre 500-600 nm), quelle que soit la nature du HDL (NiAlSO_4 , Zn_2AlCl , CoAlSO_4 ou Ca_2AlCl), avec selon les échantillons et les zones sondées un Rms compris entre 300 et 600 nm.

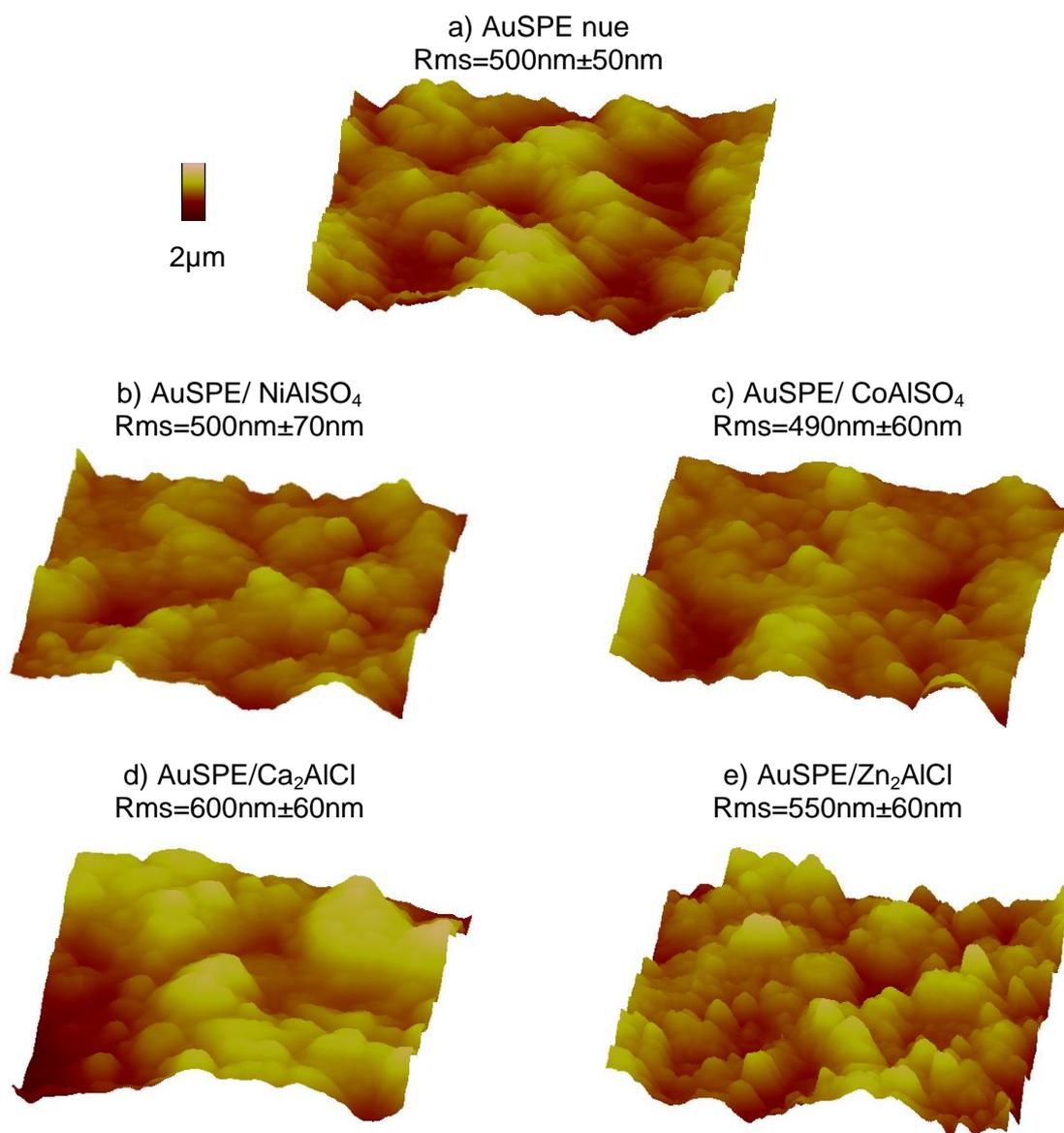


Figure III. 8. Images AFM de topographie ($20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$) en 3D, en mode tapping, de la surface de l'AuSPE avant (a) et après dépôt du film de HDLs : (b) NiAlSO_4 , (c) CoAlSO_4 , (d) Ca_2AlCl , et (e) Zn_2AlCl . Les films sont déposés par auto-assemblage à partir d'une solution de concentration 2.5 mg/mL). La rugosité moyenne (Rms) est indiquée dans chaque cas.

Le fait que la rugosité soit importante dès le départ (électrode nue) ne permet pas de mettre en évidence les éventuelles modifications de surface. On ne peut donc pas conclure sur le bon

recouvrement de la surface de l'électrode par le film de HDL. Par conséquent, et pour valider le protocole de dépôt, nous avons besoin d'utiliser un substrat de référence non rugueux. Nous avons donc choisi le mica qui est un substrat largement utilisé pour les études par AFM.

En effet, le mica est un substrat dont la rugosité est de l'ordre de 0.3 nm (rugosité atomique, Figure III.9). De plus, il est organisé sous une forme lamellaire (Figure III.9a), donc facilement clivable avant une expérience, ce qui permet de déposer les films de HDL sur une surface parfaitement propre.

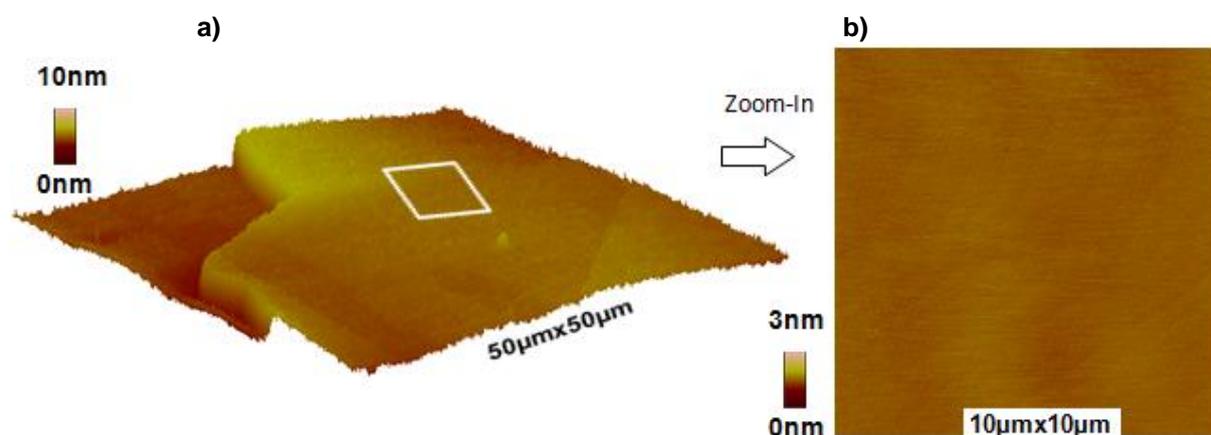


Figure III. 9. Images AFM de topographie (en mode Tapping) de mica nu : (a) en 3D et (b) zoom-in ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) en 2D de la zone indiquée par un carré en blanc dans (a). La marche dans (a) est due au clivage des lamelles formant le mica.

II.2. Effet de la méthode de dépôt

Afin d'optimiser notre protocole pour l'élaboration du film de HDL, nous avons testé deux méthodes de dépôt différentes et plusieurs concentrations de HDL: d'abord le simple dépôt d'une goutte d'une solution de HDL sur le mica (méthode appelée auto-assemblage ou *self assemblage*, SA) et ensuite le dépôt par *spin-coating* (SC).

II.2.1. Dépôt par auto-assemblage (SA)

La Figure III.10 présente des résultats typiques de ceux obtenus avec différents HDLs (ici un film de NiAlSO₄ obtenu par SA à partir d'une concentration de 2.5 mg/mL).

La surface contient des zones moyennement rugueuses (zones foncées sur la Figure III.10.a, Rms=30 nm) et d'autres présentant des agrégats de dimensions importantes (zones claires, Rms=450 nm).

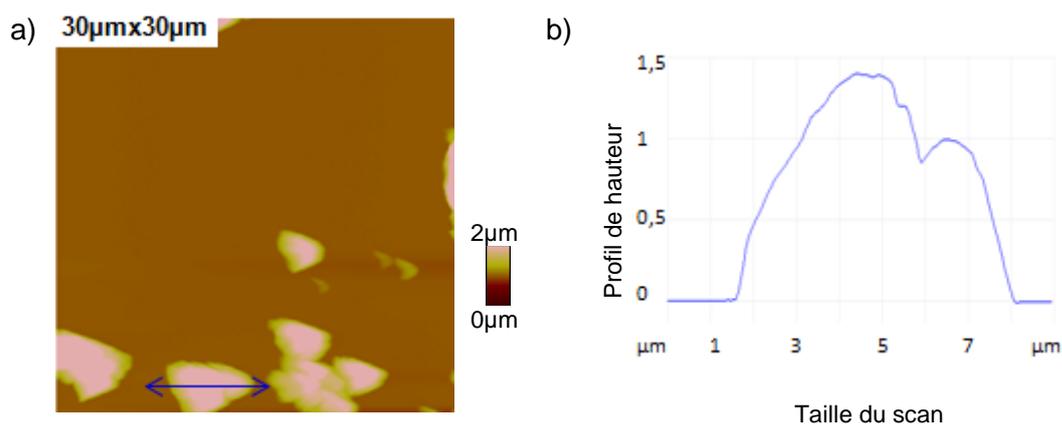


Figure III. 10. (a) Image AFM de hauteur d'un dépôt de NiAlSO_4 ($C_{\text{HDL}}=2.5\text{ mg/mL}$) déposé sur le mica par la méthode SA, (b) une section sur l'agrégat (indiquée en bleu dans (a)).

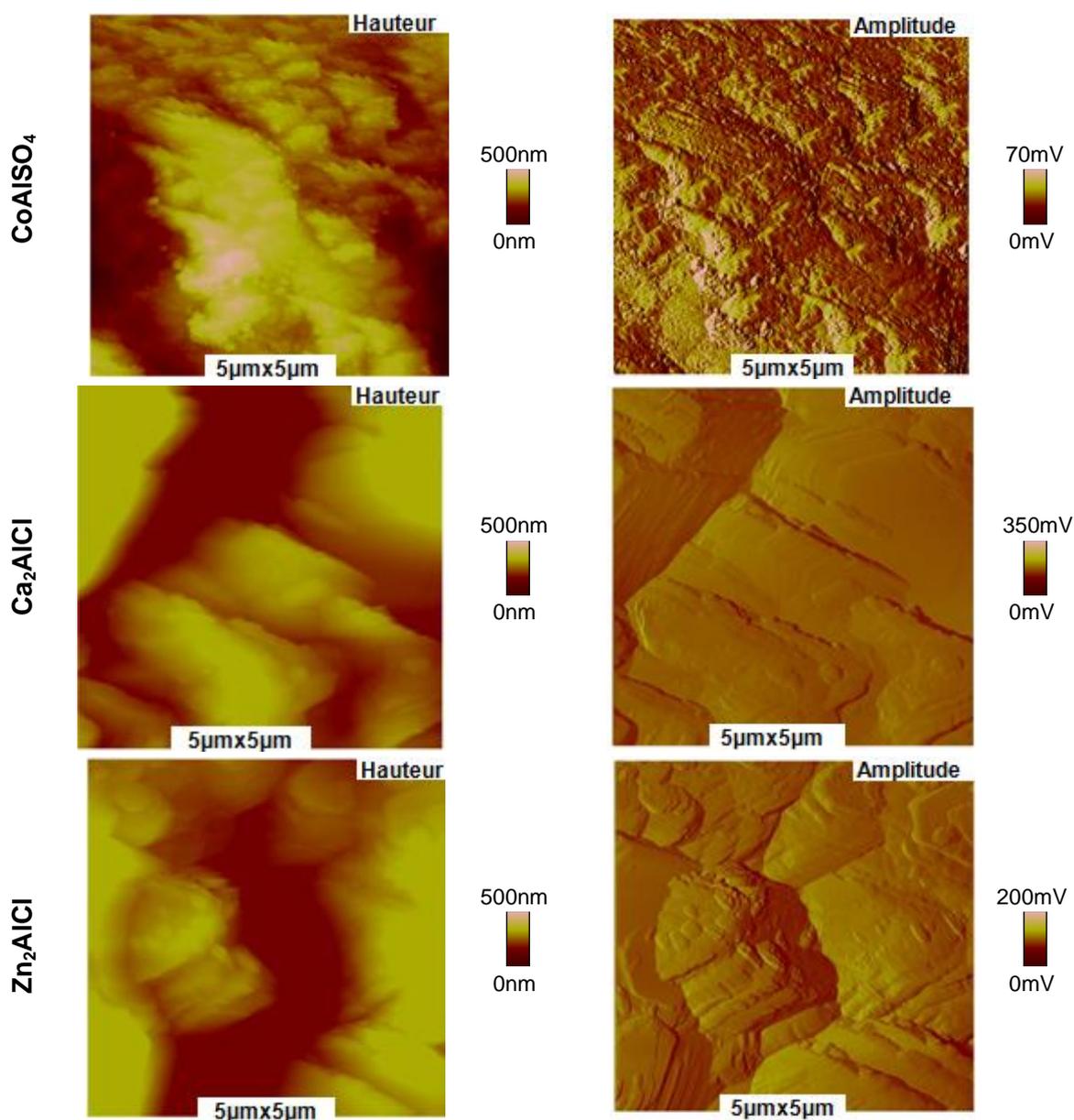


Figure III. 11. Images AFM de hauteur et d'amplitude de différents films de HDLs déposés sur le mica par la méthode SA à partir d'une solution HDL de concentration 2.5 mg/mL

La réalisation d'un profil de hauteur le long d'une section passant par un agrégat donne des dimensions de l'ordre de $7.5 \mu\text{m}$; $3.5 \mu\text{m}$ et $1.5 \mu\text{m}$ en longueur, largeur et hauteur, respectivement.

Des « zooms-in » de ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) et de ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) effectués sur les différents agrégats de HDLs sont présentés sur la Figure III.11. Ces images montrent que les surfaces présentent des « marches » de hauteurs différentes (entre 5 et 50 nm, voire plus), en accord avec l'organisation lamellaire de ces composés. Notons que les images AFM d'amplitude s'avèrent utiles soulignant les bords des marches et donnant un effet 3D, révélant ces dépôts massifs en multicouches.

II.2.1.1. Effet du rinçage sur les films déposés par SA

La grande hétérogénéité des films peut être liée à la présence d'agrégats adsorbés et donc faiblement liés à la surface de mica. C'est la raison pour laquelle nous avons testé l'effet du rinçage de ces surfaces à l'eau ultrapure après dépôt.

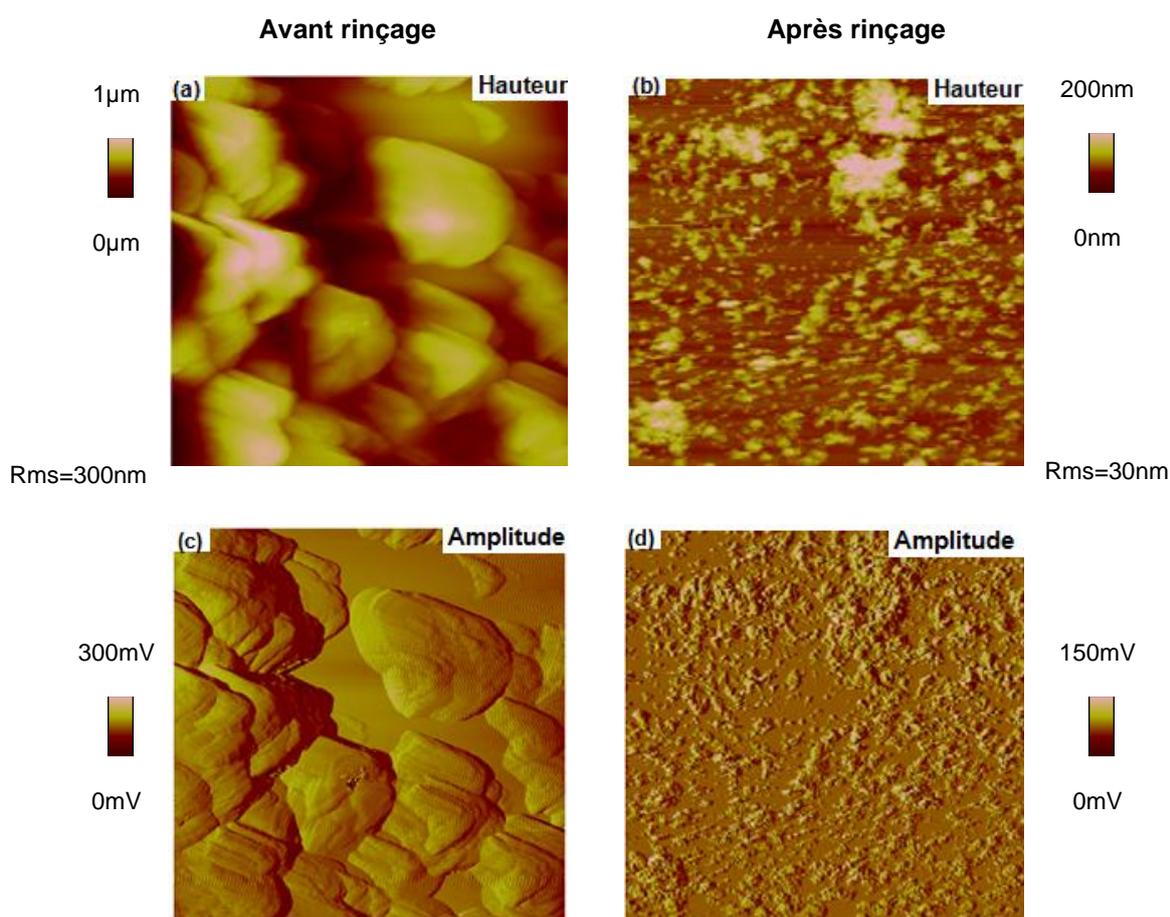


Figure III. 12. Images AFM ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) d'un film de Ca_2AlCl ($C_{\text{HDL}} = 1.5 \text{ mg/mL}$) déposé sur le mica par la méthode SA avant ((a) et (c)) et après rinçage à l'eau ultrapure ((b) (d)).

Après rinçage, on note les modifications suivantes (le contraste étant plus évident sur les images d'amplitude (Figure III.12c et d)) :

- les dimensions des agrégats se réduisent pour tous les HDLs, passant par exemple de (7.5 μm ; 3.5 μm ; 1.5 μm) à (3 μm ; 2 μm ; 160 nm) en longueur, largeur et hauteur, respectivement ;
- leur distribution sur la surface devient plus homogène ;
- la rugosité moyenne au niveau des zones homogènes (foncées) des films diminue aussi, avec un Rms autour de 5 nm.

Ces résultats montrent donc clairement que l'étape de rinçage est nécessaire pour l'optimisation de cette méthode de dépôt. Elle permet d'améliorer l'état de surface en limitant l'hétérogénéité et en réduisant la rugosité.

II.2.1.2. Effet de la concentration de la solution de HDLs sur l'homogénéité des films déposés par SA

A priori, l'hétérogénéité ou l'homogénéité de la surface des films de HDLs sont également liées à la concentration de la solution utilisée. Afin d'optimiser le choix de la concentration pour l'élaboration ultérieure du biocapteur, nous avons donc testé différentes concentrations de HDLs (de 0.5 mg/mL à 2.5 mg/mL) pour la réalisation de films par la méthode de SA, Dans un premier temps, nous avons utilisé une concentration à 2.5 mg/mL car c'est la concentration la plus utilisée dans la bibliographie [D. Shan et coll. 2003-2004 ; M. S. P. Lopez et coll., 2010 ; I.M. Apetrei et coll., 2013 ; P. Vialat et coll., 2015]. A cette concentration élevée, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les dépôts pour tous les HDLs sont massifs et très rugueux contenant des agrégats de taille importante mais aussi des zones un peu moins rugueuses.

La Figure III.13a montre l'exemple d'un film de CoAlSO_4 déposé par SA à partir d'une solution ayant une concentration de 2.5 mg/mL et après rinçage. Le scan de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ est réalisé dans une zone peu rugueuse (éloignée des gros agrégats).

Pour pouvoir bien décrire la topographie de la surface, un « zoom-in » typique de ce genre de zone est présenté sur la Figure III.13b. Cette image ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$) montre une certaine homogénéité de la surface avec la présence de quelques agrégats. La surface des zones sombres (ou moins hautes) semble lisse. La rugosité moyenne correspondante (située entre 5 et 11 nm) est toujours nettement supérieure à la rugosité du mica nu (environ 0.3 nm) confirmant ainsi la présence du dépôt d'un film de HDL. En outre, l'uniformité du contraste

dans l'image de phase correspondante (Figure III.13.d) confirme que la surface scannée est couverte par une matière homogène et monophasée. Les profils de hauteur (Figure III.13.c) révèlent que le film de HDL est constitué par l'empilement de couches avec des marches ayant des épaisseurs variantes entre 2 et 10 nm.

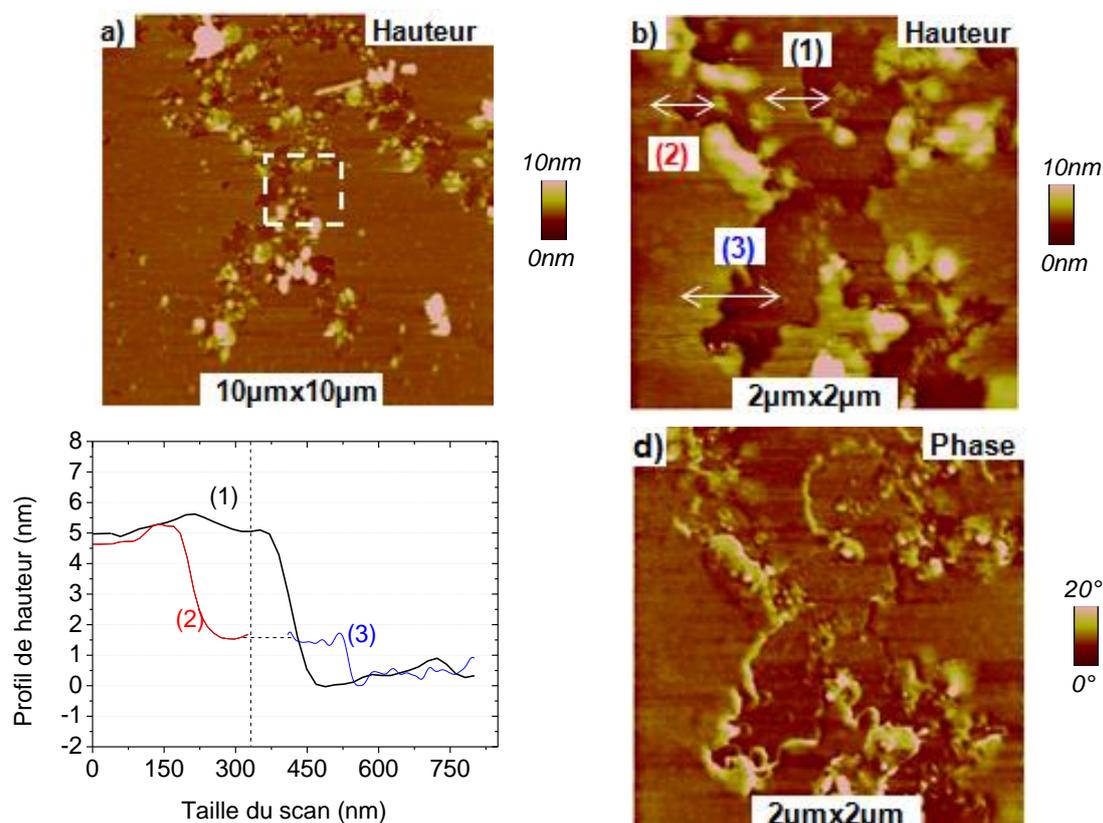


Figure III. 13. Images AFM d'un film de CoAlSO_4 ($C_{\text{HDL}} = 2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$) : (a) hauteur ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$); (b) « zoom-in » de ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$) dans la zone indiquée par un carré en blanc dans (a) ; (c) profils de hauteur extraits des sections transversales indiquées en (b) et (d) image de phase correspondante à (a).

Ces données montrent qu'une goutte d'une solution concentrée de CoAlSO_4 (2.5mg/mL) déposée par SA permet de former un film relativement épais qui recouvre complètement la surface du substrat de référence et ne disparaît pas suite au rinçage. Ce résultat est obtenu en routine pour tous les HDLs, sur plusieurs zones d'un même échantillon et pour différents échantillons réalisés de manière indépendante. Ce qui nous a conduits à réduire la concentration de la solution de HDL.

La Figure III.14 révèle l'évolution de la morphologie de la surface des films déposés sur le mica par SA sous l'effet de la dilution de la solution de HDLs.

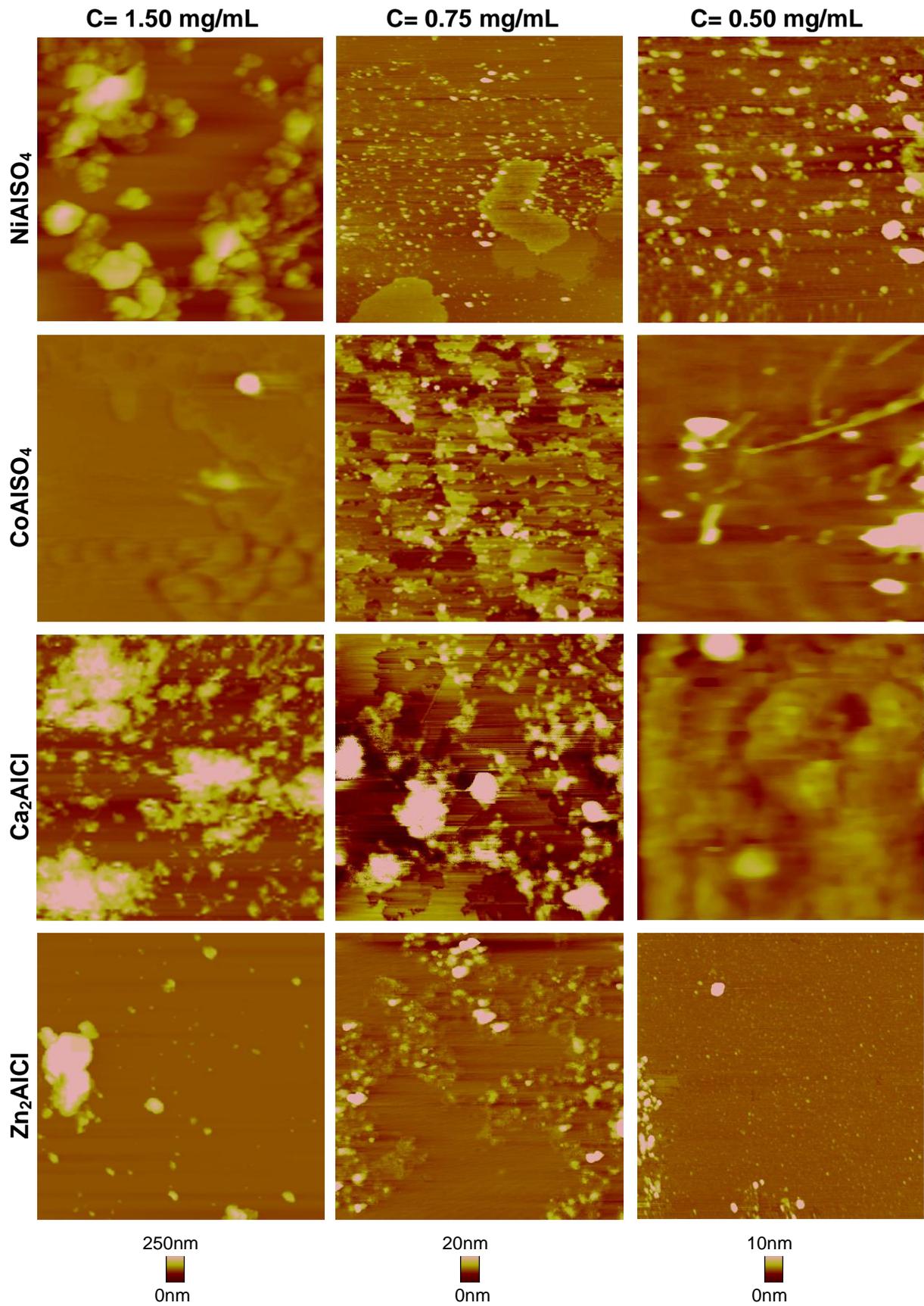


Figure III. 14. Images AFM ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) de hauteur montrant l'effet de la concentration de la solution de HDLs sur les caractéristiques morphologiques des films déposés sur le mica par la méthode SA.

Les surfaces des films déposés à partir d'une solution de HDLs de concentration 1.5 mg/mL sont, elles aussi, rugueuses et non homogènes, présentant des agrégats (les zones de couleur claire). Le Tableau III.4 regroupe les dimensions moyennes des agrégats dans le cas des différents HDLs testés. Les rugosités moyennes des surfaces sont de l'ordre de 30 à 100 nm pour des grands scans (20 μm *20 μm).

C_{HDL}	Tailles des agrégats et Rms	NiAlSO ₄	CoAlSO ₄	Ca ₂ AlCl	Zn ₂ AlCl
1.50 mg/mL	L	2.0 μm	3.0 μm	3.5 μm	2.0 μm
	l	1.5 μm	2.0 μm	2.0 μm	1.5 μm
	h	150 nm	150 nm	200 nm	300 nm
	Rms	30 nm	110 nm	45 nm	50 nm
0.75 mg/mL	L	1.0 μm	1.0 μm	1.0 μm	1.0 μm
	l	1.0 μm	1.0 μm	0.6 μm	0.4 μm
	h	20 nm	6 nm	40 nm	50 nm
	Rms	40 nm	70 nm	20 nm	30 nm
0.50 mg/mL	L	500 nm	500 nm	1.3 μm	500 nm
	l	300 nm	300 nm	400 nm	300 nm
	h	8 nm	8 nm	40 nm	8 nm
	Rms	30 nm	50 nm	10 nm	20 nm

Tableau III. 4. Dimensions moyennes (longueur *L*, largeur *l*, hauteur *h*) des agrégats et rugosités moyennes (pour des scans de 20 μm *20 μm) des films de HDLs obtenus à partir de différentes concentrations et déposés par la méthode SA.

Pour une concentration plus faible, celle de 0.75 mg/mL, la topographie des différents dépôts paraît plus homogène. Les agrégats sont moins nombreux et de tailles plus petites (Tableau III.4). La rugosité moyenne des surfaces dans les zones sombres (entre 5 et 20 nm) est plus faible comparée aux valeurs précédentes, mais toujours nettement supérieure à la rugosité du mica nu confirmant ainsi la présence d'un film de HDL. Les différents films de HDLs présentent des multicouches dont les surfaces sont lisses avec des marches de hauteur comprise entre 1 et 5 nm.

Enfin, pour une concentration encore plus faible (0.5 mg/mL), les dépôts sont beaucoup plus homogènes. Les quelques agrégats présents ont des dimensions encore plus réduites (Tableau III.4). Dans les zones ne présentant pas d'agrégats (les zones sombres ou moins hautes) sont beaucoup moins rugueuses (Rms de l'ordre de 0.3 à 3 nm) pour tous les HDLs.

II.2.1.3. Effet de la concentration de la solution de HDLs sur la morphologie et les épaisseurs des couches déposées par SA

Pour pouvoir estimer l'épaisseur et déterminer la morphologie des films de HDLs déposés, nous avons effectué des « zooms-in » sur les zones homogènes de plusieurs échantillons pour différents types de HDLs déposés par la méthode SA et avec rinçage. Nous avons vu précédemment que les zones sombres, ne contenant pas d'agrégats, d'un dépôt de HDL (par la méthode SA après rinçage) à partir d'une solution concentrée à 2.5 mg/mL sont formées de couches d'épaisseur comprise entre 2 et 10 nm (Figure III.14.c).

A titre d'exemples complémentaires, nous présentons dans ce paragraphe les « zooms-in » effectués sur deux échantillons, l'un de NiAlSO_4 et l'autre de CoAlSO_4 , les deux films étant déposés à partir d'une solution de concentration 0.75 mg/ml. Les Figures III.15 et III.16 montrent les images topographiques des surfaces de ces films.

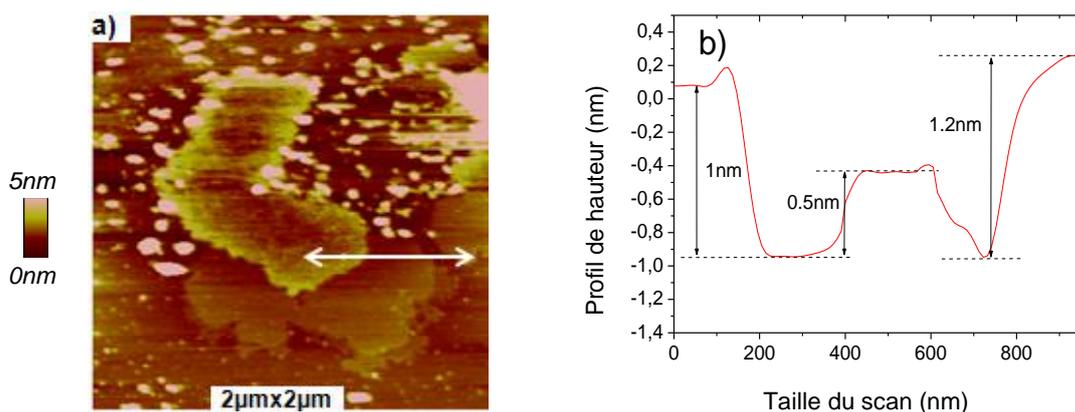


Figure III. 15. (a) image AFM de hauteur ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) d'un film de NiAlCl ($C_{\text{HDL}} = 0.75 \text{ mg.mL}^{-1}$); (b) profil de hauteur extrait de la section transversale indiquée en (a).

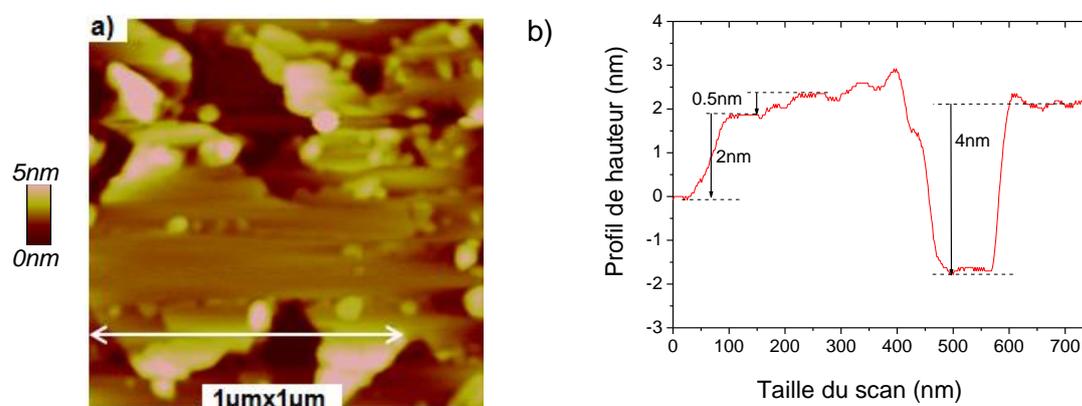


Figure III. 16. (a) image AFM de hauteur ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) d'un film de CoAlSO_4 ($C_{\text{HDL}} = 0.75 \text{ mg.mL}^{-1}$); (b) profil de hauteur extrait de la section transversale indiquée en (a).

Dans le cas du film de NiAlSO_4 , la surface présente des agrégats de hauteurs comprises entre 0.5 et 17 nm et des zones lisses en multicouches, différents plateaux ayant des marches de hauteurs comprises entre 0.5 et 1.2 nm. Dans le cas du film de CoAlSO_4 , les images sont similaires, avec des hauteurs de marche variant de 1 à 5 nm.

Afin de déterminer leur épaisseur, une opération de grattage (AFM en mode contact) a été effectuée (3 fois) sur les films en multicouches de HDLs obtenus à partir des solutions de concentrations 0.5 et 0.75 mg.mL^{-1} . Comme mentionné précédemment, les films de HDLs obtenus avec la concentration la plus faible ne sont pas homogènes, ce qui conduit à l'obtention d'épaisseurs variables. En revanche, dans le cas des échantillons obtenus à partir de solutions à 0.75 mg.mL^{-1} , l'épaisseur des films est estimée entre 10 et 20 nm pour tous les HDLs, l'épaisseur d'une monocouche étant estimée à 0.5-1.0 nm.

En supposant qu'un film homogène ayant une faible rugosité est plus approprié pour la fixation de l'enzyme, et en tenant compte du fait que les surfaces de HDL obtenus avec une solution à 0.75 mg.mL^{-1} sont bien caractérisées en termes de rugosité, d'épaisseur et d'homogénéité, nous avons considéré cette concentration comme optimale pour l'étape suivante de la construction de nos biocapteurs.

Les résultats présentés jusqu'à présent ont montré que l'étape de rinçage et l'optimisation de la concentration sont importantes puisqu'elles nous ont permis d'améliorer la qualité des films déposés. Cependant, ces améliorations ne sont pas encore suffisantes pour rendre les films beaucoup plus homogènes et moins rugueux. De plus, la méthode de SA a un inconvénient : elle impose un temps de séchage relativement long pour les échantillons (30-45 min de dépôt et 30 min de séchage à la suite du rinçage à l'eau ultrapure), d'où le fait d'envisager une seconde méthode de dépôt.

II.2.2. Dépôt par *spin-coating* (SC)

Nous avons suivi la même procédure lors de la caractérisation des films préparés par SC, en nous focalisant sur l'étape de rinçage et la concentration de la solution de HDL.

II.2.2.1. Effet du rinçage sur les films déposés par SC

La Figure III.17 représente la topographie de la surface d'un film de CoAlSO_4 (provenant d'une solution concentrée à 2.5 mg/ml) déposé par SC avant (Figures III.17a et c) et après

rinçage (Figures III.17b et d). Sans rinçage, la surface est recouverte par des grands agrégats qui font environ 200 nm de hauteur (Rms=90-150nm). Ces agrégats pourraient être dûs à la cristallisation de quelques traces de sel nécessaire à la synthèse des HDLs (Chapitre II : I). Après rinçage à l'eau ultrapure, les traces de cristallisation et les HDLs faiblement liés à la surface sont éliminés. La surface est beaucoup plus homogène contenant quelques agrégats de taille plus faible comprise entre 3 et 25 nm. Ces données montrent que l'étape de rinçage est nécessaire, y compris pour cette méthode de dépôt.

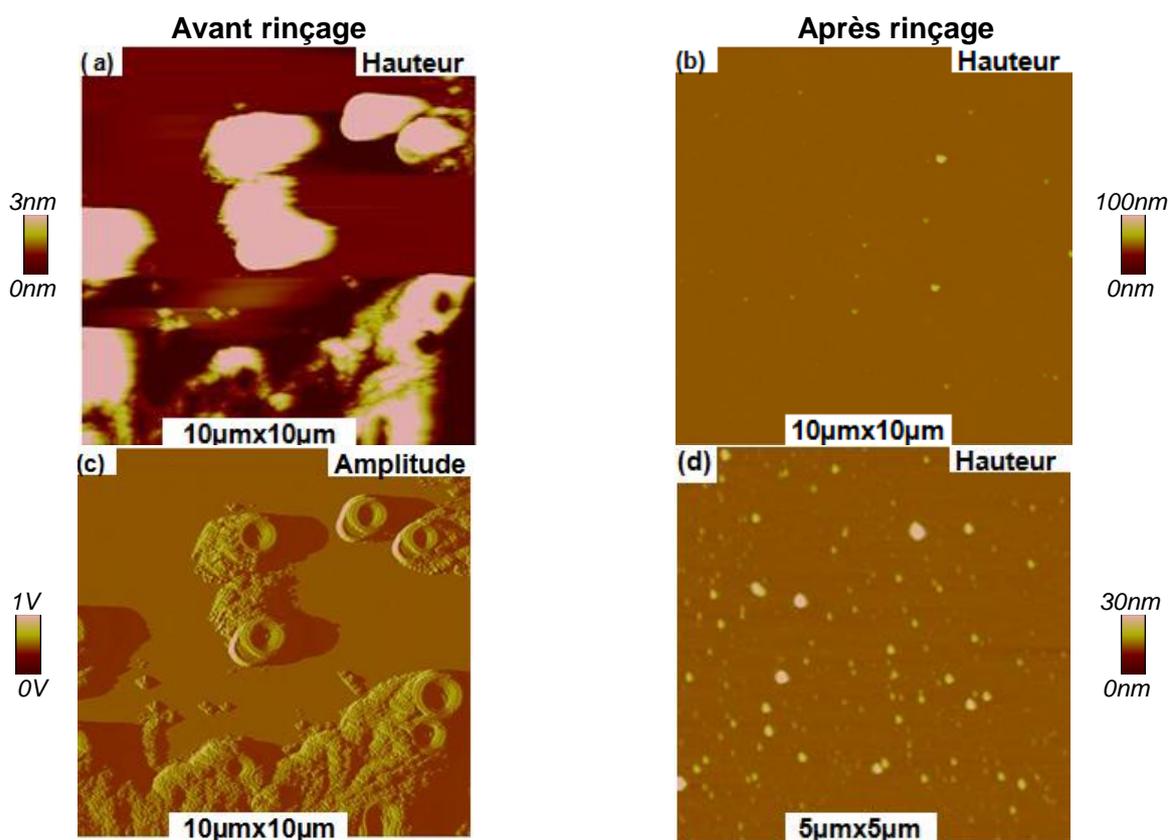


Figure III. 17. Images AFM de films de CoAlSO_4 ($C_{\text{HDL}} = 2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$) déposés par SC avant rinçage ((a) hauteur et (c) amplitude, $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) et après rinçage ((b) hauteur, (d) zoom-in de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ centré sur (b)).

L'étude des images AFM des films de HDLs réalisés par les méthodes de SA et SC, et ayant subi un rinçage, permet d'obtenir des surfaces avec des valeurs de rugosité résumées dans le Tableau III.5. Celles-ci sont déterminées systématiquement sur deux types de scan complémentaires : les grands scans sont très représentatifs de la totalité de la surface de l'échantillon, tandis que les scans plus petits permettent de donner les caractéristiques de zones particulières et aussi d'affiner certains résultats. Quelles que soient les dimensions du

scan et la nature du HDL, la comparaison des résultats obtenus par SA et SC montre que la seconde méthode de dépôts est plus intéressante que la précédente, et ce pour plusieurs raisons :

- elle permet d'obtenir des surfaces plus homogènes même à grande échelle (grands scans) ;
- les surfaces sont également nettement moins rugueuses (Tableau III.5).

HDLs	Méthode de dépôt	Avant rinçage à l'eau ultrapure		Après rinçage à l'eau ultrapure	
		20µm*20µm (aspect générale de la surface)	1µm x1µm (zone homogènes)	20µm*20µm (aspect générale de la surface)	1µm x1µm (zone homogènes)
NiAlSO ₄	SA	500	30	30	5
	SC	93	10	15	4
CoAlSO ₄	SA	500	40	110	15
	SC	200	20	40	5
Ca ₂ AlCl	SA	450	50	45	20
	SC	500	29	20	9
Zn ₂ AlCl	SA	600	60	50	30
	SC	300	40	10	7

Tableau III. 5. Rugosité moyenne (nm) des différentes surfaces de films de HDL déposés à partir d'une solution de concentration 1.5 mg/ mL par les méthodes SA et SC avant et après l'étape de rinçage à l'eau ultrapure.

C'est la raison pour laquelle nous avons décidé, dans la suite de ce travail, d'adopter la méthode de dépôt des films de HDL par SC.

II.2.2.2. Effet de la concentration sur l'homogénéité de la surface des différents films de HDLs

Maintenant que le choix de la méthode de dépôt a été fait (la méthode de SC suivant les paramètres indiqués dans le chapitre II), nous allons essayer de déterminer la meilleure concentration à utiliser pour l'élaboration du biocapteur. Différentes concentrations de HDLs (de 0.1 mg/mL à 2.5 mg/mL) ont donc été testées afin d'optimiser le choix de la concentration adéquate.

La Figure III.18 présente la topographie de surface de dépôts des quatre HDLs préparés par la méthode SC avec rinçage à partir d'une solution concentrée (C=1.5 mg/mL). Dans

l'ensemble, les films obtenus sont quasi-similaires, présentant des surfaces avec de zones apparemment homogènes et des agrégats. Cependant, le degré d'hétérogénéité est variable :

- les surfaces des films de NiAlSO₄ et CoAlSO₄ présentent des zones homogènes contenant parfois des agrégats dont les hauteurs très variables se situent, respectivement, entre 2-80 nm et 10-250 nm.
- dans le cas du Zn₂AlCl et du Ca₂AlCl, les films ont une surface un peu plus hétérogène, les agrégats ayant des dimensions plus importantes et une hauteur de l'ordre de 100 à 300 nm (Tableau III.6).
- les agrégats de tous les HDLs sont formés par des empilements avec des marches de hauteurs variables entre 1 et 30 nm. Pour les zones sans agrégats (zones sombres), le dépôt est plus homogène et par conséquent la rugosité moyenne de la surface est beaucoup moins importante (Rms ~ 4-10 nm).

Outre l'information topographique de ces surfaces via les images de hauteur, nous avons la possibilité d'avoir accès à une autre information via les images de phase de ces mêmes zones. Pour rappel, les images de phase peuvent donner accès à des informations sur l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la surface d'un point de vue mécanique (rigide ou plus souple), charge, structuration (organisé ou pas), etc...

Dans le cas présent, les images de phase (Figures III.18b, d, e et h) correspondantes aux images de hauteur décrites ci-dessus, montrent un contraste homogène ce qui suggère qu'il s'agit du même composé, le HDL, et d'une même structuration. Par ailleurs, ces données tout comme la topographie, mettent en évidence l'empilement des nanocomposites de HDL formant ainsi des marches.

On remarque que dans le cas du Zn₂AlCl, les agrégats ont une forme pseudo-hexagonale comme le montre la Figure III.19. Ces « hexagones », qui semblent être orientés selon l'axe z perpendiculaire à la surface du film, rappellent la symétrie hexagonale présente dans le groupe d'espace $R\bar{3}m$ de la structure des particules de Zn₂AlCl déjà résolue par DRX (Chapitre III :I).

Pour une concentration intermédiaire (0.75 mg/ml), les films de tous les HDLs sont plus homogènes contenant des agrégats plus réduits en taille (Tableau III.6) et les surfaces correspondantes sont moins rugueuses. Les Figures III.20a et b présentent deux exemples typiques de topographie de dépôts de HDLs (cas du CoAlSO₄ et du Ca₂AlCl) déposés à partir de cette concentration.

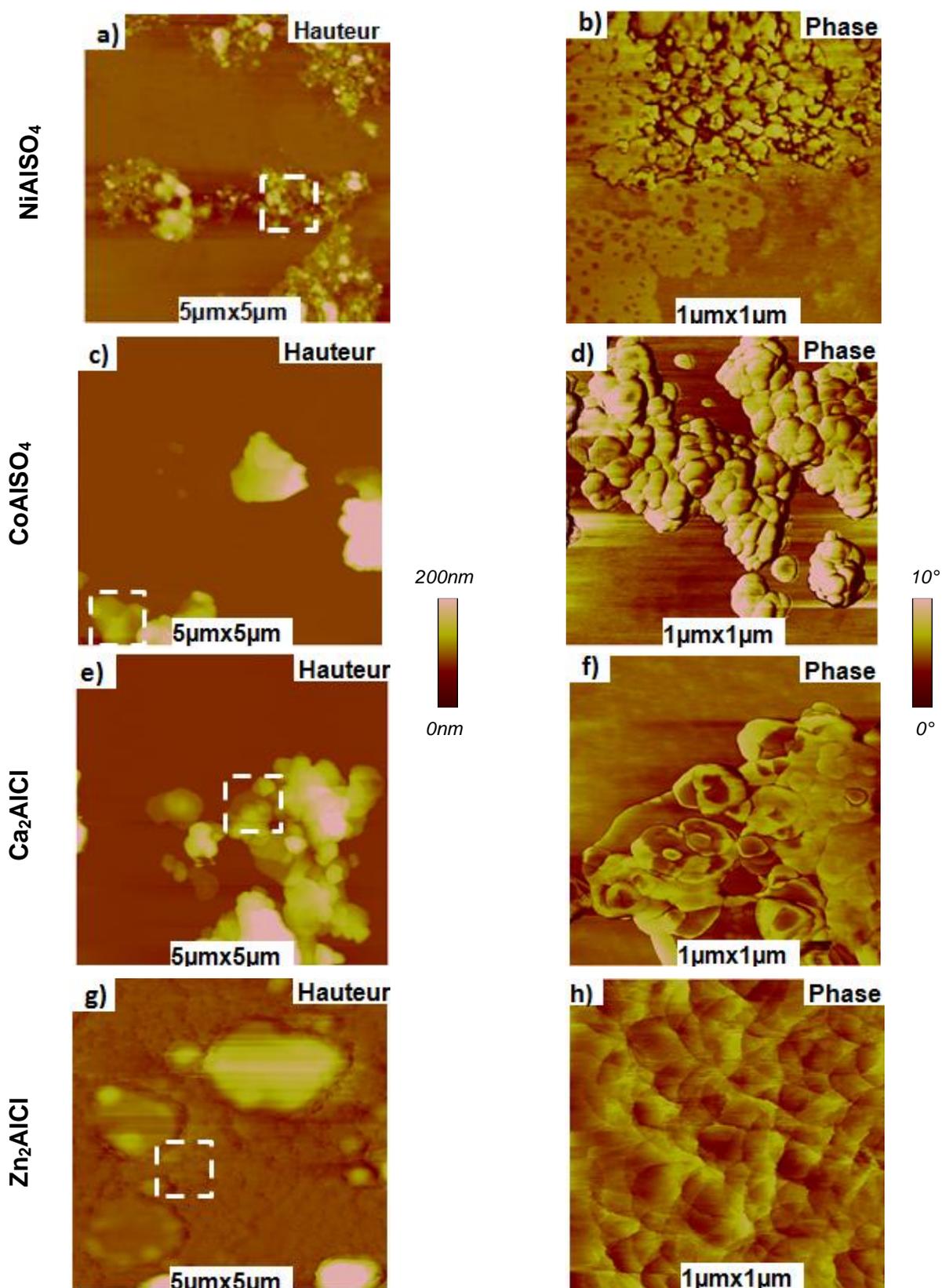


Figure III. 18. (a), (c), (e) et (g) Images AFM de topographie de films de CoAlSO_4 , NiAlSO_4 , Ca_2AlCl , et de Zn_2AlCl , respectivement, déposés par SC ($C_{\text{HDL}} = 1.5\text{mg/mL}$), et (b), (d), (e) et (h) Images AFM de phase correspondantes avec un zoom-in ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$) sur les agrégats indiqués par des carrés blancs sur les images de topographie.

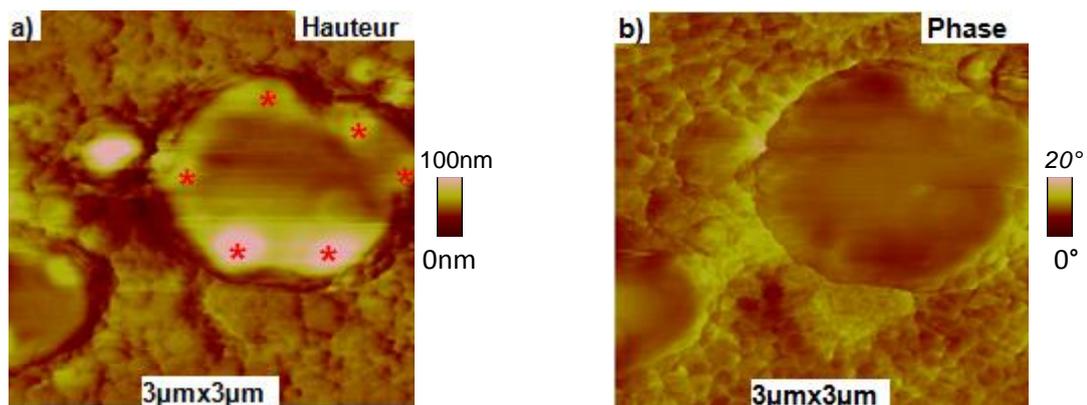


Figure III. 19. Images AFM de hauteur et de phase des agrégats de Zn_2AlCl (film déposé par SC à partir d'une solution de concentration 1.5mg/mL). Les étoiles rouges matérialisent les 6 angles de l'hexagone.

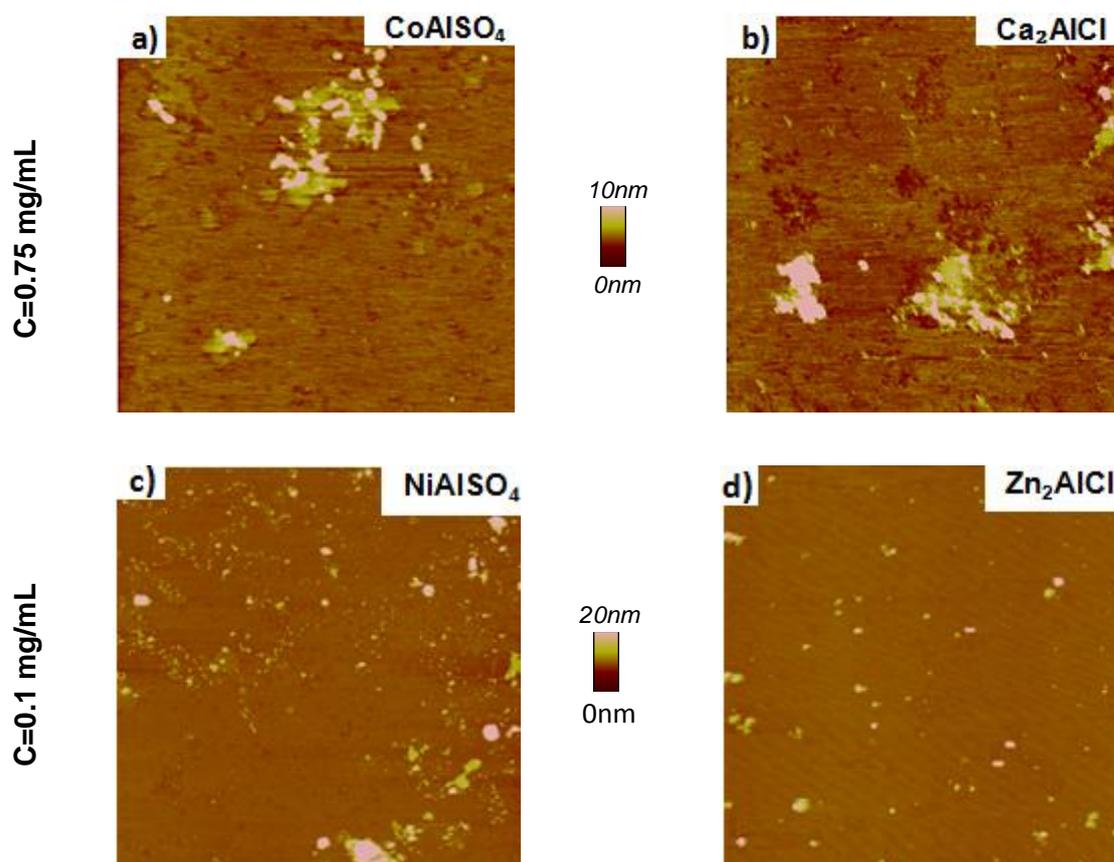


Figure III. 20. Images AFM ($10\mu m \times 10\mu m$) de topographie des films de $CoAlSO_4$ (a) et de Ca_2AlCl (b) déposés par SC à partir d'une solution de concentration 0.75mg/mL, et des films de $NiAlSO_4$ (c) et de Zn_2AlCl (d) déposés par SC à partir d'une solution de concentration 0.15 mg/mL..

On note aussi une réduction de rugosités moyennes pour tous les dépôts de HDLs, les valeurs étant estimées entre 1.5 nm et 25 nm pour les grands scans (10 μ m*10 μ m) et entre 0.5 nm et 6 nm pour les petits scans (1 μ m*1 μ m ; zones homogènes sombres dans les Figures III.20a et 20b). Ces valeurs faibles restent néanmoins supérieures à celle du Rms du mica (~0.3 nm). Ces résultats confirment le fait que le dépôt de HDL a bien été effectué.

Quand la solution initiale est plus diluée (0.1 mg/mL), les surfaces de tous les dépôts de HDLs sont nettement moins rugueuses, les agrégats sont moins nombreux et leurs dimensions sont réduites comme le montre le cas de dépôts de NiAlSO₄ et de Zn₂AlCl dans la Figure III.20c et d.

Le Tableau III.6 résume les dimensions moyennes des agrégats dans les films de HDLs obtenus à partir de différentes concentrations (1.5mg/mL, 0.75mg/mL et 0.25mg/mL) déposés par la méthode SC. On remarque que ces valeurs sont plus faibles en les comparant avec les valeurs présentées dans le Tableau III.4 dans le cas de dépôts par la méthode SA.

C_{HDL}	Dimension des agrégats et Rms	NiAlSO ₄	CoAlSO ₄	Ca ₂ AlCl	Zn ₂ AlCl
1.50 mg/mL	L	1.5 μ m	3.0 μ m	3.5 μ m	2.0 μ m
	l	0.5 μ m	2.0 μ m	2.0 μ m	1.5 μ m
	h	45 nm	200 nm	150 nm	180 nm
	Rms	15 nm	40 nm	20 nm	10 nm
0.75 mg/mL	L	1.0 μ m	1.5 μ m	1.0 μ m	0.7 μ m
	l	0.5 μ m	1.0 μ m	0.7 μ m	0.5 μ m
	h	15 nm	20 nm	40 nm	50 nm
	Rms	15 nm	25 nm	15 nm	10 nm
0.25 mg/mL	L	200 nm	200 nm	500 μ m	300 nm
	l	100 nm	200 nm	400 nm	200 nm
	h	7 nm	8 nm	15 nm	7 nm
	Rms	5 nm	10 nm	5 nm	2.5 nm

Tableau III. 6. Dimensions moyennes (longueur L, largeur l, hauteur h) des agrégats et rugosités moyennes (pour des scans de 20 μ m*20 μ m) des films de HDLs obtenus à partir de différentes concentrations déposés par la méthode SC.

Afin de préciser ces premières informations, la rugosité de ces films a été reportée en fonction de la concentration de la solution de HDL (Figure III.21), pour différentes dimensions de scan (rappelons que le scan le plus faible est effectué sur une zone homogène ce qui explique qu'on ait systématiquement des Rms faibles).

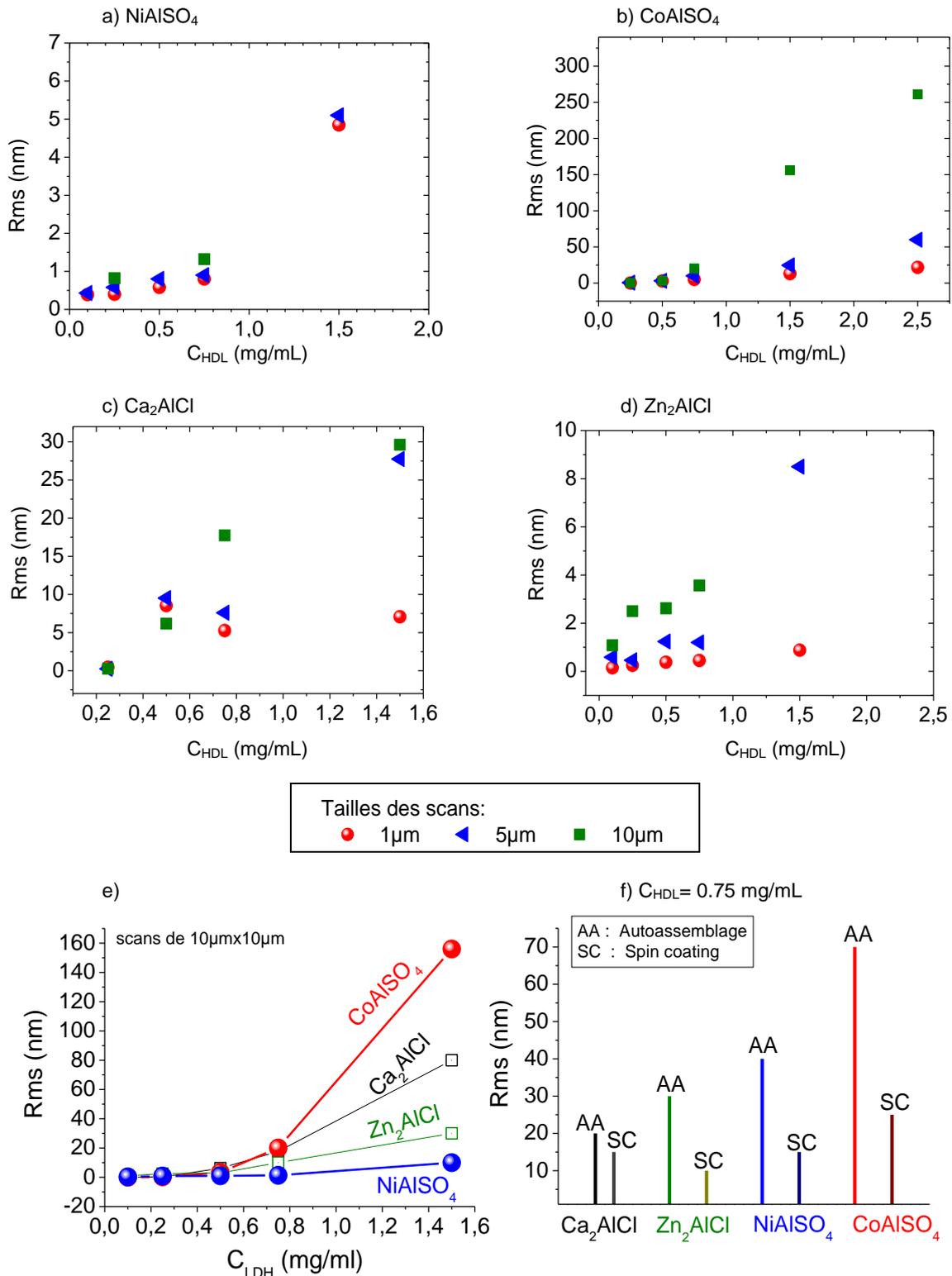


Figure III. 21. Évolution du Rms en fonction des concentrations ($Rms=f(C_{HDL})$) des solutions de HDLs utilisées pour former les films (déposés par SC) de : a) NiAlSO₄, b) CoAlSO₄, c) Ca₂AlCl et Zn₂Al-Cl. Les mesures sont effectuées sur des scans de différentes dimensions (1 μ m*1 μ m ; 5 μ m*5 μ m ; 10 μ m*10 μ m). e) Comparaison des évolutions du Rms = f(C_{HDL}) pour les films de quatre HDLs (déposés par SC, scan de 10 μ m*10 μ m) et f) Comparaison entre les deux méthodes SC et AA en termes de Rms des films déposés à partir d'une concentration initiale de HDL de 0.75 mg/mL.

Plusieurs observations peuvent être extraites de ces données :

- Pour tous les HDLs, la rugosité moyenne augmente avec la concentration. Ce résultat est cohérent et en accord avec l'observation d'agrégats qui deviennent de plus en plus nombreux et volumineux au fur et à mesure que la concentration croît (Tableau III.6). Il faut noter que l'amplitude des variations est plus importante dans le cas du CoAlSO_4 et du Ca_2AlCl .
- Dans le cas du CoAlSO_4 , la valeur maximale de la rugosité moyenne des grands scans atteint une valeur de l'ordre de 250-300 nm, alors qu'elle ne dépasse pas une valeur de 30-50 nm dans le cas du Ca_2AlCl et de 10 nm dans le cas du NiAlSO_4 et du Zn_2AlCl . Ceci est en accord avec les tailles des agrégats plus importantes du CoAlSO_4 .
- Dans le cas du Zn_2AlCl et Ca_2AlCl , les valeurs de rugosité obtenues pour différentes tailles de scans sont très dispersées ce qui indique que la surface de ces échantillons est beaucoup plus hétérogène que celle obtenue dans le cas des films de NiAlSO_4 et CoAlSO_4 .
- La rugosité des zones les plus homogènes (petits scans effectués dans les zones sombres) pour tous les HDLs est presque nulle pour des concentrations inférieures à 0.5 mg/mL, ce qui tend à confirmer la présence de zones au niveau desquelles le HDL ne s'est pas fixé.
- On peut en conclure que l'état de surface est meilleur pour des concentrations de l'ordre de 0.75 mg/mL.

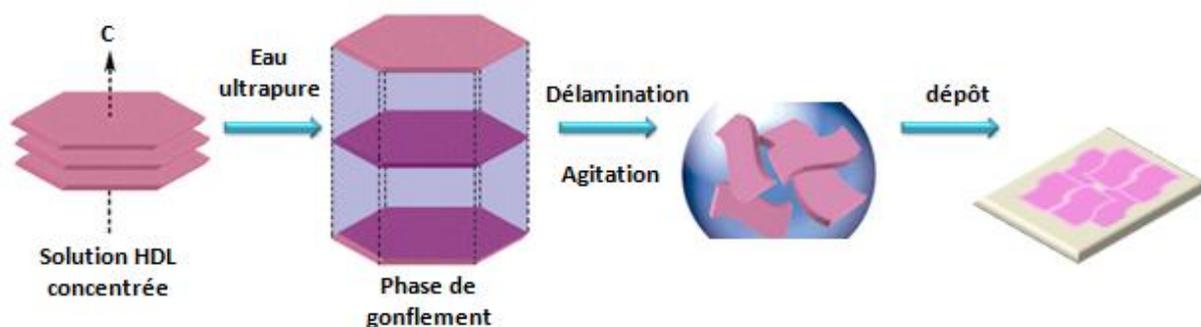


Figure III. 22. *Effet de la solubilisation sur les feuillets de HDLs et procédure de reconstruction lors du dépôt du film.*

En conclusion, et comme nous l'avons vu, les HDLs ont une structure en feuillets empilés les uns sur les autres. En les dispersant dans l'eau, les HDLs subissent une exfoliation [F. Leroux et coll., 2001] en feuillets indépendants. Après dépôt d'une goutte de la solution sur le support, la reconstruction de ce matériau inorganique est donc possible par réempilement des

plaques délaminiées ce qui donne naissance au film (Figure III.22). Cet arrangement se réalise probablement d'une façon aléatoire ce qui justifie la présence d'agrégats hétérogènes plus ou moins importants selon les zones observées.

II.2.2.3. Effet de la concentration de la solution de HDLs sur la morphologie et l'épaisseur des films déposés par SC

Pour aller plus loin dans la caractérisation des dépôts obtenus, nous avons ciblé des expériences et exploité un peu plus nos données. Nous avons en particulier procédé à des « *zoom-in* » en temps réel au niveau des zones les plus homogènes afin de déterminer plus précisément l'état de surface et de déduire les épaisseurs correspondantes. A titre d'exemple, nous présentons dans ce paragraphe les images réalisées sur un film de NiAlSO₄ (solution initiale à 1.5 mg/mL) dont l'image de topographie est présentée Figure III.20a. Sur cette image, un premier zoom de 5 µm*5 µm a été réalisé en position centrée (Figure III.23a), puis deux zones distinctes de cette surface ont été étudiées, étant significatives de l'échantillon :

- L'une au niveau d'une portion homogène de l'image (zone 1 encadrée en bleu) ;
- L'autre au niveau d'un agrégat (zone 2 encadrée en vert).

Au niveau de la zone 1, on peut noter les points suivants :

- Cette zone est située dans un plan inférieur à celui de la zone 2 (partie du film la moins épaisse), comme l'indique le contraste sur l'image de hauteur (Figure III.23a) ;
- Cette zone est très homogène mais présente aussi des portions plus foncées (trous, Figure III.23b), donc moins épaisses. Le profil de hauteur mesuré le long d'une section réalisée au niveau d'une de ces portions illustre bien cette différence de hauteur entre les deux parties du film qui est de l'ordre de 0.5 nm.
- L'image de phase correspondante (Figure III.23d) présente une différence de contraste qui peut être corrélée à une variation des propriétés mécaniques de la surface du film. En effet, pour une surface donnée, une zone claire (correspondant à une valeur de phase plus élevée) peut être considérée comme plus « dense et/ou rigide et/ou organisée » alors qu'une zone relativement plus sombre (correspondant à une valeur de phase relativement plus faible) peut être considérée comme « plus fluide et/ou moins rigide et/ou moins organisée ». Par ailleurs, on peut noter que le contraste des images de hauteur et de phase est inversé (Figure III.23d). Les plateaux (zones du film hautes, plus épaisses) correspondent aux zones claires de l'image de hauteur et aux zones sombres de l'image de phase, autrement dit « plus fluides » que les trous. Ces derniers (zones du film moins

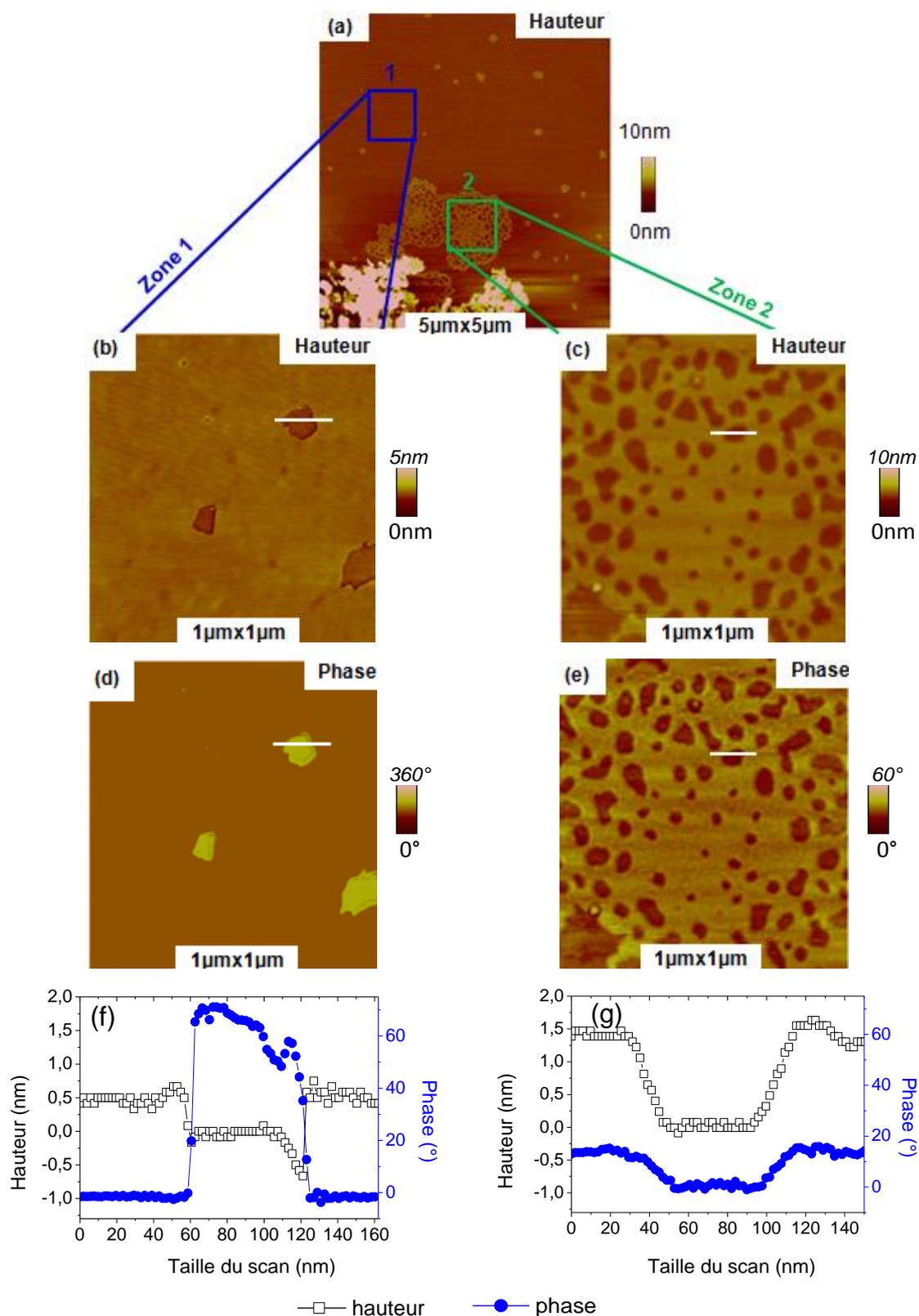


Figure III. 23. Images AFM en mode tapping du film de NiAlSO_4 ($C=1.5 \text{ mg.mL}^{-1}$): (a) « zoom-in » de ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) centré sur l'image de la Figure III.20a, (b) et (c) images de hauteur des zones 1 et 2; (d) et (e) images de phase correspondantes. (f) et (g) profils de hauteur et de phase réalisés le long des sections indiquées en (b); (c), (d) et (e).

épaisses) présentent les zones sombres de l'image de hauteur et possèdent une phase claire plus élevée ce qui suggère que cette partie de la surface est rigide.

On peut déduire que le plateau correspond au film de HDL et que le fond des trous correspondent soit :

- au substrat de référence, le mica (hypothèse 1) ;
- soit au film de HDL beaucoup plus organisé et rigide dans le cas où toute la surface de notre échantillon serait complètement recouverte (hypothèse 2).

Au niveau de la zone 2, l'analyse permet de dégager les conclusions suivantes :

- Cette zone paraît moins homogène que la zone 1, le contraste de l'image de hauteur (Figure III.23c) met en évidence deux niveaux d'épaisseurs différentes qui apparaissent clairement dans le profil de hauteur (Figure III.23g) et dont la valeur est d'environ 1.5 nm. Par ailleurs, la zone claire de cette zone 2 est plus élevée que le niveau de la zone 1 ce qui laisse supposer qu'il s'agit de multicouches et que le fond de cette zone 2 (sombre) n'est pas le mica.
- L'image de phase (Figure III.23e) correspondante présente le même type du contraste que l'image topographique.
- Contrairement à ce qu'on a observé dans la zone 1, sur cette partie du film le profil de phase (Figure III.23g) suit l'évolution topographique mais avec une variation très légère, d'à peine 10° alors qu'elle était de 70° pour la zone 1. Ce qui laisse supposer que les zones des plateaux (claires) ou du fond (sombres) sont quasi-similaires. Autrement dit, la totalité de la surface de cette zone 2 est recouverte par le HDL qui se trouve organisé en multicouches.

En conclusion, l'étude de la zone 1 suggère que le NiAlSO_4 recouvre de manière très homogène le mica à quelques défauts près (sur lesquels nous reviendrons dans le paragraphe suivant). Une monocouche de ce matériau aurait en moyenne une épaisseur de l'ordre de 0.5 nm. Cependant, des multicouches peuvent également se former localement comme le montrent les images de la zone 2.

Pour vérifier ces propositions et estimer les épaisseurs de ces films, une manipulation de grattage a été effectuée en mode contact sur une surface de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ de la zone 1 de ce même échantillon. L'épaisseur du film déduite à l'aide d'une section effectuée au niveau du trou creusé par la pointe est estimée à 10 nm. Cette valeur est beaucoup plus importante que celle montrée précédemment par le profil de hauteur de la Figure III.23f (0.5 nm). On en

conclut que l'hypothèse (1) précédente, stipulant que le fond des trous de la zone 1 est le mica, n'est pas la bonne et que la surface du substrat est complètement recouverte par le dépôt de HDL. Ce dépôt, provenant d'une solution initiale de NiAlSO_4 concentrée, serait donc organisé en multicouches d'épaisseurs multiples de 0.5 nm et présentant localement des défauts.

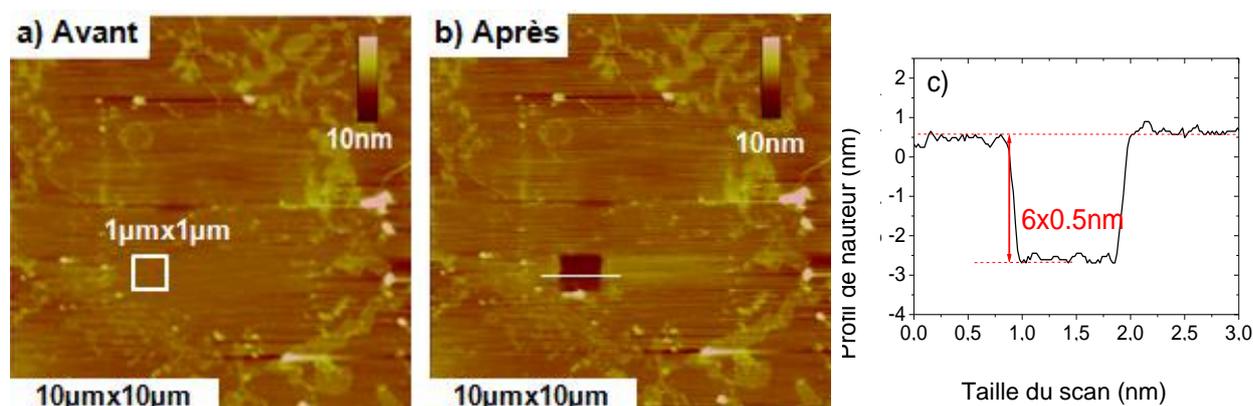


Figure III. 24. Détermination de l'épaisseur d'un film de HDL- NiAlSO_4 ($C=0.1\ \text{mg/mL}$) par une manipulation de grattage en mode contact: état de la surface avant (a) et après (b) grattage (images AFM de hauteur en mode tapping) et c) profil de hauteur correspondant à la section indiquée dans (b).

La même manipulation a été effectuée en mode contact sur une surface de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ (matérialisée par un carré blanc sur la Figure III.24a) d'un film de NiAlSO_4 déposé sur le mica et obtenu à partir d'une solution de faible concentration ($0.1\ \text{mg/mL}$).

Après grattage, on voit apparaître un trou (zone foncée sur l'image de hauteur, Figure III.24b), car plus basse. La Figure III.24c montre le profil de hauteur réalisé le long d'une section traversant la zone grattée ce qui permet d'estimer l'épaisseur du film à 3 nm (cela pourrait correspondre à 6 couches empilées de 0.5 nm chacune).

Les mêmes études de grattage ont été réalisées avec les autres HDLs (la Figure III.25 présente les résultats dans le cas du Zn_2AlCl). Le Tableau III.7 résume les valeurs des épaisseurs obtenues, ainsi qu'un rappel des diamètres estimés des cristallites constituant ces différents HDLs et les distances interréticulaires correspondantes.

À partir du Tableau III.7, on peut constater que les épaisseurs trouvées après grattage dans le cas des films de NiAlSO_4 et de CoAlSO_4 sont plus faibles. Elles sont probablement dues aux dimensions plus réduites des nanoparticules constituant la poudre initiale de ces deux HDLs.

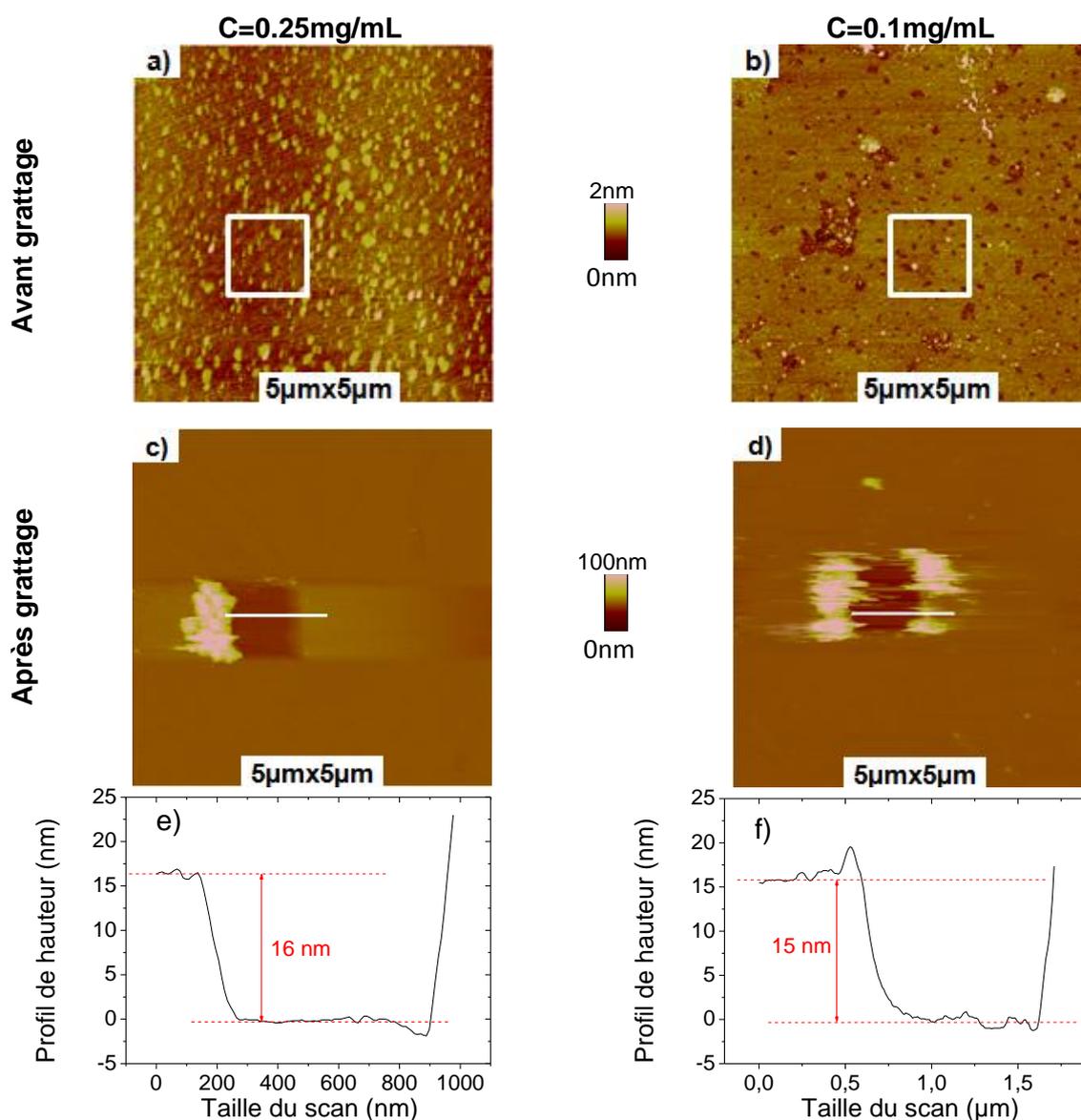


Figure III. 25. Détermination des épaisseurs de films de HDL Zn_2AlCl ($C=0.25$ mg/mL et 0.1 mg/mL) par la manipulation de grattage en mode contact: a) et b) état des surfaces avant le grattage, c) et d) état des surfaces après le grattage, et e) et f) profils de hauteur correspondant aux sections indiquées dans (c) et (d).

Nature du HDL	C_{HDL} (mg/mL)	Tailles des nano-cristallites de HDL (nm)	d (nm)	Épaisseur obtenue par grattage (nm)
NiAlSO ₄	1.5	17-21	0.75	10
	0.1			3
CoAlSO ₄	0.75	20-28	0.76	10
Ca ₂ AlCl	0.75	38-49	0.78	20
Zn ₂ AlCl	0.25	40-50	0.76	16
	0.1			10

Tableau III. 7. Épaisseurs des films de HDL déterminées après grattage.

La valeur de 0.5nm qui correspond à l'épaisseur estimée d'une monocouche de HDLs (après exfoliation) reste bien dans l'ordre de grandeur de la valeur de la distance interréticulaire ($d \sim 7.6 \text{ \AA}$) qui représente la distance entre deux feuillets de HDLs.

En conclusion de cette partie, notre étude montre bien que la diminution de la concentration en HDL améliore la qualité des films en favorisant l'homogénéité de leur surface et la diminution du nombre d'agrégats. Compte-tenu de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser une concentration en HDL entre 0.1 mg/mL et 0.75 mg/mL pour la réalisation de films destinés au greffage de la tyrosinase. Le paragraphe suivant est dédié à l'étude des films après greffage de l'enzyme et permettra de montrer l'intérêt de ces films dans l'organisation de l'enzyme.

III. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE PAR AFM DES FILMS MINCES HYBRIDES : HDLs / TYROSINASE

La dernière étape de la réalisation du biocapteur concerne la fonctionnalisation de sa surface par la tyrosinase. Afin de déterminer les conditions optimales de greffage et de mettre en évidence l'intérêt des HDLs pour ce dernier, nous avons fait varier la concentration de la solution de tyrosinase et étudié deux types de substrats, le mica nu ou couvert d'un film de HDL. Nous avons donc étudié l'évolution de l'état de la surface avant et après dépôt de la tyrosinase par AFM en mode tapping, ce dernier mode de fonctionnement étant particulièrement adapté aux biomatériaux.

III.1. Morphologie des films de tyrosinase déposés directement sur le mica

Tout d'abord, différentes concentrations (allant de 0.1 à 2.0 mg/mL) de la solution de tyrosinase ont été testées pour la formation des films de tyrosinase sur le mica (suivant le même protocole que celui décrit dans le chapitre II.VI) afin d'optimiser le choix de la concentration pour l'élaboration du biocapteur.

A une concentration faible de 0.1 mg/mL le dépôt obtenu n'est pas homogène, comme le montre la Figure III.26a. La rugosité moyenne est de l'ordre de 0.8 nm, avec des valeurs maximales allant jusqu'à 16 nm pour un scan de $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$.

Le film contient des agrégats ou des grains (zones claires sur l'image de hauteur, Figure III.26a), de tailles réduites et dont les hauteurs n'excèdent pas 14 nm.

Ces agrégats ne couvrent en moyenne que 25% de la surface et on retrouve la rugosité moyenne du mica dans le reste de la surface (zones sombres). Un « zoom-in » sur $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ (Figure III.26b) permet d'observer plus finement la forme de ces agrégats qui apparaissent comme de petits grains recouverts d'une couche d'épaisseur $\sim 2\ \text{nm}$ (Figure III.26c).

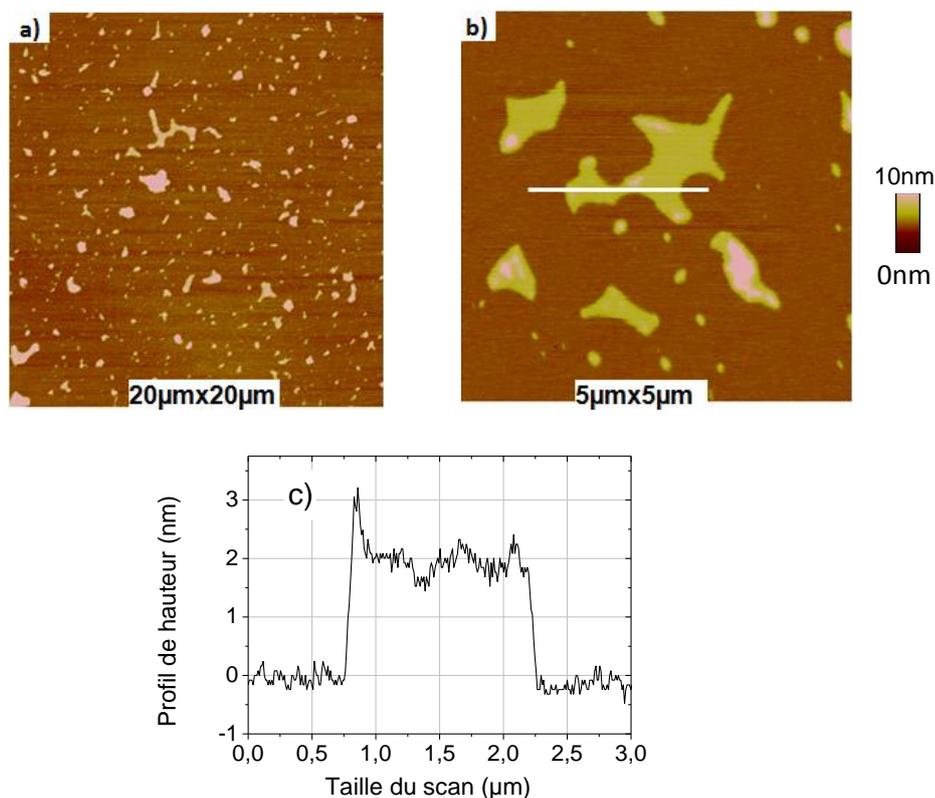


Figure III. 26. Images AFM de hauteur (mode tapping) d'un film de tyrosinase déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration $0.1\ \text{mg/mL}$: a) scan de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, b) scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, c) profil de hauteur le long de la section indiquée par un trait blanc dans (b).

Sachant qu'une enzyme se classe dans la catégorie des macromolécules et que son volume est de l'ordre de μm^3 [Z.-L Yu et coll., 2013], les données obtenues pour la concentration $0.1\ \text{mg/mL}$ montrent non seulement que cette concentration est insuffisante pour couvrir la surface de manière homogène, mais que la conformation de la protéine n'est pas préservée dans ces conditions.

En augmentant la concentration à $0.5\ \text{mg/mL}$, le même type d'agrégats apparaît sur la surface de mica, mais en nombre et dimensions plus importants. Les grains ont des hauteurs variables entre 14 et 80 nm et couvrent en moyenne 40% de la surface (Figure III.27a). La couche qui entoure ces grains garde la même épaisseur (2 nm, Figure III.27b) mais s'étend sur plusieurs μm^2 ($> 10\ \mu\text{m}^2$, couche 1 sur la Figure III.27a). Le profil de hauteur montre, de plus, la

présence d'une couche plus épaisse (couche 2 de 1.5 nm qui se trouve au dessus de la couche 1). La rugosité moyenne est de 15 nm (valeur maximale de l'ordre de 250 nm) pour un scan de $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ et à 3 nm (valeur maximale de 50 nm) pour un scan de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$.

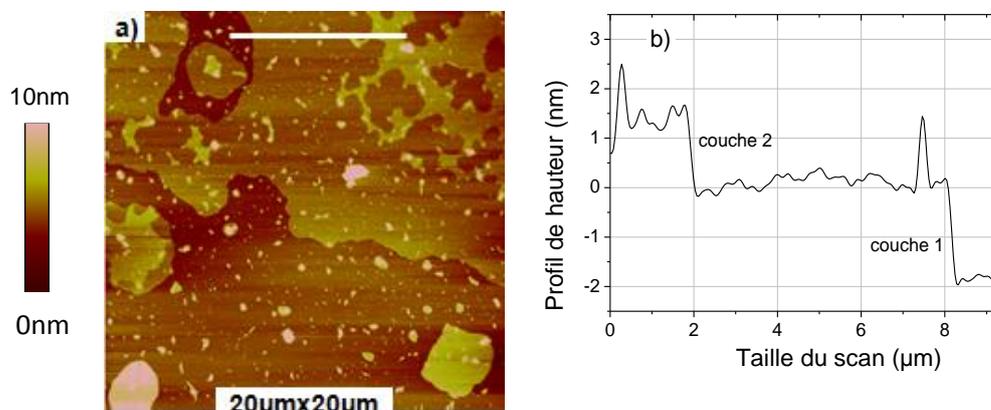


Figure III. 27. Images AFM de topographie (mode tapping) de la tyrosinase déposée sur le mica à partir d'une solution de concentration 0.5mg/mL : a) premier scan de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ b) profil de hauteur réalisé le long de la section indiquée par un trait blanc dans (a).

Pour une concentration plus importante (1.5mg/mL , Figure III.28), la topographie du film de tyrosinase déposé sur le mica ressemble à celle d'un tapis homogène ($R_{\text{ms}} = 2\ \text{nm}$ sur $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, Figure III.29a) formé par des grains de tailles variant entre 1 et 20 nm de hauteur, et entre 8 et 70 nm de diamètre.

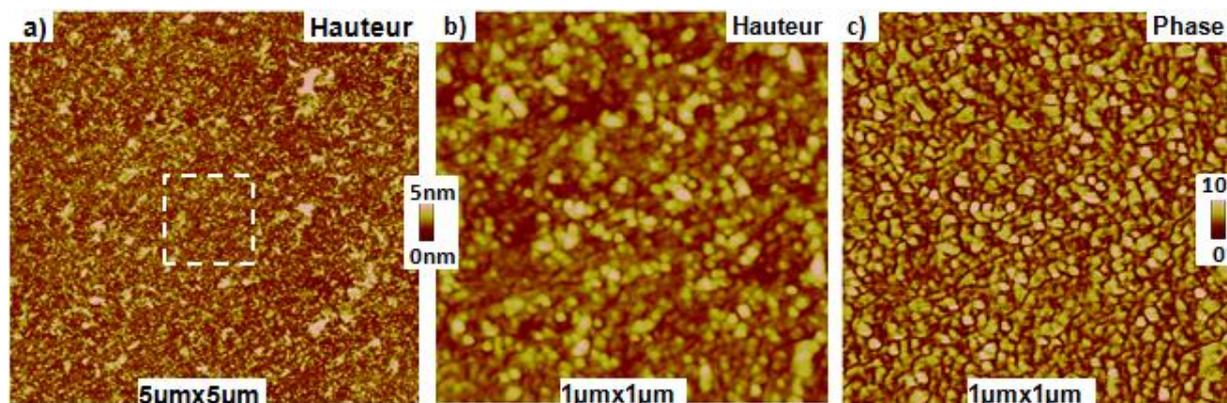


Figure III. 28. Images AFM de topographie (mode tapping) d'un film de tyrosinase déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration 1.5mg/mL : a) scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, b) scan de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, c) image de phase correspondante à (b).

Notons que le logiciel Nanoscope Analysis ne permet de déterminer la dimension des objets étudiés que si ces derniers sont bien séparés ou isolés. Les grains de dimension inférieure à 2

nm sont sans doute collés les uns aux autres. À cela s'ajoute le problème de convolution de la forme de la pointe. Il est cependant possible de faire une estimation approximative et de déterminer l'aire moyenne couverte par un grain en utilisant un filtre passe-haut réglé sur une hauteur supérieure à 3 nm. Cette aire est de l'ordre de $0.76 \mu\text{m}^2$ (valeur définie à partir d'un scan de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$).

Enfin, le scan de petite dimension montre que les grains se répartissent uniformément sur la surface en gardant une distance grain-grain comprise entre 0 et 40 nm. Le contraste homogène de l'image de phase (Figure III.28c) révèle que ces grains sont formés a priori de la même matière et montre plus clairement les contours de chacun.

Pour une concentration supérieure (2 mg/mL), la surface du film de tyrosinase devient hétérogène (rugosité moyenne de 20 nm et maximale de 300 nm pour un scan de $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$, Figure III.29a) présentant des dépôts sous forme d'agrégats de dimensions variables comprises entre 100 nm et 4 μm .

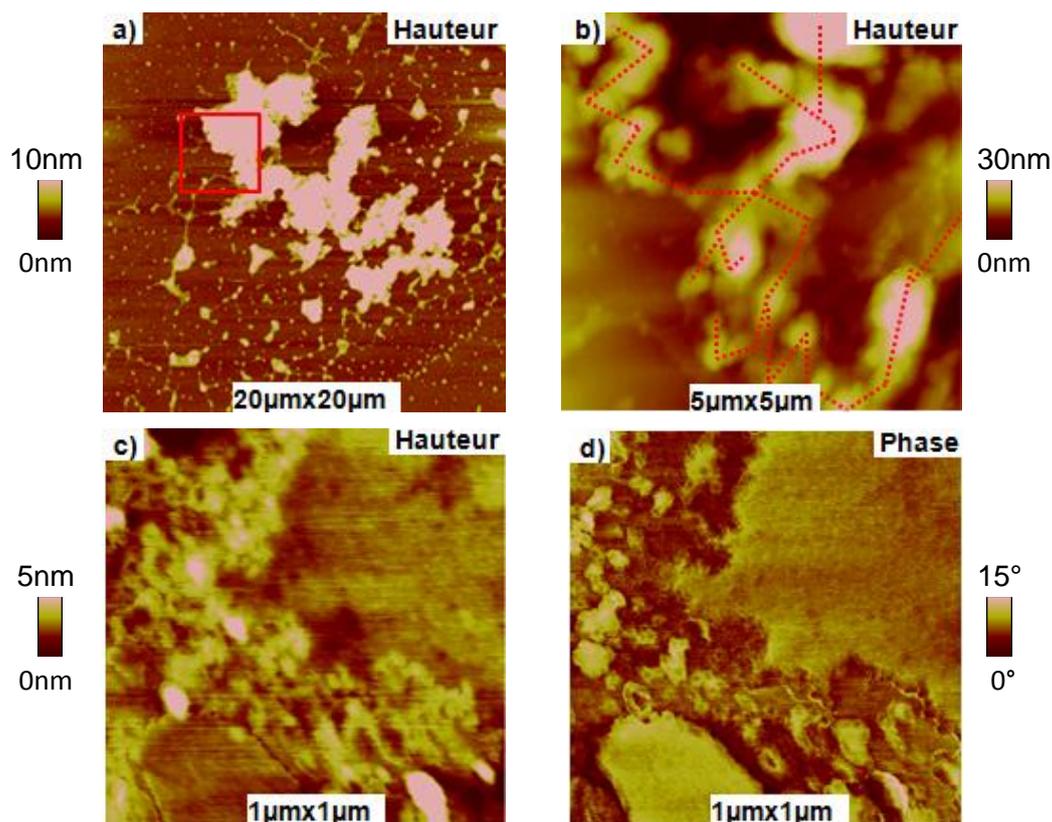


Figure III. 29. Images AFM de topographie (mode tapping) d'un film de tyrosinase déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration 2 mg/mL : a) scan de $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$, b) scan de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ (« zoom-in » de la zone indiquée par un carré dans (a)), c) scan de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ dans une zone éloignée des agrégats, d) image de phase correspondante à (c).

Un premier « zoom-in » de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ sur une partie de ces agrégats (Figure III.29b) montre des grains de forme allongée (longueur $0.7\ \mu\text{m}$ et largeur $0.45\ \mu\text{m}$, Figure III.29b) qui se collent les uns aux autres constituant un filament épais de dimension de l'ordre de 200nm , $3\ \mu\text{m}$ et 100nm (en longueur, largeur et hauteur, respectivement) et dont le squelette est matérialisé par des traits en rouge sur la Figure III.29b. En faisant plusieurs zooms sur l'intégralité du grand agrégat présenté dans la Figure III.29a, la longueur approximative trouvée pour tout le filament est supérieure à $27\ \mu\text{m}$. Il s'agit probablement d'un filament non dispersé de tyrosinase.

L'examen d'une surface encore plus petite confirme une organisation aléatoire des grains dans le film et leurs dimensions variables avec la présence en particulier de petits grains entre 8 et $100\ \text{nm}$.

Toutes ces données suggèrent finalement que la concentration optimale de la tyrosinase, en termes d'homogénéité et de taux de couverture de surface, est $1.5\ \text{mg/mL}$. Nous avons donc utilisé cette concentration par la suite.

III.2. Morphologie des films de tyrosinase déposés sur les couches de HDLs

Les films de tyrosinase ont été déposés à partir d'une solution de concentration optimisée (1.5mg/mL) sur des films constitués des différents HDLs suivant le protocole décrit dans le chapitre II.VI. A titre d'exemple, nous montrerons dans ce paragraphe les résultats obtenus pour le HDL CoAlSO_4 (0.75mg/mL).

La Figure III.30 présente les résultats obtenus dans le cas des films de CoAlSO_4 /tyrosinase. Afin de faciliter la comparaison, les images d'un film de tyrosinase et d'un film de CoAlSO_4 déposés directement sur le mica sont également reportées dans cette figure.

En tenant compte de la surface du film de CoAlSO_4 déposé directement sur le mica (Figure III.30a et d), la comparaison des images de hauteur et de phase (b et c, e et f respectivement), en particulier celles réalisées sur de petites surfaces présentant peu d'agrégats (e et f), montre que la présence du film de HDL modifie l'organisation de la tyrosinase. De plus, l'immobilisation de la tyrosinase sur le film de HDL augmente la rugosité de la surface ($R_{\text{ms}} = 20\ \text{nm}$ pour un scan de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$).

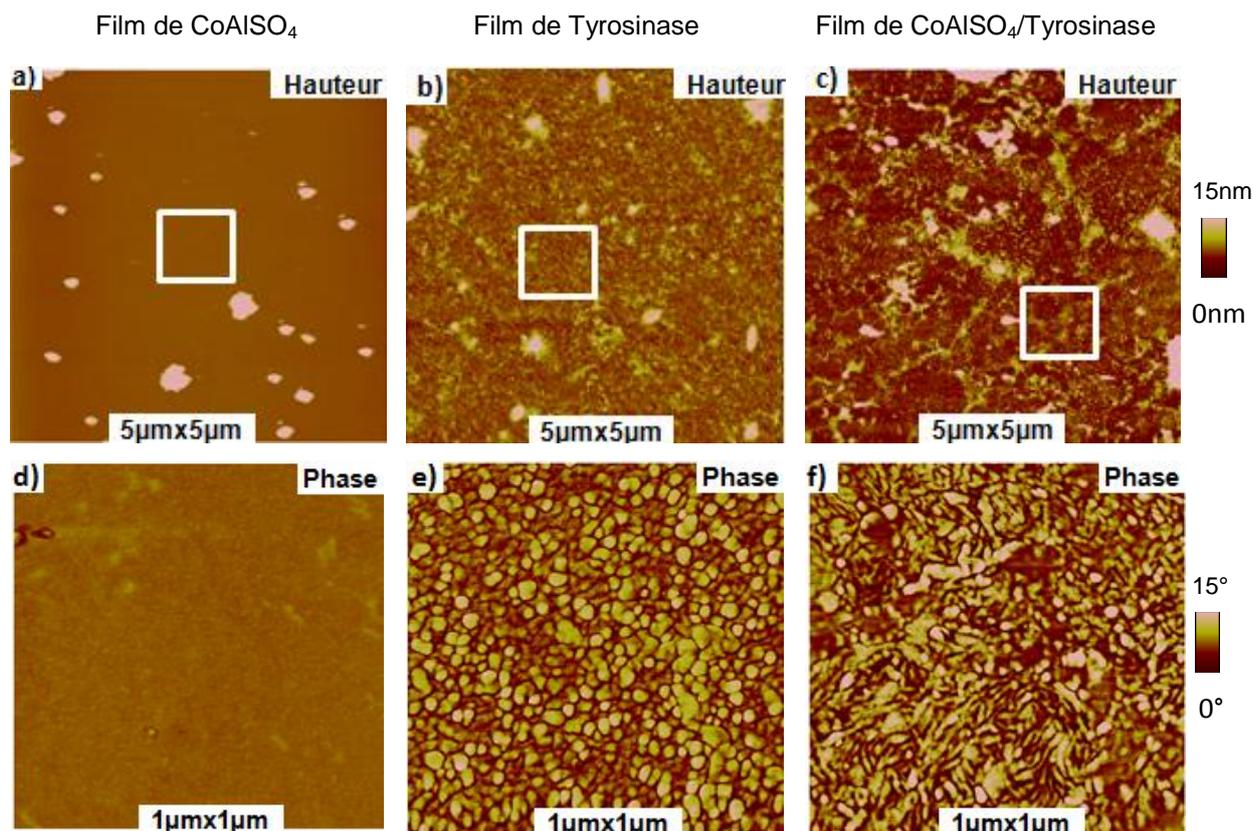


Figure III. 30. Images AFM de topographie (mode tapping, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) de films de : a) CoAlSO_4 déposé sur le mica à partir d'une solution de concentration 0.75mg/mL , b) tyrosinase déposée sur le mica à partir d'une solution de concentration 1.5mg/mL , c) tyrosinase déposée sur le film de HDL présenté en (a), et d), e) et f) images de phase correspondant aux « zoom-in » de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ indiqués par des carrés blancs.

Les images de phase correspondantes (Figures III.30d, e et f), réalisées sur des surfaces plus petites, confirment les différences entre les dépôts. L'organisation de la tyrosinase en grains (Figure III.30e) devient filamenteuse en présence d'un film de HDL. Ces filaments ont des diamètres variant entre 20 et 30 nm et sont séparés par une distance moyenne de 20 nm. On peut supposer que la tyrosinase établit des interactions électrostatiques avec les films de HDL, modifiant ainsi son organisation et/ou son orientation sur la surface. De plus, on remarque que la « nappe » de tyrosinase reste encore homogène en présence du film de HDL.

Toutes ces données montrent finalement que la tyrosinase est bien immobilisée sur la surface de film de HDL, validant notre protocole de fixation. Cependant, seules les mesures électrochimiques permettront de déterminer si l'enzyme conserve ou pas son activité.

IV. DISCUSSION SUR LES FILMS DE HDL

De nombreuses études ont déjà été menées sur la morphologie des particules de HDL de compositions variées et leur organisation sur un support. Comme nous l'indiquons précédemment, l'AFM a été peu utilisée, d'autres méthodes d'imagerie comme la microscopie électronique par transmission (*Transmission Electron Microscopy* ou TEM) ou par balayage (*Scanning Electron Microscopy* ou SEM) étant plus largement appliquées. Ces méthodes permettent de mettre en évidence l'organisation des HDL sous la forme de cristaux aux arêtes acérées [Mousty, 2008] ou de particules de forme hexagonale décrites comme des « *hexagonal sheet* » [Chen, 2004] ou « *hexagonal nanoplatelet* » [Musumeci, 2010 ; Liu, 2012], en accord avec nos propres observations (Figures III.19 et III.31). Ces particules sont organisées en couches plus ou moins homogènes selon la nature du HDL et les conditions expérimentales (telle que la concentration de la solution initiale de HDL ou l'ajout d'autres molécules permettant leur fonctionnalisation), une comparaison directe étant rendue difficile du fait de ces différences.

Images SEM de cristaux de HDL, (a) Zn_2AlCl , (b) Mg_2AlCO_3 , (c) film de HDL Mg_2Al fonctionnalisé par la phosphatase alcaline [C. Mousty, 2008].

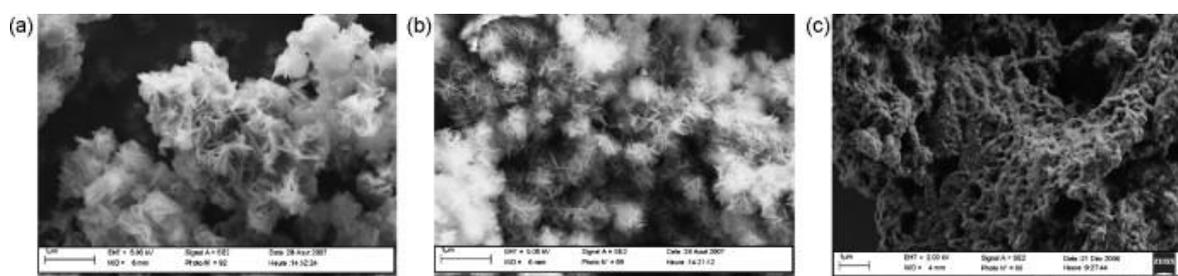


Image TEM de particules hexagonales de Poly(méthyl méthacrylate)-MgAl [W. Chen, 2004]

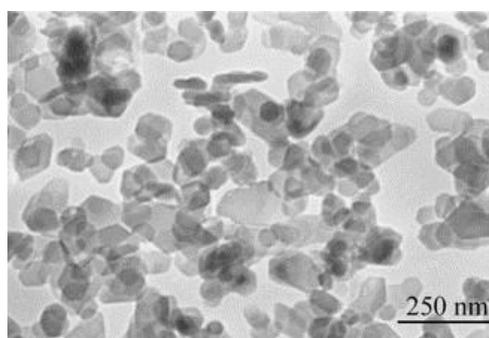
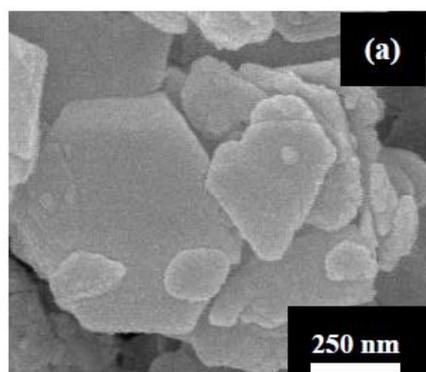


Figure III. 31. Particules de différents HDLs observés par microscopie électronique.

Image SEM du HDL CaAlCl [P. Zhang, 2012]



Images AFM de hauteur (a) et d'amplitude (b) d'un film de Ca_2AlCl déposé à partir d'une solution à 2.5 mg/mL.

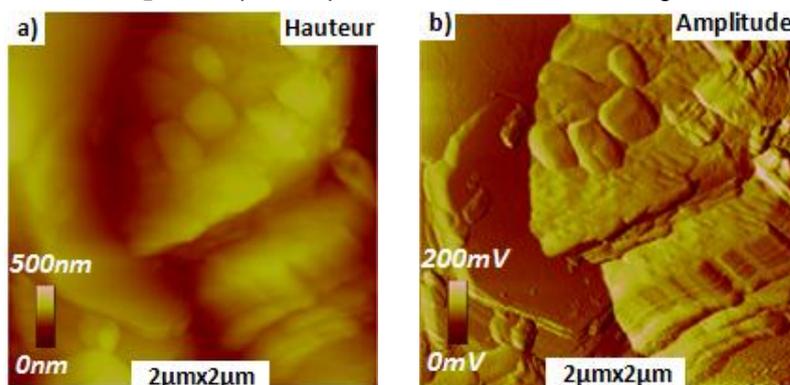
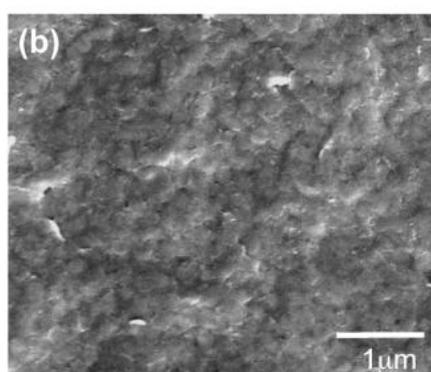
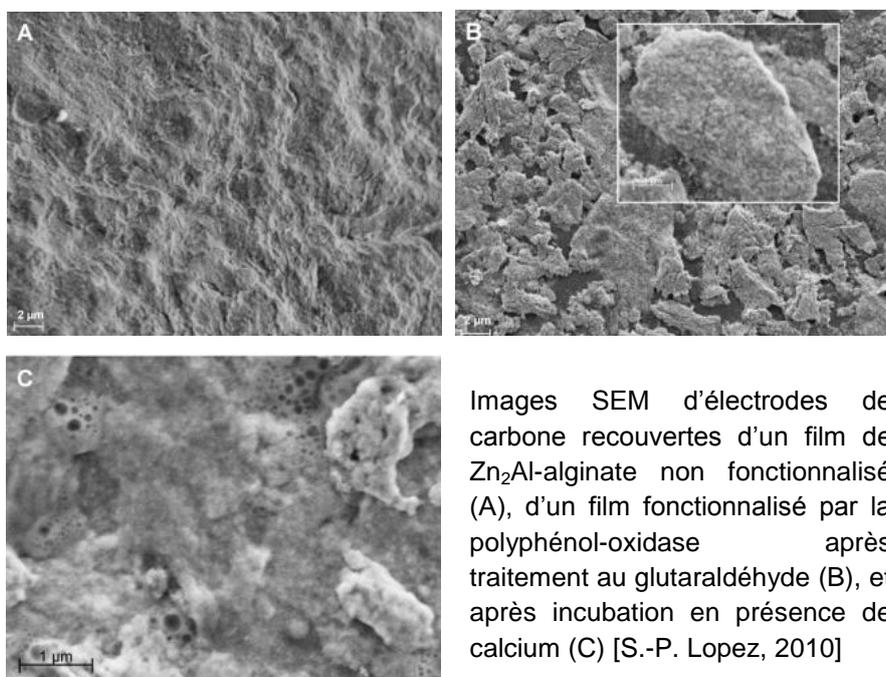
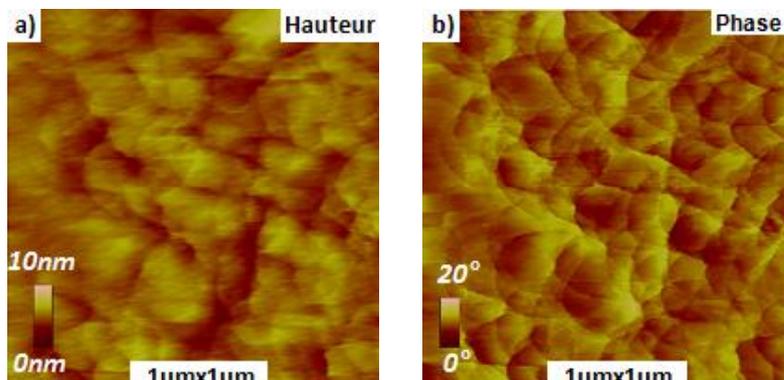


Image SEM de la surface d'un film de ZnAlNO_3 [M.S. Yarger, 2008]



Images AFM de hauteur (a) et de phase (b) d'un film de ZnAlCl déposé à partir d'une solution à 1.5 mg/mL



Images SEM d'électrodes de carbone recouvertes d'un film de Zn_2Al -alginate non fonctionnalisé (A), d'un film fonctionnalisé par la polyphénol-oxidase après traitement au glutaraldéhyde (B), et après incubation en présence de calcium (C) [S.-P. Lopez, 2010]

Figure III. 32. Comparaison de nos images AFM avec des images SEM de films de HDLs.

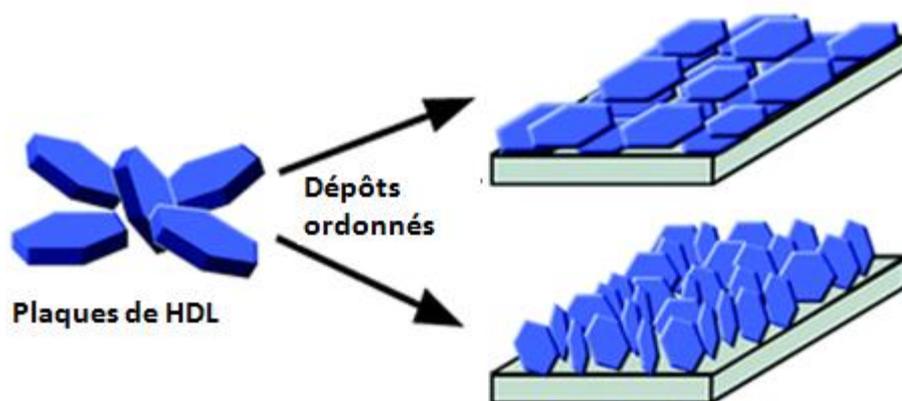


Figure III. 33. Modèles possibles d'orientation des particules de HDL selon [X. Guo, 2010].

Cependant, Han et coll. notent que le HDL MgAlCO_3 associé à une phtalocyanine forme une surface continue et uniforme avec des Rms comparables aux nôtres à une concentration de l'ordre de 0.5 mg/mL [J. Han, 2011]. De même, nos images AFM sont en accord avec des images obtenues par SEM ou TEM comme le montrent quelques exemples rassemblés dans la Figure III.32.

Notons que la morphologie des films dépend également de l'orientation des particules de HDL, ainsi que le soulignent Guo et coll. [X. Guo, 2010]. En effet, les particules hexagonales sont caractérisées par le fait que les dimensions des faces sont largement supérieures à l'épaisseur. Les particules peuvent alors s'orienter selon deux grands types d'organisation dans un film : soit les particules sont couchées sur la surface du substrat (faces parallèles au substrat), soit elles sont orientées perpendiculairement (faces perpendiculaires au substrat). Un modèle extrait de [X. Guo, 2010] est présenté sur la Figure III.33, les deux types d'organisation ayant potentiellement des propriétés différentes.

Enfin, notre étude montre que la fonctionnalisation de nos films de HDL par la tyrosinase se traduit par des changements importants au niveau de leur morphologie, preuve de la fixation efficace de l'enzyme, en accord avec des résultats publiés précédemment dans le cas de la phosphatase alcaline [C. Mousty, 2008] ou de la polyphénol-oxydase (Figure III.32, [S.-P. Lopez, 2010]). Dans ce dernier cas, les « craquelures » observées à la surface des films sont attribuées à des contraintes mécaniques dues au « piégeage » de l'enzyme.

VI. CONCLUSION

Dans ce chapitre, une étude structurale et morphologique des différents HDLs synthétisés (NiAlSO_4 , CoAlSO_4 , Ca_2AlCl et Zn_2AlCl) a été présentée.

Dans un premier temps, la combinaison de différentes techniques physiques (DRX et spectroscopie IR et Raman) nous a permis de valider notre méthode de synthèse. Dans une deuxième étape, l'AFM a été particulièrement utile pour déterminer les conditions expérimentales optimales permettant d'obtenir des films homogènes, adaptés à l'immobilisation efficace de la tyrosinase. Cette étude a montré que les concentrations faibles de HDLs (0.10-0.25 mg/mL pour NiAlSO_4 et Zn_2AlCl et 0.75 mg/mL pour CoAlSO_4 et Ca_2AlCl) et un dépôt par *spin-coating* doivent être favorisés, pour produire des couches relativement lisses et uniformes sur de grandes surfaces. Enfin l'AFM a permis de mettre en évidence le rôle structurant de la couche de HDL sur l'organisation de la tyrosinase.

**CHAPITRE 4 : DETECTION ET QUANTIFICATION DES
POLYPHENOLS PAR LE BIOCAPTEUR**

I. ETUDE DU COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DES HDLs

Une différence de réponse électrochimique entre une électrode nue et une électrode recouverte d'un dépôt permet d'émettre des conclusions sur le dépôt. Pour cette raison, la vérification du comportement électrochimique des électrodes d'or sérigraphiées (AuSPE) avant et après modification de leur surface s'avère une étape nécessaire.

Les mesures électrochimiques ont été réalisées en présence d'une solution tampon de PBS contenant ou pas le couple ferricyanure/ferrocyanure ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$). Ce dernier est en effet connu pour amplifier les signaux électrochimiques en accélérant le transport des électrons, étant lui-même un système quasi-réversible rapide [W. J. Niu et coll., 2015].

I.1. Comportement électrochimique d'une AuSPE

I.1.1. Comportement électrochimique de l'AuSPE nue dans le PBS

Le PBS est une solution tampon qui contient du chlorure de sodium et du chlorure de potassium (NaCl et KCl), du phosphate disodique (Na_2HPO_4) et du phosphate monopotassique (KH_2PO_4). Nous avons choisi ce tampon car la concentration de ces sels (10 mM, 0.137 M NaCl, pH 7.4) est compatible avec les conditions requises pour maintenir la structure et la fonction d'une enzyme comme la tyrosinase.

Une étude préliminaire des AuSPEs avant toute modification de la surface de l'électrode de travail (ET) est réalisée en étudiant par voltamétrie cyclique leur réponse à différentes concentrations de polyphénols. Ceci permet à la fois de vérifier la qualité de l'électrode ET mais aussi de la contre-électrode (CE) et si nécessaire, d'ajuster la courbe de calibration du biocapteur dans les différentes étapes de validation de la modification de surface.

Pour cela, dans un premier temps, différentes fenêtres de potentiels ont été testées ([-1V ; 1V], [-0.9V ; 0.5V] et [-0.4V ; 0.6V]). Ici, le choix de la gamme de potentiel dépend de l'application finale qu'on veut réaliser : le biocapteur de polyphénols. Plusieurs études ont montré que l'oxydation et la réduction des polyphénols se produisent à des potentiels faibles, aux alentours de -0.2V pour la réduction et 0.2V pour l'oxydation [G. Wang et coll., 2002 ; D. Shan et coll., 2004 ; B. X. Gu, et coll., 2008 ; M. S. P. Lopez et coll., 2010 ; I.M. Apetrei et coll., 2013 ; S. Lupu et coll., 2013]. Il faut donc choisir une fenêtre de potentiel qui inclut ces valeurs. De plus, étant donné que nous avons étudié la possibilité d'utiliser le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ pour la détection (voir plus loin), nous avons donc choisi, dans un premier temps,

la fenêtre de potentiel [-0.4V ; 0.6V] qui contient les potentiels d'oxydoréduction de ce couple et ceux des polyphénols.

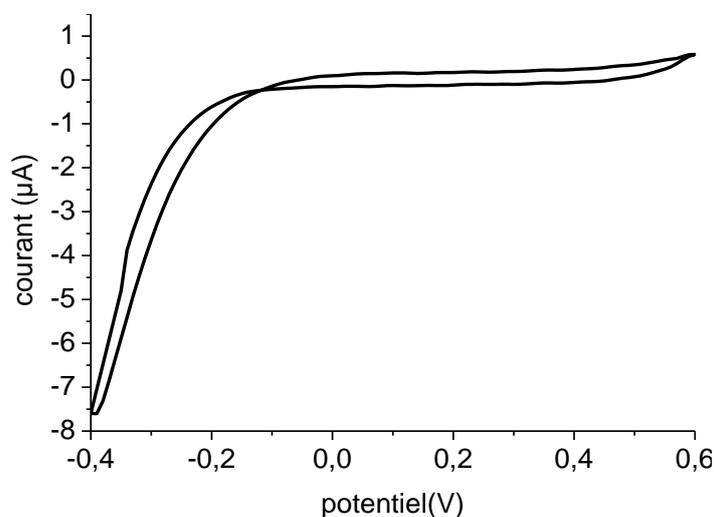


Figure IV. 1. Voltamogramme obtenu dans le cas de l'AuSPE nue (vs Ag/AgCl) plongée dans le PBS (10 mM, 0.137 M NaCl, pH 7.4) en balayant la gamme de potentiels [-0.4V ; 0.6V] à la vitesse de balayage de 50 mV/s.

Sur la fenêtre [-0.4V ; 0.6V], l'absence des pics redox dans cette gamme de potentiel et l'intensité très faible du courant ($-7.7 \mu\text{A} < I < 0.7 \mu\text{A}$) suggèrent que le PBS peut être considéré comme un milieu non-électroactif.

I.1.2. Comportement électrochimique de l'AuSPE nue en présence du couple ferricyanure/ferrocyanure

Pour distinguer l'effet des différentes étapes de modification de l'AuSPE, nous avons vérifié les résultats obtenus dans le PBS en refaisant les tests en présence du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

Le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ est un électrolyte support (Chapitre 2 : IV.2) qui joue le rôle de sonde électrochimique et qui est, de ce fait, très largement utilisé dans les travaux relatifs aux électrodes modifiées [J. E. O'Reilly, 1973 ; H. Trzeciakiewicz, 2015].

Ce couple est en effet réversible sur des électrodes métalliques classiques. Il est basé sur l'échange électronique suivant :



La Figure IV.2 montre le voltamogramme de référence obtenu avec une AuSPE nue plongée dans une solution de PBS contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ à une concentration de 3 mM.

On note deux modifications majeures entre les voltammogrammes de l'AuSPE en absence (Figure IV.1c) et en présence (Figure IV.2) du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$:

- une augmentation nette du courant mesuré, en accord avec la fonction d'électrolyte support ;
- la présence de deux pics d'oxydoréduction caractérisés par un $E_{1/2} = (E_{p,ox} + E_{p,red})/2 = 0.125\text{V}$, compatible avec le potentiel standard du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ mentionné dans la littérature ($E^\circ = 0.36\text{ V vs ENH}$ ou 0.15 V vs Ag/AgCl).

L'écart en potentiel ΔE_p entre le pic de réduction (= 0.07 V) et le pic d'oxydation (= 0.18 V) est supérieur à celui attendu pour un système réversible mettant en jeu un électron (110 mV , au lieu de 59 mV). De plus, en faisant varier la vitesse de balayage (entre 10 et $200\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Figure IV.3), les courbes obtenues gardent la même allure générale, les intensités des pics augmentant (en valeur absolue) et le ΔE_p devenant plus large, ce qui est vérifié par l'équation de la densité de courant d'un système rapide (Annexe C).

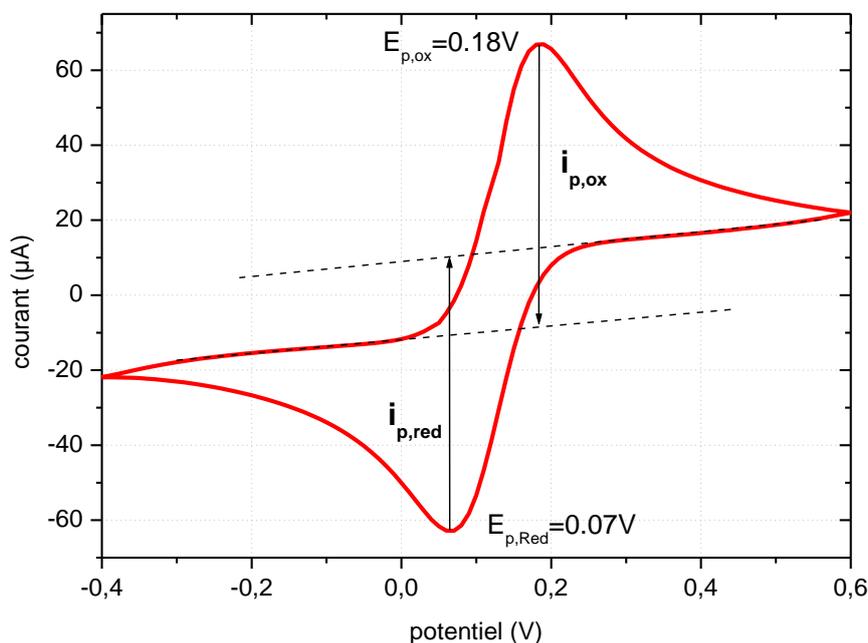


Figure IV. 2. Voltammogramme obtenu avec une AuSPE nue plongée dans une solution de PBS (10 mM, 0.137 M NaCl, pH 7.4) contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (3 mM). La vitesse de balayage est égale à 50 mV/s .

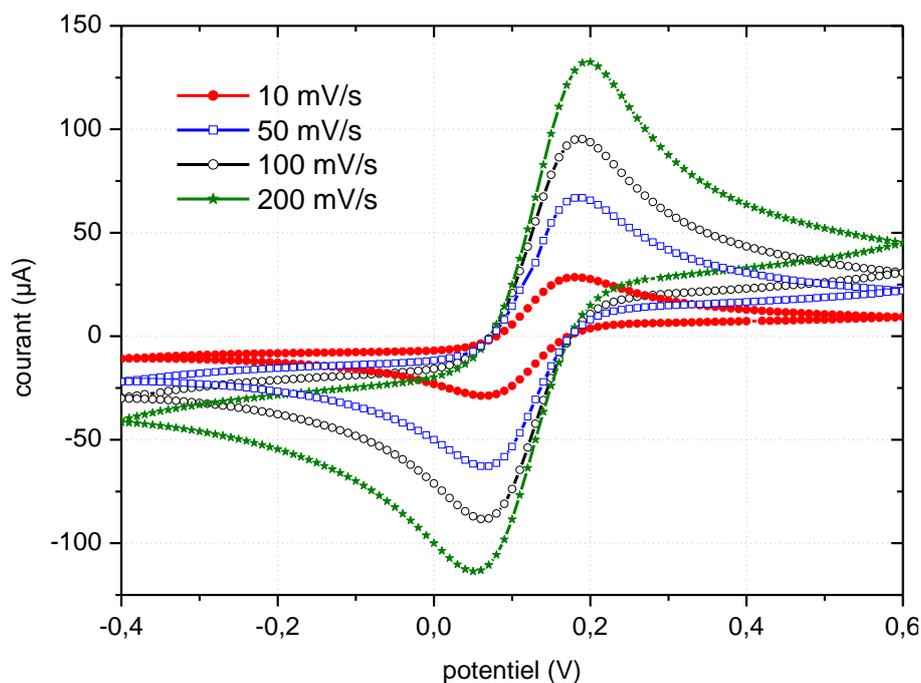


Figure IV. 3. Influence de la vitesse de balayage sur l'évolution des voltammogrammes de l'AuSPE plongée dans du PBS (10 mM, 0.137 M NaCl, pH 7.4) contenant le couple de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (3 mM).

Ce résultat suggère que dans nos conditions expérimentales, le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ est un système quasi-réversible.

Suite à ce résultat, nous avons choisi d'utiliser une vitesse de balayage de 50 mV/s car les deux pics redox du couple sont bien séparés et les intensités de courant sont suffisamment amplifiées.

I.2. Comportement électrochimique de l'AuSPE modifiée par un dépôt de HDL

Bien que l'AFM nous ait permis précédemment d'étudier l'effet de la concentration en HDL sur l'homogénéité des films, il n'en demeure pas moins que cette étude a été réalisée sur du mica, la surface des électrodes étant trop rugueuse.

C'est pourquoi nous avons jugé utile d'étudier l'effet de la concentration en HDL sur les voltammogrammes des AuSPEs fonctionnalisées par ces HDLs, afin d'éventuellement optimiser ces concentrations en fonction du courant mesuré.

Des AuSPEs ont donc été plongées dans une solution de PBS contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ pour vérifier leur réponse ampérométrique avant et après modification de leurs surfaces par le

dépôt de différents HDLs (NiAlSO_4 , CoAlSO_4 , Ca_2AlCl et Zn_2AlCl) à différentes concentrations (entre 0.25 et 2.50 mg/mL). Les voltammogrammes sont présentés sur la Figure IV.5. Ils se sont avérés stables à partir de 10 à 20 cycles, le restant même après 50-70 cycles. De plus les mesures sont reproductibles sur trois électrodes différentes.

On remarque tout d'abord que pour tous les dépôts de HDL, l'allure générale des voltammogrammes cycliques affichés sur la Figure IV.4 ne change pas par rapport à celle de référence (Figure IV.2). Cependant, les intensités des pics d'oxydoréduction et leurs positions en termes de potentiel varient selon le type et la concentration de HDL déposé (Figure IV.5). On peut globalement distinguer deux cas :

- NiAlSO_4 et CoAlSO_4 : pour ces deux HDLs, une augmentation de la concentration en HDL provoque tout d'abord une augmentation du courant d'oxydation et une diminution du courant de réduction. Au-delà d'une certaine concentration (0.25 mg/ml pour NiAlSO_4 et 0.75 mg/ml pour CoAlSO_4), la tendance s'inverse, les courants atteignant finalement des valeurs légèrement inférieures (ou supérieures selon la nature du courant) à celles mesurées en absence de HDL. La position en termes de potentiel des pics évolue par ailleurs très peu (de l'ordre de 0.01V).
- Ca_2AlCl et Zn_2AlCl : une augmentation de la concentration en HDL induit des variations plus limitées et plus régulières des courants d'oxydation et de réduction. Dans le cas du Ca_2AlCl , ces courants semblent atteindre une valeur limite dans la gamme de concentration testée (aux alentours de 55 μA et -45 μA , pour les courants d'oxydation et de réduction, respectivement), ce qui n'est pas le cas du Zn_2AlCl . De plus, les positions des pics fluctuent davantage, en particulier dans le cas du Ca_2AlCl où nous notons un léger décalage des pics d'oxydation pour les concentrations supérieures à 0.75 mg/mL.

Globalement à forte concentration, les courbes tendent à se rejoindre, suggérant un comportement similaire du système pour toutes les natures de HDL.

L'augmentation du courant (en valeur absolue) est due au changement de la barrière de potentiel et de la courbure des bandes à l'interface solide / liquide qui se traduit par une nouvelle zone de charge d'espace (ZCE) (Chapitre 2 : IV.1.1.) à l'interface solide de type HDL. La ZCE accentue le transfert des porteurs de charge (donneurs ou accepteurs) provenant des espèces électroactives oxydées ou réduites ainsi que de la sonde électrochimique $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ présente dans la solution.

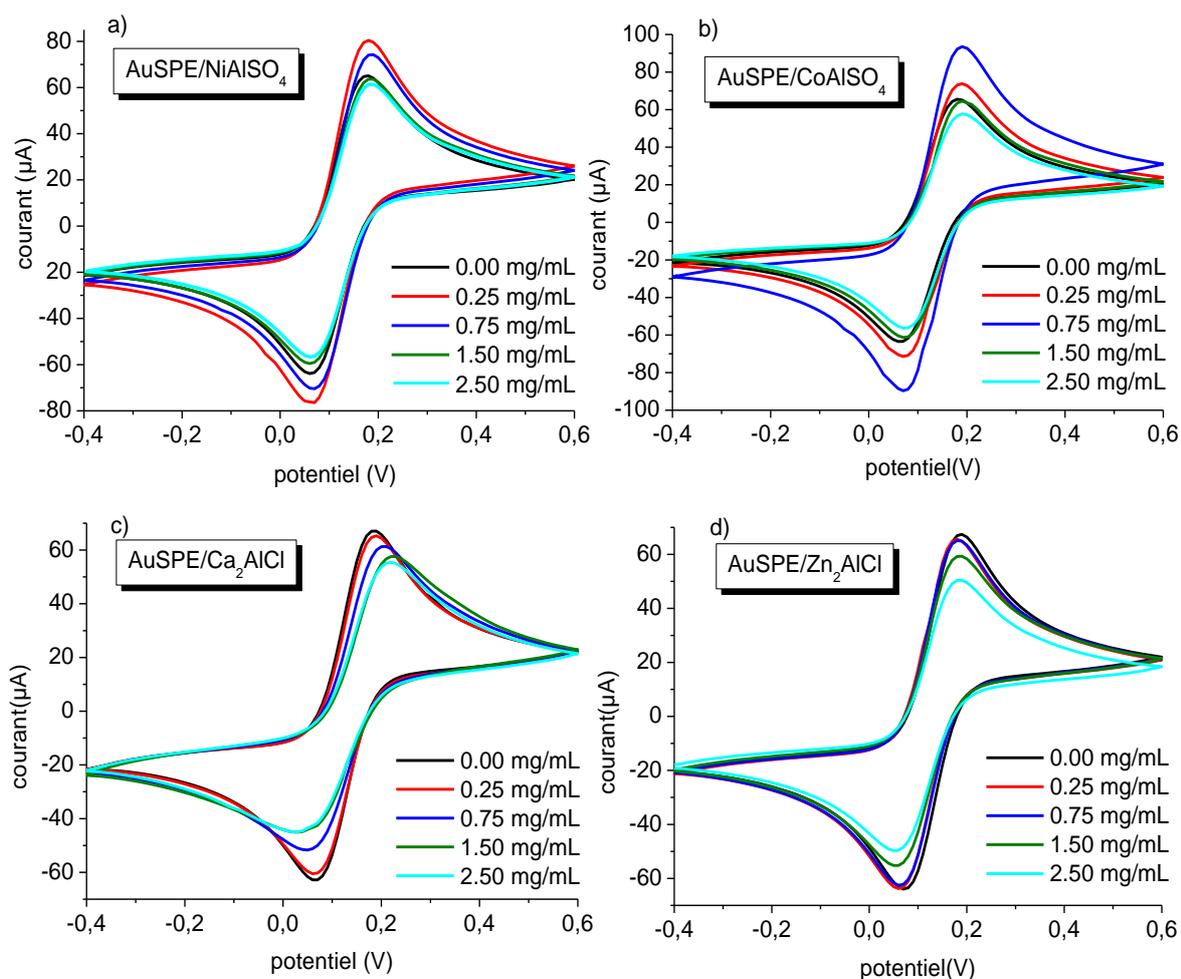


Figure IV. 4. Voltamogrammes cycliques des AuSPEs avant et après modification de leur surface par le dépôt de différentes solutions de HDL à des concentrations variant entre 0.25 et 2.50 mg/mL : a) NiAlSO_4 , b) CoAlSO_4 , c) Ca_2AlCl , d) Zn_2AlCl . L'électrolyte est le PBS 10mM contenant le couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

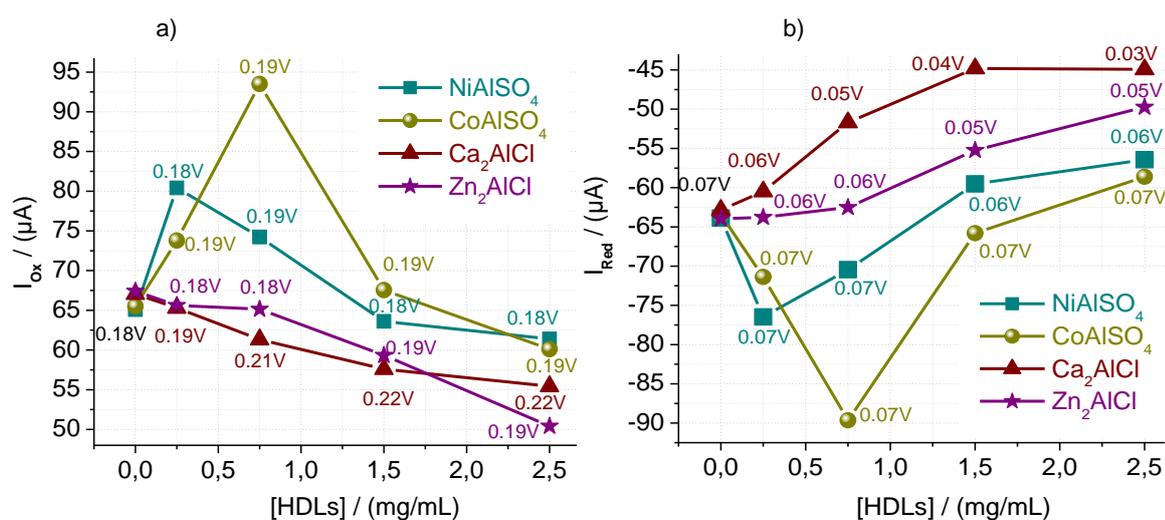


Figure IV. 5. Effet de la concentration de la solution de HDLs déposée sur l'AuSPE sur les pics d'oxydation (a) et de réduction (b).

Cette variation est due à la réaction d'oxydation réversible d'une fraction x du métal divalent (M^{II}) en métal trivalent (M^{III}) qui peut s'accompagner de l'insertion entre les feuillets d'anions OH^- dans un milieu dont le pH est supérieur à 7 [A. Faour et coll., 2012].

Cette réaction est modélisée par :



où M représente les cations de Ni, Co, Ca ou Zn.

Cependant, nos résultats montrent que les variations du courant sont plus importantes en présence de $NiAlSO_4$ et $CoAlSO_4$, ce qui peut être expliqué par la plus grande électroactivité des cations de Co et de Ni, mais également par la plus grande électronégativité des anions SO_4^{2-} par rapport aux anions Cl^- , présents dans les feuillets.

Enfin, à une concentration plus importante, les couches de HDL déposées commencent à jouer le rôle d'une barrière s'opposant au passage du courant. C'est pourquoi nous avons choisi de greffer l'enzyme sur des films de HDL déposés à partir de solutions de concentration intermédiaire (0.25-0.75 mg/mL). Ce choix est compatible avec le résultat de l'étude morphologique décrite dans le chapitre III.

La Figure IV.6 présente les voltammogrammes cycliques de quatre autres AuSPE plongées dans une solution de PBS ne contenant pas la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, avant et après modification de leurs surfaces par le dépôt de solutions de HDLs à une concentration de 0.75 mg/mL.

En tenant compte de l'allure du voltammogramme de référence (Figure IV.6a), on remarque ici encore que tous les HDLs ne provoquent pas les mêmes effets. Comme précédemment, les HDLs Zn_2AlCl et Ca_2AlCl n'apportent pas de modification importante, le voltammogramme semble seulement translaté vers des valeurs de courant légèrement plus élevées. Le décalage est par contre plus significatif dans le cas des HDLs $CoAlSO_4$ et $NiAlSO_4$, certains pics étant par ailleurs apparus.

En effet, la présence du dépôt de $CoAlSO_4$ sur l'électrode rend sa surface plus conductrice et fait apparaître un pic d'oxydation à 0.45 V et un pic de réduction à 0.08 V. La position de ce dernier pic est compatible avec la valeur de potentiel standard à 0.07 V dans le cas du cobalt (Tableau IV.1). De plus, des études récentes sur le comportement électrochimique du cobalt dans les phases de HDLs ont montré qu'il est possible d'oxyder la forme Co^{2+} présente dans le matériau de départ en Co^{3+} , en appliquant des potentiels assez faibles de l'ordre de 0.4 V vs

ECS (Electrode au Calomel Saturé) et de 0.5 V vs Ag/AgCl [X.M. Liu et coll., 2003; L.H. Su et coll., 2008 ; P. Vialat, 2014]. Dans ce cas, l'équation IV.1 s'écrit :

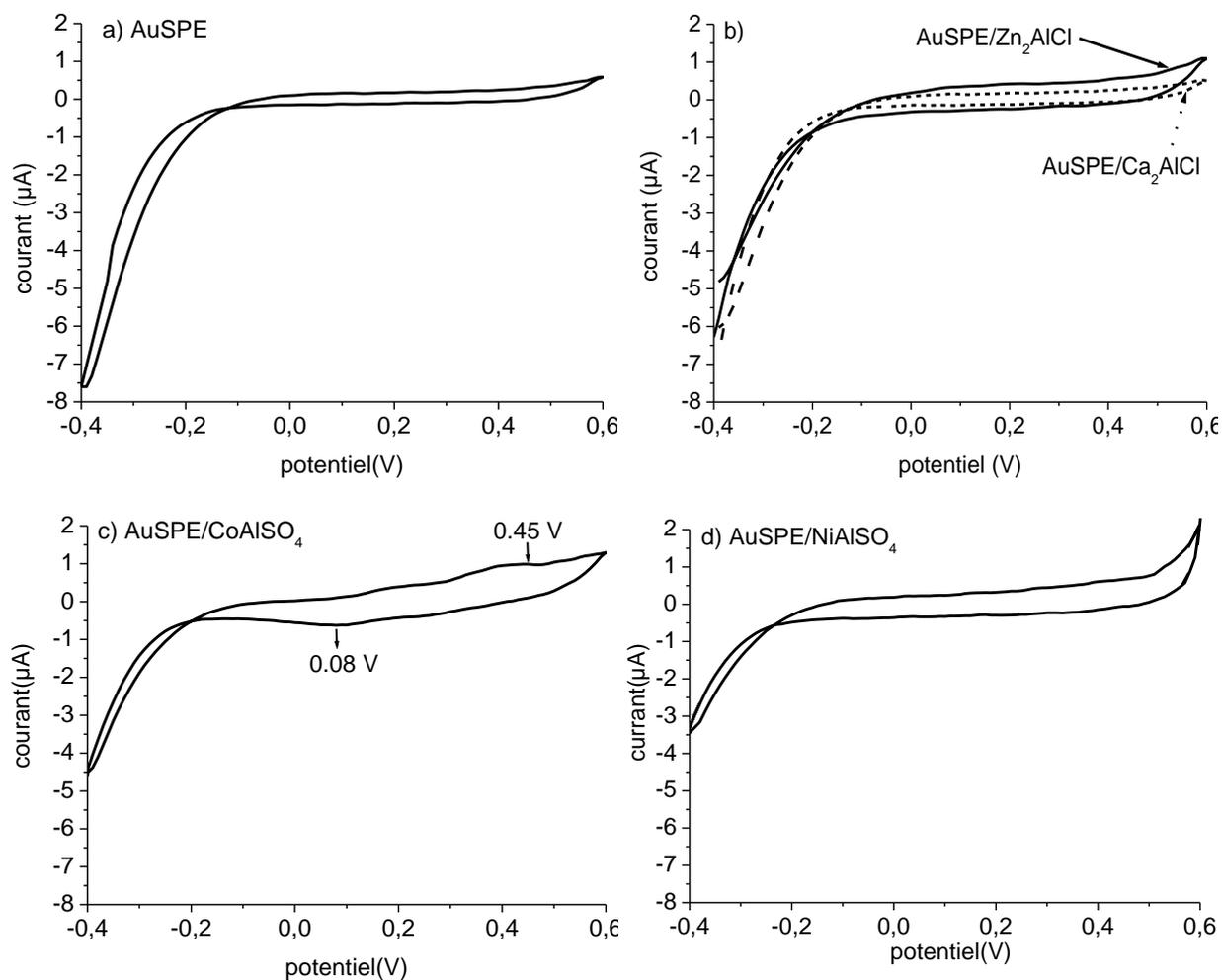


Figure IV. 6. Voltamogrammes cycliques de différents AuSPE avant (a) et après modification de leur surface par le dépôt des différentes solutions de HDL à une concentration de 0.75 mg/mL : b) Ca_2AlCl et Zn_2AlCl , c) CoAlSO_4 , et d) NiAlSO_4 . L'électrolyte est le PBS. La vitesse de balayage est de 50 mV/s

Couple redox	E^0 (V vs ENH)	E^0 (V vs Ag-AgCl)
$\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$	1.84	0.76
$\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}$	0.17	0.07
$\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$	2.56	1.06

Tableau IV. 1. Les potentiels redox standards des métaux Cobalt et Nickel. [A.J. Bard et coll., 1985 ; F.J. Mompean et coll., 2005].

L'effet de la vitesse de balayage (v) sur la réponse électrochimique du CoAlSO_4 a été analysé (Figure VI.7). Les résultats montrent que les intensités des pics d'oxydoréduction s'accroissent à partir d'une valeur de 50 mV/s. Cela justifie notre choix de fixer la vitesse de balayage à 50 mV/s pour l'enregistrement des voltamogrammes. En outre, la courbe représentative de l'intensité I_{ox} du pic d'oxydation (à $E=0.45\text{V}$) en fonction de $v^{1/2}$ révèle une bonne linéarité ce qui suggère que le comportement électrochimique est régi par un phénomène diffusionnel au sein des feuillets de HDL [Annexe C].

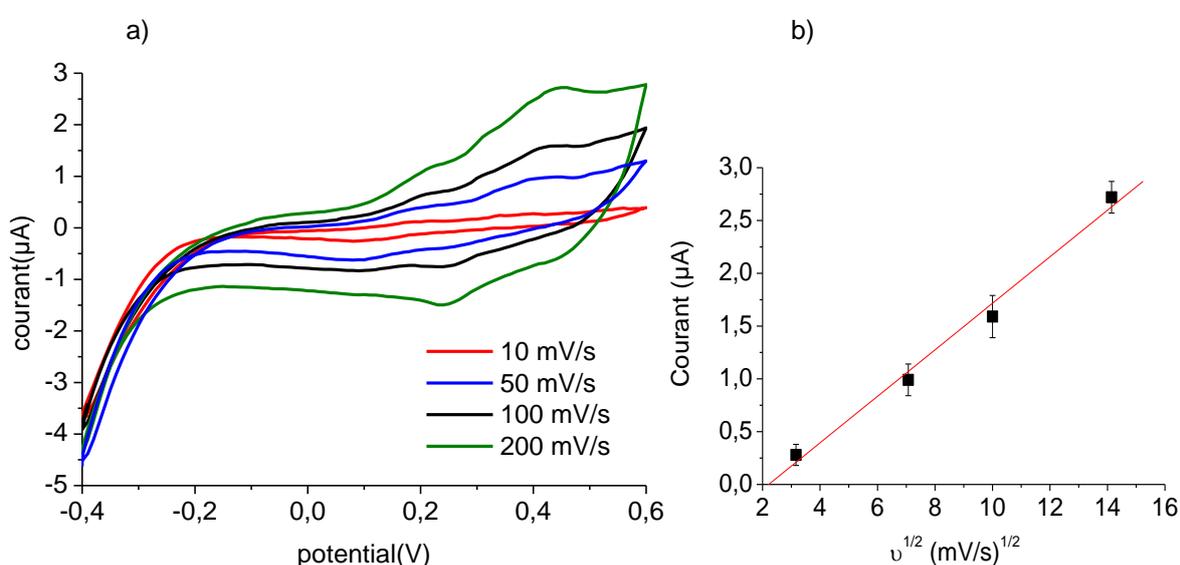


Figure IV. 7. a) Effet de la vitesse de balayage sur les voltamogrammes d'une AuSPE recouverte par un film de CoAlSO_4 et plongée dans une solution de PBS ; et b) représentation de l'intensité I_{ox} du pic d'oxydation (à $E=0.45\text{V}$) en fonction de $v^{1/2}$. Les barres d'erreurs représentées sur la droite correspondent à trois mesures.

Enfin, le voltamogramme correspondant au dépôt du HDL NiAlSO_4 (Figure IV.6d) présente une augmentation du courant anodique au potentiel 0.6 V. Il s'agit du début de l'oxydation de la forme Ni^{2+} présente dans le matériau de départ en Ni^{3+} , qui se produit au voisinage d'un potentiel de 1.06 V (Tableau IV.1). Son équation s'écrit sous la forme suivante :



II. BIOCAPTEUR DE POLYPHÉNOLS À BASE DE TYROSINASE IMMOBILISÉE SUR UN FILM MINCE DE HDL

La détection électrochimique de polyphénols est réalisable même en absence de fonctionnalisation de l'électrode. En effet, des études ont démontré que la présence de phénols peut être identifiée par leur oxydation électrochimique directe sur la surface d'une électrode de platine ou d'or en milieu acide. Cependant, la surface de l'électrode peut être affectée par la polymérisation des produits d'oxydation [P.I. Iotov et coll., 1998]. Une fonctionnalisation de cette surface est donc nécessaire, soit par un moyen purement chimique [J. Han et coll., 2011], soit par l'intermédiaire d'une enzyme.

Notre but est donc d'analyser le comportement électrochimique de l'AuSPE après modification de sa surface avec les différents films hybrides HDL/tyrosinase afin de trouver le HDL le plus efficace pour l'élaboration d'un biocapteur performant en termes de sensibilité à la détection des polyphénols. Une telle étude comparative a été adoptée précédemment avec succès dans notre équipe (Nanobioingénierie, INRAP) dans le cas de l'acétylcholine estérase: sa principale conclusion est que l'activité enzymatique est modulée en fonction de la composition du HDL, certains d'entre eux conduisant à une forte inhibition de l'activité enzymatique [S. Hidouri et coll., 2011]. Dans le même contexte, il a été démontré que le HDL MgAl améliore l'adsorption et la stabilité de la phosphatase alcaline par rapport au HDL Zn₂Al [C. Mousty, 2008].

II.1. Comportement électrochimique de l'AuSPE modifiée par le film hybride de HDL/ tyrosinase

Après dépôt de la tyrosinase sur les différents films de HDL décrits dans le paragraphe précédent, une nouvelle analyse de la réponse voltampérométrique de l'AuSPE ainsi fonctionnalisée a été réalisée. Les voltammogrammes ont été enregistrés dans les mêmes conditions que précédemment. Ils sont stables et reproductibles même après 50 cycles.

La Figure IV.8 montre les voltammogrammes cycliques d'une AuSPE de référence, et les voltammogrammes des quatre électrodes AuSPE fonctionnalisées par les différents dépôts de HDL (C=0.75 mg/mL), puis par la tyrosinase. L'immobilisation de l'enzyme entraîne des changements en termes de déplacement des pics redox du système Fe(CN)₆^{3-/4-} et d'intensité de courant tant au niveau de l'oxydation que de la réduction.

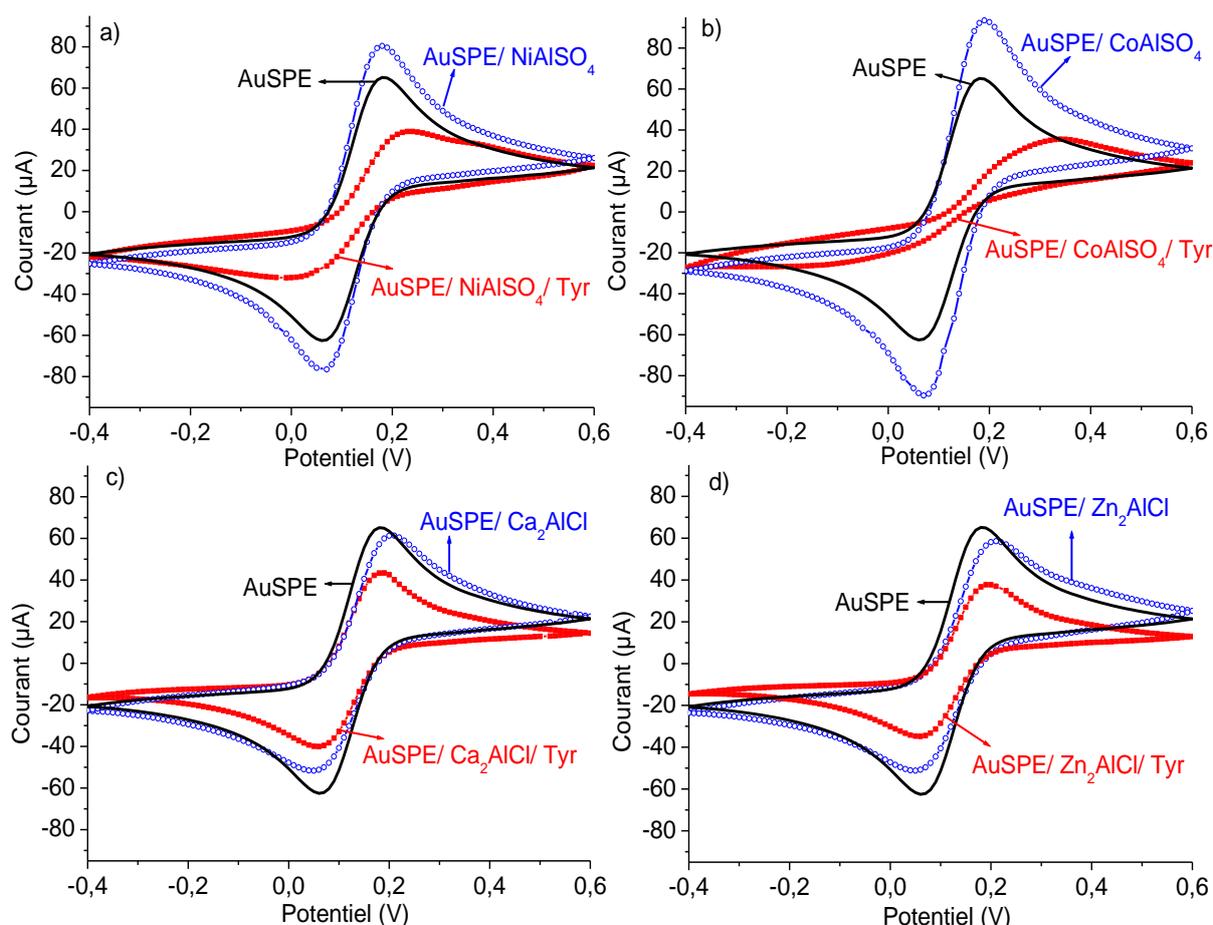


Figure IV. 8. Voltammogrammes cycliques de l'AuSPE nue; de l'AuSPE modifiée par le dépôt des films de HDL ($C=0.75\text{mg/mL}$) NiAlSO₄ (a), CoAlSO₄ (b), Ca₂AlCl (c) et Zn₂AlCl (d), puis par l'immobilisation de la tyrosinase (Tyr) sur les films de HDL. Les expériences sont effectuées dans une solution de PBS (10 mM, 0.137 M de NaCl, pH 7.4) avec couple rédox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (3 mM) à température ambiante.

	E_{ox} (V)		E_{red} (V)		I_{ox} (µA)		I_{red} (µA)	
	HDL	HDL/Tyr	HDL	HDL/Tyr	HDL	HDL/Tyr	HDL	HDL/Tyr
AuSPE	0.18-0.19		0.07		65.14		-62.62	
NiAlSO₄	0.19	0.24	0.07	0.01	80.41	38.92	-76.50	-32.04
CoAlSO₄	0.19	0.34	0.07	-0.12	93.51	35.48	-89.65	-25.73
Ca₂AlCl	0.21	0.18	0.05	0.06	61.32	43.34	-51.68	-40.05
Zn₂AlCl	0.21	0.19	0.06	0.06	58.56	37.70	-51.23	-34.83

Tableau IV. 2. Évolution des potentiels et courants des pics redox du système $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ suite aux différentes modifications de l'AuSPE.

Ces changements sont résumés dans le Tableau IV.2. Comme précédemment, le comportement du système diffère selon la nature des HDLs, ces derniers pouvant être classés en deux catégories :

- La présence des HDLs NiAlSO₄ et CoAlSO₄ fonctionnalisés par la tyrosinase entraîne une augmentation du potentiel d'oxydation par rapport à l'AuSPE nue de 0.05 V ou 0.15 V, respectivement. Le potentiel de réduction, lui, diminue assez fortement. Globalement, on a donc une augmentation de l'écart ΔE_p entre les deux pics, le couple CoAlSO₄/ tyrosinase étant plus efficace que le couple NiAlSO₄/ tyrosinase.
- Par contre, la présence des HDLs Ca₂AlCl et Zn₂AlCl couplés à la tyrosinase n'entraîne pas de modification évidente de la position des pics par rapport à l'AuSPE nue. Seule la diminution des intensités du courant d'oxydoréduction permet de conclure à une modification de la surface avec probablement un faible taux de recouvrement.
- En termes d'intensité de courant, ce dernier décroît en valeur absolue, quelle que soit la nature du HDL, en présence de la tyrosinase. Le courant d'oxydation diminue de 22 à 30 μ A, tandis que le courant de réduction diminue de 22 à 37 μ A, les variations les plus importantes étant obtenues avec la couche hybride CoAlSO₄/ tyrosinase.

Les modifications observées sur les voltammogrammes de la Figure IV.8 (diminution du courant au niveau des pics, déplacement des positions des pics en potentiel) sont cohérents avec la présence de l'enzyme sur la surface de l'AuSPE, cette dernière entraînant une augmentation de la résistance de l'interface. Ces résultats sont également compatibles avec ceux de R. Villalonga et coll. [2012] qui ont étudié les effets de la fonctionnalisation d'une électrode d'or par des nanoparticules d'or polyfonctionnalisées servant ensuite de matrice pour la fixation de la tyrosinase. En effet, l'analyse des voltammogrammes obtenus montre tout d'abord une augmentation importante du courant quand les nanoparticules seules sont fixées sur l'électrode. Le greffage de l'enzyme conduit, lui, à une diminution importante du courant et à une augmentation de la valeur ΔE_p avec un élargissement des deux pics. Des mesures d'impédance montrent de manière complémentaire que la présence de l'enzyme augmente notablement la résistance de transfert. Une augmentation de la résistance de l'électrode a également été notée par exemple dans le cas d'électrodes de carbone fonctionnalisées par un mélange de laccase et Nafion (un fluoropolymère), l'ajout de nanoparticules de NiCu contre balançant en partie ce phénomène [D. Li et coll., 2015].

Une augmentation du courant après le dépôt d'une couche mince sur l'électrode de travail signifie que celle-ci favorise la diffusion des espèces électroactives présentes dans la solution. Nos résultats précédents suggèrent la présence des films de HDL à la surface des électrodes, les HDLs de NiAlSO₄ et CoAlSO₄ étant les plus prometteurs pour fonctionnaliser de manière efficace la surface du biocapteur. Après dépôt de l'enzyme, les changements observés sur les voltammogrammes suggèrent que la tyrosinase est bien présente, probablement en quantité plus importante dans le cas des films de NiAlSO₄ et CoAlSO₄.

Pour ces raisons, dans la suite de notre travail nous avons retenu seulement les HDLs de type NiAlSO₄ et CoAlSO₄ pour élaborer des biocapteurs hautement sensibles aux polyphénols.

II.2. Détection des polyphénols

Les deux biocapteurs élaborés de type AuSPE/HDL (CoAlSO₄ ou NiAlSO₄)/tyrosinase ont été immergés dans une solution de PBS contenant ou pas le couple redox (Fe(CN)₆^{3-/4-}). L'injection de faibles volumes d'une solution mère de polyphénols préparée dans du PBS permet de varier la concentration du substrat biologique à doser dans l'électrolyte de 0 à 2000 ng.mL⁻¹.

II.2.1. Tests de contrôles pour la détection des polyphénols dans le PBS contenant le couple Fe(CN)₆^{3-/4-}

Dans un premier temps, une série de mesures a été effectuée sur le biocapteur AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase dans la solution de PBS contenant le couple Fe(CN)₆^{3-/4-}. Deux types de CE ont été utilisées: une CE en carbone (AuSPE-CCE) et une CE en platine (AuSPE-PtCE). Les voltammogrammes correspondants ont été enregistrés dans une gamme de potentiel de [-0.6V ; 0.5V] à une vitesse de balayage de 50 mV/s et à température ambiante.

II.2.1.1. Effet de la nature de la CE sur la réponse ampérométrique d'une AuSPE nue en présence de polyphénols

La Figure IV.9 présente les voltammogrammes correspondant aux électrodes AuSPE-CCE et AuSPE-PtCE nues, obtenus après les différentes injections de la solution de polyphénols, les concentrations variant de 0.01ng/mL à 2000.00 ng/mL.

Globalement, on retrouve dans les deux cas l'allure du voltammogramme déjà présenté dans la Figure IV.2, avec la présence des deux pics caractéristiques du couple Fe(CN)₆^{3-/4-}, centrés à 0.18 V (oxydation) et 0.07 V (réduction).

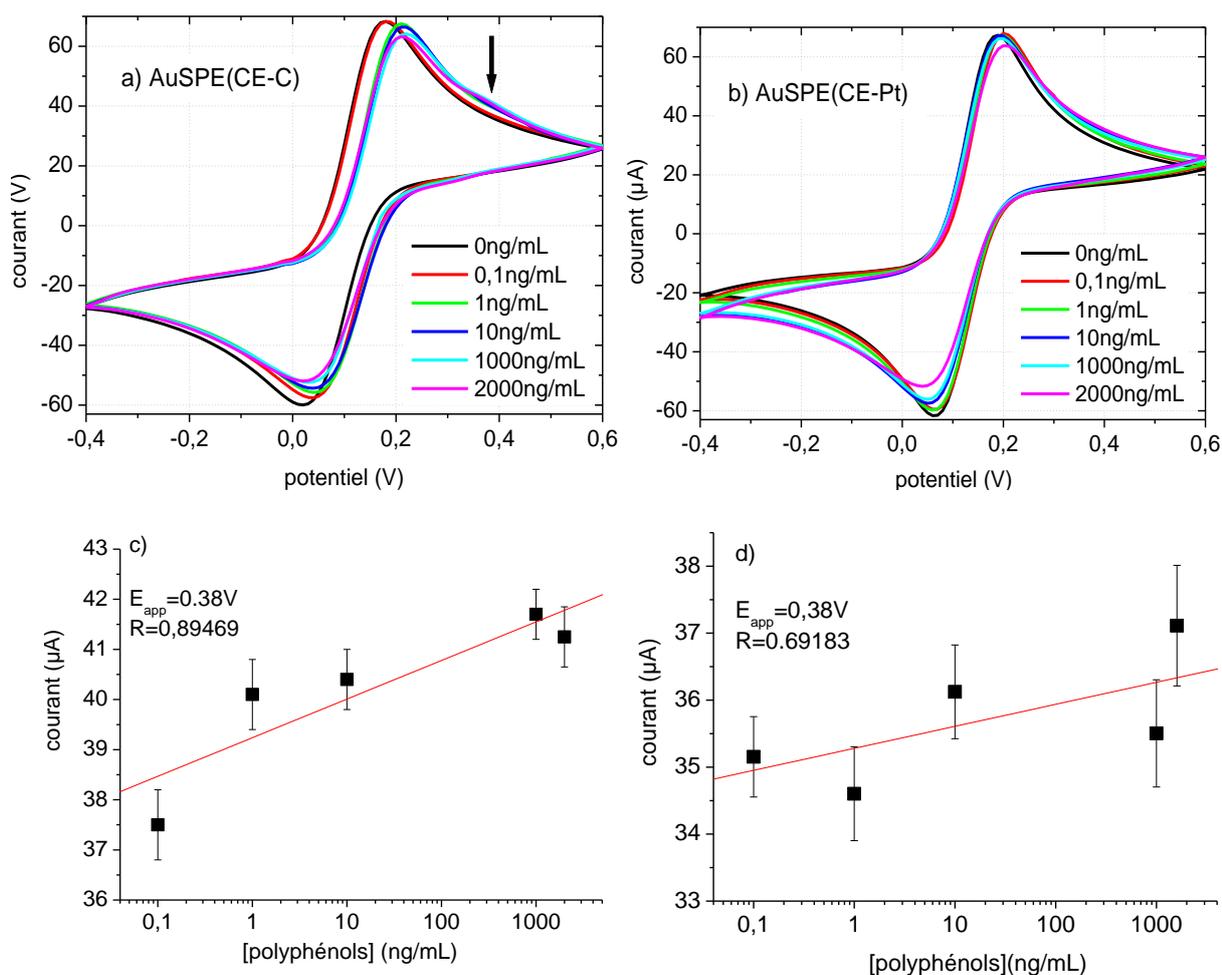


Figure IV. 9. Réponse voltampérométrique des électrodes AuSPE-CCE (a) et AuSPE-PtCE (b) aux ajouts successifs d'une solution de polyphénols à une concentration finale comprise entre 0.1 et 2000.0 ng.mL⁻¹ dans le PBS contenant le couple Fe(CN)₆^{3-/4-}; (c et d) Courbes de calibration, au potentiel appliqué E_a=0.38V. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.

On note cependant des modifications après les injections successives des polyphénols entre 0.1 ng/mL et 1000 ng/mL :

- La diminution (en valeur absolue) des intensités de ces pics : ceci est dû à la dilution de l'électrolyte support (Fe(CN)₆^{3-/4-}) par l'ajout de volumes successifs de la solution de polyphénols [J. Kafka et coll., 2013] ;
- L'augmentation de l'intensité du courant à E = 0.38 V avec l'apparition d'un épaulement dans le cas de AuSPE-CCE à partir d'une concentration en polyphénols de 50 ng.mL⁻¹.

Il a déjà été montré que la présence de phénols peut être détectée par leur oxydation chimique directe à la surface d'électrodes de platine, d'or ou de platine/or en milieu acide [P.I. Iotov et

coll., 1998]. Bien que les conditions expérimentales soient différentes, ici l'apparition du pic sur le voltammogramme de l'AuSPE-CCE peut être expliquée par le fait que ce système est sensible à la présence des polyphénols. Or, ce pic n'apparaît pas sur les voltammogrammes correspondants à l'AuSPE-PtCE lorsqu'on injecte les mêmes quantités de polyphénols. On peut alors conclure que ce phénomène est spécifique à une adsorption de polyphénols à la surface de la CE de carbone.

D'autre part, les courbes de calibration tracées à $E=0.38$ V pour les deux systèmes (Figures IV.9c et d) sont linéaires, caractérisées cependant par une très faible amplitude des variations de courant et des coefficients de corrélation médiocres. Ces résultats suggèrent que ce type de système est inapproprié à la détection et la quantification de polyphénols.

II.2.1.2. Comparaison entre les réponses des électrodes modifiées : AuSPE-CCE, AuSPE-CCE/CoAlSO₄, AuSPE-CCE/tyrosinase et AuSPE-CCE/CoAlSO₄/tyrosinase

Les électrodes AuSPE-CCE, AuSPE-CCE/CoAlSO₄, AuSPE-CCE/tyrosinase et AuSPE-CCE/CoAlSO₄/tyrosinase, préparées de la même façon que celle décrite précédemment ($C_{\text{HDL}}=0.75$ mg/mL et $C_{\text{tyrosinase}}=1.50$ mg/mL, Chapitre II-III), ont été immergées dans le PBS en présence du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Des injections successives de polyphénols à des concentrations finales comprises entre 0.01 ng.mL⁻¹ et 2000.00 ng.mL⁻¹ ont été effectuées. A partir des voltammogrammes correspondants (Figure IV.10), plusieurs observations peuvent être faites :

- Dans le cas de AuSPE-CCE nue, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la présence de polyphénols à une concentration inférieure à 50 ng.mL⁻¹ ne modifie pas significativement la réponse voltammétrique (l'augmentation de la concentration de polyphénols dans cette gamme ne diminue que légèrement les intensités des pics redox du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$). A une concentration supérieure, un second pic d'oxydation apparaît autour de 0.38 V, ce qui est probablement dû à l'adsorption des espèces phénoliques au niveau de la CE de carbone.
- La modification de la surface de AuSPE par le dépôt du film de HDL CoAlSO₄ entraîne une amplification du courant (comme on l'a vu précédemment dans le paragraphe I.2). Le pic à 0.38 V semble cependant moins prononcé, ce qui pourrait s'expliquer par un bon recouvrement de la surface de l'électrode par le film.
- L'adsorption de la tyrosinase seule sur l'AuSPE n'entraîne pas de modification

majeure des voltammogrammes. On peut supposer que la tyrosinase n'adhère pas (ou adhère peu) à la surface de l'électrode, n'en modifiant donc pas le comportement.

- Par contre, dans le cas où la fonctionnalisation de l'électrode est complètement finalisée (HDL + enzyme), on note une augmentation du courant à 0.38 V nettement plus importante que les précédentes, dès la première injection de polyphénols. Cela suggère un greffage efficace de la tyrosinase sur le film de HDL.

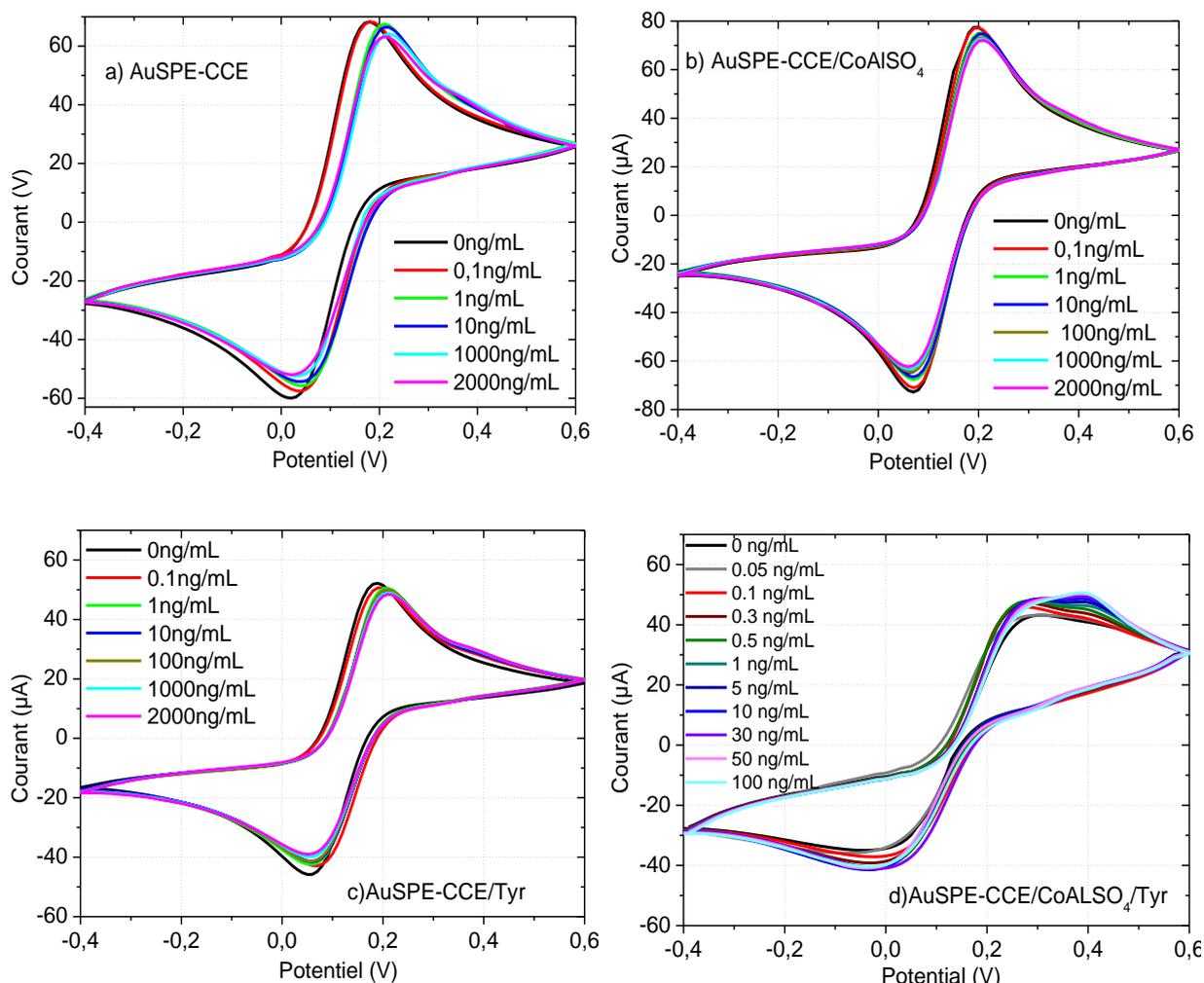


Figure IV. 10. Voltammogrammes cycliques de l'AuSPE-CCE (a), l'AuSPE-CCE /CoAlSO₄ (b), l'AuSPE-CCE/tyrosinase (c) et de l'AuSPE-CCE /CoAlSO₄/tyrosinase (d) obtenus après les ajouts de polyphénols à une concentration finale comprise entre 0.1 et 2000.0 ng.mL⁻¹ dans le PBS avec le couple rédox Fe(CN)₆^{3-/4-}.

La Figure IV.11a montre un zoom sur la plage de potentiel correspondant à ce pic d'oxydation et la courbe d'étalonnage correspondante à 0.38 V. La réponse ampérométrique est linéaire dans la gamme de concentrations 0.05-100.00 ng.mL⁻¹. La saturation de la réponse du biocapteur est atteinte à une concentration supérieure à 100.00 ng.mL⁻¹. Le courant I₀ initial

est estimé entre 42 à 51 μA pour les différentes électrodes réalisées. La pente est calculée à $2.60 \mu\text{A}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ avec un coefficient de corrélation de 0.996. La limite de détection (LOD) est calculée à $8.21 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ selon la méthode de la déviation standard et la pente (*Standard Deviation of blank response and slope method*), méthodes décrites précédemment [S. Chandran et coll., 2007].

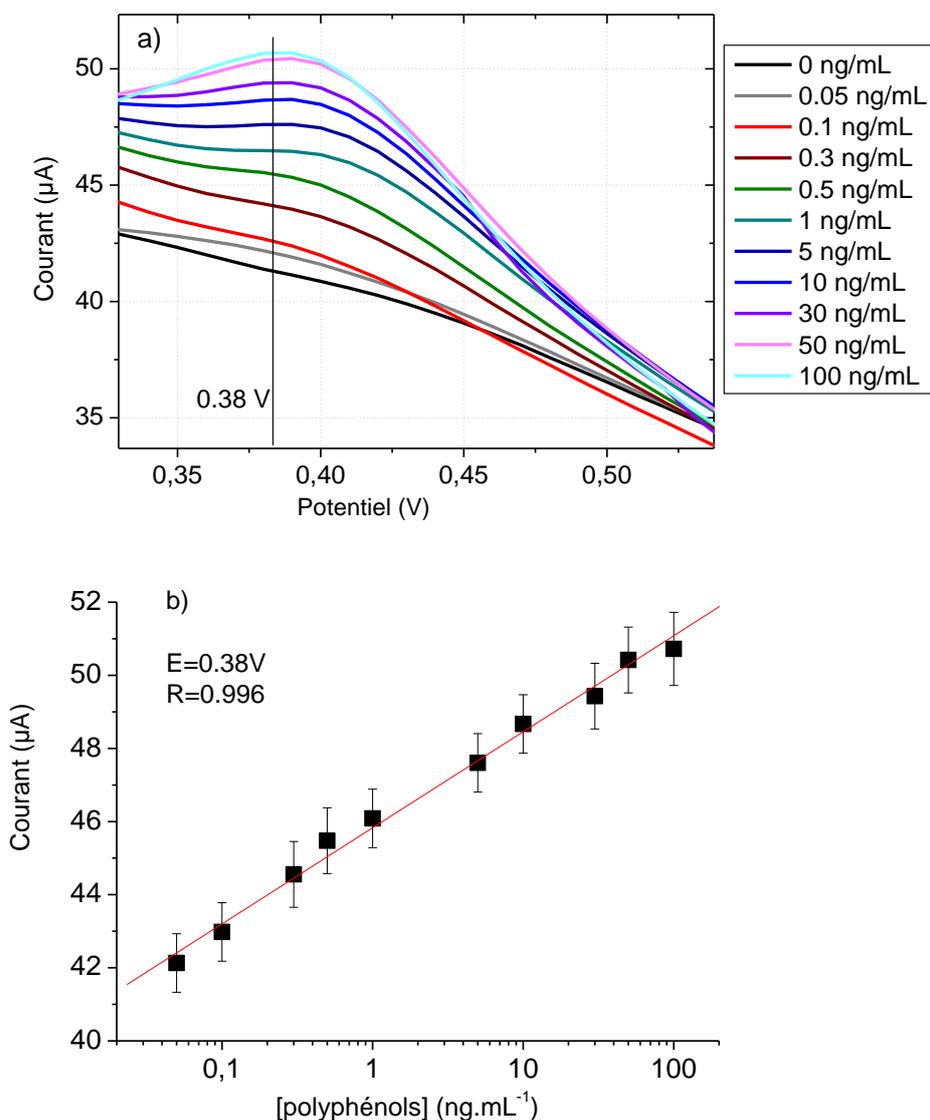


Figure IV. 11. (a) Zoom sur le pic d'oxydation à 0.38 V correspondant au biocapteur AuSPE-CCE/CoAlSO₄/tyrosinase ; (b) courbe de calibration à température ambiante, l'électrolyte étant le PBS (10 mM, pH=7.4) avec le couple rédox Fe(CN)₆^{3-/4-}. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.

II.2.1.3. Discussion

La comparaison entre les comportements des électrodes différemment fonctionnalisées conduit aux conclusions suivantes :

- Dans le cas des deux systèmes AuSPE-CCE et AuSPE-PtCE, l'oxydation des polyphénols est observée grâce à l'apparition d'un épaulement ou une augmentation faible du courant centrée à 0.38 V, un peu plus importante dans le cas de l'AuSPE-CCE. Pour cette dernière, la saturation du signal est obtenue pour des concentrations supérieures à 50 ng.mL⁻¹. La largeur de ce pic est probablement due au fait que les polyphénols ne sont pas purifiés et constituent un mélange complexe [C. Astill et coll., 2001; Y.S.Lin et coll., 2003, M. Friedman et coll., 2006], chaque dérivé ayant son propre potentiel. La saturation, elle, est probablement en relation avec le fait que les polyphénols ont la capacité de polluer la surface de l'électrode en formant un film isolant lors de leur oxydation [J. Wang et coll., 1998 ; P.I.Iotov et coll., 1998].

- De même, la présence du film de CoAlSO₄ semble avoir non seulement un effet amplificateur du courant mais aussi un effet protecteur vis-à-vis de l'électrode, étant donné que l'amplitude des variations de courant au potentiel de 0.38 V est limitée. Les résultats montrent par ailleurs que la présence de ce film est nécessaire à une adsorption efficace de la tyrosinase, cette dernière adhérant sans doute peu à la surface nue de l'électrode.

- Dans le cas de l'AuSPE-CCE/ CoAlSO₄/ tyrosinase, après l'immobilisation de la tyrosinase sur le film de HDL, le courant diminue et le ΔE_p augmente. La tyrosinase rend la surface de l'électrode plus isolante, comme déjà mentionné [R.Han et coll., 2012].

- En présence du couple $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, le biocapteur ne détecte les polyphénols que dans une gamme limitée comprise entre 0 et 100 ng.mL⁻¹.

- En outre, il a été rapporté que les o-quinones provenant de l'oxydation des phénols (à 0.20 V) sont réduits par voie électrochimique à un potentiel de -0.20 V, cette réduction étant la base de la détection des polyphénols dans certains biocapteurs [D.Shan, 2004; M. S. P. Lopez et coll., 2010; R.Han et coll., 2012]. Une telle réduction est masquée et le potentiel d'oxydation est déplacé dans le cas de la présence du couple $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, probablement à cause de la rapidité des réactions d'oxydoréduction de ce couple fort. Afin de surmonter ce problème et de visualiser les deux réactions d'oxydoréduction des polyphénols, nous avons choisi de travailler en utilisant le tampon physiologique « PBS » sans le couple $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, ce milieu étant compatible avec le fonctionnement de la tyrosinase.

II.2.2. Détection des polyphénols dans le PBS

II.2.2.1. Détection des polyphénols par le biocapteur « AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase »

II.2.2.1.1. Détection par voltammétrie cyclique

Dans un premier temps, les tests ont été réalisés dans du PBS sans couple redox et les voltammogrammes correspondants ont été enregistrés dans une gamme de potentiel de [-0.9V ; 0.5V] à une vitesse de balayage de 50 mV/s et à température ambiante.

Les courbes obtenues (Figure IV.12) mettent en évidence un pic d'oxydation à un potentiel de 0.13 V, et deux pics de réduction à des potentiels de -0.25 V et -0.59 V, respectivement. Ces valeurs sont en accord avec les potentiels d'oxydation et de réduction de polyphénols déjà rapportées dans la littérature [G. Wang et coll., 2002 ; D. Shan et coll., 2004 ; B. X. Gu, et coll., 2008 ; M. S. P. Lopez et coll., 2010 ; I.M. Apetrei et coll., 2013, S. Lupu et coll., 2013]. Les injections successives de polyphénols entraînent une augmentation du courant de réduction (négatif) et une diminution du courant d'oxydation (positif). Les courants de saturation sont atteints pour des concentrations supérieures à 1000 ng.mL⁻¹.

Ces variations sont plus accentuées aux valeurs de potentiel de -0.25 V et +0.20 V. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié plus finement ces deux zones qui permettent d'avoir la meilleure sensibilité de détection du biocapteur (Figure IV.12 (b et c)). Les courbes de calibration correspondantes sont représentées dans la Figure IV.12 (d et e). La variation du courant δI est calculée selon la formule $\delta I = I_m - I_0$ où I_m est la valeur de courant mesurée à une concentration en polyphénols donnée et I_0 est celle mesurée en absence de polyphénols.

En tenant compte des signes des deux courants, on obtient

- une valeur δI positive dans le cas du courant mesuré à -0.25 V ;
- une valeur δI négative dans le cas du courant mesuré à +0.20 V.

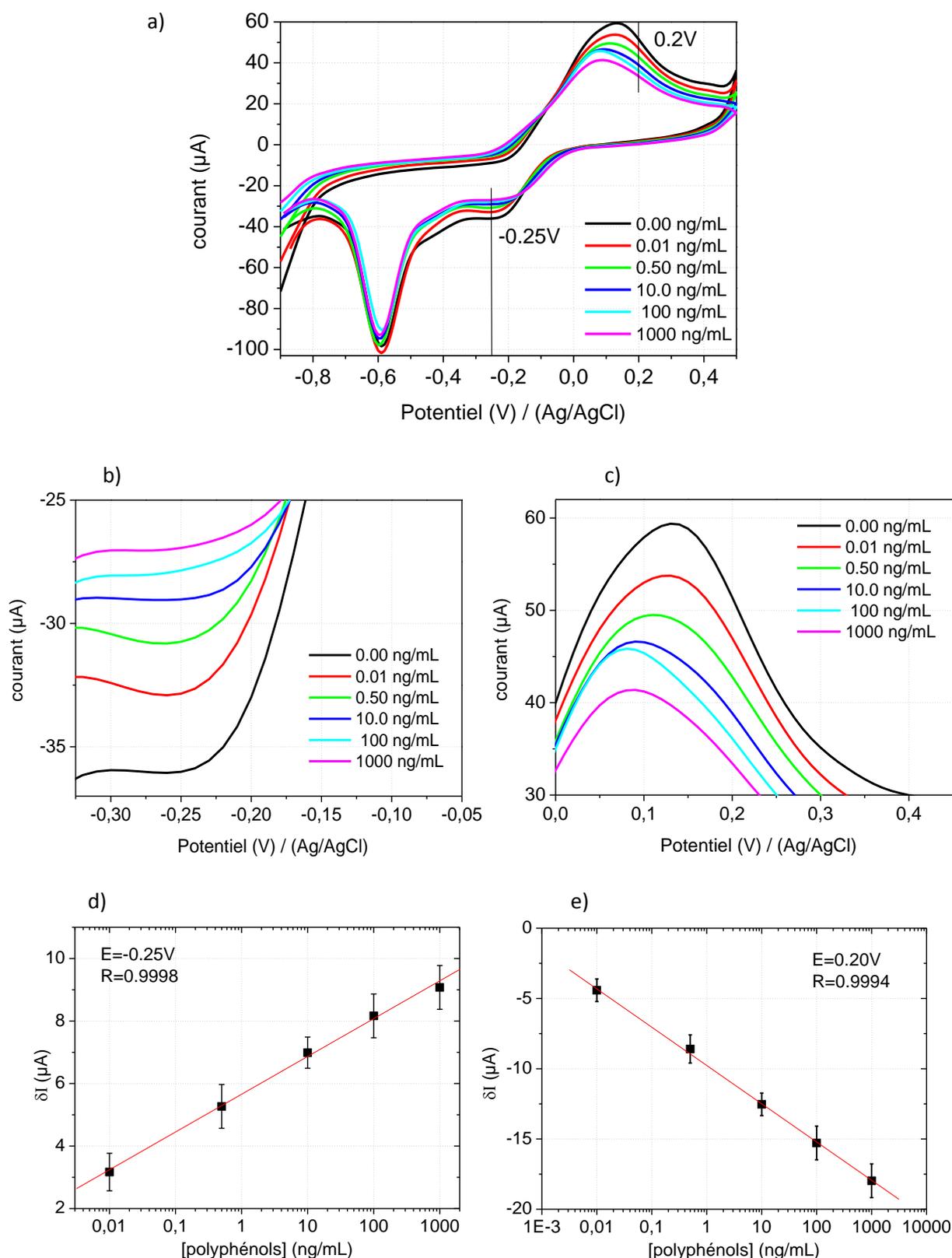


Figure IV. 12. a) Réponse voltampérométrique du biocapteur « AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase » aux ajouts successifs de polyphénols pour une concentration finale comprise entre 0.01 et 1000.00 ng.mL⁻¹ dans le PBS ; b) et c) zooms sur les pics de réduction à -0.25 V et d'oxydation à +0.20 V ; e) et f) courbes de calibration correspondantes.

Ces courbes de calibration sont linéaires dans une large gamme de concentration en polyphénols qui s'étale de 0 à 1000 ng.mL⁻¹. Le Tableau IV.3 résume les valeurs importantes associées à ces deux droites de calibration.

	E= -0.25 V	E= +0.20 V
 δI_{\max} (μA)	9.07	18.00
Sensibilité (μA/ng.mL⁻¹)	1.20	2.74
Facteur de corrélation R	0.99	0.99
Limite de détection LOD (pg.mL⁻¹)	0.02	0.30

Tableau IV. 3. Performances du biocapteur « AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase »

Les barres d'erreur reportées sur les droites de calibration correspondent aux résultats obtenus sur 16-18 mesures séparées dans le temps.

Pour tester la reproductibilité et la stabilité de la réponse du biocapteur, nous avons procédé à des tests de répétabilité sur 2 électrodes pendant un mois de la manière suivante :

- un test par jour pendant 3 jours consécutifs ;
- un test tout les 5 jours pendant 25 à 30 jours ;

soit un total de 8 à 9 mesures par électrode.

A chaque fois, les injections successives de polyphénols ont été effectuées dans la gamme de concentration mentionnée ci-dessus, les électrodes étant conservées soit dans l'eau, soit dans le PBS à 4°C entre deux mesures. La Figure IV.13 montre l'évolution de la pente de la droite de calibration obtenue au potentiel de 0.20 V au cours du temps, selon que le capteur est conservé dans l'eau ou le PBS.

Dans le PBS, le biocapteur conserve ~90% de sa réponse initiale au bout de 20 jours, la sensibilité diminuant jusqu'à ~58% de la valeur initiale après 1 mois de stockage. Le stockage dans l'eau cause, lui, une perte de 64% au bout de 10 jours. On peut conclure que la tyrosinase reste active et plus stable plus longtemps dans le PBS. Ce résultat était prévisible compte tenu des conditions générales de stabilité (pH, force ionique..) d'une protéine en général, et de la tyrosinase en particulier. Selon le fournisseur de la tyrosinase (Sigma Aldrich), le pH optimum de fonctionnement de cette enzyme est de l'ordre de 6 à 7. Cette gamme de pH est par ailleurs en accord avec des mesures effectuées dans le cadre d'autres

études portant sur l'élaboration de biocapteurs reposant sur la tyrosinase [D. Shan et coll., 2003 ; M. Cortina-Puig et coll., 2010]. Bien que l'eau ultrapure ait un pH de l'ordre de 6, elle est sans doute moins stable en termes de pH qu'un milieu tamponné comme le PBS. De plus ce dernier a une force ionique biocompatible avec l'enzyme immobilisée.

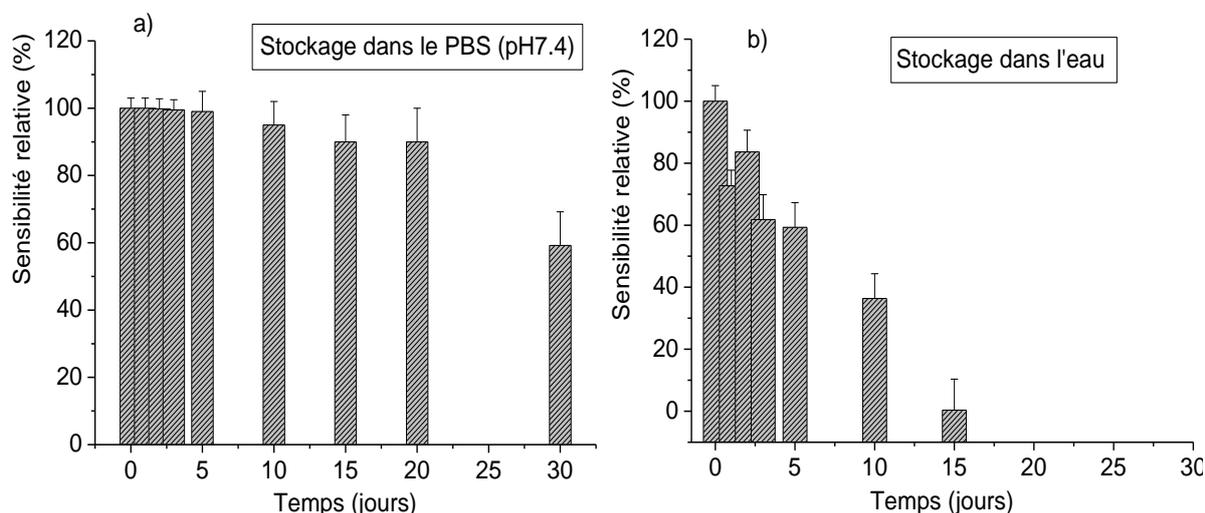


Figure IV. 13. Étude de la durée de vie du biocapteur « AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase » et effet des conditions de stockage : a) dans le PBS, b) dans l'eau. Les sensibilités correspondent à un potentiel appliqué $E = 0.20 \text{ V}$.

II.2.2.1.2. Détection par chronoampérométrie

La chronoampérométrie, technique complémentaire de celle utilisée précédemment, a également été appliquée pour caractériser le biocapteur. La Figure IV.14a montre l'évolution du courant de réduction mesuré au cours du temps à un potentiel de -0.25 V suite à des injections successives de polyphénols. Chaque injection entraîne une augmentation du courant (en accord avec la voltammétrie cyclique), le courant se stabilisant en quelques minutes. La Figure IV.14b montre la courbe de calibration obtenue en traçant la variation $\delta I = I_m - I_0$ (même notation que précédemment, I_m étant mesurée à saturation du signal) en fonction de la concentration en polyphénols. Les barres d'erreur sur la droite de calibration correspondent aux résultats obtenus sur 16-18 mesures séparées dans le temps.

Cette courbe de calibration nous permet d'accéder à la sensibilité et à la limite de détection du biocapteur estimées à $1.6 \mu\text{A}/(\text{ng}/\text{mL})$ et $0.1 \text{ pg}/\text{mL}$, respectivement. On retrouve donc le même ordre de grandeur pour ces deux paramètres avec les deux méthodes.

De plus, nous avons étudié la diffusion des espèces électroactives réduites en solution. Pour cela, nous avons tracé la courbe $a/I^2=f(t)$ à une concentration donnée du polyphénol, a étant une constante dont l'expression s'écrit sous la forme $a = (nFS)^2/\pi$, où :

- n est le nombre d'électrons échangés pour la réduction d'une mole d'oxydant (les *o-quinones* captent $2e^-$ pour se réduire en dérivés de catéchols) ;
- F est la constante de Faraday ($F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$) ;
- S est la surface de l'électrode ($S=12.6 \text{ mm}^2$).

Pour notre système électrochimique, la valeur calculée de la constante a est égale à $1.88 \times 10^6 \text{ C}^2.\text{mol}^{-2}.\text{m}^4$.

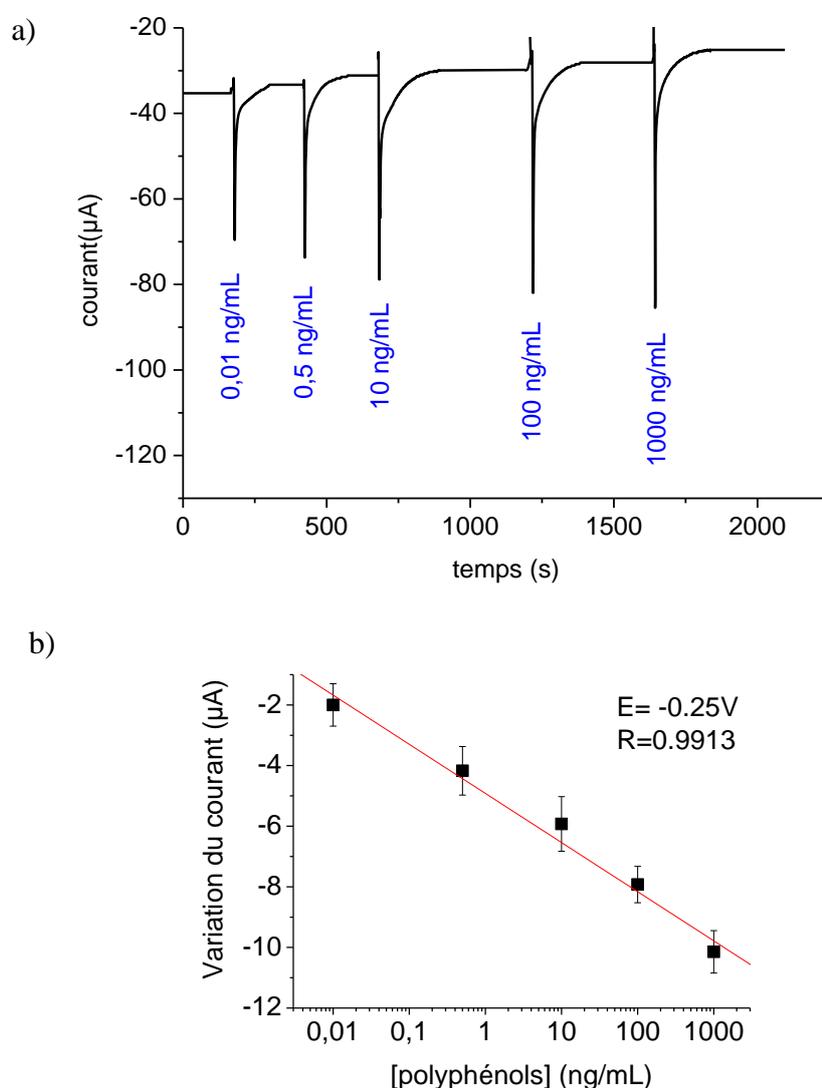


Figure IV. 14. a) Réponse chronoampérométrique (à -0.25V) du système AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase aux ajouts successifs de polyphénols à des concentrations variant de 0.01 ng.mL⁻¹ à 2000 ng.mL⁻¹ dans le PBS ; b) Courbe d'étalonnage.

A titre d'exemple, nous présentons les résultats à une concentration en polyphénols de 0.5 ng/ml sur la Figure IV.15. Au temps courts, la courbe obtenue est assimilable à une droite de coefficient directeur $\alpha_c = \frac{1}{[\text{polyphénols}]^2 \cdot D}$ où D représente le coefficient de diffusion de l'espèce réduite (voir Chapitre.2 : IV.2.)

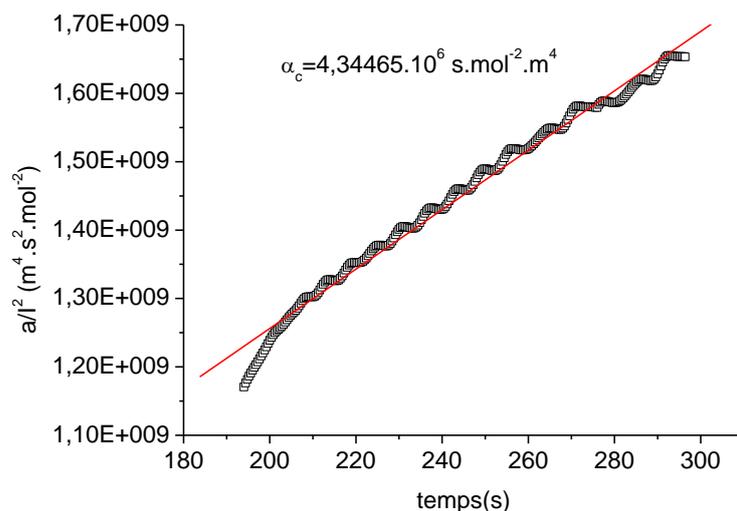


Figure IV. 15. Variation de l'inverse du carré du courant en fonction du temps après injection de 0.5 ng/mL de polyphénols.

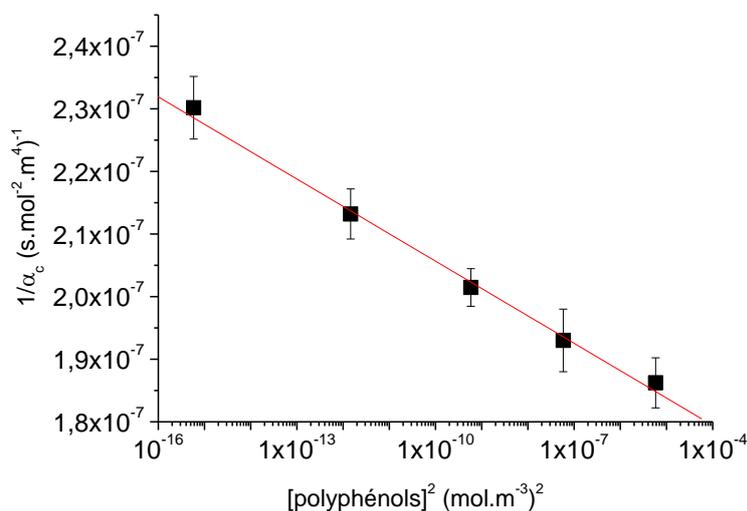


Figure IV. 16. Graphe de $\frac{1}{\alpha_c} = f([\text{polyphénols}]^2)$ dans le cas du biocapteur AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.

Pour plus de précision nous avons estimé la valeur de α_c pour différentes valeurs de la concentration en polyphénols et représenté graphiquement $1/\alpha_c$ en fonction de $[\text{polyphénols}]^2$ (Figure IV.16). La droite obtenue (vérifiant donc bien la loi de Cottrelle) permet d'estimer la valeur moyenne du coefficient de diffusion D des espèces réduites, pente de la droite.

Le calcul donne une valeur de D de $4.43 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ avec un coefficient de corrélation de la régression linéaire de 0.998. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans la littérature bien qu'elle soit légèrement plus grande ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour le catéchols) [L. Coche-Guerente, 2001]. Cela suggère que les espèces phénoliques réduites dans la solution diffusent plus facilement dans notre film hybride HDL/tyrosinase.

II.2.2.1.3. Détermination de la constante apparente de Michaelis-Menten

Une manière de caractériser la réaction catalytique de la tyrosinase greffée sur la surface du capteur consiste à estimer la constante de Michaelis-Menten K_m , à partir de la représentation graphique de "Lineweaver-Burk" (Chapitre 1 : éq I.6).

Dans notre cas, l'équation s'écrit :

$$\frac{1}{I} = \left(\frac{K_m}{I_{max}} \right) \left(\frac{1}{[\text{polyphénols}]} \right) + \frac{1}{I_{max}}$$

Au potentiel appliqué de -0.25 V, la représentation graphique de l'inverse du courant en fonction de l'inverse de la concentration en polyphénols est une droite dont l'ajustement linéaire permet de calculer la constante apparente de Michaelis-Menten K_m et le courant maximal I_{max} (Figure IV.17). On obtient les valeurs suivantes :

- $K_m = 35.0 \mu\text{M}$
- $I_{max} = -26.3 \mu\text{A}$

La valeur de K_m obtenue est compatible avec la plupart des valeurs rapportées dans le cas de la tyrosinase immobilisée à la surface d'un biocapteur. En effet, ces valeurs sont de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de μM , variant selon la nature du capteur et la nature de la molécule détectée [H. Xue et coll., 2002 ; E. Dempsey et coll., 2004 ; D. Shan et coll., 2004 ; J. Abdullah et coll., 2006 ; E. Han et coll., 2007 ; S. Tembe et coll., 2007 ; S. Wang et coll., 2008 ; M.S.P. Lopez et coll., 2010 ; I.M. Apetrei et coll., 2013 ; I.M. Apetrei et coll., 2015]. Des valeurs exceptionnellement faibles du K_m (0.65 - 1.44 μM) ont cependant été

rapportées dans le cas d'un biocapteur utilisant un composite de type nanofibre de carbone [J. Zhang et coll., 2009].

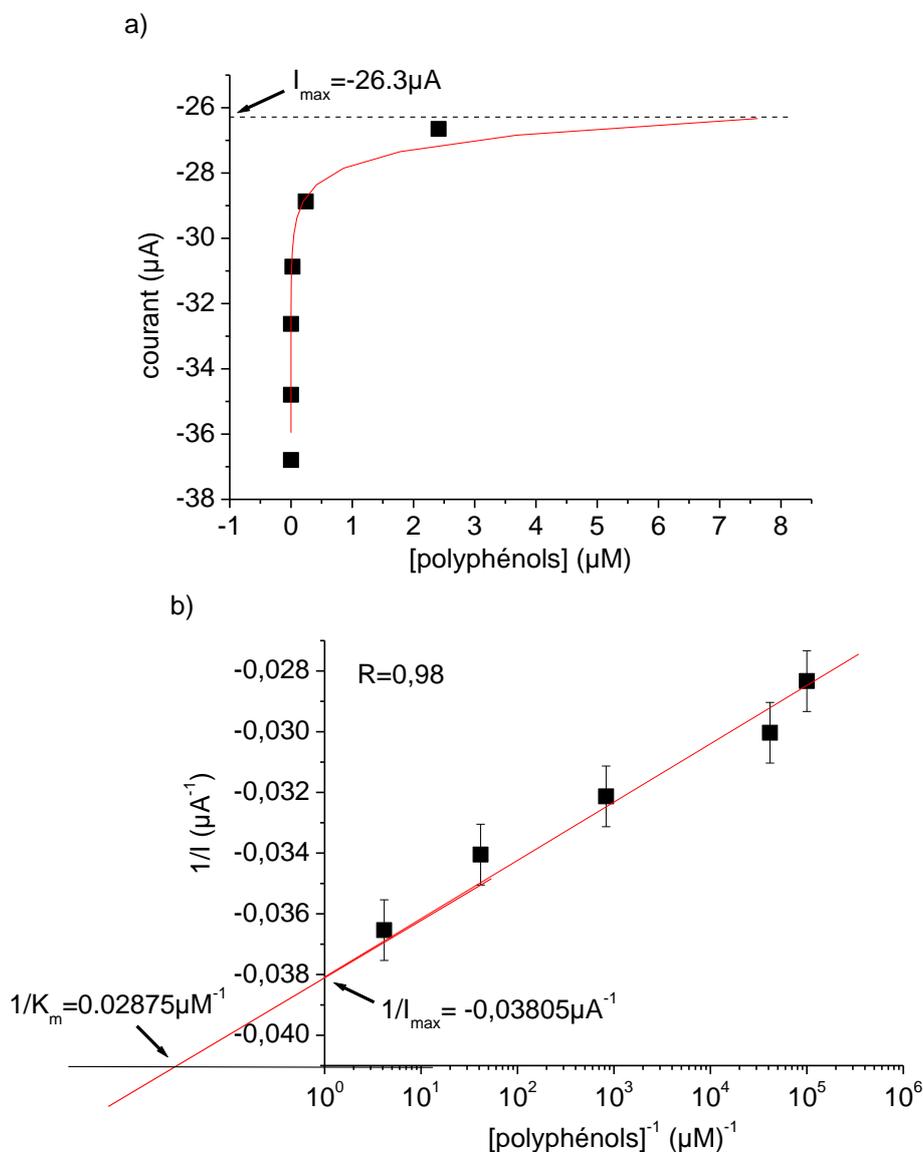


Figure IV. 17. a) Graphe de $I=f([\text{polyphénols}])$, b) représentation de Lineweaver et Burk de la réaction de dégradation des polyphénols par l'enzyme immobilisée sur le biocapteur AuSPE/CoAlSO₄. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.

Dans l'ensemble les valeurs de K_m de la tyrosinase immobilisée sont inférieures ou du même ordre de grandeur que la valeur estimée pour l'enzyme libre en solution, de l'ordre de 300 μM dans le cas des cathécols [C. Mousty et coll., 2007]. Des valeurs de l'ordre de 444 à 760 μM ont également été rapportées [S. Halaouli et coll, 2006]. Une diminution de la valeur de cette constante indique une meilleure sensibilité de l'enzyme pour son substrat (l'activité maximale de l'enzyme étant atteinte à une concentration en substrat plus faible). Cependant dans le cas

des biocapteurs, une explication plus plausible repose sur une concentration locale en substrat plus élevée au niveau de la surface active par rapport à la solution [M.S.P. Loper et coll., 2010].

II.2.2.2. Détection des polyphénols par le biocapteur « AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase »

II.2.2.2.1. Détection par voltammétrie cyclique

Les voltammogrammes obtenus (Figure IV.18) sont de même type que les précédents bien que les intensités de courant sont moins importantes. L'amplitude des variations du courant par rapport au signal de référence (I_0 , mesuré en absence de polyphénols) augmente en fonction de la concentration en polyphénols, la saturation étant atteinte à partir de la même valeur de 1000 ng.mL⁻¹.

Comme précédemment, nous nous sommes focalisés sur les pics d'oxydoréduction des polyphénols, en analysant la variation de courant ($I_m - I_0$) aux potentiels de -0.20V et +0.20 V (Figures IV.18b et c), valeurs pour lesquelles le paramètre ($I_m - I_0$) varie avec le plus d'amplitude et de manière régulière avec la concentration en polyphénols. Comme dans le cas du biocapteur précédent (AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase), on observe des courbes de calibration ($I_m - I_0$) = f ([polyphénols]) linéaires dans la gamme de concentration 0-1000 ng/mL (Figures IV.18d et e). Les barres d'erreur sont estimées à partir des courbes expérimentales mesurées pour 4 électrodes différentes. Le Tableau IV.4 résume les valeurs importantes associées à ces deux droites de calibration.

	E= -0.20 V	E= +0.20 V
δI_{\max} (μA)	3.9	4.6
Sensibilité ($\mu A/ng.mL^{-1}$)	0.42	1.02
Facteur de corrélation R	0.98	0.99
Limite de détection LOD ($pg.mL^{-1}$)	6.58	0.20

Tableau IV. 4. Performances du biocapteur AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase.

L'étude de la durée de vie du biocapteur dans le PBS montre que 90% de la sensibilité initiale (mesurée à 0.20 V) sont maintenus pendant une durée de 15 jours. La sensibilité est ensuite réduite de 20% après 20 jours et de 60% après un mois (Figure IV.19).

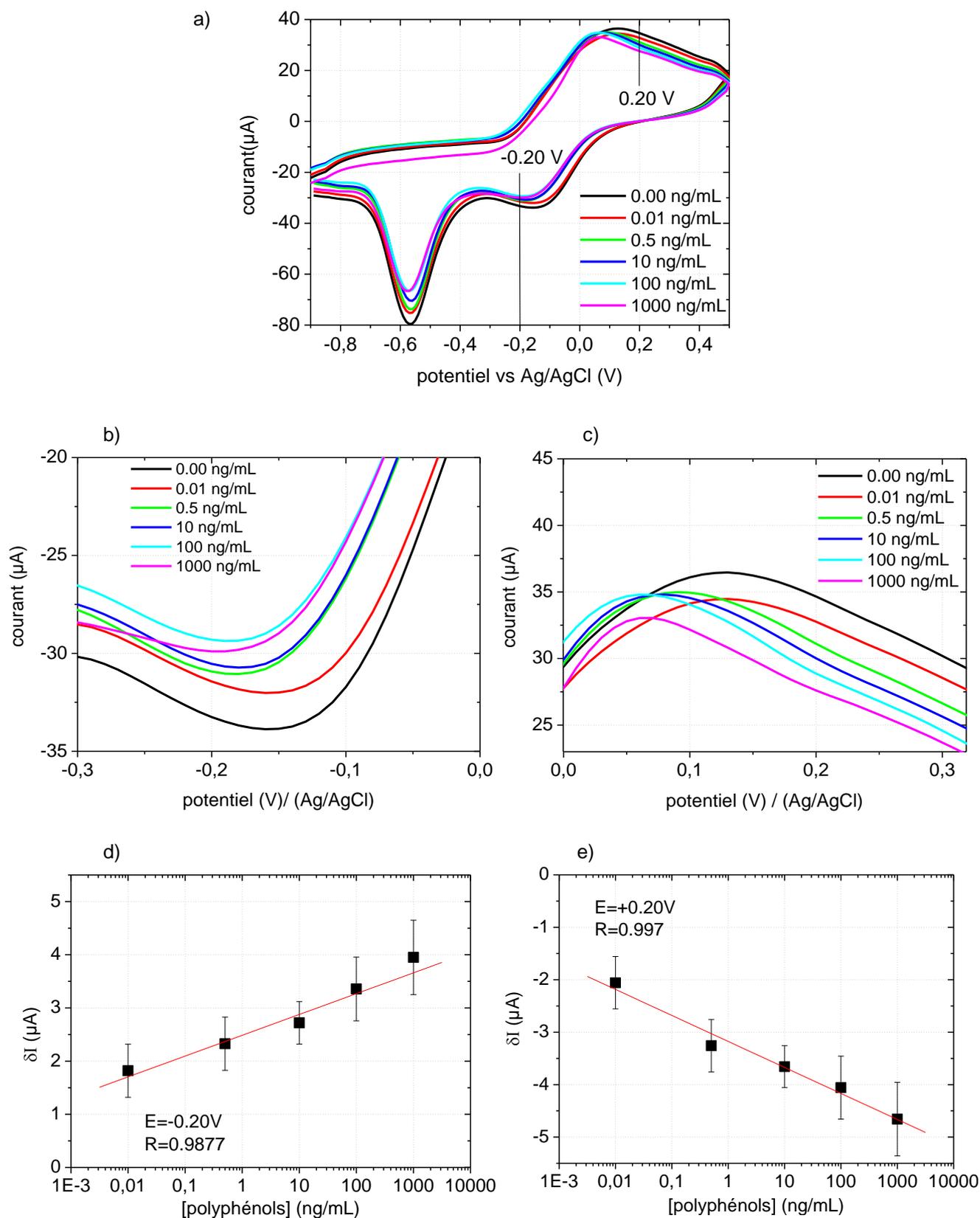


Figure IV. 18. a) Réponse voltampérométrique du biocapteur AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase aux ajouts successifs de polyphénols comprise entre 0.01 et 1000.00 ng.mL⁻¹ dans le PBS ; b) et c) zooms sur les pics de réduction à -0.20 V et d'oxydation à +0.20 V ; e) et f) courbes de calibration correspondantes.

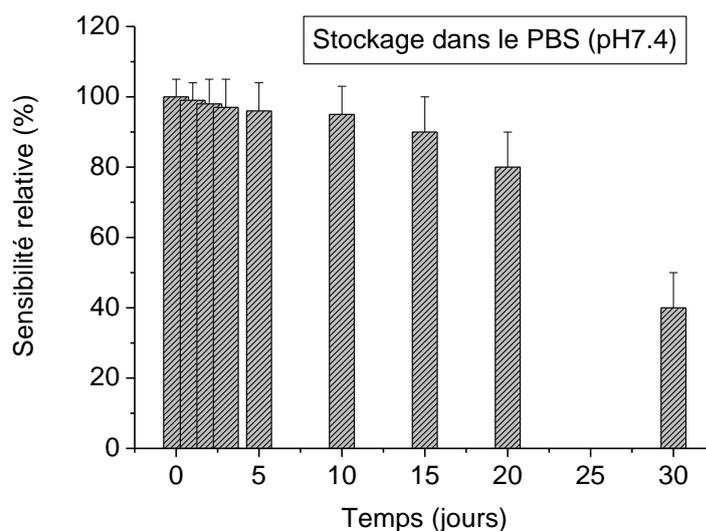


Figure IV. 19. Étude de la durée de vie du biocapteur « AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase » dans le PBS. Les sensibilités correspondent à un potentiel appliqué $E = 0.20$ V.

II.2.2.2.2. Détection par chronoampérométrie

La Figure IV.20a représente la réponse ampérométrique typique $I(t)$ (à un potentiel appliqué $E = -0.20$ V) du biocapteur AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase en fonction du temps pour différentes injections successives de polyphénols dans le PBS (10 mM à pH 7.4) à des concentrations finales comprises entre 0.01 et 1000.00 ng.mL⁻¹.

En accord avec les expériences précédentes, le courant de réduction augmente après chaque ajout de polyphénols. La Figure IV.20b représente la courbe de calibration obtenue en reportant la variation de courant $\delta I = I_m - I_0$ (I_m étant mesurée à saturation) en fonction de la concentration en polyphénols. Les barres d'erreur sur la droite de calibration correspondent aux résultats obtenus sur 15 mesures séparées dans le temps.

L'analyse de la courbe de calibration permet d'estimer la sensibilité à 0.34 $\mu\text{A}/\text{ng.mL}^{-1}$ et la limite de détection LOD à 11 pg/mL. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles trouvées dans l'étude de la réponse du biocapteur par voltamétrie cyclique.

De même, pour chaque concentration en polyphénols, la courbe de $I=f(t)$ (Figure IV.17a) peut être assimilée à une droite au voisinage du saut induit par l'injection.

Les coefficients directeurs ($\alpha_c = \frac{1}{[\text{polyphénols}]^2 \cdot D}$) de chaque droite ont été calculés comme précédemment dans le cas du biocapteur AuSPE/CoAlSO₄/tyrosinase afin de trouver le coefficient de diffusion de l'espèce réduite en solution.

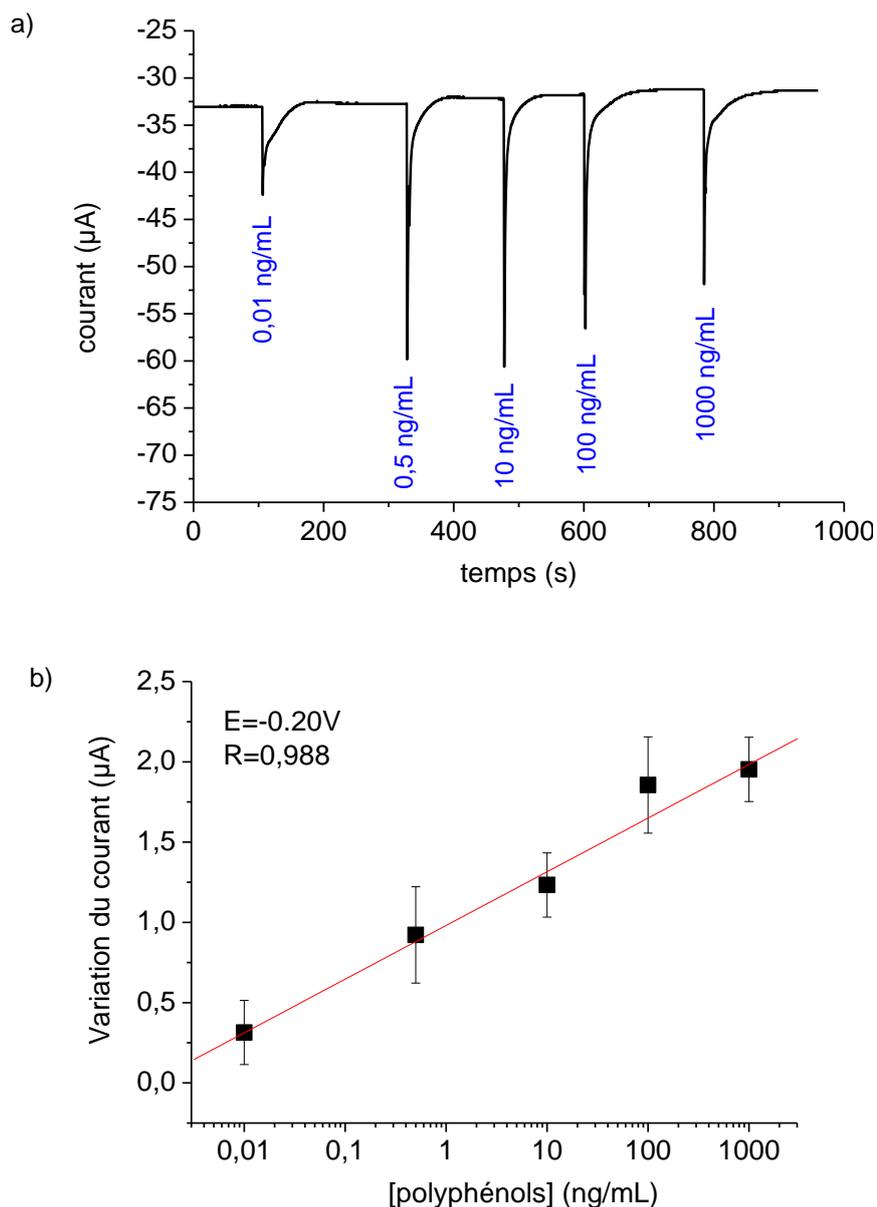


Figure IV. 20. a) Réponse chronoampérométrique (à $E = -0.20V$) du capteur $AuSPE/NiAlSO_4/tyrosinase$ suite aux ajouts successifs de polyphénols à des concentrations entre $[0.01-1000 \text{ ng/mL}]$ dans le PBS. b) Courbe d'étalonnage.

La représentation graphique $\frac{1}{a_c} = f\left(\frac{1}{[\text{polyphénols}]^2}\right)$ est une droite (Figure IV.21, $R=0.96$). Le coefficient de diffusion D des espèces réduites est estimé à $D=3.8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est légèrement inférieure à celle du biocapteur $AuSPE/NiAlSO_4/tyrosinase$ ce qui révèle que la membrane hybride $CoAlSO_4/tyrosinase$ est un plus perméable favorisant le transfert de charge à la surface de l'électrode.

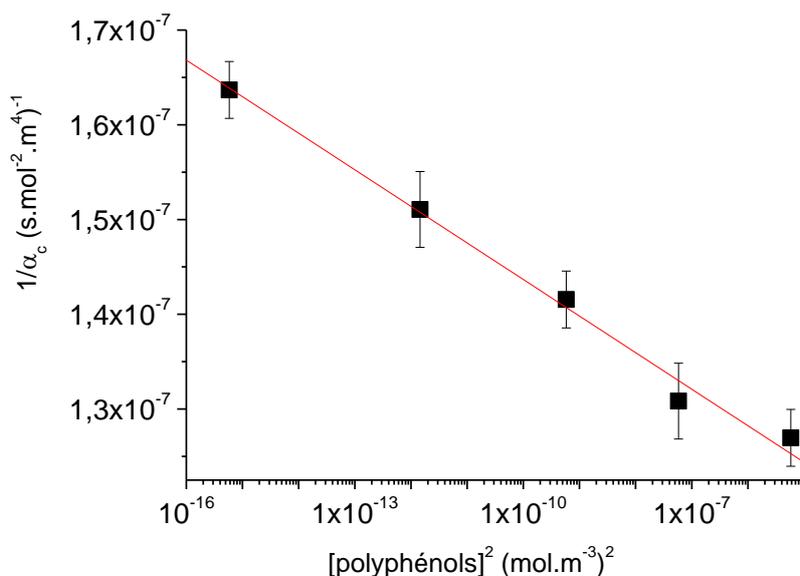
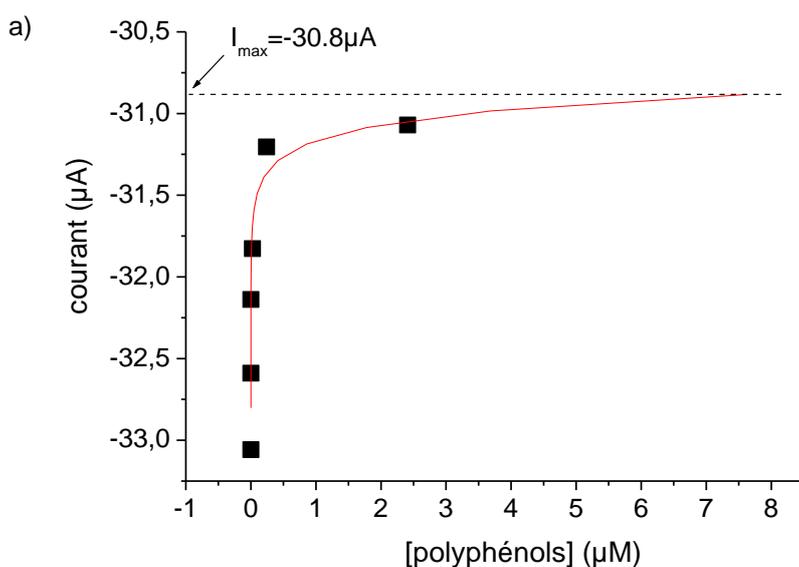


Figure IV. 21. Graphe de $\frac{1}{\alpha_c} = f([\text{polyphénols}]^2)$ dans le cas du capteur AuSPE/NiAlSO₄/tyrosinase. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.

II.2.2.2.3. Détermination de la constant apparente de Michaelis-Menten

Comme précédemment, nous avons utilisé la présentation graphique de Lineweaver et Burk (Figure IV.22) pour déterminer la valeur de K_m apparente de la tyrosinase à la surface du capteur. Cette constante est de l'ordre de 21 μM , donc du même ordre de grandeur que dans le cas précédent mais légèrement inférieure.



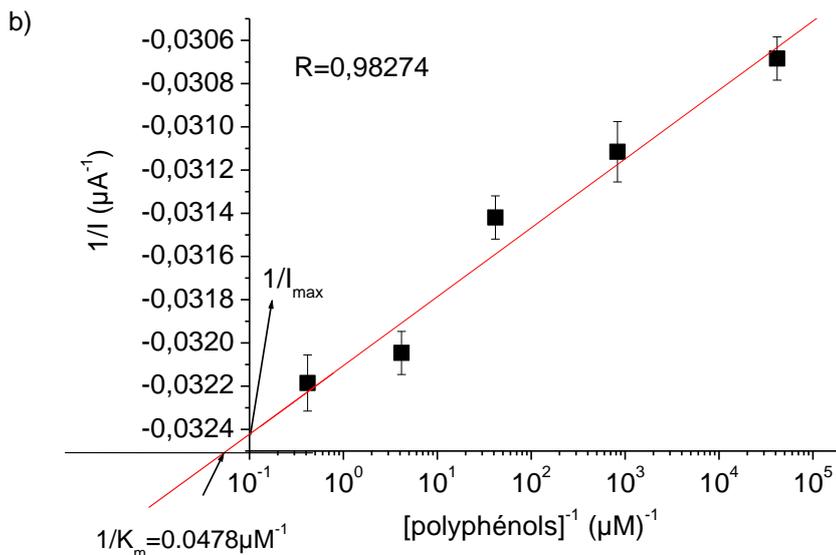


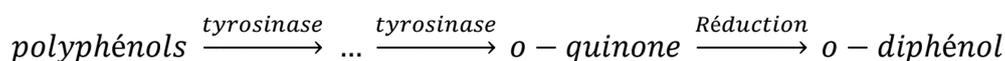
Figure IV. 22. a) Graphe de $I=f([polyphénols])$, b) représentation de Lineweaver et Burk de la réaction de dégradation des polyphénols par l'enzyme immobilisée sur le biocapteur AuSPE/NiAlSO₄. Les barres d'erreurs sont déterminées à partir de cinq mesures.

II.2.2.3. Discussion

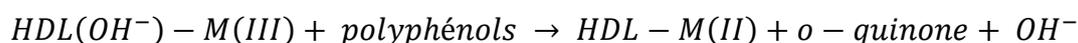
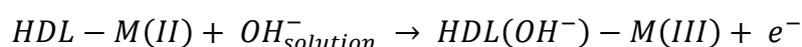
Le mécanisme des biocapteurs de polyphénols à base de la tyrosinase [S. Andreescu et coll.2004; J. Han, 2011, D. Tonelli, 2013, IM Apetrei et coll., 2015] se décompose en trois étapes:

- premièrement les polyphénols sont enzymatiquement oxydés en o-diphénols;
- ensuite, ces composés sont oxydés par la tyrosinase en o-quinones ;
- enfin, les o-quinones sont électrochimiquement réduites au niveau de la surface active (produit de la réaction).

Ce mécanisme peut être schématisé comme suit :



Les HDLs participent également à la réaction d'oxydoréduction comme on l'a décrit précédemment :



Le schéma présenté dans la Figure IV.23 résume ces réactions.

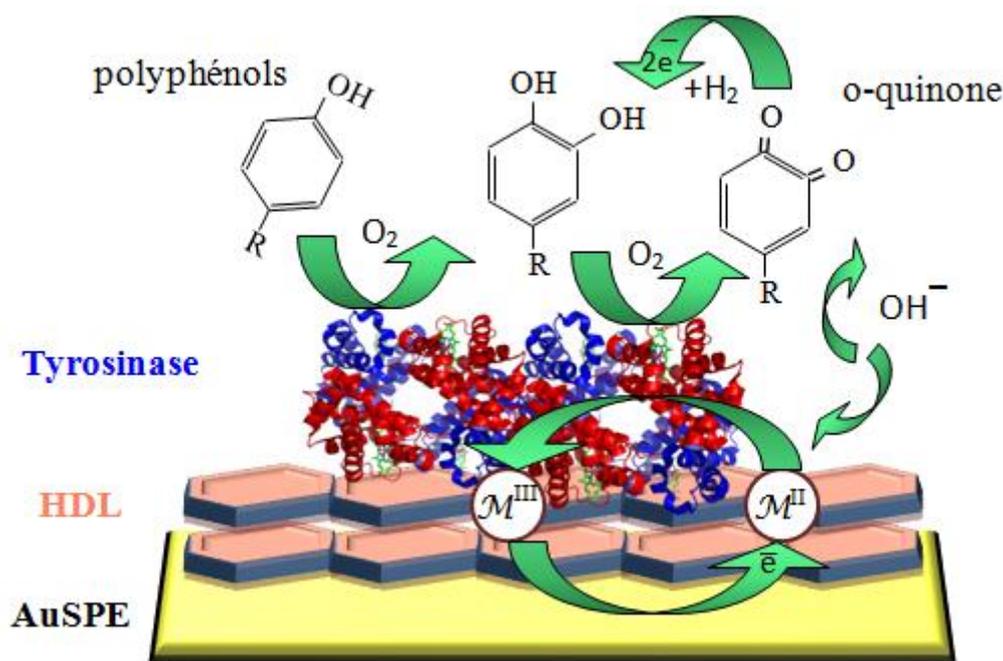


Figure IV. 23. Schéma du rôle des cations métalliques divalents des HDLs (Co ou Ni) dans le fonctionnement du biocapteur.

Dans la littérature, la plupart des biocapteurs qui utilisent la tyrosinase pour détecter les polyphénols reposent sur l'analyse des variations du courant correspondant au pic de réduction, cette solution étant généralement préférée car elle permet d'éviter les interférences [S. Andreescu et coll.2004 ; I. M. Apetrei et coll., 2015]. Cependant, l'utilisation du signal d'oxydation dû aux produits oxydés par la tyrosinase reste une deuxième solution valable pour l'analyse de la détection. Dans notre cas, la présence du pic de réduction dans les voltammogrammes obtenus confirme d'abord que le mode opératoire utilisé pour immobiliser la tyrosinase respecte la conformation et l'activité enzymatique. De plus, nos résultats montrent que ces biocapteurs basés sur une transduction assurée par les matériaux hybrides HDL/tyrosinase permettent de détecter la présence de polyphénols suivant deux signaux différents en même temps, celui de la réduction (à -0.25 V pour $CoAlSO_4$ /tyrosinase et -0.20 V pour $NiAlSO_4$ /tyrosinase) et celui d'oxydation (à $+0.20$ V), menant à une détection plus fiable.

En ce qui concerne les performances, le Tableau IV.5 regroupe les différents paramètres de détection obtenus pour les deux biocapteurs en question, ainsi que les principales performances des biocapteurs basés sur la tyrosinase déjà rapportés dans la littérature.

Analyte	Capteur	E_a (V)	S ($A.M^{-1}$)	S ($A.M^{-1}cm^{-2}$)	I_{max} ($\mu A.cm^{-2}$)	LDR (μM)	LOD (μM)	Références
Phénol	gCE/ ZnAlCl/ tyrosinase	-0.20		7.807	492	1.7-13.3	1.70×10^{-3}	[D.Shan et coll., 2003]
	GSPE/ ferrocène/ tyr	0.05	4.80×10^{-3}			0.25-5	10	[M. R. Montereali et coll., 2010]
	Tyr-CPE	-0.15	222.90×10^{-3}	1.486		1-15	0.01	[S.Andreescu et coll., 2004]
	gCE/CHT- Zn ₃ AlCl/tyr	-0.20		2.229		0.005-20	0.50×10^{-3}	[E.Han et coll., 2007]
Catéchine (C)	GSPE/ ferrocène/ tyr	0.05	0.207×10^{-3}			0.25-5	140	[M.R. Montereali et coll., 2010]
	CSPE/tyr	-0.15	35×10^{-3}			0.25-5		[S. Nadifiyine et coll., 2013]
EGCG	CSPE/tyr	-0.15	1.70×10^{-3}			1-15		[S. Nadifiyine et coll., 2013]
EC	CSPE/tyr	-0.15	52.00×10^{-3}			0.1-5		
GC	CSPE/tyr	-0.15	3.00×10^{-3}			2-20		
EGC	CSPE/tyr	-0.15	2.30×10^{-3}			1-80		
ECG	CSPE/tyr	-0.15	7.90×10^{-3}			1-15		
Catéchol	CSPE/tyr	-0.15	0.217			0.05-23	0.03	[S. Nadifiyine et coll., 2013]
	CoPc- CNTPE/tyr	-0.10	0.064	8.152	-14 μA	10-120	1.66	[I.M. Apetrei et coll., 2013]
	G-SPE/ ferrocène/ tyr	0.05	3021			0.25-5	10	[M.R. Montereali et coll., 2010]
	Tyr-CPE	-0.15	0.2085	1.3902		1-20	0.025	[S.Andreescu et coll., 2004]
	gCE/CHT- Zn ₃ AlCl/tyr	-0.20		2.750	408	0.0036-60	0.36×10^{-3}	[E.Han et coll., 2007]
Poly- phénols	AuSPE/ CoAlSO ₄ / tyr	-0.25	498.00	3952.40	213.10	0- 2.4	0.04×10^{-6}	[nous]
		0.20	1137.10	9024.60	219.05	0- 2.4	0.72×10^{-6}	[nous]
	AuSPE/ NiAlSO ₄ / tyr	-0.20	423.30	3359.50	213.81	0- 2.4	0.48×10^{-6}	[nous]
		0.20	174.30	1383.30	265.32	0- 2.4	15.85×10^{-6}	[nous]

tyr : tyrosinase ; gCE : glassy carbon electrode ; G-SPE : screen printed graphite electrode ; Tyr-CPE : tyrosinase carbon paste electrode ; CoPc-CNTPE : cobalt phthalocyanine carbon-nanotubes paste electrodes ; CHT : chitosan

Tableau IV. 5. Caractéristiques analytiques des biocapteurs de composants phénoliques à base de tyrosinase décrits dans la littérature et celles obtenues pour nos biocapteurs élaborés (le calcul est basé sur une masse molaire moyenne des polyphénols de 415 g.mol^{-1} et sur une surface sensible de 12.6 mm^2).

Dans les deux modes d'oxydation (à 0.2 V) et de réduction (à -0.2 V), les deux biocapteurs sont très sensibles à la présence des polyphénols (de 0.42 à 2.74 $\mu\text{A} / \text{ng.mL}^{-1}$ et de 1.02 à 1.20 $\mu\text{A} / \text{ng.mL}^{-1}$), dans une très large gamme dynamique linéaire qui s'étend de 0.01 à 1000 ng.mL^{-1} . La LOD estimée par la méthode de la déviation standard et la pente (*Standard Deviation of blank response and slope method*) [S. Chandran et coll., 2007] est extrêmement faible, estimée au plus à quelques pg/mL (0.02 pg/mL).

Finalement, en présence et en absence du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, nous trouvons des caractéristiques des biocapteurs quasi-similaires. L'utilisation du couple redox nous a donc aidés à vérifier la reproductibilité de nos résultats. Ces caractéristiques correspondent à des valeurs moyennes, car elles sont obtenues à partir d'un mélange de polyphénols extraits du thé vert. En effet, l'efficacité des biocapteurs varie en fonction de la nature des polyphénols détectés, comme décrit dans la littérature (Tableau IV.5).

Comme le montre le Tableau IV.5, les gammes de détection linéaires dans le cas des biocapteurs basés sur la tyrosinase sont typiquement comprises entre quelques dizaines de nM et de quelques dizaines de μM . On peut donc conclure que la gamme de détection linéaire de nos biocapteurs (entre 0 et 2.4 μM) est bien adaptée à la détection de faibles concentrations de polyphénols extraits du thé. Concernant les LOD, les biocapteurs élaborés dans cette étude présentent des valeurs nettement inférieures à celles déjà décrites, montrant ainsi leur efficacité. De plus, nos biocapteurs à base de HDL sont plus sensibles que ceux présentés dans la littérature avec une gamme linéaire qui s'étale sur 5 décades, permettant des applications plus larges.

D'autre part, on remarque que les caractéristiques électrochimiques obtenues pour les biocapteurs à base de CoAlSO_4 sont plus intéressantes que celles obtenues pour les biocapteurs à base de NiAlSO_4 . En effet le premier biocapteur possède une sensibilité plus élevée et une LOD plus faible pour une même gamme linéaire de détection.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer la différence entre les performances des deux biocapteurs « $\text{AuSPE}/\text{CoAlSO}_4/\text{tyrosinase}$ » et « $\text{AuSPE}/\text{NiAlSO}_4/\text{tyrosinase}$ » :

- Un meilleur greffage de la tyrosinase au sens large : quantité d'enzyme plus importante, meilleure orientation, meilleure sensibilité. Sur ce point, notre estimation du K_m de la tyrosinase fixée sur la matrice de CoAlSO_4 montre une valeur (35 μM) compatible avec celles déjà publiées dans des cas similaires (enzyme greffée sur une

surface) et plus faible que celle en solution, ce qui suggère une meilleure sensibilité. Dans le cas du NiAlSO_4 , la valeur du K_m est légèrement inférieure, égale à 21 μM . Cette valeur plus faible suggère donc que la tyrosinase présente une sensibilité plus grande au substrat quand elle est immobilisée sur le NiAlSO_4 . Elle ne plaide pas en faveur d'une fixation plus efficace du substrat en présence de cobalt.

- Des propriétés électrochimiques du cobalt mieux adaptées que celles du nickel et/ou un meilleur effet activateur du cobalt sur l'enzyme d'où une meilleure disponibilité du substrat pour l'enzyme en présence de cobalt. En effet, il a été montré que ces ions sont capables d'activer la tyrosinase en solution [J.R. Jara et coll., 1990]. Cependant, le nickel s'avère dans ces conditions plus efficace que le cobalt.
- L'estimation des coefficients de diffusion des espèces réduites montre une valeur supérieure en présence du cobalt par rapport au nickel, ce qui suggère une plus forte perméabilité de la biomembrane CoAlSO_4 /tyrosinase.

Enfin, le biocapteur AuSPE/CoAlSO_4 /tyrosinase est plus stable dans le temps que le biocapteur AuSPE/NiAlSO_4 /tyrosinase, dans des conditions propices au maintien de l'activité de l'enzyme (en présence de PBS). Il conserve ~90% de sa réponse initiale au bout de 20 jours. Au-delà, la sensibilité décroît jusqu'à ~58% après un mois d'utilisation.

III. CONCLUSION

Dans ce chapitre, une étude des caractéristiques des différents biocapteurs à base de HDLs a été décrite. Les résultats présentés montrent que ces nanomatériaux permettent d'immobiliser efficacement des enzymes tout en respectant leur conformation. Ils peuvent aussi assurer le relais dans le transfert électronique se produisant à la surface des électrodes modifiées. La comparaison entre les différentes réponses voltammétriques a montré que les films de HDLs de type CoAlSO_4 et NiAlSO_4 présentent des propriétés d'oxydoréduction plus intéressantes que les films de HDLs de type Zn_2AlCl et Ca_2AlCl . Parmi ces deux premiers, il semble que le HDL contenant du cobalt soit plus performant.

Les biocapteurs ampérométriques élaborés à partir de l'immobilisation de la tyrosinase sur les deux films de HDLs CoAlSO_4 et NiAlSO_4 , détectent simultanément l'oxydation et la réduction des composés phénoliques générés par voie enzymatique. Leurs caractéristiques analytiques comparées à celles de biocapteurs déjà décrits montrent que ces biocapteurs sont

compétitifs et fiables. Le biocapteur à base de films hybrides CoAlSO_4 /tyrosinase est le plus sensible aux faibles concentrations de polyphénols et facilite mieux la diffusion des formes réduites de ces composées. Les résultats sont reproductibles dans le temps et en utilisant deux électrolytes supports différents (le PBS avec et sans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$), mettant en évidence le double rôle de CoAlSO_4 à la fois de matrice hôte du biorécepteur mais aussi activateur.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail concernait l'immobilisation d'une enzyme, la tyrosinase dans des argiles ioniques de type hydroxydes doubles lamellaires (HDLs) afin d'élaborer des biocapteurs pour la détection de polyphénols extraits du thé vert, applicables par exemple dans le domaine agroalimentaire. Cette étude a été consacrée à la caractérisation de ces nanomatériaux sous forme de poudre, la réalisation de films minces de HDLs et HDLs-tyrosinase et à la détermination de la réponse des biocapteurs ainsi élaborés.

Dans un premier temps, un bilan bibliographique nous a permis de placer notre problématique dans le contexte des recherches actuelles concernant les biocapteurs de composants phénoliques, et de souligner les avantages et inconvénients des différents types de transducteurs et de matrices d'immobilisation des enzymes généralement utilisés.

Nous avons ensuite présenté ces matériaux ainsi que la méthode de synthèse utilisée et les différentes techniques utilisées pour leur caractérisation physicochimique. L'une des méthodes les plus simples et commodes pour préparer des HDLs est la coprécipitation à température et pH constants. Elle nous a permis de synthétiser quatre HDLs : CoAlSO_4 , NiAlSO_4 , Zn_2AlCl et Ca_2AlCl . Les spectroscopies IR et Raman nous ont permis de valider la méthode de synthèse en vérifiant la composition des HDL obtenus. La caractérisation structurale par diffraction des RX a suggéré des réseaux à symétrie rhomboédrique avec la présence de traces de sel.

Une des particularités des matrices HDL concerne la possibilité de moduler leurs propriétés morphologiques. Les films des HDLs élaborés à partir des poudres forment des plaquettes pseudo-hexagonales empilées les unes au-dessus des autres. L'exfoliation des différentes couches est accessible par dilution. La technique AFM a été particulièrement utile à ce stade pour déterminer les conditions expérimentales optimales donnant des films homogènes, adaptés à l'immobilisation efficace de la tyrosinase. Cette étude a montré que les concentrations faibles de HDLs (0.10-0.25 mg/mL pour NiAlSO_4 et Zn_2AlCl et 0.75 mg/mL pour CoAlSO_4 et Ca_2AlCl) et un dépôt par *spin-coating* doivent être favorisés, pour produire des couches relativement lisses et uniformes sur de grandes surfaces.

Nous avons ensuite développé un protocole efficace pour immobiliser la tyrosinase à la surface des films constitués des différentes matrices de HDL. Après le greffage de l'enzyme,

l'AFM a permis de mettre en évidence le rôle structurant des films en vue de la fixation de la tyrosinase.

Nous avons finalement transposé ces résultats à la surface du transducteur. Pour évaluer les performances des biocapteurs ainsi élaborés, une étude électrochimique a été menée sur chaque biocapteur, basée sur des mesures de voltammétrie cyclique et de chronoampérométrie, couplée à une étude de la reproductibilité des résultats obtenus (sensibilité, sélectivité, intervalle et limite de détection, durée de vie ...). Les caractéristiques analytiques trouvées prouvent que nos systèmes sont performants et concurrentiels. Le biocapteur à base de film hybride CoAlSO₄/tyrosinase s'avère le plus sensible à la présence des faibles concentrations d'analyte. Les résultats sont reproductibles dans le temps et en utilisant deux électrolytes supports différents (le PBS avec et sans Fe(CN)₆^{3-/4-}).

Ce travail de thèse ouvre de larges perspectives dans différentes directions :

- A l'heure actuelle, les biocapteurs ont été testés sur des mélanges de polyphénols. Il serait intéressant d'étudier leur sensibilité vis-à-vis de molécules purifiées ou de polyphénols d'origine autre.
- On peut envisager la possibilité de mélanger différentes phases de HDLs pour former une nouvelle phase complexe qui pourrait améliorer le comportement électrochimique du film fonctionnalisant l'électrode de travail.
- Le dépôt de multicouches de polyélectrolytes à la surface de transducteurs s'avère souvent intéressant pour améliorer les caractéristiques d'un biocapteur (adsorptions successives par la méthode *Layer by Layer* de polyélectrolytes alternativement chargés positivement ou négativement, l'architecture étant maintenue par des interactions électrostatiques). Nous avons procédé à des tests qui ont montré qu'il y a bien une interaction entre les HDL et le « coussin » de polyélectrolytes. Cette méthode pourrait améliorer les performances de notre biocapteur.
- On peut aussi envisager de tester une autre possibilité pour former des films plans de HDL en vue de la fonctionnalisation de la surface des électrodes : il s'agit de réaliser une monocouche d'acide gras (acide arachidique par exemple) à l'interface air-eau d'une cuve de Langmuir, d'y faire adsorber les HDL solubilisés dans la phase aqueuse puis de transférer la monocouche mixte acide gras-HDL sur un support par la méthode de Langmuir-Blodgett. Bien que nous ayons envisagé cette méthode au cours de la

thèse, nous avons malheureusement dû abandonner cette hypothèse de travail car elle s'avérait trop coûteuse en HDL, compte tenu du volume de la cuve de Langmuir à notre disposition.

- Enfin, il serait intéressant de greffer d'autres types de biomolécule sur les matrices de HDLs afin d'étudier leur biocompatibilité.

Annexes

A. Les facteurs représentatifs de la qualité de l'affinement en DRX

La qualité de l'affinement est mesurée par les facteurs suivants [P. Gravereau, 2012] :

- Le résidu de profil pondéré :

$$R_{wp}(\%) = 100 \sqrt{\frac{\sum_i W_i (y_{obs\ i} - y_{calc\ i})^2}{\sum_i W_i (y_{obs\ i})^2}} \quad (\text{éq A.6})$$

- Le résidu de profil non pondéré :

$$R_p(\%) = 100 \frac{\sum_i |y_{obs\ i} - y_{calc\ i}|}{\sum_i y_{obs\ i}} \quad (\text{éq A.7})$$

où $y_{obs\ i}$ et $y_{calc\ i}$ sont respectivement les intensités observée et calculée au pas angulaire i , et W_i le poids attribué à l'intensité au pas angulaire i .

- Le résidu de Bragg :

$$R_B(\%) = 100 \frac{\sum_i |I_{obs\ i} - I_{calc\ i}|}{\sum_i I_{obs\ i}} \quad (\text{éq A.8})$$

où $I_{obs\ i}$ est l'intensité intégrée observée de la $i^{\text{ème}}$ réflexion.

- Le « R-structure facteur » défini par :

$$R_F(\%) = \frac{\sum_i |\sqrt{I_{obs\ i}} - \sqrt{I_{calc\ i}}|}{\sum_i \sqrt{I_{obs\ i}}} \quad (\text{éq A.9})$$

- Le résidu lié aux fluctuations statistiques en l'absence d'erreur systématique :

$$R_{exp}(\%) = 100 \sqrt{\frac{N - P + C}{\sum_i W_i (y_{obs\ i})^2}} \quad (\text{éq A.10})$$

B. Notions d'électrochimie : B1- transfert et transport de matière

Lors de la réaction électrochimique, deux processus sont cinétiquement en compétition : le transport de la matière et la réaction de transfert électronique.

Le transport peut être dû à [F. Bedioui, 1999]:

- la diffusion : c'est le mouvement des espèces électroactives provoqué par un gradient de concentration, créé à la suite de l'oxydoréduction des espèces à la surface de l'électrode ;
- la migration, provoquée par un gradient de potentiel dans la solution : les espèces chargées subissent une force électrique ;
- la convection, qui est un mouvement d'ensemble de la solution et qui peut être forcée (agitation mécanique : barreau aimanté, électrode tournante...) ou naturelle (agitation thermique).

Dans ce travail, nous nous intéresserons à l'étude du phénomène de diffusion qu'on considère comme le phénomène prépondérant pour calculer le coefficient de diffusion à l'aide de la méthode de chronoampérométrie.

Dans ce cas, le courant d'électrolyse I , c'est-à-dire le nombre d'électrons échangés à l'électrode, peut être relié au flux molaire J de l'espèce électroactive à l'électrode de la manière suivante : $I = nFSJ_{ox}$, où n est la quantité (exprimée en moles) d'électrons échangés pour la réduction d'une mole d'oxydant, F la constante de Faraday et S la surface de l'électrode.

Le flux de l'oxydant est défini en fonction de son gradient de concentration à l'aide de la première loi de Fick dans le cas d'une diffusion linéaire (électrode de surface plane, le gradient de concentration étant orthogonal à cette surface et dépendant uniquement de la distance x à l'électrode), par la relation suivante :

$$J_{ox} = -D_{ox} \frac{\delta C_{ox}}{\delta x} \quad (\text{éq. B.2})$$

A l'aide de l'équation de Nernst-Einstein (éq. B.3) ou de l'équation de Stokes-Einstein (éq. B.4), on peut déterminer le coefficient de diffusion D_{ox} (en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

$$\lambda_i = \frac{z_i^2 F^2 D_i}{RT} \quad (\text{éq. B.3})$$

avec λ_i la conductivité de l'espèce i en solution et z_i la charge de l'espèce i ,

$$D_i = \frac{kT}{6\pi\eta r_i} \quad (\text{éq. B.4})$$

La deuxième loi de Fick (éq. B.5 et Figure B.2) de diffusion linéaire de la matière permet de déterminer le courant de diffusion en fonction du temps ainsi que les profils de concentration à un temps t à condition de connaître les conditions initiales et aux limites de l'expérience.

$$\frac{\delta C_{Ox}}{\delta t} = D_{Ox} \frac{\delta^2 C_{Ox}}{\delta x^2} \quad (\text{éq. B.5})$$

Pour résoudre l'équation (B.5) il est nécessaire de connaître les conditions aux limites :

- à $t=0$, $C_{Ox}(x,0) = C_{0,Ox}$ (concentration initiale uniforme) ;
- à t quelconque $C_{Ox}(\infty,t) = C_{0,Ox}$ (diffusion semi-infinie) et $C_{Ox}(x,t) = 0$ (on impose un potentiel suffisamment inférieur au potentiel standard du couple Ox/Red).

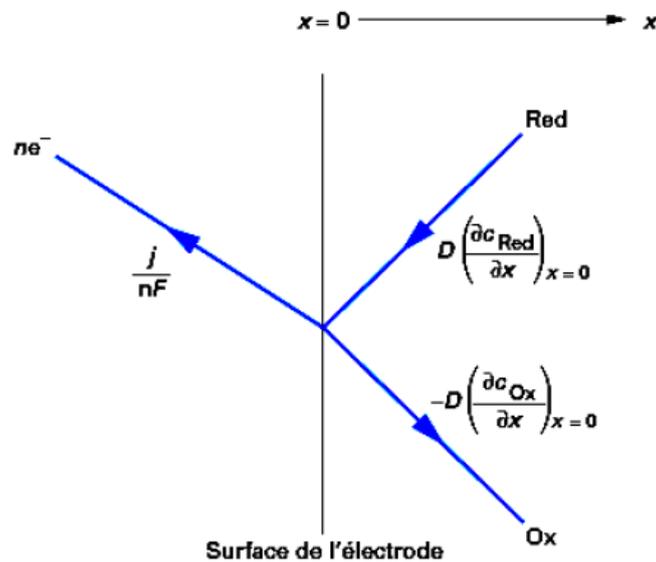


Figure B. 1. Représentation schématique de l'égalité des flux à la surface de l'électrode [F. Bedioui, 1999].

La résolution de l'équation précédente donne l'équation B.6:

$$C_{Ox}(x,t) = C_{Ox}^0 \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{x}{2\sqrt{D_{Ox}t}} \right) \right) \quad {}^{36} (\text{éq. B.6})$$

Si l'on dérive par rapport au temps, on obtient :

$$J_{Ox}(0,t) = C_{Ox}^0 \sqrt{\frac{D_{Ox}}{\pi t}} \quad (\text{éq. B.7})$$

³⁶ $\operatorname{erf}(y) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-x^2} dx$.

$$I_{ox}(t) = nFS J_{ox}(o, t) = nFS C_{ox}^0 \sqrt{\frac{D_{ox}}{\pi t}} \quad (\text{éq. B.8})$$

A partir de l'équation B.8 connue sous le nom d'équation de Cottrell [F. G. Cottrell, 1902], on peut remarquer que :

- I est proportionnel à C_{ox}^0 et décroît en fonction du temps en $t^{-1/2}$;
- $I(t = 0) \rightarrow \infty$. En réalité, on n'observe qu'une valeur finie du courant, imposée par le transfert électronique à l'électrode qui est alors limitant et due aux limitations instrumentales ;
- de plus, aux temps courts, le courant mesuré possède une contribution capacitive due au chargement de la double couche à l'électrode. Avec les potentiostats couramment utilisés, le temps caractéristique du courant capacitif est inférieur à la milliseconde (pour une électrode d'un millimètre carré de surface). Nous ne serons donc pas gênés ici par ce phénomène ;
- enfin, aux temps longs, le courant ne suivra plus cette loi, mais tendra vers une valeur non nulle, due à la convection naturelle.

B. Notions d'électrochimie : B2- Double couche électrique

Quand l'électrode est au contact de la solution contenant un électrolyte, la variation du potentiel électrique aux abords de sa surface est décrite par le modèle de la double couche électrique [M. J. Bedzyk, 1990]. La double couche électrique est la zone de l'interface électrode/électrolyte contenant les espèces chargées. Elle est assimilée à un condensateur plan en se basant sur un modèle physique dans lequel une couche d'ions est adsorbée à la surface.

Dans l'électrolyte la charge est constituée d'ions; dans le conducteur, il peut s'agir soit d'électrons soit de trous. Pour maintenir la neutralité électrique du système, une deuxième couche chargée de signe opposées est nécessaire (Figure B.2). Au sein de l'électrolyte, la chute de tension est due au courant ionique résistant au solvant visqueux. La résistance ionique dans l'électrolyte peut être assimilée au frottement des ions dans le solvant. La résistance ionique augmente avec la viscosité.

En régime statique, et en absence de courant, le potentiel est plat (constant) dans l'électrolyte. Le séparateur est une membrane poreuse qui contient environ 50% d'électrolyte. La membrane assure l'isolation électronique entre les électrodes.

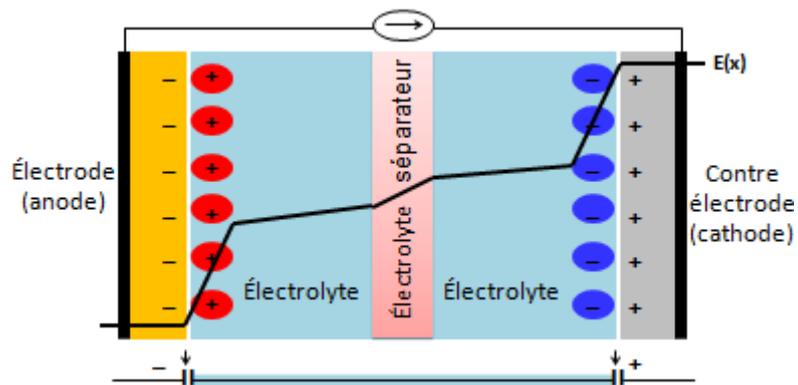


Figure B. 2. Répartition des charges dans un système anode-cathode et variation du potentiel électrique $E(x)$.

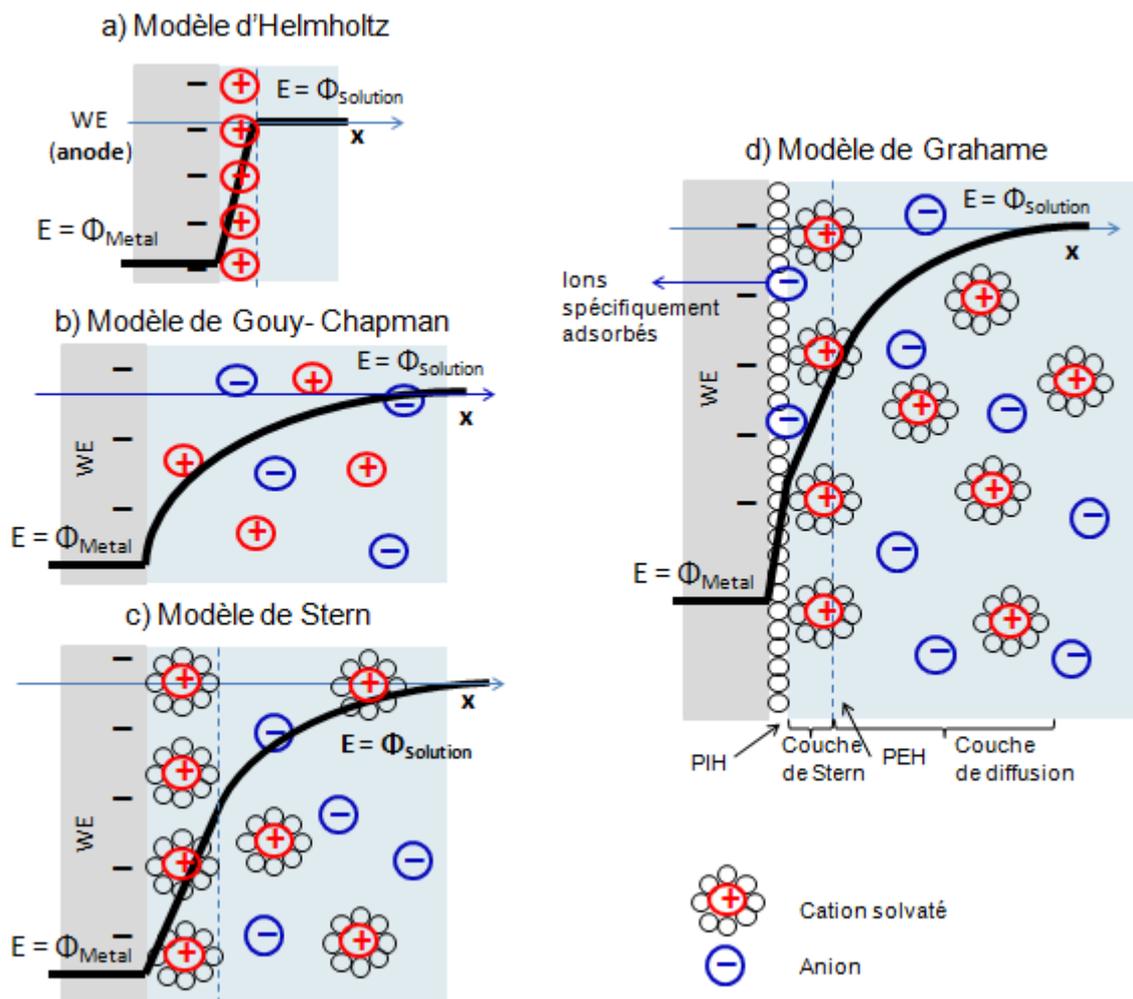


Figure B. 3. Répartition des charges et variation du potentiel E au niveau de la double couche électrique au voisinage d'une électrode en métal plongée dans un électrolyte : les modèles d'Helmholtz (a), Gouy- Chapman (b), Stern (c) et Grahame (d).

Le paragraphe suivant présente les différentes théories décrivant la répartition spatiale des charges à une interface métal-électrolyte (Figure B.3): modèles d'Helmholtz, Gouy-Chapman, Stern (combinaison de Helmholtz et de Gouy - Chapman), Grahame (modèle moderne).

Modèle I : la double couche d'Helmholtz (1879)

C'est le modèle le plus simple pour décrire la distribution spatiale de charge à une interface métal-électrolyte. Il est basé sur le fait que des ions de charge opposée à celle de l'électrode se répartissent sur la surface de cette dernière, d'où une assimilation à la notion de condensateur. Dans ce modèle, tous les ions impairs (ayant un nombre impair d'électrons) sont à une distance d de la surface du métal. Le taux de diffusion des ions est infini.

Dans l'électrode négative (Figure B.3a), le potentiel E est égal au potentiel du métal Φ_{Metal} . Loin de l'électrode négative, dans l'électrolyte le potentiel E est égal au potentiel de la solution $\Phi_{Solution}$. Les ions de charges positives ont quitté le solvant pour se localiser à la surface de l'anode. Le même nombre d'ions de charge négative sont accueillis par l'électrode positive qui ne figure pas dans la Figure B.3a.

Dans l'électrolyte les ions négatifs et positifs qui ne sont pas utilisés à l'interface restent en paires pour assurer la différence de potentiel : $\Phi_{Metal} - \Phi_{Solution} = Q / C$, où Q est la densité de charge dans la double couche et C est la capacité d'un condensateur plan.

A une distance d'environ 1 nm, les ions forment une monocouche compacte sur la surface de l'électrode. Cette distance est considérée comme l'épaisseur de la couche. Elle dépend de la taille de l'ion et du potentiel.

Modèle II : la double couche de Gouy- Chapman (1913)

Plus tard, Gouy et Chapman ont amélioré le modèle d' Helmholtz. Dans ce modèle, la couche de contre-ions au contact de l'électrode chargée intègre des ions de même signe que l'électrode (théorie de la double couche diffuse, liée à l'agitation thermique). Dans ce modèle étendu, le potentiel de surface décroît de façon exponentielle.

Modèle III : la double couche de Stern (1924)

Ce modèle combine les deux modèles précédents en faisant intervenir la couche dense de Helmholtz (appelée alors couche de Stern) et la couche diffuse de Gouy-Chapman. La couche diffuse commence alors à une distance finie de la paroi.

Les approximations notables de ce modèle sont les suivantes :

-Les ions sont considérés comme des charges ponctuelles ;

- Seules les interactions coulombiennes sont significatives ;
- La permittivité électrique est constante à l'intérieur de la double couche ;
- Le solvant est uniforme à l'échelle atomique.

Modèle IV : la double couche de Grahame (1940)

Grahame a justifié l'adsorption spécifique à l'aide d'un modèle décrivant trois couches : en plus des deux couches du modèle de Stern, il introduit le plan interne d'Helmholtz (PIH) et le plan externe d'Helmholtz (PEH) qui limitent la première couche de Stern (la deuxième étant la couche de diffusion) contenant des ions adsorbés spécifiquement. Ces ions perdent leur gaine de solvation à l'approche de l'électrode et peuvent posséder une charge de même signe ou de signe contraire à celle de l'électrode. Le lien entre ces ions et la surface de l'électrode est plus important que des forces électrostatiques habituelles.

C. Description de la voltammétrie cyclique

L'analyse des voltamogrammes (potentiels de pics, hauteurs et espacements, courants en fonction du temps et de la vitesse de balayage), nous permet d'apporter des informations quantitatives sur la réversibilité des réactions et la rapidité des systèmes. On distingue ainsi les systèmes rapides, quasi-rapides et lents (Figure C.1).

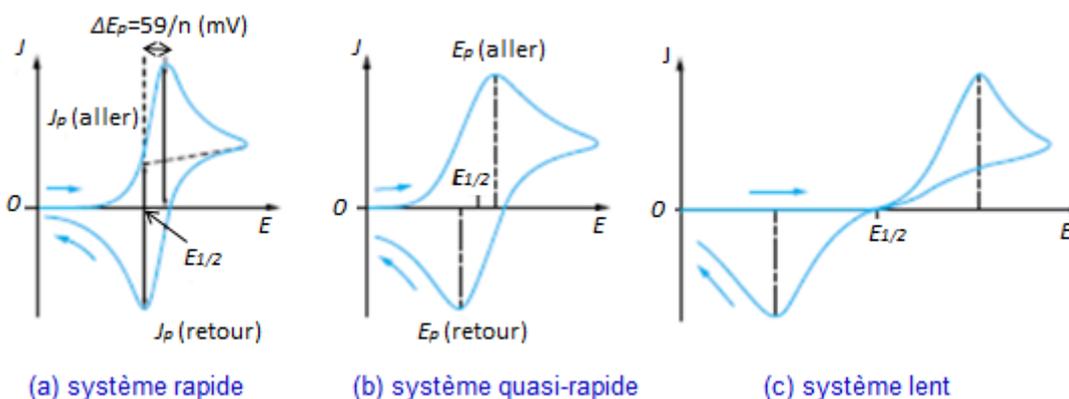


Figure C. 1. Différentes allures des voltampérogrammes cycliques selon la rapidité du système.

1) *Système rapide*

La comparaison de l'allure des courbes cathodique et anodique permet de déterminer si l'échange électronique à l'électrode correspond à un processus réversible ou non. Ainsi, lorsque l'échange électronique à l'électrode de travail est suffisamment rapide et que les coefficients de diffusion des formes oxydante et réductrice sont voisins, le couple est électrochimiquement réversible [Girault, 2007 ; Benmansour, 2015].

Un système rapide est défini comme étant un système dans lequel le processus de transfert de charge entre l'électrode et les espèces électroactives est beaucoup plus rapide que le processus de transport des espèces de la solution vers la surface de l'électrode.

Dans ce cas, la densité de courant déduite de la loi de Nernst suit la loi suivante :

$$J = -n \cdot F \cdot C_{Ox}^0 \cdot (\pi \cdot D_{Ox})^{1/2} \left(\frac{n \cdot F}{R \cdot T} \cdot v \right)^{1/2} \cdot \chi(\sigma, t) \quad (\text{éq. C.1})$$

où $\chi(\sigma, t)$ est une fonction de E , calculée numériquement pour certaines valeurs de $(E - E_{1/2})$ et $\sigma = \frac{n \cdot F}{R \cdot T} \cdot v$. La densité de courant J et exprimée en A/cm^2 si D est exprimé en cm^2/s , v en V/s et la concentration C en mol/cm^3 .

La loi simplifiée de Nernst suffit à expliquer différents phénomènes :

- Lors du balayage du potentiel pour le tracé du voltamogramme, on observe d'abord une croissance du courant lorsque la réaction électrochimique commence à se produire (ceci correspond à l'accélération du processus par accroissement de la surtension), puis une décroissance lorsque le ralentissement dû au phénomène de diffusion devient prépondérant (Figure C.1a).
- $\Delta E_p = E_p^a - E_p^c = 59/n$ (mV à 25 °C), indépendant de v ; (n est le nombre d'électrons échangés) ;
- E_p^a et E_p^c sont indépendants de la vitesse de balayage v ;
- $E_p - E_{p/2} = 59/n$ (mV à 25 °C) ;
- $I_p^a / I_p^c = 1$;
- I_p varie en $v^{1/2}$; en pratique, le traçage de la courbe du courant en fonction de la racine carré de la vitesse de balayage nous renseigne sur le type de système

2) *Système quasi-rapide (quasi-réversible)*

Dans le cas d'un système quasi-rapide, il est nécessaire de prendre en compte la relation inverse et donc de prendre en compte la relation de Butler-Volmer complète. Les développements théoriques ont été réalisés par plusieurs auteurs [W.H. Reinmuth et coll.,

1957 ; H. Matsuda et coll., 1955]. Pour une telle réaction, l'intensité du courant n'est plus strictement linéaire vis-à-vis de la racine carrée de la vitesse de balayage.

Rappelons que la densité du courant est donnée par la relation :

$$J = -n \cdot F \cdot C_{Ox}^0 \cdot (D_{Ox})^{1/2} \left(\frac{n \cdot F}{R \cdot T} \cdot v \right)^{1/2} \cdot \psi(E) \quad (\text{éq. C.3})$$

où ψ est une fonction tabulée pour différentes valeurs de $(E - E_{1/2})$.

La Figure C.1b présente le profil du voltamogramme cyclique obtenu. Il est caractérisé par :

- I_p augmente avec v , mais n'est pas proportionnel à $v^{1/2}$;
- E_p^c se déplace vers les valeurs négatives lorsque v augmente ;
- $\Delta E_p = E_p^a - E_p^c$ est supérieur à $59/n$ (mV) et augmente avec v ;
- I_p conserve la même expression que dans le processus irréversible.

3) Système lent (irréversible)

Lorsque la vitesse de transfert de charge devient plus faible que la vitesse de transfert de matière, le système est dit irréversible. Le courant reste proportionnel à la concentration et à la racine carrée de la vitesse de balayage, mais il est plus faible en raison de la teneur de la cinétique du transfert électronique. Cette cinétique est exprimée par le coefficient de transfert (α) et apparaît dans l'équation régissant l'intensité du pic.

On utilise dans ce cas la relation de Butler-Volmer pour prendre en compte les vitesses réactionnelles à la surface des électrodes. Après intégration nous obtenons l'équation suivante [R.S. Nicholson et coll., 1964 ; W.H. Reinmuth et coll., 1957] :

$$J = -n \cdot F \cdot C_{Ox}^0 \cdot (\pi \cdot D_{Ox})^{1/2} \left(\frac{\alpha \cdot n \cdot F}{R \cdot T} \cdot v \right)^{1/2} \cdot \chi \left(\frac{\alpha \cdot n \cdot F}{R \cdot T} \sigma \cdot t \right) \quad (\text{éq. C.2})$$

où α est le coefficient de transfert de charge (sans unité).

La Figure C.1c présente le profil du voltamogramme cyclique obtenu. Il est caractérisé par les points suivants:

- E_p^a et E_p^c sont fonction de v ; $E_p = f(\lg v)$ est une droite de pente $0.03/\alpha n$ (en V) ; ΔE_p augmente avec la vitesse de balayage ;
- I_p varie en $v^{1/2}$;
- $E_p - E_{p/2} = 48/\alpha n$ (mV à 25 °C) ;
- $I_p^a/I_p^c \neq 1$ (ou pas de pic retour) ;
- $I_p = (2.99 \times 10^5) \alpha^{1/2} n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C$.

A partir de ces expressions, on constate que, suivant la vitesse de balayage que l'on adopte pour appliquer les potentiels, on se trouve dans un système ou dans un autre. Il sera donc important dans le tracé des voltampérogrammes expérimentaux de bien appréhender ce paramètre de vitesse.

Références

- Abdullah J., Ahmad M., Karuppiah N., Heng L.Y., & Sidek H., *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114 (2006) 604-609.
- Abhijith K.S., Sujith Kumar P.V., Kumar M.A., & Thakur M.S., *Anal. Bioanal. Chem. J*, 389 (2007) 2227-2234.
- Aisawa S., Takahashi S., & Narita E., *J. Solid State Chem.*, 162 (2001) 52-62.
- Akselrud L., & Grin Y., *J. of App. Crystallography*, 47 (2014) 803-805.
- Albareda-Sirvent M., Merkoci A., & S. Alegret, *Sensors and Actuators B*, 69 (2000) 153-163.
- An N., Zhou C.H., Zhuang X.Y., Zhuang X.Y., Tong D.S., & Yu W.H., *Applied Clay Science*, 114 (2015) 283-296.
- An Z., Lu S., He J., & Wang Y., *Langmuir*, 25 (2009) 10704.
- Andrade J. M., & Fasolo D., *Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and Contribution to Health Promotion*. Chapter 20, (2014) 253-265.
- Andreescu S., & Sadik O. A., *Analytical chemistry*, 76 (2004) 552-560.
- Anh T. M., & Dzyadevych S.V., Van M.C., Jaffrezic-Renault N., Nguyen- Duc C., & Chovelon J.-M., *Talanta*, 63 (2004) 365-370.
- Apetrei I. M., Rodriguez-Mendez M. L., Apetrei C., & De Saja J. A. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 177 (2013) 138-144.
- Apetrei I. M., & Apetrei C., *Journal of Food Engineering*, 149 (2015) 1-8.
- Asanov A. N., Wilson W. W., & Oldham P.B., *Anal.Chem*, 70 (1998) 1156-1163.
- Assaker I. B., *Thèse de doctorat, Evry-Val d'Essonne*, 2009.
- Astill C., Birch M.R., Dacombe C., Humphrey P.G., & Martin P. T., *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 5340-5347.
- Aynaci E., Yaşar A., & Arslan F., *Sens. and Actuat. B: Chem.*, 202 (2014) 1028-1036.
- Babacan S., Pivarnik P., Letcher S., Rand A.G., *Biosensors and Bioelectronics*, 15 (2000) 615-621.
- Baccar Z. M., & Hafaiedh I., *International Journal of Electrochemistry*, 2011.
- Baccar Z. M., Caballero D., Eritja R., & Errachid A., *Electrochimica Acta*, 74 (2012) 123-129.

- Baccar Z. M., Caballero D., Zine N., Jaffrezic-Renault N., Errachid A., *Sensor Letters*, 7 (2009) 1-7.
- Baccar Z. M., Hidouri S., & Errachid A., *J. of nanoscience and nanotechnology*, 11 (2011), 8798-8803.
- Baccar Z. M., Hidouri S., El Bari N., Jaffrezic-Renault N., Errachid A., & Zine N., *Sensor Letters*, 7 (2009) 647-655.
- Badreddine M., Legrouri A., Barroug A., de Roy A., & Besse JP., *Materials Letters*, 38 (1999) 391-395.
- Bang G. S., Cho S., Lee N., Lee B. R., Kim J. H., & Kim B. G., *Biosensors and Bioelectronics*, 39 (2013) 44-50.
- Bard A. J., Parsons R., & Jordan J., *Standard potentials in aqueous solution*, CRC press, 6 (1985).
- Barhoumi H., Maaref A., Rammah M., Martelet C., Jaffrezic N., Mousty C., Vial S. & Forano C., *Mater. Sci. Eng. C*, 26 (2006) 328.
- Barhoumi H., Maaref A., Rammah M., Marteletb C., Jaffrezic-Renault N., Mousty C., Cosnier S. & Perezet E. and Rico-Lattes I., *Biosens. Bioelectron*, 20 (2005) 2318.
- Barhoumi H., Thèse de doctorat, Université de Monastir et école centrale de Lyon, Faculté des Sciences de Monastir, (2006).
- Barié N., & Rapp M., *Biosens. and Bioelectron*, 16 (2001) 979-987.
- Baur J., thèse de doctorat en Chimie, Université de Grenoble, (2010).
- Bedioui F., *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 3 (1999) P2126-1.
- Bedzyk M. J., Bommarito G. M., Caffrey M., & Penner T. L., *Science*, 248 (1990) 52-56.
- Bendoula R., *Biological Physics*. Université de Franche-Comté, 2005.
- Benmansour Y., thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen UABT, (2015).
- Bertrand D., Dufour E., *La spectroscopie infrarouge*, Lavoisier, (2006).
- Bhullar K. S., & Vasantha Rupasinghe H. P., *J. Food Chem.*, 168 (2015) 595-605.
- Boehn H. P., Steinle J., & Vieweger C., *Angew Chem Int Ed Engl*, 16 (1977) 265.
- Borgmann S., Schulte A., Neugebauer S., & Schuhmann W., part 1: *Amperometric Biosensors*, John Wiley & Sons, (2011) 1-84.
- Boujakhrouf A., Sanchez A., Diez P., Jiménez-Falcao S., Martínez-Ruiz P., Peña-Alvarez M., Pingarrón J. M., & Villalonga R., *J. of Materials Chemistry B*, 3 (2015) 3518-3524.

- Boulbitch A., *Journal of Electron Microscopy*, 49 (2000) 459-462.
- Boultif A., & D. Louër, *Journal of Applied Crystallography*, 24 (1991) 987-993.
- Braakman, I., & Hebert D. N. , *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a013201.
- Brenes A., Viveros A., Chamorro S., & Arija I., *Animal Feed Science and Technology*, 211 (2016) 1-17.
- Brigouleix C., thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, (2004).
- Buckle P. E., Davies R.J., Kinning T., Caetano F.R., Bergamini M.F., & Pollard-Knight D., *Biosens. and Bioelectron.*, 8 (1993) 355-363.
- Caglioti G., Paoletti A. T., & Ricci F. P., *Nuclear Instruments*, 3 (1958) 223-228.
- Campanella L., Bonanni A., & Tomassetti M., *J. of Pharmaceutical and Biomedical Anal.*, 32 (2003) 725-736.
- Campanella L., Bonanni A., Martini E., Todini N., & Tomassetti M., *Sens. and Act. B: Chemical*, 111-112 (2005) 505-514
- Canbay E., Habip A., Kara G., Eren Z., & Akyilmaz E., *Food Chemistry*, 169 (2015) 197-202
- Canevari T. C., Vinhas R. C., Landers R., Gushikem Y., *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 2402-2406.
- Cantrell D.G., Gillie L.J., Lee A.F., Wilson K., *Applied Catalysis A: General*, 287 (2005), 183-190.
- Carralero Sanz V., Luz Mena M., Gonzalez-Cortes A., Yanez-Sedeno P. & Pingarron J.M., *Anal. Chim. Acta.* 528 (2004) 1-8.
- Cass A.E., Davis G., Francis G.D., Hill H.A., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L.D., & Turner A.P., *Anal. Chem.*, 56 (1984) 667-671.
- Chakraborty S., Sarkar I., Haldar K., Pal S.K., & S. Chakraborty, *App. Clay Science*, 107 (2015) 98-108.
- Challener W. A., Edwards J.D., McGowan R.W., Skorjanec J., & Yang Z., *Sens. and Act. B*, 71 (2000) 42-46.
- Chandran S., & Singh R.S., *Pharmazie*, 62 (2007) 4-14.
- Charradi K., thèse de doctorat en cotutelle, Université 7 Novembre de Carthage et Université de Grenoble, Université de Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010.
- Chatelet L., Bottero J.V., Yvon J., & Bouchelaghem A., *Colloids Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 111 (1996) 167-175.
- Chen H., Mousty C., Chen L., & Cosnier S., *Mater. Sc. Eng. C* 28 (2008) 726.

- Chen H., Mousty C., Cosnier S., Silveira C., Moura J.J.G. & Almeida M.G., *Electrochem. Comm.* 9 (2007) 2240.
- Chen J.-P., Lin W.-S., *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2003) 801-811.
- Chen W., Feng L., & Qu B., *Solid State Communications*, 130 (2004) 259-263.
- Chen X., Fu C., Wang Y., Yang W. & Evans D.G., *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 356.
- Chen Z., De Marco R., & Alexander P.W., *Anal. Commun.*, 34 (1997) 93-95.
- Chevalier T., Rigal D.D., Mbéguié D., Gaillard F., Richard-Forget F. & Fils-Lycaon BR., *Plant Physiology*, 119 (1999) 1261-1269.
- Cho C., Wallace K.L., Hagen D.A., Stevens B., Regev O., & Grunlan J.C., *Nanotech.*, 26 (2015) 185703.
- Chouteau C., Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, (2004).
- Chovelon J. M., Thèse de doctorat, Ecole Centrale de Lyon: Lyon, France (1991).
- Choy J. H., Choi S.-J., Oh J.-M., & Park T., *Applied Clay Science*, 36 (2007) 122–132.
- Choy J. H., Jung E.Y., Son Y.H., Park M., *J. of Physics and Chemistry of Solids*, 65 (2004) 509-512.
- Christophe C., Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, (2010).
- Clark L.C., Lyon C., & Ann NY., *Acad. Sci.*, 102 (1962) 29-45.
- Clenet H., Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2009.
- Coche-Guerente L., Labbe P., & Mengeaud V., *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 3206-3218.
- Colombari M., Ballarin B., Carpani I., Guadagnini L., Mignani A., Scavetta E. & Tonelli D., *Electroanalysis*, 19 (2007) 2321.
- Comtat M., & Bergel A., *Biofutur*, 1997 (1997) 33-36.
- Cortina-Puig M., Muñoz-Berbel X., Calas-Blanchard C., & Marty J.L., *Microchim Acta* 171 (2010) 187-193.
- Cosnier S., Mousty C., Cui X., Yang X., & Dong S., *Anal. Chem.* 78 (2006) 4985.
- Cosnier S., Mousty C., Gondran C., & Lepellec A., *Mater. Sci. Eng. C* 26 (2006) 442.
- Cottrell F.G., *Z Physik Chem.*, 42 (1902) 385.
- Coulet P. R., & Bertrand C., *Analytical Letters*, 12 (1979) 581-587.

- Courbion G., & Ferey G., *Journal of Solid State Chemistry*, 76 (1988) 426-431.
- Cui X., Feng Z., Jin Y., Cao Y., Deng D., Chu H., Cao S., Dong C. & Zhang J., *J. of App. Cryst.*, 48 (2015) 1581-1586.
- Daghestani H. N., & Day B.W., *Sensors*, 10 (2010) 9630-9646.
- Dalluge J. J., & Nelson B. C., *J. of Chromatography A*, 881(2000) 411-424.
- Das J., Das D., & Dash G.P., *J. Colloid Interface Sci.*, 251 (2002) 26-32.
- Datta S., Christena L. R., & Rajaram Y. R. S., *3 Biotech*, 3 (1013) 1-9.
- De Roy A. & Besse J.-P., *Solid State Ionics*, 35 (1989) 35-43.
- De Roy A., Besse J.P., & Bondot P., *Mater. Res. Bull.*, 20 (1985) 1091-1098.
- De Marco R., Clarke G., & Pejic B., *Electroanal.*, 19 (2007) 1987-2001.
- Decker H., & Jaenicke E., *Developmental & Comparative Immunology*, 28 (2004) 673-687.
- Decker, H. E. I. N. Z., & Terwilliger N. O. R. A., *Journal of Experimental Biology*, 203 (2000) 1777-1782.
- Del Arco M., Gutierrez S., Martin C., Rives V., & Rocha J., *J. of Solid State Chemistry*, 177 (2004) 3954-3962.
- Demel J., Zhigunov A., Jirka I., Klementová M. & Lang K., *J. of colloid and interface science*, 452 (2015) 174-179.
- Demir B., Selecı M., Ag D., Cevik S., Yalcinkaya E.E., Demirkol D.O., Anik U., & Timur S., *RSC Advances*, 3 (2013) 7513-7519.
- Demirkol D.O., Yildiz H.B., Sayın S., & Yilmaz M., *RSC Advances*, 4 (2014) 19900-19907.
- Demourgues-Guerlou L., Braconnier J.J., & Delmas C., *J. of Solid State Chemistry*, 104 (1993) 359-367.
- Dempsey E., Diamond D., & Collier A., *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2004), 367-377.
- Descrovi E., Rivolo P., Boarino L., De Leo N., & Giorgis F., *New Sensing Strategies Based on Surface Modes in Photonic Crystals, Part III in Organic and Hybrid Photonic Crystals.*, Springer International Publishing (2015) 321-337.
- Dinh N.T., Sowade E., Blaudeck T., Hermann S., Rodriguez R. D., Zahn D.R., & Kanoun O., *Carbon*, 96 (2016) 382-393.
- Dolinska M.B., Kovaleva E., Backlund P., Wingfield P. T., Brooks B. P. & Sergeev Y. V., *PloS one*, 9 (2014) e84494.

- Dornelles Mello L., Alves A.A., Vazde Macedo D., & Tatsuo Kubota L., *Food Chemistry*, 92 (2005) 515-519.
- Dribek M., thèse de doctorat, Université Rennes 1, 2010.
- Duckworth H.W., & Colman J.E., *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 1613-1625.
- Dussault L., thèse de doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2005.
- Duvault-Herrera Y., Jaffrezic-Renault N., Clechet P., Serpinet J., & Morel D., *Colloids Surf.*, 50 (1990) 197.
- Espin J.C., Varon R., Fenoll L.M., Gilabert M.A., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., & Garcia-Canovas F., *Eur. J. Biochem.*, 267 (2000) 1270.
- Fan Q., Shan D., Xue H., He Y. and Cosnier S., *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 816.
- Fan X., Yanga Z., Xie X., Longa W., Wanga R., Houa Z., *J. of Power Sources*, 241 (2013) 404-409.
- Faour A., Mousty C., Prevot V., Devouard B., De Roy A., Bordet P., Elkaim E., & Taviot-Gueho C., *J. Phys. Chem. C*, 116 (2012) 15646-15659.
- Farahmand E., Ibrahim F., Hosseini S., Rothan H.A., Yusof R., Koole L.H. & Djordjevic I., *Applied Surface Science*, 353 (2015) 1310-1319.
- Faye N. R., thèse de doctorat, université de bordeaux, 2014.
- Feitknecht W., Fischer G., & Helu G. *Helv. Chim. Acta*, 18 (1935) 555-569.
- Feng Y., Wang D. Li, Y., D. G. Evans, & Duan X., *Polymer Degradation and Stability*, 91 (2006) 789-794.
- Forano C., Vial S., & Mousty C., *Curr. Nanosci.*, 2 (2006) 283.
- Friedman M., Levin C.E., Choi S.H., Kozukue E., & Kozukue N., *J. Food Sci.* 71 (2006) 328-337.
- Fujimori A., Ohmura K., Honda N., & Kakizaki K., *Langmuir*, 31 (2015) 3254-3261.
- Geng T., Morgan M.T., & Bhunia A.K., *Appl. Environ. Microbiol, Am. Soc. Microbiol.*, 70 (2004) 6138-6146.
- Geraud E., Prevot V., Forano C. & Mousty C., *Chem. Comm.* (2008) 1554.
- Géraud E., Thèse de doctorat, Université de Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. <tel-00716798>
- Ghica M.E., Ricardo C. Carvalho, Amine A., & Brett C. M.A., *Sens. and Act. B: Chemical*, 178 (2013) 270-278.

- Gileadi E., *Electrode kinetics*, VCH, New York 5 (1993).
- Gillespie J.P., Bidochka M.J., & Khachatourians G.G., *Comp. Biochem. Physiol.*, 98C (1991) 351-358.
- Girault H. H., *Electrochimie physique et analytique*. PPUR presses polytechniques, 2007.
- Golbeck J. H., & Cammarata K.V., *Plant Physiol*, 67 (1981) 977-984.
- Gomes S. A.S.S., Rebelo M.J.F., *Sensors*, 3 (2003) 166-175.
- Goujon C., Pauporté T., Mansour C., Delaunay S., & Bretelle J.L., *Electrochimica Acta*, 176 (2015) 230-239.
- Gouzi H., & Benmansour A., *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5 (2007) 1-11.
- Gouzi H., Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, (2014).
- Gravereau P., thèse de doctorat, Université de Bordeaux, 2012
- Grubel P., Bhaskar K.R., Cave D.R., Cave D. R., P. Garik, H.E. Stanley, & Lamont J.T., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 11 (1997) 139-145.
- Gschneidner T. A., & Kasper M.-P., *Handbook of Single-Molecule Electronics* (2015) 205.
- Gu B.X., Xu C.X., Zhu G.P., Liu S.Q., Chen L. Y., & Li X.S., *The J. of Phys. Chem. B*, 113 (2008) 377-381.
- Gualandi I., Monti M., Scavetta E., Tonelli D., Prevot V., & Mousty C., *Electrochimica Acta*, 152 (2015) 75-83.
- Guo K., Chen X., Freguia S., & Donose B.C., *Biosensors and bioelectronics*, 47 (2013) 184-189.
- Guo X., Lin C.S., Chen S.H., Ye R., Wu V. C. H, *Biosens. and Bioelect.*, 38 (2012) 177-183.
- Guo X., Zhang F., Evans D. G., & Duan X., *Chemical Communications*, 46 (2010) 5197-5210.
- Gupta N., Sharma S., Mir I. A., & Kumar D., *J. Scien. Ind. Res.*, 65 (2006) 549-557.
- Hafeman D.G., Parce J.W., & McConnell H.M., *Lightaddressable Science* 240 (1988)1182.
- Haghbeen K., Saboury AA., & Karbassi F., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1675 (2004) 139-146.
- Halaouli S., Asther M., Sigoillot J. C., Hamdi M., & Lomascolo A., *Journal of Applied Microbiology*, 100 (2006) 219-232.
- Hammami A., Kuliček J., & Raouafi N., *Food chemistry*, 209 (2016) 274-278.

- Hammami M., Soussou A., Idoudi F., Cohen-Bouhacina T., Bouhaouala-Zahar B. & Baccar Z., *IEEE transactions on nanobioscience* (2015).
- Han E., Shan D., Xue H., & Cosnier S., *Biomacromolecules* 8 (2007) 971-975.
- Han J., Xu X., Rao X., Wei M., Evans DG, & Duan X., *J. Mater Chem.* 21 (2011) 2126-2130.
- Han K.S., Guerlou-Demourgues L., & Delmas C., *Solid State Ionics*, 84 (1996) 227-238.
- Han R., Cui L., Ai S., Yin H., Liu X., Qiu Y., *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 449-456.
- Han Z.-P., Fu J., Ye P., & Dong X.-P., *Enzyme and Microbial Technology*, 53 (2013) 79-84.
- Heller A., *J. Phys. Chem.*, 96 (1992) 3579-3587.
- Hidouri S., Baccar Z. M., Abdelmalek H., Marty J. L., Diogène J. & Campàs M., Conference paper, XV Trobada Transfronterera de Sensors i Biosensors, At Sant Carlos de la Rapià, 2010.
- Hidouri S., Baccar Z. M., Abdelmelek H., Noguier T., Marty J. L. & Campàs M., *Talanta*, 85 (2011) 1882-1887.
- Hong-Yang Z., Kai-Bo L., Deng X., Jiang J., & Zhang F., *Proc. Biochem.*, 44 (2009) 791.
- Hossain S. Z., Brennan J. D., *Anal. Chem.*, 83 (2011) 8772-8778.
- Huang H. M., Huang P. K., Kuo W. H., Ju Y. H., & Wang M. J., *Journal of sol-gel science and technology*, 67 (2013) 492-500.
- Huang T. C., Toraya H., Blanton T. N., & Wu Y., *J. Appl. Cryst.*, 26 (1993) 180-184.
- Ionita E., Aprodu I., Stănciuc N., Râpeanu G., & Bahrim G., *Food chemistry*, 156 (2014) 129-136.
- Iost R.M., Madurro J.M., Brito-Madurro A.G., Nantes I.L., Crespilho F. N., & L. Caseli, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 2965 – 2997.
- Iotov P.I., & Kalcheva S.V., *J. of Electr. Chem.*, 442 (1998) 19-26.
- Ismaya W. T., Rozeboom H. J., Weijn A., Mes J. J., Fusetti F., Wichers H. J., & Dijkstra B. W., *Biochemistry*, 50 (2011) 5477-5486.
- Itaya K., Chang H.C., & I. Uchida, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 624-626.
- Iwayanagi Y., Igawa T., Maeda A., Haraya K., Wada N.A., Shibahara N., Ohmine K., Nambu T., Nakamura G., Mimoto F., Katada H., Ito S., Tachibana T., Jishage K. & Hattori K., *The J. of Immunology*, 195 (2015) 3198-3205.
- Jara J.R., Solano F., Garcia-Borron J.C., Aroca P., Lozano J.A., *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (1990) 276-285.

- Johnsen R.E., Krumeich F., & Norby P., *J. App. Crystallography*, 43 (2010) 434-447.
- Josserand C., & Thoroddsen S.T., *Drop Impact on Solid Surf., Annual Review of Fluid Mechanics*, 48 (2016) 1.
- Kafka J., *Sensors* 2013, 13(2013) 6319-6333.
- Kamaruddin S. A., Chan K.-Y., H-K.Yow, M. Z. Sahdan, H. Saim & D. Knipp, *J.Applied Physics*, 104 (2011).
- Kannan S., Swamy C.S., *J. Mater. Scien. Lett.* 11 (1992) 1585-1587.
- Kashyout A. B., Soliman H.M.A., Shorkry Hassan H., & A.M.Abousehly, *J. nanomaterials*, 1155 (2010).
- Kaur H., Kumar S., & Verma N., *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (2014) 613-619.
- Kertez D., & Zito R., *Biochim. Biophys. Acta*, 96 (1965) 447.
- Kestwal D.B., Karve M.S., Kakade B., & Pillai V.K., *Biosens. and Bioelect.*, 24 (2008) 657-664.
- Kestwal R. M., Bagal-Kestwal D., & Chiang B.H., *Analytica chimica acta*, 886 (2015) 143-150.
- Khalidi M., Badreddine M., Legrouri A., Chaouch M., Barroug A., De Roy A. & Besse J.P., *Materials research bulletin*, 33 (1998) 1835.
- Kilmartin P.A., & Hsu C.F., *Food Chemistry*, 82 (2003) 501-512.
- Kim D.H., Lee B.G., Park M.J., Choi J. S., Hong S.I., & Moon D.J., *In The 2008 Annual Meeting*, (2008).
- Kim Y., Lim S.I., Choi S., Cho I.S., Park E.H. & An D.J., *J. of Virological Methods*, 219 (2015) 23-27.
- Kissinger P.T., & Heineman W.R., *J. Chem. Educ*, 60 (1983) 702.
- Kloprogge J.T., & Frost R.L., *Journal of Solid State Chemistry*, 146 (1999) 506-515.
- Kochana J., Wapiennik K., Kozak J., Knihnicki P., Pollap A., Woźniakiewicz M., Nowak J. & Koscielniak P., *Talanta*, 144 (2015) 163-170.
- Koide A., & Yokoyama K., *J.Electronal.Chem.*, 468(1999) 193-201.
- Korkut S., Keskinler B., Erhan E., *Talanta*, 76 (2008) 1147-1152
- Kowalik P., Konkol M., Kondracka M., Pr_ochniak W., Bicki R. & Wiercioch P., *Appl. Catal. A General*, 464 (2013) 339-347.

- Kumar Anil V. B., Mohane Kishor TC., & Murugan K., *Food Chemistry*, 110 (2008) 328-333.
- Kumbhar P., *Chemical Communications*, 10 (1998) 1091-1092.
- Lakey J. H., & Raggett E. M., *Curr. Opin Struc. Biol*, 8 (1998) 119-123.
- Lal M., & Howe A.T., *J. Solid State Chem.*, 39 (1981) 368-376.
- Leroux F., Adachi-Pagano M., Intissar M., Chauvière S., Forano C. & Besse J.P., *Journal of Materials Chemistry*, 11 (2001) 105-112.
- Lévêque P., *Caractérisation des matériaux et composants, Cours Master 2* (2007).
- Li B., He J., Evans D.G., & Duan X., *Appl. Clay Sci.*, 27 (2004) 199-207.
- Li D., Lv P., Zhu J., Lu Y., Chen C., Zhang X., & Wei Ni Q., *Sensors* 15 (2015) 29419-29433.
- Li F., & Duan X., *Layered Double Hydroxides*, Springer Berlin Heidelberg, 119 (2006) 193-223
- Li S., Yang M., Zhou W., Johnston T. G., Wang R. & Zhu J., *Applied Surface Science*, 355 (2015) 570-576.
- Liang X., Zang Y., Xu Y., Tan X., Hou W., Wang L. & Sun Y., *Colloids and Surfaces A: Phys. and Eng. Aspects*, 433 (2013) 122-131.
- Lin Y. S. , Tsai Y. J., Tsay J. S., & Lin J. K., *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 1864-1873.
- Lin Y.S., Tsai Y.J., Tsay J.S., & Lin J.K , *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1864-1873.
- Linares C.F., Moscoso J., Alzurutt V., Ocanto F., Bretto P., & González G., *Materials Science and Engineering: C*, 61 (2016) 875-878.
- Liu L., Deng D., Xing Y., Li S., Yuan B., J. Chen, & N. Xia, *Electrochimica Acta*, 89 (2013) 616-622.
- Liu T., Su H., Qu X., Ju P., Cui L., & Ai S., *Sens. and Actuators B: Chemical*, 160 (2011) 1255-1261.
- Liu X.M., & Zhang X.G., *Dianyuan Jishu*, 27 (2003) 315-317.
- Liu Z., Yan Z., & Bai L., *Applied Surface Science*, 360 (2016) 437-441.
- Lobo R.F.M., Pereira-da Silva M.A., Raposo M., Faria R.M, Oliveira Jr.O.N., Pereira-da-Silva M.A., & Faria R.M., *Nanotechnology*, 10 (1999) 389.
- Lopez M.A., Ortega F., Dominguez E., & Katakis I., *J.Mol.Recognition*, 11 (1998) 178-181.

- Lopez M.S.P., Leroux F., & Mousty C., *Sensors and Actuators B: Chemical*, 150 (2010) 36-42.
- Lötzbeier T., Schuhmann W., & Schmidt H.L., *Sens. Actuat., B* 33 (1996) 50-54.
- Luong J. H. T., Male K. B., & Glennon J. D., *Biotech. Advances*, 26 (2008) 492-500.
- Lupu S. et coll., *Sensors*, 13 (2013) 6759-6774.
- Mai, A. T., Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I, (2004).
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., & Jiménez L., *The American journal of clinical nutrition*, 79 (2004) 727-747.
- Mansouri H., Forano C., Prevot V., Jaffrezic R.N., & Ben Haj Amara A., *Sens. Lett.*, 7 (2009) 1.
- Maquere F., & Frappart C., *Bulletin de l'Union des physiciens*, 841 (2002) 43-50.
- Marri C., Frazzoli A., Hochkoepler A., & Poggi V., *Phytochemistry*, 63 (2003) 745-752.
- Marx K. A., *Biomacromolecules*, 4.5 (2003) 1099–1120.
- Mascini M., Guilbault G.G., Urea coupled ammonia electrode for urea determination in blood serum, *Anal. Chem.*, 145(1983)795-798.
- Mascolo G., & Mascolo M. C., *Microporous and Mesoporous Materials*, 214 (2015) 246-248.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., & Fernandez-Lafuente R., *Enzyme and Microbial Tech.*, 40 (2007) 1451-1463.
- Matsuda H., & Ayabe Y., *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 59 (1955) 494-503.
- Mayer K.M., & Hafner J. H., *Chem. Rev.*, 111 (2011) 3828-3857.
- Mbinze Kindenge J., Kalenda Tshilombo N., Chavez P. F., De Bleye C., Sacre P. Y., Mavar Tayey Mbay J., Hubert P., Marini R., Djang'Eing'A & E. Ziemons, *Spectra Analyse*, 43 (2014).
- Melo V. De, Cosnier S., Mousty C., & Jaffrezic-Renault N., *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4037.
- Miao Y., Yang Z., Liu X., Xu L., Ouyang L., Gu Y., Chang H. & Ouyang R., *Electrochimica Acta*, 111 (2013) 621-626.
- Mignani A., Scavetta E., & Tonelli D., *Anal. Chim. Acta*, 577 (2006) 98.
- Min K., & Y. J. Yoo, *Talanta*, 80 (2009) 1007-1011.
- Minami K., & Tsuzuki H., U.S. Patent No. 8,236,575 (2012).

- Miranda M., Bonfigli A., Zarivi O., Ragnelli A.M., Pacioni G. & Botti D., *Plant Science*, 81 (1992) 175-182.
- Miranda M., Zarivi O., Bonfigli A., Porretta R., Aimola P., Pacioni G., Ragnelli A. M. & Pacioni P.G., *Plant Science*, 120 (1996) 29-36.
- Moccelini S.K., Franzoi A.C., Vieira I.C., Dupont J. & Scheeren C.W., *Bios. and Bioelec.*, 26 (2011) 3549-3554.
- Mompean F.J., Illemassène M., Perrone J., *Chemical Thermodynamics of Nickel*, Elsevier Science, 6 (2005).
- Monk P.M.S., Chester S.L., Higham D.S., *Electrochim. Acta.*, 39 (1994) 2277-2284.
- Montereali M.R., Della Seta L., Vastarella W., & Pilloton R., *J. of Molec. Catal. B: Enzy.* 64 (2010) 189-194.
- Morales Borges R., Guadalupe Carbajal Arizaga G., & Wypych F., *J. Biochem. Eng.* 48 (2009) 93.
- Morandi S., Prinetto F., Di Martino M., Ghiotti G., Lorret O., Tichit D., Malagu C., Vendemiati B., & Carotta M. C., *Sens. Actuators, B: Chemical*, 118 (2006) 215-220.
- Mostarih R., & de Roy A., *J. of physics and chemistry of solids*, 67 (2006) 1058-1062.
- Mousty C., Kaftan O., Prevot V., & Forano C., *Sens. Actuators, B* 133 (2008) 442.
- Mousty C., & Prévot V., *Anal Bioanal Chem*, 405 (2013) 3513-3523.
- Mousty C., & Walcarius A., *Journal of Solid State Electrochemistry*, 19 (2015) 1905-1931.
- Mousty C., *Applied Clay Science*, 27 (2004) 159-177.
- Mousty C., Cosnier S., Sanchez-Paniagua Lopez M., Lopez-Cabarcos E., & Lopez-Ruiz B., *Electroanalysis*, 19 (2007) 253-258.
- Mousty C., Forano C., Fleutot S., & Dupin J.-C., *Electroanalysis*, 21 (2009) 399.
- Mousty C., Vieille L., & Cosnier S., *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 1733.
- Moyo M., Okonkwo J. O., *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193 (2014) 515-521.
- Mullet W.M., Lai E.P.C., & Yeung J.M., 22 (2000) 77-91.
- Nadifiyine S., Calas-Blanchard C., Amine A., & Marty J. L., *Food and Nutrition Sciences*, 4 (2013) 108-118.
- Nakayama H., Takeshita K., & Tshako M., *J. Pharm. Sci.*, 92 (2003) 2419-2426.
- Nakayama H., Wada N., & Tshako M., *International journal of pharmaceutics*, 269 (2004) 469-478.

- Nangia Y., Bhalla V., Kumar B., C. Raman Suri C., *Electrochemistry Communications*, 14 (2012) 51-54.
- Nartker S., Hassan M., Stogsdill M., *Materials Research Express*, 2 (2015) 035401.
- Neumann C., Reichardt S., Venezuela P., Drögeler M., Banszerus L., Schmitz M., Watanabe K., Taniguchi T., Mauri F., Beschoten B., Rotkin S.V., & Stampfer C., *Nature commun.*, 6 (2015).
- Neuville D.R., de Ligny D., & Henderson G.S., *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 78 (2014) 509-541.
- Nicholson R.S., Shain I., Theory of stationary electrode polarography, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 706.
- Niu W.J., Zhu R.H., Cosnier S., Zhang X.J., & Shan D., *Analytical chemistry*, 87 (2015) 11150-11156.
- Noguer T., Leca B., Jeanty G., & Marty J.-L., *Field Analytical Chemistry & Technology*, 3 (1999) 171-178.
- Noi S.A.P., Pei S.C., Harun F.K.C., Pei L.L., Aziz A.A., *IEEE-Control Conference (ASCC)*, (2015) 1-5.
- Nony L., thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I (2000).
- Notsu H., Tatsuma T., & Fujishima A., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 523 (2002) 86-92.
- Ogończyk D., Tymecki L., Wyżkiewicz I., Koncki R., & Glab S., *Sens. and Act. B: Chemical*, 106 (2005) 450-454.
- Ookubo A., Ooi K., & Hayashi H., *J. Pharm. Sci.*, 81 (1992) 1139-1140.
- O'Reilly J. E., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 292(1973) 509-515.
- Palacio M.L., & Bhushan B., *J. of Vacuum Science & Technology A*, 30 (2012) 050607.
- Pankratov I., & Lev O., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 393(1995) 35-41.
- Papa G., Pessione E., Leone V., & Giunta C., *Int. J. Biochem*, 26 (1994) 215-221.
- Park M., Lee C.I., Lee E.J., Choy J.H., Kim J.E. & Choi J., *J. of Phy. and Chemistry of Solids*, 65 (2004) 513-516.
- Park Y., Nam G., & Leem J. Y., *J. of the Korean Physical Society*, 66 (2015) 1253-1258.
- Parlak O., Tiwari A., Turner A. P.F., & Tiwari A., *Biosensors and Bioelectronics* 49 (2013) 53-62.
- Paulhiac J. L., & Clause O., *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 11602-11603.

- Peerboom N., Cecchet F., Caudano Y., Moreau J., Wautier S., Marchand-Brynaert J., Henry M., Demoustier-Champagne S., & Lis D., Springer Netherlands, (2015) 545-546.
- Pérez M.R., Pavlovic I., Barriga C., Cornejo J., Hermosín M.C. & Ulibarri M.A., *Applied Clay Science*, 32 (2006) 245-251.
- Pisson J., Morel J.P., Morel-Desrosiers N., Taviot-Guého C. & Malfreyt P., *The J. of Phys. Chem. B*, 112 (2008) 7856-7864.
- Prata E. R., & Oliveira L. S., *LWT-Food Science and Technology*, 40 (2007) 1555-1560.
- Prince J., Tzompantzi F., Mendoza-Damián G., Hernández-Beltrán F., Valente J. S., *App. Cat. B: Environmental*, 163 (2015) 352-360.
- Pundir C. S., & Chauhan N., *Analytical Biochemistry*, 429 (2012) 19-31.
- Radziuk D.V., & Möhwald H., *Polymers* 3 (2011) 674-692.
- Raghu P., Madhusudana Reddy T., Reddaiah K., Kumara Swamy B.E. & Sreedhar M., *Food Chemistry*, 142 (2014) 188-196.
- Raghu P., Swamy B.K., Reddy T.M., Chandrashekar B.N., & Reddaiah K., *Bioelectrochemistry*, 83 (2012) 19-24.
- Rahman M. B. A., Basri M., Hussein M. Z., Idris M. N. H., Rahman R. N. Z. R. A., & Salleh A. B., *Catalysis Today*, 93 (2004) 405-410.
- Ramirez-Coronel M.A., Marnet N., Kumar Kolli V.S., Roussos S., Guyot S., & Augur C., *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1344-1349.
- Ras R.H.A., Umemura Y., Johnston C.T., Yamagishi A., & Schoonheydt R.A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9 (2007) 918-932.
- Raymundo-Pereira P. A., Teixeira M. F., Caetano F. R., Bergamini M. F., & Marcolino-Júnior L. H., *Electroanalysis*, 27 (2015) 2371-2376.
- Reinmuth W.H., Nernst-controlled currents in hanging-drop polarography, *Chem J. Am.. Soc.* 79 (1957) 6358.
- Ren L., He J., Evans D.G., Duan X., & Ma R., *J. of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 16 (2001) 65-71.
- Ren L., He J., Zhang S., Evans D.G., & X. Duan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18 (2002) 3.
- Renaudin G., Rapin J.-P., Elkaim E., & François M., *Cement and Concrete Research*, 34 (2004) 1845–1852.
- Renaudin G., Rapin J.-P., Humbert B., & François M., *Cement and Concrete Research*, 30 (2000) 307–314.

- Rickert J., Brecht A., Göpel W., *Biosens. and Bioelectron.*, 12 (1997) 567-575.
- Rietveld H.M., *Acta. Cryst.*, 22 (1967)151.
- Rietveld H.M., *J. Appl. Cryst.*, 2 (1969) 65.
- Roede J.R., & Jones D.P., *Redox Biology*, 2 (2014) 651–655.
- Rojas R., Perez M.R., Erro E.M., Ortiz P.I., Ulibarri M.A., & Giacomelli C.E., *J. of Colloid and Interface Science*, 331 (2009) 425-431.
- Saito S.T., Welzel A., Suyenaga E.S., Bueno F., *Food Science and Technology (Campinas)*, 26 (2006) 394-400.
- Sambasiva Rao K.R.S., Tripathy N.K., Srinivasa Rao D., & Prakasham R.S., *Research Journal of Biotechnology*, 8 (2013) 1.
- Sanchez C., Rozes L., Ribot F., Laberty-Robert C., Grosso D., Sassoie C., & Nicole L., *Comptes Rendus Chimie*, 13 (2010) 3-39.
- Scalbert A., Johnson I.T., & Saltmarsh M., *the American j. of clinical nutrition*, 81 (2005) 215S-217S.
- Scalbert A., Morand C., Manach C., & Rémésy C., *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56 (2002) 276-282.
- Scavetta E., Guadagnini L., Mignani A., & Tonelli D., *Electroanalysis* 20 (2008) 2199.
- Schmidt T. F., Caseli L., Viitala T., & Oliveira O.N., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778 (2008) 2291-2297.
- Scholl F.A., & Caseli L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126 (2015) 232-236.
- Schuhmann W., Kranz C., Huber J., & Wohlschlager H., *Synth. Met.*, 61 (1993) 31-35.
- Schuhmann W., *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (2002) 425-441.
- Sergeyeva T. A., Lavrik N.V., Rachkov A.E., Kazantseva Z.I. & Al.skaya A.V., *Biosens. and Bioelectron*,13 (1998) 359-369.
- Shan D., Cosnier S., & Mousty C., *Anal. Chem.* 75 (2003) 3672.
- Shan D., Cosnier S., & Mousty C., *Anal. Lett.* 36 (2003), 909.
- Shan D., Cosnier S., & Mousty C., *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 390.
- Shan D., Mousty C., & Cosnier S., *Anal. Chem.* 76 (2004) 178.
- Shan D., Yao W., & Xue H., *Bioelectron*, 23 (2007) 432.
- Shan D., Yao W., & Xue H., *Electroanalysis* 18 (2006), 1485.

- Sheldon R.A., *Adv. Synt. & Cat. SI: Biocat.* 349 (2007) 1289-1307.
- Shi C., Liu Q., Dai Y., Xie Y., & Xu X., *Acta Biochim Polon.* 49 (2002) 1029-1035.
- Shi Q., Han E., Shan D., Yao W., & Xue H., *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 31 (2008) 519.
- Shi W., Wei M., Jin L. and Mol C. Li, J., *Catal. B: Enzym.*, 47 (2007) 58.
- Sigma-Aldrich : www.sigmaaldrich.com
- Silveira C. M., & Almeida M.G., *Anal. and Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 3619-3635.
- Silwana B., Horst C.V.D., Iwuoha E., & Somerset V., *J. of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49 (2014) 1501-1511.
- Site de l'IUBMB, EC 1.10.3.1, 1978, EC 1.14.18.1, 1972
- Skoog D.A., Holler F.J., & Nieman T.A., *De Boeck Supérieur*, (2003) 956.
- Sojo M.M., Nuñez-Delicado E., García-Carmona F., & Sánchez-Ferrer A., *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 4931-4936.
- Soldatkin O.O., Kucherenko I.S., Pyeshkova V.M., Kukla A.L., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A.V., Dzyadevych S.V., & Soldatkin A.P., *Bioelectrochemistry*, 83 (2012) 25-30.
- Solin S.A., Hines D.R., Seidler G.T., & Treacy M.M.J., *J. Phys. Chem. Solids*, 57 (1996) 1043.
- Sorar I., Tepehan F., & Tepehan Z., *J. Optoelectronics and advanced materials rapid communications*, 3 (2009).
- Stanimirova T., & Kirov G., *Applied Clay Science*, 22 (2003) 295-301.
- Su L.H., Zhang X.G., Mi C.H., & Liu Y., *J. Power Sources*, 179 (2008) 388-394.
- Sun W.Q., Payne G.F, Moas M.S.G.L., Chu J.H., & Wallace K.K., *Biotechnology progress*, 8 (1992) 179-186.
- Sun Y., Zhou J., Cheng Y., Yu J., & Cai W., *Adsorption Science & Technology*, 32 (2014) 351-364.
- Sun Y.S., & Zhu X., *Real-Time, Sensors*, 14 (2014) 23307-23320.
- Syshchik O., Skryshevsky V.A., Soldatkin O.O., Alexey P. Soldatkin, *Biosensors and Bioelectronics*, 66 (2015) 89-94.
- Tekaya N., Saiapina O., Ben-Ouada H., Lagarde F., Ben-Ouada H., & Jaffrezic-Renault N., *Bioelectrochemistry*, 90 (2013) 24-29.

- Tekaya N., Saiapina O., Ben-Ouada H., Lagarde F., Namour P., Ben-Ouada H. & Jaffrezic-Renault N., *J. of Environ. Protec.*, 5 (2014) 13.
- Temani M., Baccar Z.M., Ben Mansour H., *Microelec. Eng.*, 126 (2014) 165-168.
- Tembe S., Inamdar S., Haram S., Karve M., & D'Souza S. F., *Journal of biotechnology*, 128 (2007) 80-85.
- Tetik İ., Master dissertation in Biotechnology, Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, (2015).
- Therias S., & Mousty C., *Appl. Clay Sci.*, 10 (1995) 147-162.
- Tolba M., Ahmed M.U., Tlili C., Eichenseher F., Loessner M. J. & Zourob M., *Analyst*, 137 (2012) 5749-5756.
- Tonelli D., Scavetta E., & Giorgetti M., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 603-614.
- Toolan D.T.W., Haq E.u., Dunbar A., Ebbens S., Clarke N., Topham P.D., & Howse J.R., *J. of Poly. Sc. PartB: Polymer Phys.*, 51 (2013) 875-881.
- Torbiero, B., Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, (2006).
- Tran M. C., *Les biocapteurs : Principes, constructions et applications*, Masson, (1991) 158.
- Trzeciakiewicz H., Villanueva J.E., Soudy R., Kaur K., & Milne S.M., *Sensors*, 15 (2015) 19429-19442.
- Tsyganok A. & Sayari A., *J. of solid State Chemistry*, 179 (2006) 1830-1841.
- Turner A.P.F., Hendry S.P., & Cardosi M.F., *World Biotechnol. Rep.*, 1 (1987) 125-127.
- Updicke S. J., & Hicks G. P., *The enzyme electrode*, *Nature*, 214 (1967) 986.
- Vámos-Vigyázó L., & Haard N. F., *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 15 (1981) 49-127.
- Vaysse C., Thèse de doctorat, « Caractérisation structurale d'hydroxydes doubles lamellaires contenant des anions oxométallates (Mo, W) ou acrylate intercalés », Université Bordeaux I, (2001).
- Vchirawongkwin V., & Rode B. M., *Chemical physics letters*, 443 (2007) 152-157.
- Védrine C., & Fabiano S., Tran-Minh C., *Talanta*, 59 (2003) 535-544.
- Vermette J., Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, (2008).
- Vial S., Forano C., Shan D., Mousty C., Barhoumi H., Martelet C., & Jaffrezic N., *Mater. Sc. Eng.*, C 26 (2006) 378.
- Vial S., Prevot V., Leroux F., & Forano C., *Microporous Mesoporous Mater.* 107 (2008) 190.
- Vialat P., Leroux F., & Mousty C., *Electrochimica Acta*, 158 (2015) 113-120.

- Vialat P., Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014.
- Vianello F., Ragusa S., Cambria M.T., & Rigo A., *Biosens. Bioelectron.* 2006, 2155 – 2160.
- Vicentini F.C., Garcia L.L., Figueiredo-Filho L.C., Janegitz B.C., & Fatibello-Filho O., *Enzyme and Microbial Technology*, 84 (2016) 17-23.
- Vieira A. C., Moreira R. L., & Dias A., *J. Phys. Chem. C*, 113 (2009) 13358-13368.
- Villalonga R., Díez P., Casado S., Eguílaz E., Yáñez-Sedeño P., & Pingarrón JM., *Analyst* 137 (2012) 342-348.
- Vlad A., Birjega R., Matei A., Luculescu C., Nedelcea A., Dinescu M., Zavoianu R., & Pavel O. D., *Applied Surface Science*, 352 (2015) 184-188.
- Volpe G., Cozzi L., Migliorelli D., Croci L. & Palleschi G., *Anal. and Bioanal. Chem.*, 406 (2014) 2399-2410.
- Vuonga Q.V., Hiruna S., Phillips P.A., Chuena T.L.K., Bowyer M.C., Goldsmitha C.D., & Scarlett C.J., *J. of Ethnopharmacology*, 152 (2014) 227-242.
- Walcarius A., *Electroanalysis*, 10 (1998) 1217-1235.
- Wang A., Bai Y., Gao H., & Wang S., *Anal. Methods*, 7 (2015) 6842-6847.
- Wang B., Zhang J., & Dong S., *Biosensors and Bioelectronics*, 15 (2000) 397-402.
- Wang D., Ge N., Li J., Qiao Y., Zhu H., & Liu X., *ACS applied materials & interfaces*, 7 (2015) 7843-7854.
- Wang G., Xu J. J., Ye L. H., Zhu J. J., & Chen H. Y., *Bioelectrochemistry*, 57 (2002) 33-38.
- Wang J., *Electrochemical Glucose Biosensors*, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 814-825.
- Wang J., Jiang M., & Lu F., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 444 (1998), 127-132.
- Wang J., Kalinichev A.G., Kirkpatrick R.J., *Geochimica et Cosmochimica acta*, 68 (2004) 3351-3365.
- Wang S., Tan Y., Zhao D., & Liu G., *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2008) 1781-1787.
- Wang W., Xie Y., Wang Y., Du H., Xia C., Tian F., *Microchimica Acta*, 181 (2014) 381-387.
- Wang X., Han M., Bao J., Tu W., & Dai Z., *Analytica chimica acta*, 717 (2012) 61-66.
- Wang X., Li Y., Tang L., Zhou W., Li S., & Shi W., *Sensors and Actuators B: Chemical*, 223 (2016) 634-640.
- Warriner K., Reddy S.M., Namvar A., & Neethirajan S., *Trends in Food Science & Technology*, 40 (2014) 183-199.

- Watson L. D., Maynard P., Cullen D. C., Sethi R. S. Brettle J., & Lowe C. R., *Biosensors*, 3(1988) 101-115.
- Wei M., Wang J., Rao R., Shi S., Wang J., Li Y. & Duan X., *J. Solid State Chem.*, 177 (2004) 2534-2541.
- Weisser M., Tovar G., Mittler-Neher S., Knoll W., Brosinger F., Freimuth H., Lacher M., & Ehrfeld W., *Biosens. and Bioelectron.*, 14 (1999) 405-411.
- Whitaker J. R., Polyphenol oxidase, In *Food Enzymes*, Springer US, (1995) 271-307.
- Willems G. M., Janssen M.P., Comfurius P., Galli M., Zwaal R.F.A. & E.M. Bevers. *Biochemistry*, 41 (2002) 14357-14363.
- Williams G. R., & O'Hare D, *Solid State Sciences*, 8 (2006) 971-980.
- Wong T. C., Luh B. S., & Whitaker J.R., *Plant Physiol.*, 48 (1971) 19-23.
- Xia Y., Li J., & Jiang L., *Journal of colloid and interface science*, 377 (2012) 34-39.
- Xue H., & Shen Z., *Talanta*, 57 (2002) 289-295.
- Yağar H., & Sağıroğlu A., *Turk J Chem.*, 26 (2002) 97-103.
- Yagiz F., Kazan D.,& Nilgun Akin A., *Chem. Eng. J.* 134 (2007), 262.
- Yagur-Kroll S., Schreuder E., Ingham C. J., Heideman R., Rosen R., & Belkin S., *Biosens. and Bioelect.*, 64 (2015) 625-632.
- Yang C.-T., Méjard R., Griesser H.J., Bagnaninchi P.O., & Thierry B., *Anal. Chem.*, 87 (2015) 1456-1461.
- Yarger M.S., Steinmiller E.M., & Choi K.S., *Inorganic chemistry*, 47 (2008) 5859-5865.
- Yeung C.K., Ingebrandt S., Krause M., Offenhäusser A., & Knoll W., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 45 (2001) 207-214.
- Yin H., Zhou Y., Xu J., Ai S., Cui L., & Zhu L., *A. Analytica chimica acta*, 659 (2010) 144-150.
- Yin S. J., Si Y. X., Chen Y. F., Qian G.Y., Lü Z.R., Oh S. & Park Y.D., *The protein journal*, 30 (2011) 273-280.
- Yu Z. L., Zeng W. C., & Lu X. L., *Ultrasonics sonochemistry*, 20 (2013) 805-809.
- Zamfir L.-G., Rotariu L., & Bala C., *Biosens. and Bioelect.*, 46 (2013) 61-67.
- Zarivi O., Bonfigli A., Cesare P., Amicarelli F., Pacioni G., & Miranda M., *FEMS microbiology letters*, 220 (2003) 81-88.

- Zawistowski J., Biliaderis C. G., Eskin N. A., Robinson D. S., & Eskin N. A. M., *Oxidative enzymes in foods*, (1991).
- Zehani N., Fortgang P., Saddek Lachgar M., Baraket A., Arab M., Dzyadevych S.V., Kherrat R., & Jaffrezic-Renault N., *Bios. and Bioelect.* 74 (2015) 830-835.
- Zhang F., Sun M., Xu S., Zhao L., & Zhang B., *Chemical Engineering Journal*, 141 (2008) 362-367.
- Zhang J., Lei J., Liu Y., Zhao J., Ju H., *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 1858-1863.
- Zhang J., Zhan F., Ren L., Evtas D., Duan X., *Materials Chemistry and Physics*, 85 (2004) 207-214.
- Zhang P., Qian G., Xu Z.P., Shi H., Ruan X., Yang J. & Frost R.L., *Journal of colloid and interface science*, 367 (2012) 264-271.
- Zhang Y.T., Fan L.H., Zhi T.T., Zhang L., Huang H. & Chen H.L., *Polym J.. Sci. Part A: Polym Chem.*, 47 (2009) 3232.
- Zhang Z., Hua F., Liu T., Zhao Y., Li J., Yang R., Yang C., & Zhou L., *PLoS ONE*, 9 (2014) e95429.
- Zhao Y., Guang Li J., Fang F., Chu N., Ma H., & Yang X., *Dalton Transactions*, 41(2012) 12175-12184.
- Zhou Z., & Hartmann M., *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 3894-3912.
- Zhoury E., & El Hajbi A., *Ann. Chim. Sci. Mat*, 24 (1999) 57-62.
- Zijlstra P., Paulo P.M.R., Orrit M., *Nature Nanotechnology*, 7 (2012) 379-382.
- Ziyan E., & Pekyardimci Ş., *Turk J Chem*, 27 (2003) 217-225.
- Ziyan E., & Pekyardimci S., *Turk J Chem.*, 28 (2004) 547-557.
- Zou Y., Lou D., Dou K., He L., Dong Y., & Wang S., *J. of Solid State Electrochemistry*, (2015) 1-8.