

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed El Bachir Elibrahimi – Bordj Bou Arreridj
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département Sciences de la Matière

جامعة محمد البشير الإبراهيمي « برج بوعريريج »
كلية العلوم والتكنولوجيا
قسم علوم المادة



Mémoire de fin d'étude

PRESENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE : Licence

Filière : Chimie
Option : Chimie analytique

THÈME : LES BIOCAPTEURS A BASE DES POLYMERES

Préparé par : Abbou Ameer

Soutenu le : 23/06/2013

Devant le jury :

Président : Mr. R. Tabti

MAB

Université de BBA

Rapporteur : Dr. H. Ferkous

MCA

Université de BBA

Examineur: M^{me}. S. Djellali

MAA

Université de BBA

Année Universitaire 2012-2013

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Je remercie notre dieu qui m'avoir aidé à atteindre ce but, et de défier tous les obstacles afin de compléter ce modeste mémoire.

J'exprime mes remerciements à mon encadreur M^{me} H.Ferkous pour la proposition du thème de ce travail et pour ses encouragements, son aide et son soutien.

Je remercie monsieur R. Tabti, maitre assistant à l'université de Mohamed El Bachir Elibrahimi, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Je veux également associer mes remerciements aux différents membres de jury:

M^{me} S. Djellali, maitre assistant à l'université de Mohamed El Bachir Elibrahimi, pour avoir accepté de juger ce travail et honorer avec sa participation dans cette soutenance.

Je remercie tous les enseignants et les enseignantes pour avoir accepté de me guider toutes les trois années.

Tous ceux qui ont participé de loin ou de proche pour réaliser ce travail.

Merci a tous

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents qui n'ont jamais manqué l'occasion de me soutenir durant mes études.

A mes chers frères, mes chers sœurs, a tout les enfants de ma famille.

A tous mes amis.

A. Abbou

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Généralités sur les capteurs

I.1. Définition.....2

I.2. Capteur ou sensor.....2

I.3. Grandeurs d'influence.....2

I.4. Constituants d'un capteur.....3

I.5. Différents types du capteur.....4

I.6. Caractéristiques du capteur.....5

I.7. Domaines d'application du capteur.....7

Chapitre II : Les biocapteurs

II.1. Historique des biocapteurs.....8

II.2. Définition d'un biocapteur.....8

II.3. Structure et principe d'un biocapteur.....9

II.4. Classification du biocapteur.....10

II.5. Types du biorécepteur.....10

II.6. Types du transducteur.....11

II.6.1. Thermiques.....11

II.6.2. Optiques.....12

II.6.3. Piézo-électriques.....13

II.6.4. Electrochimiques.....	14
II.6.4.1. Ampérométriques.....	14
II.6.4.2. Potentiométriques	15
II.6.4.3. Conductimétriques.....	16
II.6.4.4. Impédancemétriques.....	17
II.7. Méthodes d'immobilisation du biorécepteur.....	17
II.8. Caractéristiques des biocapteurs.....	19
II.9. Domaines typiques d'application des biocapteurs.....	20
Chapitre III : Les biocapteurs à base des polymères	
III.1. Généralités sur les polymères.....	21
III.2. Les polymères utilisés pour l'immobilisation des enzymes.....	22
III.2.1. Les polymères non conducteurs.....	22
III.2.2. Les polymères conducteurs.....	23
III.2.3. Le polyneutral red (PNR).....	23
III.3. Biocapteurs à base de polymères électrogénérés.....	26
III.3.1. Encapsulation.....	27
III.3.2. Adsorption.....	28
III.3.3. Greffage chimique.....	28
III.3.4. Ancrage par interactions affines.....	29
III.3.5. Polymérisation de monomères bio-fonctionnalisés.....	29
III.4. Intégration des polymères conducteurs dans les biocapteurs.....	30
Conclusion.....	32
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

λ : Longueur d'onde

ADN: Acide Désoxyribonucléique

IR: Infrarouge

IUPAC: International Union for Pure and Applied Chemistry

Med: Médiateur

NAD: Nicotinamide- Adénine- dinuclotide

NR: Neutral red

OX: Oxydant

P: Produit

PA: Polyamide

PC: polycarbonate

PE: Polyéthylène

PEs: Polyester

PNR: Polyneutral red

PP: Polypropylène

PS: Polystyrène

PVC: Polychlorure de vinyle

Red: Réducteur

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RX: Rayonnement X

S: Substrat

UV: Ultraviolet

Liste des figures

Figure I.1 : Schéma du principe d'un capteur.....	2
Figure I.2 : Constituants d'un capteur.....	3
Figure I.3 : Quelques exemples des capteurs physiques (balance, thermomètre et spectrophotomètre UV-Visible).....	4
Figure I.4: Quelques exemples des capteurs chimiques (conductimètre et pH-mètre).....	5
Figure II.1: Principe générale d'un biocapteur.....	8
Figure II.2: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	9
Figure II.3: Représentation schématique des différents biorécepteurs.....	11
Figure II.4: Schéma d'exemple d'un biocapteur thermique.....	11
Figure II.5: Schéma de principe d'un capteur à fibres optiques.....	13
Figure II.6: Schéma d'exemple d'un biocapteur piézoélectrique.....	14
Figure II.7: d'exemple d'un biocapteur ampérométrique : transferts des électrons courant.....	15
Figure II.8: Schéma d'exemple d'un biocapteur potentiométrique : accumulation de charge potentielle.....	16
Figure II.9: Schéma d'exemple d'un biocapteur conductimétrique : migration des ions résistances.....	16
Figure II.10: Schéma d'un capteur redox.....	17
Figure III.1: Exemples des polymères isolant.....	21
Figure III.2: Polymères utilisés dans l'élaboration d'électrodes enzymatiques.....	22
Figure III.3: Mécanisme de polymérisation du phénol.....	23
Figure III.4: Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation à base de polymères électrogénérés illustrées pour un biocapteur enzymatique.....	26

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Principaux événements marquants l’histoire des biocapteurs.....	8
Tableau II.2 : Principaux événements marquants l’histoire des capteurs chimiques.....	14
Tableau II.3 : Exemples de supports d’immobilisation.....	18
Tableau II.4: Domaines d'applications des biocapteurs.....	20
Tableau III.1: Exemple de biocapteurs utilisant la molécule de neutral red comme médiateur d’enzymes.....	25

Résumé

Dans le domaine des biocapteurs, des nouveaux nanomatériaux, apparaissent, tels que les polymères comme outils très prometteurs pour l'amélioration des performances du biocapteur. Les polymères sont considérés comme des matériaux efficaces pour l'immobilisation des biomolécules et la transduction/amplification du signal électrique au sein de capteur. Les polymères permettent d'augmenter la surface de contact avec le milieu environnant ainsi que la densité de greffage des biomolécules et de maintenir la stabilité et l'activité de la biomolécule.

L'objectif de ce travail est l'étude de la synthèse d'immobilisation des biomolécules ; visant à développer à terme un biocapteur pour la détection. Ces nouvelles procédures de fonctionnalisation de surface utilisées pour immobiliser les biomolécules.

Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à définir les polymères en tant que nanomatériaux utilisés pour la fabrication des biocapteurs développés.

Mots clés : Capteur, biocapteur, polymère, l'immobilisation de biorécepteur.

Abstract

In the field of the biosensors, the new nanomaterials ones appear, such as polymers like very promising tools for the improvement of the performances of the biosensor. The polymers are regarded as effective materials for the immobilization of the bimolecular and the transduction/amplification of the electric signal within sensor. The polymers make it possible to increase the surface of contact with the surrounding medium as well as the density of grafting of the bimolecular and to maintain the stability and the activity of the bimolecular.

The objective of this work is to study the synthesis of immobilization of the bimolecular; aiming at in the long term developing a biosensor for detection. These new procedures of fonctionnalisation of surface used to immobilize the bimolecular.

In what follows, we will be interested to define polymers as nanomaterials used for the manufacture of the developed biosensors.

Key words: Sensor, biosensor, polymer, the immobilization of bioreceiver.

المخلص

في مجال اللواقط الحيوية، ظهرت العديد من المواد النانومترية الجديدة والتي من بينها متعددات الأجزاء، التي تعتبر أداة واعدة لتحسين نتائج اللواقط الحيوية. متعددات الأجزاء هي مواد فعالة في تثبيت الجزيئات الحيوية ونقل وتضخيم الإشارة الإلكترونية داخل اللاقط تسمح متعددات الأجزاء بزيادة وتوسيع مساحة التماس مع الوسط المحيط إضافة إلى زيادة نشاط واستقرار الجزيئات الحيوية. الهدف من هذا العمل هو دراسة تثبيت الجزيئات الحيوية بحيث التركيز على تطوير لاقط حيوي خاص بالكشف وذلك بالإجراء الوظيفي للسطح واستعماله في تثبيت الجزيئات الحيوية. وبالتالي الاهتمام بتعريف متعددات الأجزاء كمواد مجهرية يساهم في استعماله لصنع لواقط حيوية متطورة. **الكلمات المفتاحية :** اللاقط، اللاقط الحيوي، متعدد الأجزاء، تثبيت المستقبل الحيوي.

Introduction :

Les biocapteurs sont des dispositifs d'analyse qui répondent à ces exigences pour la détection et le dosage d'espèces chimiques ou biochimiques, et ils peuvent par conséquent être envisagés en remplacement de certains instruments généralement utilisés.

Cependant, malgré les efforts intenses faits en matière de recherche, très peu de réalisations commerciales ont vu le jour, en raison de leur principal inconvénient qui réside dans la dénaturation et l'instabilité de la molécule biologique. Pour remédier à ces problèmes, les recherches actuelles sont orientées vers la création et l'amélioration des stratégies d'immobilisation déposées sur l'élément biologique. Parmi les différentes stratégies d'immobilisation employées, l'une des plus prometteuses est celle qui consiste à utiliser des polymères. En effet, ceux-ci permettent de préserver l'accessibilité des macromolécules biologiques greffées sur la surface du transducteur tout en alliant une grande précision et une bonne reproductibilité des dépôts dues à leur adressage électrochimique. En raison de leurs propriétés aisément modulables.

Dans ce travail, nous avons donné une revue sur les biocapteurs et les différents polymères utilisés pour les biocapteurs.

Ce mémoire comprend trois chapitres :

- Le premier chapitre présente des généralités sur les capteurs.
- Le deuxième chapitre est réservé aux différents types des biocapteurs et leurs applications.
- Le dernier chapitre est consacré aux quelques exemples des biocapteurs élaborés grâce à des polymères.

I.1. Définition :

Le capteur est le dispositif qui transforme une grandeur mesurande non électrique (physique, chimique ou biologique) en une grandeur électrique « signal » (charge, tension, courant ou impédance) [1,2].

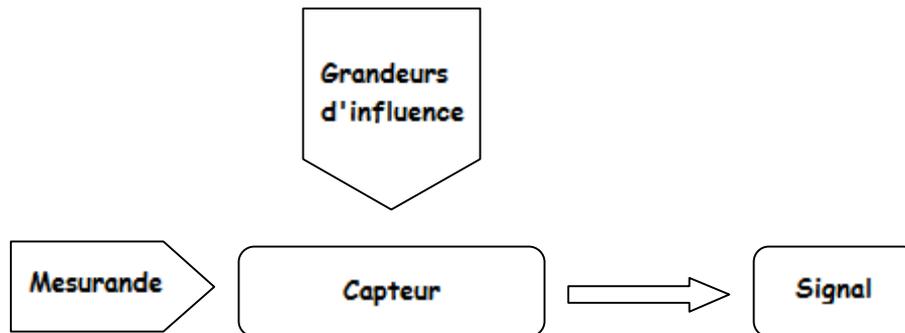


Figure I.1 : Schéma du principe d'un capteur [3].

Exemple :

- **Le papier pH est-il un capteur :**

On pourrait répondre a priori oui, car il acquiert une variable quantifiable (le pH) sous forme de grandeur physique mesurable (longueur d'onde de la couleur prise) avec une transduction optique/électrique [2].

I.2. Capteur ou sensor :

Certains pays francophones utilisent le terme *sensor* qui est une traduction anglaise de capteur. Cette expression a l'avantage de ne pas être ambiguë au niveau du langage, par comparaison avec le mot capteur, car elle fait référence aux organes sensoriels, dont la fonction est équivalente à celle des capteurs dont les espèces vivantes sont pourvues. Si le mot *sensor* était adopté par les instances d'autorité (IUPAC, Académie Française), le terme capteur pourrait alors être réservé aux dispositifs qui piègent réellement les entités pour permettre ultérieurement une mesure quantitative ou qualitative [2].

I.3. Grandeurs d'influence :

Parmi les grandeurs d'influence usuelles on peut répertorier [3] :

- La température du milieu dans lequel évolue le capteur.

- Des grandeurs mécaniques auxquelles est associé le capteur (position, vitesse, accélération, etc.).
- Des grandeurs chimiques associées au milieu (pH, concentrations en certains ions...).
- Les champs électromagnétiques et les grandeurs électromagnétiques associées (champ E, B, etc.).
- Les rayonnements parasites de type nucléaire, X, gamma...
- La pression de vapeur saturante, etc.

I.4. Constituants d'un capteur :

Les différentes parties constitutives d'un capteur sont décrites (Figure I.2) [4] :

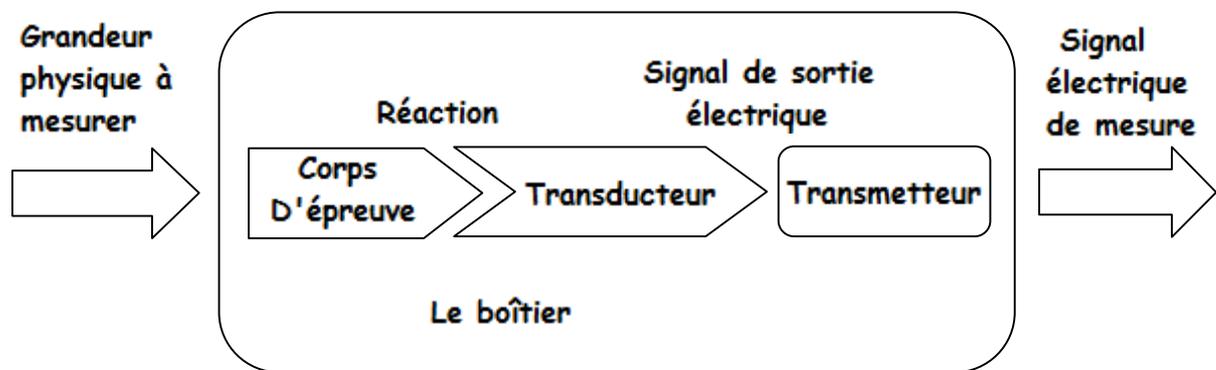


Figure I.2 : Constituants d'un capteur [4].

- **Corps d'épreuve :**

Le corps d'épreuve est un élément qui réagit sélectivement avec la grandeur à mesurer. Il transforme la grandeur à mesurer en une autre grandeur physique mesurable.

- **Transducteur :**

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

- **Transmetteur :**

Le transmetteur est un élément d'amplification, de filtrage et de mise à niveau du signal de sortie pour sa transmission à distance. Il peut être incorporé ou non au capteur.

- **Le boîtier :**

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

I.5. Différents types du capteur :

Il existe plusieurs classifications des capteurs. La plus répandue se réfère à la nature des mesurandes ou à la transduction, de façon indépendante de l'utilisation [2].

- Capteurs physiques :

Ce sont des dispositifs sensibles à des phénomènes physiques, les mesurandes étant notamment la température, la pression (totale), la masse, la vitesse, le déplacement, la position (niveau), le débit, la force (accélération), le rayonnement (visible, UV, RX, gamma, IR, micro-ondes).

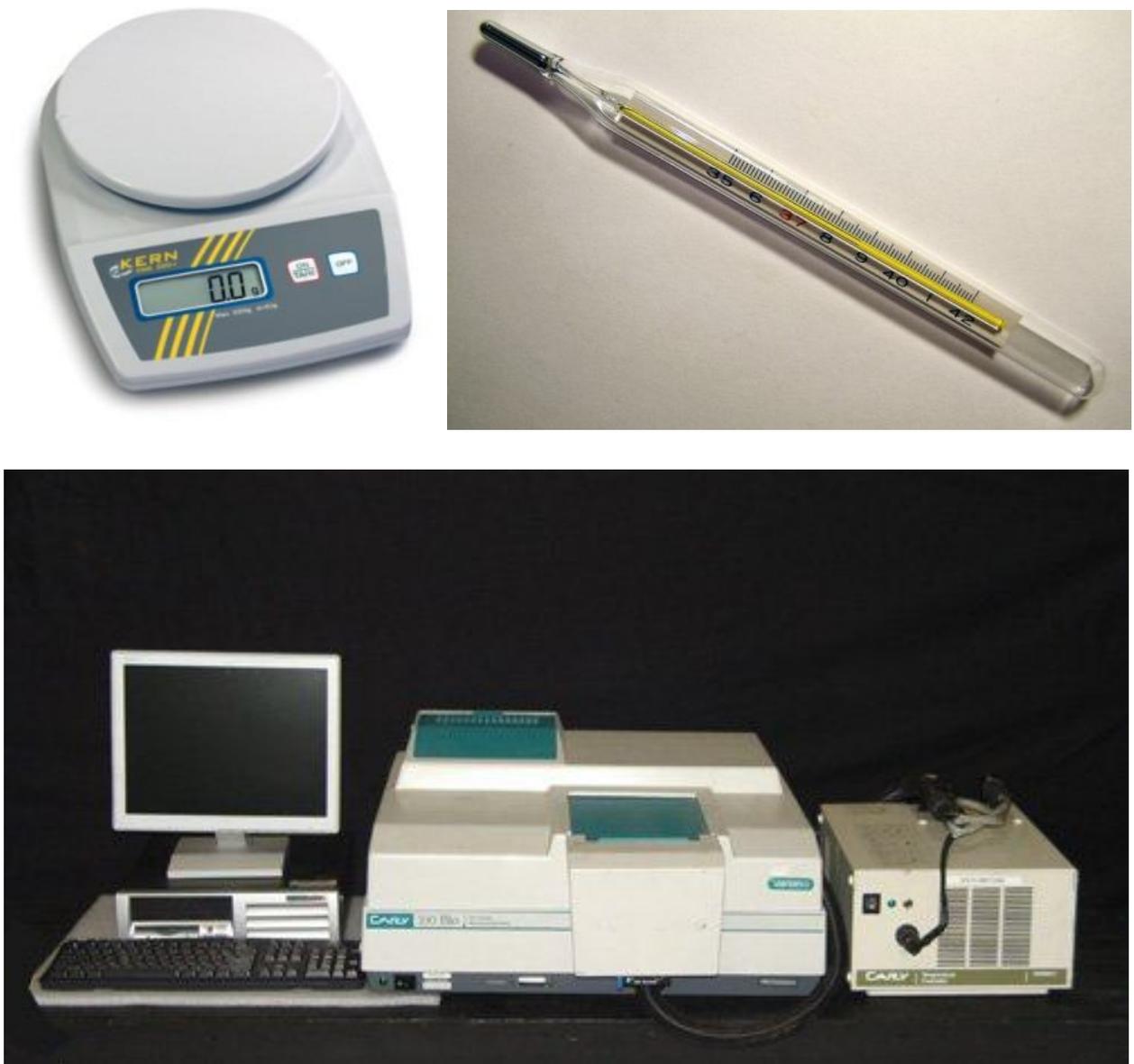


Figure I.3 : Quelques exemples des capteurs physiques (balance, thermomètre et spectrophotomètre UV-Visible) [2].

- Capteurs chimiques :

On désigne ainsi les capteurs permettant de déterminer des mesurands chimiques, c'est-à-dire des pressions partielles pour les espèces en phase gazeuse, les concentrations (activités) pour les espèces en solution (ions ou molécules dissoutes). Ils ont généralement une double fonction : identification et quantification.



Figure I.4 : Quelques exemples des capteurs chimiques (conductimètre et pH-mètre) [2].

I.6. Caractéristiques du capteur :

Les caractéristiques d'un capteur par rapport à la nature de la grandeur à mesurer et aux conditions de mesure sont appréciées en déterminant certains paramètres comme [2, 3, 5] :

- Résolution :

Se définit comme la plus petite valeur de variation du mesurande donnant une lecture significative de la grandeur à mesurer.

- Reproductibilité :

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

- Sensibilité :

Ce paramètre caractérise l'aptitude du capteur à détecter la plus petite variation de la grandeur à mesurer. Il est calculé par le quotient de l'accroissement de la réponse d'un instrument de mesure par l'accroissement correspondant du signal d'entrée.

- Sélectivité :

C'est la capacité du capteur à ne mesurer qu'une seule grandeur dans le milieu où il est utilisé ou en d'autres termes, d'être le plus insensible aux grandeurs d'influence, grandeurs qui ne font pas l'objet de la mesure, mais qui influent sur la sortie du capteur.

- Limite de détection :

C'est la petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable. Qui donnant un signal du bruit de fond.

- Domaine de linéarité :

C'est la zone linéaire comprise entre le seuil de détection et le temps de réponse.

- Réponse de capteur ou dynamique :

C'est la zone qui représente le domaine de réponse du capteur avant saturation. Cette réponse est fonction de la diffusion des substances impliquées dans la réaction.

- Dérive et stabilité :

C'est l'évolution du signal en fonction du temps.

- la réversibilité :

C'est l'aptitude que possède un capteur à redonner la même valeur après des fluctuations du mesurande.

- Précision, justesse :

Une mesure sera dite juste lorsque les valeurs obtenues au cours de plusieurs déterminations sont très proches. Elle est précise lorsque l'erreur aléatoire est très faible.

- Temps de réponse :

Il correspond au temps nécessaire pour que le capteur délivre une certaine proportion de la pleine amplitude du signal.

I.7. Domaines d'application du capteur :

Les principales applications concernent le contrôle des bioprocédés. Spécialement les capteurs chimiques, ils trouvent, ou trouveront, leur utilité dans les domaines suivants [2] :

- L'**environnement** (analyses d'effluents et de milieux naturels, liquides ou gazeux), pour mesurer la demande biologique en oxygène, la teneur en matières organiques et organophosphorées, le pouvoir oxydant, le pH des effluents, l'émanation d'hydrocarbures dans les gaz de combustion...
- Le secteur **automobile** avec le contrôle de la combustion, de l'habitacle, de la charge des batteries...
- L'**agroalimentaire** (procédés et qualité des produits) par l'analyse du glucose, du lactate, du saccharose dans la fabrication des confitures, de l'éthanol dans les boissons alcoolisées...
- L'**agriculture** (analyse des sols et des eaux d'irrigation).
- Le **biomédical** (diagnostic, surveillance par exemple lors des anesthésies) pour l'analyse du glucose, de l'urée, du cholestérol, des ions minéraux, du pH...
- La **domotique** pour la surveillance de fuites de gaz et émanations toxiques, la dureté de l'eau, le contrôle des cuissons, la qualité de l'habitacle, l'optimisation de la combustion au niveau des chaudières domestiques...

Le développement industriel est fonction du marché potentiel, car la valeur ajoutée sur un capteur reste toujours relativement faible, le développement est donc fonction de la potentialité d'une production de masse et, sachant que dans ce cas le cout d'un capteur doit rester très bas, on comprend que les techniques de production s'orientent vers les microtechnologies.

II.1. Historique des biocapteurs :

Le premier biocapteur a été l'œuvre de Leland Clark en 1950 dans le but de mesurer la concentration en oxygène dissous dans le sang. En 1962, ce même biocapteur est adapté afin de quantifier le taux (ou concentration) de glucose dans le sang. Puis en 1967, Updike et Hicks élaborent les premières électrodes enzymatiques. Depuis les années 70, un effort considérable a été fait dans leur développement du fait de leurs applications dans des domaines diverses et variés (médecine, agro-alimentaire, ou contrôle environnemental). En effet, de par leur petite taille, leur facilité d'utilisation et la possibilité de les utiliser sur site, ce sont des éléments d'analyse particulièrement avantageux et intéressants [6].

Tableau II.1 : Principaux événements marquant l'histoire des biocapteurs [7].

Date	Événement
1962	Première description de biocapteur : électrode à enzyme ampérométrique pour le glucose
1969	Premier biocapteur potentiométrique
1972-1975	Premier biocapteur commercial : biocapteur de glucose
1982	Premier biocapteur à base de fibre optique pour le glucose
1984	Premier biocapteur ampérométrique à médiation : pour la détection du glucose
1987	Commercialisation d'un biocapteur pour doser le glucose dans le sang

II.2. Définition d'un biocapteur :

Un biocapteur est un dispositif analytique capable de fournir des informations quantitatives ou semi-quantitatives. Il est constitué d'un élément biologique intimement lié à un transducteur. Le bioélément immobilisé reconnaît spécifiquement un substrat et le transducteur transforme le signal biochimique en un signal physique mesurable [1,5]. C'est un analyseur biologique conçu pour fonctionner en continu, semi continu ou discontinu, in situ et donner une réponse en temps réel sur la qualité des flux au sein desquels il est placé [5].

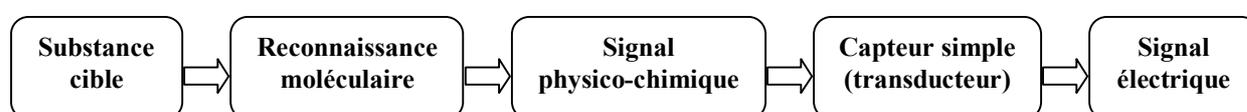


Figure II.1 : Principe générale d'un biocapteur [1].

II.3. Structure et principe d'un biocapteur :

La construction d'un biocapteur est essentiellement basée sur l'immobilisation du biorécepteur sur un transducteur (Figure II.2). En effet, c'est grâce à la combinaison judicieuse d'un composant biologique et d'un transducteur qu'un biocapteur permet la détection et le dosage d'un composé d'intérêt, appelé « analyte », dans un milieu complexe [8].

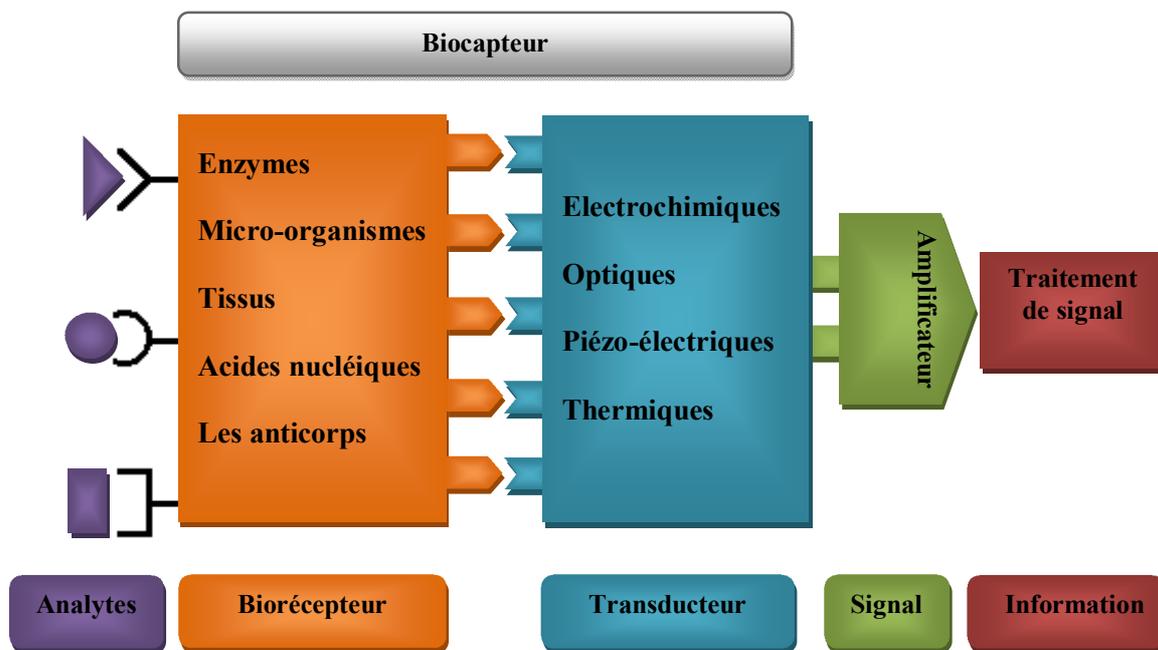


Figure II.2 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur [9].

Le biocapteur est composé de trois éléments principaux :

- **Le biorécepteur :**

Le biorécepteur constitue l'élément de capture spécifique du biocapteur et en théorie, toute structure biochimique ou biologique possédant cette capacité de reconnaissance spécifique est utilisable. [1]

- **Le transducteur :**

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique, issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur, pour la transformer en signal électrique [1,5].

- **Le conditionneur :**

C'est l'élément qui peut assurer des rôles d'amplification, acquisition et traitement du signal pour le transformer en une information dans un format approprié pour l'utilisateur. [8]

II.4. Classification du biocapteur :

Les biocapteurs peuvent être classés suivant différents critères [9] :

- **Par type de biorécepteur :** biocapteurs enzymatiques, immunologiques, etc...
- **Par type de transducteur :** biocapteurs optiques, électrochimiques, thermiques, etc...

II.5. Types du biorécepteur :

Le choix du biorécepteur est également lié à celui du transducteur selon la nature du signal biologique émis (modifications physico-chimiques, fluorescence, ...). De plus, le biorécepteur doit répondre à un certain nombre d'exigences telles que la stabilité de son signal ou sa facilité d'immobilisation.

- **Les enzymes :**

Les plus utilisées et les plus commercialisées. En effet, elles présentent un grand nombre d'avantages notamment la reproductibilité des lots mais par contre il peut y avoir une instabilité de leur fonctionnement et la nécessité d'utiliser un cofacteur ou plusieurs enzymes associées pour un même biocapteur [10].

- **Les microorganismes (cellules entières) :**

Principalement utilisés en cas de systèmes réactionnels complexes puisque les enzymes et cofacteurs essentiels y sont intrinsèquement présents [11].

- **Les tissus et organites (structures spécialisées contenues dans les cellules) :**

Aussi bien d'origine animale que végétale. Ils sont surtout utilisés pour la détection des aminoacides de par leur robustesse et leur bonne cohésion [12].

- **Les anticorps-antigènes:**

Le développement de biocapteurs immunologiques s'appuie sur la reconnaissance moléculaire des anticorps-antigènes. La réaction de couplage antigène-anticorps peut alors être suivie par détection électrochimique ou optique. Un grand nombre de travaux ont eu recours au marquage de l'anticorps ou de l'antigène par une enzyme qui permet de suivre facilement la réaction de reconnaissance moléculaire [13].

- **L'ADN :**

L'utilisation de séquences d'ADN comme biorécepteurs sur des puces à ADN suscite aujourd'hui un intérêt croissant. Le principe repose sur la détection d'évènements d'hybridation reflétant la reconnaissance entre deux séquences complémentaires [14].

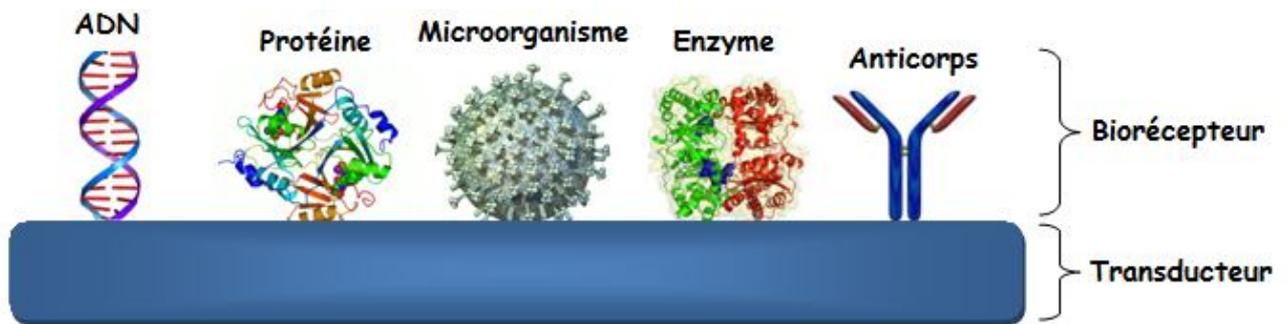


Figure II. 3 : Représentation schématique des différents biorécepteurs [15].

II.6. Types du transducteur :

Plusieurs types de transducteurs sont employés pour la construction des biocapteurs :

II.6.1. Thermiques :

Cette technique utilise les propriétés énergétiques des réactions enzymatiques. Cette méthode fait essentiellement appel aux réactions exo ou endothermiques. Pour ce type de biocapteur, il n'est pas nécessaire de mesurer le produit de la réaction, seule la chaleur dégagée au cours de la réaction est exploitée dans la mesure. Ainsi, la fixation de l'enzyme sur un capteur de température permet de réaliser un biocapteur par le suivi de la variation thermique induite par la réaction enzymatique. Des biocapteurs thermiques ont été réalisés dans le domaine pharmaceutique et clinique pour doser le cholestérol [16].

Ces biocapteurs sont adaptés aux mesures en continu ; en outre ils ne sont pas sensibles à la lumière. Cependant, à cause de leur prix élevé et de la difficulté de leur mise en œuvre, ces appareils ne sont pas couramment utilisés.

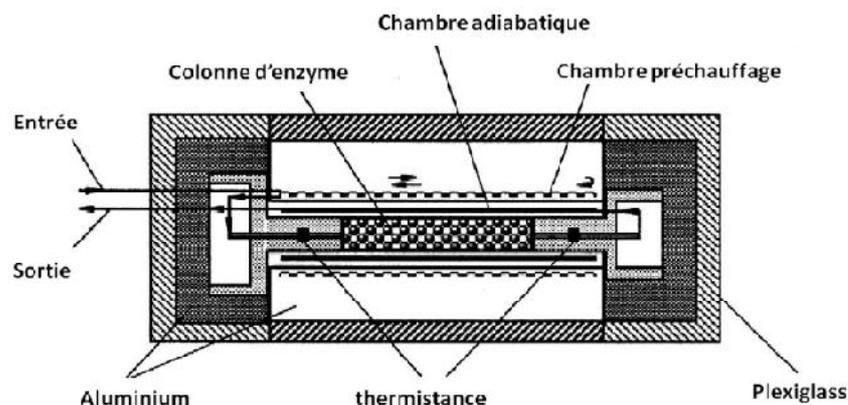


Figure II.4 : Schéma d'exemple d'un biocapteur thermique [6].

II.6.2. Optiques :

Les capteurs optiques sont des outils qui mettent en jeu des réactions basées sur des réactifs colorés ou des composés luminescents. Le principe de détection est d'utiliser une réaction biocatalytique qui engendre la modification des propriétés optiques de l'un des constituants. Ce composé optiquement actif peut être directement issu de la réaction biochimique ou être un médiateur qui est susceptible de réagir avec un produit de réaction pour donner un composé photodélectable.

Les capteurs à fibre optique se divisent en deux catégories :

- **Les capteurs intrinsèques :**

Les capteurs à fibre optique sont intrinsèques lorsque l'élément sensible est constitué par une ou plusieurs fibres optiques. Ces capteurs, dont les caractéristiques de transmission, de réflexion ou d'émission de la lumière sont fonctions de ces fibres, peuvent détecter les variations de pression, de température ou de champ magnétique.

- **Les capteurs extrinsèques :**

Les capteurs à fibre optique sont extrinsèques lorsque les caractéristiques de la lumière sont modifiées par la grandeur à mesurer à l'extérieur de la ou des fibres optiques : par exemple, un réactif immobilisé dont l'interaction avec le composé à doser change ses propriétés optiques (l'absorption, la fluorescence et la chimie/bioluminescence). Dans ce cas, la fibre sert au transport de la lumière vers l'élément sensible et son retour vers l'appareil de mesure. Ce sont en générale les capteurs extrinsèques qui servent de base à la réalisation de biocapteurs.

Les biocapteurs à fibre optique présentent des qualités fortes intéressantes : faible coût de production, possibilité de miniaturisation pour des dosages in vivo, possibilité de fonctionnement à haute température, en milieu corrosif ou explosif, inertie chimique et surtout extrême sensibilité [17].

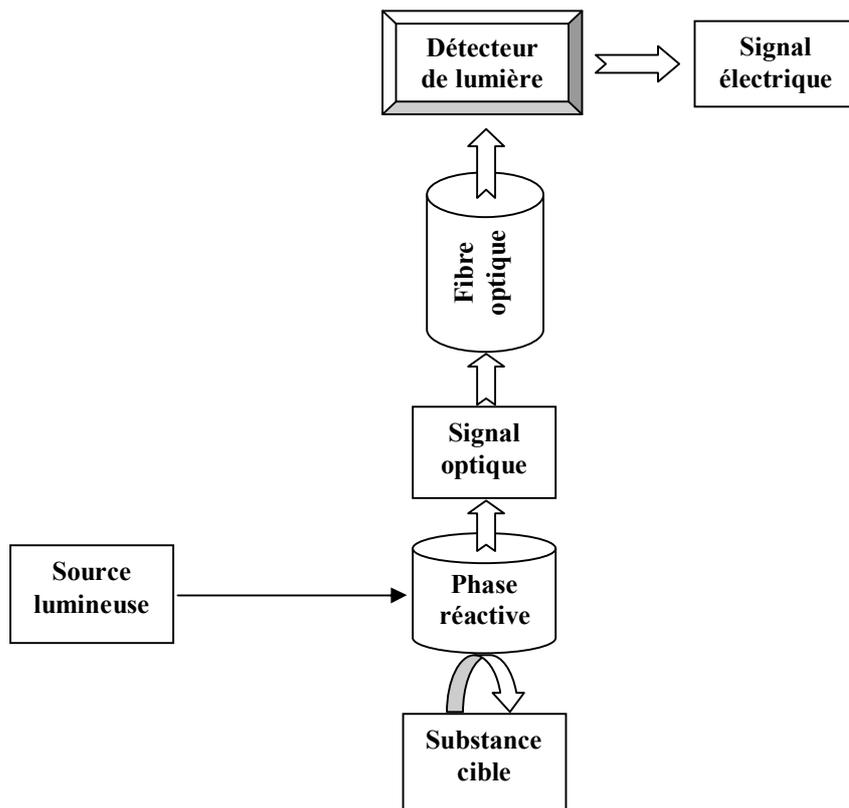


Figure II.5 : Schéma de principe d'un capteur à fibres optiques [18].

II.6.3. Piézo-électriques :

Le concept de la transduction piézoélectrique est basé sur la mesure de la masse d'un échantillon déposé sur la surface d'un cristal piézoélectrique par l'intermédiaire de la variation de sa fréquence de résonance. Ces cristaux piézoélectriques sont donc capables de traduire un effet mécanique en signal électrique et réciproquement.

Ainsi, en suivant la variation de la fréquence de résonance du quartz lors de la réaction, on peut accéder à la variation de la masse.

Des biocapteurs piézoélectriques sont développés dans le domaine médical, pour la détection de virus, des antigènes ou des anticorps, dans le contrôle environnemental, pour la détection de métaux lourds et de pesticides [19].

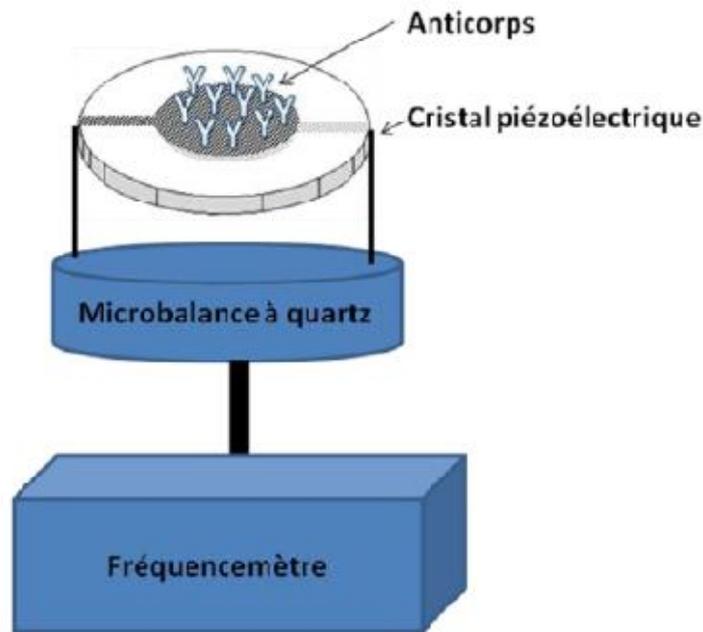


Figure II.6 : Schéma d'exemple d'un biocapteur piézoélectrique [6].

II.6.4. Electrochimiques :

Les biocapteurs électrochimiques sont des électrodes sur lesquelles est déposé un bioélément immobilisé dans une matrice hôte. L'enzyme est l'élément biologique le plus utilisé dans l'élaboration de ce type de capteurs. L'ampérométrie et la potentiométrie sont en général appliquées dans ce domaine, mais d'autres techniques telles que la conductimétrie, la spectroscopie d'impédance électrochimique (impédancemétrie) est aussi utilisée.

Tableau II.2 : Principaux événements marquants l'histoire des capteurs chimiques [7].

Date	Evénement
1922	Première électrode de pH en verre
1956	Invention de l'électrode à oxygène
1975	Invention de l'électrode pO ₂ /pCO ₂
1980	Premier capteur de pH à fibre optique pour les gaz du sang in vivo

II.6.4.1. Ampérométries :

Les biocapteurs ampérométries sont les plus développés à ce jour, tant au niveau de la recherche qu'au niveau de l'application industrielle. Dans ce cas, l'enzyme immobilisée consomme ou produit une espèce électroactive au cours de la réaction enzymatique. La détection d'un substrat

est réalisée via l'oxydation ou la réduction de cette espèce directement à la surface de l'électrode, cette dernière étant maintenue à un potentiel adéquat [20].

On distingue trois générations de biocapteurs ampérométriques.

Première génération :

La première génération correspond aux biocapteurs dans lesquels l'espèce enzymatiquement générée est directement oxydée ou réduite au niveau de l'électrode.

Deuxième génération :

La deuxième génération des biocapteurs ampérométriques a été développée pour réduire les phénomènes d'interférences en abaissant le potentiel de détection de l'espèce électroactive. La détection s'effectue via l'oxydation ou la réduction d'un médiateur redox qui interagit avec l'espèce enzymatiquement générée.

Troisième génération :

Il s'agit de biocapteurs au sein desquels l'enzyme est directement connectée à l'électrode afin de simplifier le transfert d'électrons. Ce système permet de s'affranchir des problèmes d'interférences rencontrés lors des dosages dans les milieux complexes.

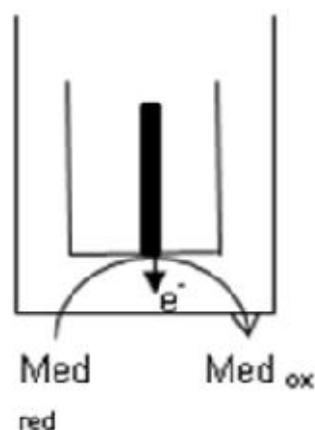


Figure II.7 : Schéma d'exemple d'un biocapteur ampérométrique : transferts des électrons courant [6].

II.6.4.2. Potentiométriques :

Les capteurs potentiométriques se basent sur la mesure de la différence de potentiel électrochimique de l'espèce chimique impliquée dans la réaction enzymatique en fonction du temps.

Ce type de capteurs couvre une large gamme de concentrations, mais reste néanmoins très peu sensibles à de faibles variations. Ils sont souvent conçus par une association d'une enzyme et d'une électrode sélective ionique [21].

électrode de référence



Figure II.8 : Schéma d'exemple d'un biocapteur potentiométrique : accumulation de charge potentielle [6].

II.6.4.3. Conductimétriques :

Les capteurs conductimétriques consistent en deux électrodes de platine ou d'or de faibles dimensions entre lesquelles l'élément biologique est immobilisé. Le produit de la réaction enzymatique engendre une variation de la conductivité entre les électrodes, ce qui permet d'enregistrer le signal. Cependant, la mesure intègre tous les ions présents dans la solution ; ces instruments ne sont donc pas sélectifs.

Les biocapteurs conductimétriques sont de plus en plus utilisés en particulier dans le contrôle de la pollution par les pesticides et les métaux lourds [22].

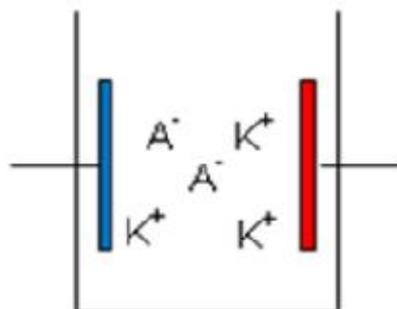


Figure II.9 : Schéma d'exemple d'un biocapteur conductimétrique : migration des ions résistances [6].

II.6.4.4. Impédancemétries :

Ces capteurs se basent sur la mesure de l'impédance suite à une perturbation sinusoïdale en potentiel de faible amplitude, appliquée au système étudié.

Cette technique est largement utilisée dans l'étude cinétique des systèmes électrochimiques mono ou multi-couches. Ainsi, ces capteurs présentent plusieurs avantages comme la rapidité, la possibilité de miniaturisation et le faible coût [23].

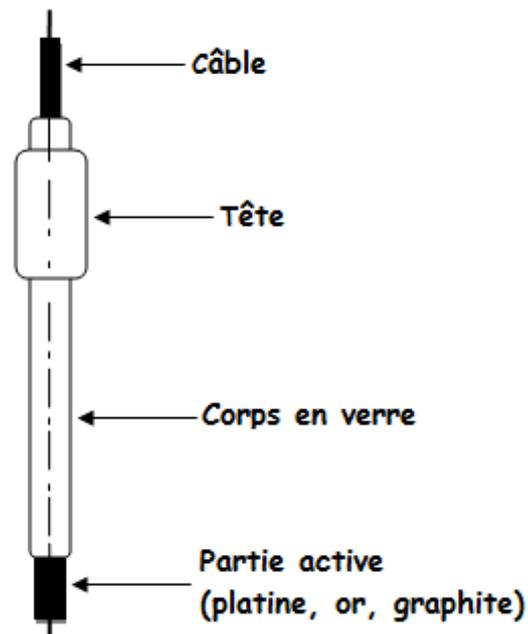


Figure II.10 : Schéma d'un capteur redox [24].

II.7. Méthodes d'immobilisation du biorécepteur :

A fin de pouvoir être associé aisément au transducteur, l'élément biologique sensible est généralement immobilisé sur, ou dans, un support artificiel [1]. Les méthodes d'immobilisation sont habituellement réparties en cinq catégories : l'adsorption, l'inclusion, le confinement, la réticulation et le couplage covalent. Des supports de différents types et de différentes natures ont été utilisés (Tableau II.3) [18].

Tableau II.3 : Exemples de supports d'immobilisation [18].

Type d'immobilisation	Type de support
Adsorption	Agarose, alumine, amidon, carbone, cellulose, gel de silice, polyamide, polystyrène, polyuréthane
Inclusion	Gels (amidon, gélatine, polysiloxane, polystyrène, silice)
Confinement	Membranes de dialyse et membranes d'ultrafiltration
Couplage covalent	Polyaminoacides et protéines Polysaccharides Polymères synthétiques Supports inorganiques

- **L'adsorption :**

L'adsorption est simplement due à des interactions entre le biorécepteur et son support. Des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène, de Van der Waals, hydrophobes) s'établissent entre le biorécepteur et le support. Cette méthode est donc peu utilisée pour la mise en œuvre de biocapteurs.

- **L'inclusion :**

Cette méthode consiste à incorporer le biorécepteur dans un polymère se présentant généralement sous forme de gel. Le biorécepteur n'est donc pas directement lié à son support.

L'inclusion est principalement utilisée pour l'immobilisation de cellules entières ou de fractions subcellulaires.

- **Le confinement :**

Dans la technique de confinement, le biorécepteur reste en solution à l'intérieur d'un compartiment limité par une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que les petites molécules.

- **La réticulation :**

La réticulation est utilisée pour accroître la stabilité des complexes enzyme-support obtenus après adsorption ou inclusion.

- **Le couplage covalent :**

La fixation covalente de biorécepteurs, essentiellement des protéines, sur supports activés se fait par l'établissement de liaisons covalentes entre des groupements fonctionnels du support et des groupements fonctionnels du biorécepteur n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire.

II.8. Caractéristiques des biocapteurs :

Le caractère opérationnel d'un biocapteur est habituellement évalué sur la base de quatre critères [1] : spécificité, stabilité du biorécepteur, réutilisation et seuil de détection.

- **Spécificité :**

La spécificité est apportée par le biorécepteur, le plus souvent une enzyme. La spécificité est une propriété inhérente d'une enzyme et ne peut pratiquement pas être modulée. Certaines enzymes ont une spécificité très étroite.

Exemple 1 : le cas de glucose oxydase qui ne reconnaît que le β -D-glucose.

Exemple 2 : d'autres ont une spécificité plus large comme les phosphates (acides ou alcalines) qui catalyseront l'hydrolyse de pratiquement tous les monoesters phosphoriques naturels ou synthétiques.

- **Stabilité :**

La stabilité, c'est-à-dire l'aptitude à maintenir l'activité catalytique au cours du temps, est également une propriété inhérente d'une enzyme donnée. Cependant, certains paramètres expérimentalement contrôlables comme le pH, la nature du tampon ou la température, influent sur la stabilité.

Exemple : le glucose oxydase est une enzyme particulièrement stable qui peut supporter de rester à température ambiante pendant plusieurs jours sans perte notable d'activité.

- **Réutilisation :**

La réutilisation de l'élément sensible du biocapteur est rendue possible par le fait même de l'immobilisation. Selon le type d'application envisagée (analyse au coup par coup, en continu, capteur d'alerte) et la cadence d'analyse désirée, cet avantage sera exploité ou non.

- **Seuil de détection :**

Le seuil de détection n'est pas forcément le paramètre le plus déterminant. Il est souvent plus important de considérer la gamme dynamique de mesure qui permettra d'apprécier l'adéquation entre les performances du biocapteur et les exigences de l'utilisateur.

Exemple : un biocapteur à éthanol pour le suivi de fermentations alcooliques ne nécessite pas un seuil bas dans la mesure où les échantillons à doser auront une teneur en alcool comprise entre 0.08 et 2 mol.l⁻¹.

La limite de détection ainsi que la gamme dynamique de mesure dépendent à la fois des propriétés intrinsèques du biorécepteur (caractéristiques cinétiques pour une enzyme, constante d'affinité pour un anticorps) mais également du type de détection associée à la reconnaissance moléculaire. Cependant, on peut citer quelques valeurs moyennes de limite de détection :

- 0.1 µmol.l⁻¹ pour de nombreuses électrodes enzymatiques.
- 1 µmol.l⁻¹ pour les thermistances à enzymes.
- 10 µmol.l⁻¹ pour les biocapteurs optiques à détection de fluorescence.
- 0.1 µmol.l⁻¹ pour les biocapteurs optiques à détection de chimiluminescence.
- 0.1 µmol.l⁻¹ pour les biocapteurs optiques à détection de bioluminescence.

II.9. Domaines typiques d'application des biocapteurs :

Les principales applications concernent le contrôle des bioprocédés. Cependant, on ne peut ignorer les deux autres grands domaines d'applications qui sont l'analyse médicale et l'environnement (Tableau II.4) [1].

Tableau II.4 : Domaines d'applications des biocapteurs [25].

Domaine d'application	Types de biocapteur	Utilisation
Agroalimentaire	Optique	- quantification des divers acides - détection des contaminants (pathogènes, pesticides)
Station d'épuration	Ampérométrique	- mesure des métaux lourds - mesure de polluants organiques
Santé	Ampérométrique	- estimation du glucose, cholestérol - détection de l'éthanol dans le sang humain - traitement de la maladie d'Alzheimer
Environnement	Potentiométrique	- détection des composés toxiques

III.1. Généralités sur les polymères :

On appelle polymère une grande molécule constituée d'unités fondamentales appelées monomères (ou motifs monomères) reliées par des liaisons covalentes.

Un monomère est un composé constitué de molécules simples pouvant réagir avec d'autres monomères pour donner un polymère.

Contrairement au polymère, un monomère a une faible masse moléculaire.

Le terme macromolécule est souvent utilisé à la place de polymère.

La polymérisation est la réaction qui, à partir des monomères, forme en les liants des composés de masse moléculaire plus élevée, les polymères ou macromolécules. Les noyaux des monomères sont le plus souvent constitués des molécules organiques ou d'un atome de silicium (polymères siliconés).

Un homopolymère est un polymère qui comporte des motifs monomères tous identiques.

Un copolymère est un polymère qui comporte des motifs monomères de deux ou plus sortes différentes.

Les polymères peuvent être d'origine naturelle (animale ou végétale) ou d'origine synthétique. Les macromolécules naturelles sont les caoutchoucs, les polysaccharides, le glycogène, l'ADN, les protéines...

Les macromolécules synthétiques sont représentées par exemple par le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS), le polychlorure de vinyle (PVC), les polyesters (PEs), les polycarbonates (PC), les polyamides (PA)...etc (Figure III.1) [26].

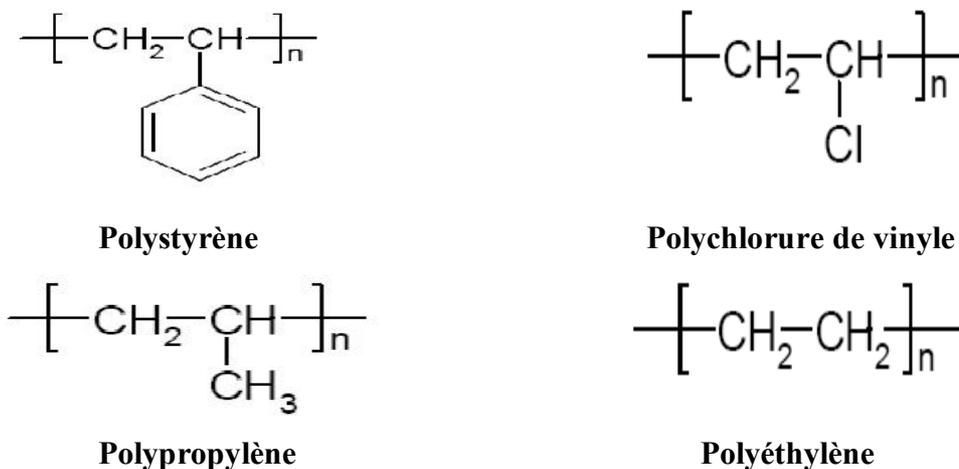


Figure III.1 : Exemples des polymères isolant [26].

Les polymères sont généralement, réputés pour être de bons isolants électriques et toute conductivité électrique dans les polymères était généralement considérée comme un phénomène indésirable. A partir des années 50, des applications spécifiques exigent la conception de nouveaux matériaux associant les propriétés mécaniques des polymères classiques et les propriétés électriques des conducteurs. Ces nouveaux matériaux, constitués de polymères possédant une conductivité électrique importante, sont nommés « polymère conducteur » [26].

III.2. Les polymères utilisés pour l'immobilisation des enzymes :

On peut diviser les polymères utilisés pour l'immobilisation des enzymes par encapsulation en deux classes : les polymères conducteurs électroniques ou métaux synthétiques et les polymères non conducteurs. Un grand nombre de polymères ont été étudiés comme l'illustre (figure III.2) [6].

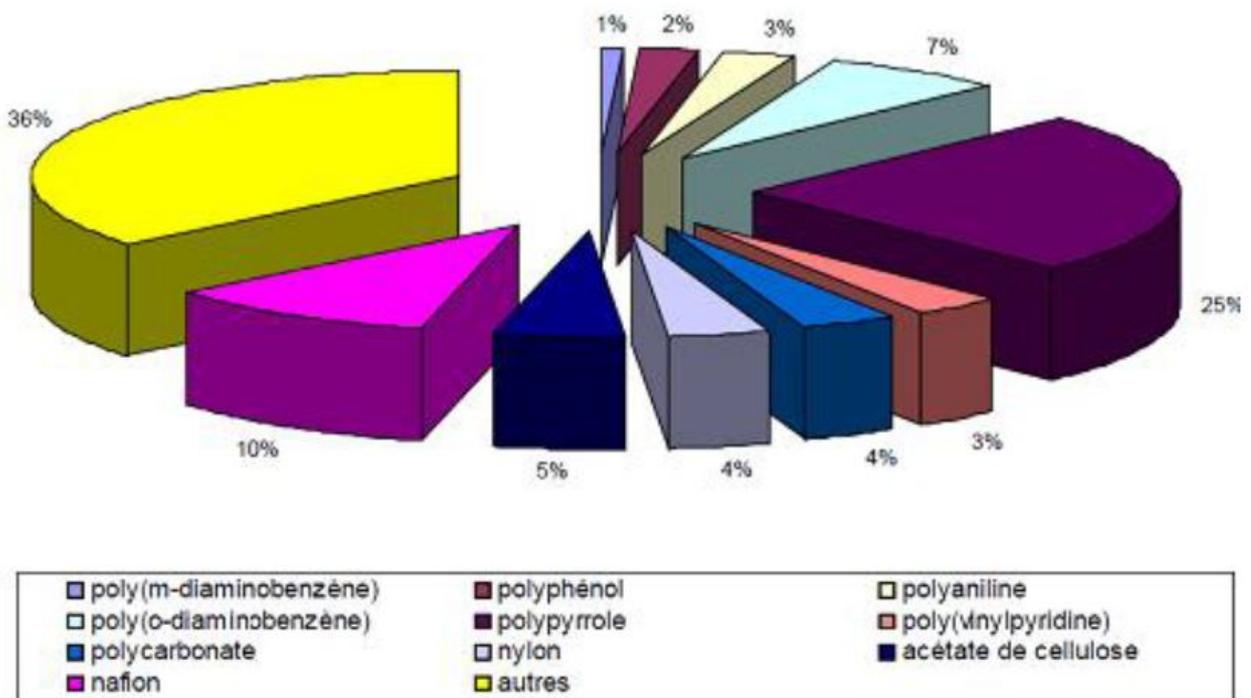


Figure III.2 : Polymères utilisés dans l'élaboration d'électrodes enzymatiques [6].

III.2.1. Les polymères non conducteurs :

Les travaux relatifs à l'utilisation de ces polymères sont moins nombreux que ceux concernant les polymères conducteurs. On peut néanmoins citer plusieurs exemples de films non conducteurs électroniques comme le poly (phénol) (figure III.3), le poly (pyrrole) sur-oxydé ou encore le poly (phénylènediamine). Leur utilisation se justifie principalement par le fait que les produits obtenus peuvent avoir une incidence sur les propriétés des films conducteurs, notamment sur la conductivité. En effet, la conductivité du polypyrrole, par exemple, est affectée par la

présence du peroxyde d'hydrogène pouvant être produit lors de la réaction enzymatique comme l'a démontré Bélanger et son équipe. Ces films permettent donc notamment de réduire les interférences électrochimiques.

Ces films sont donc utilisés uniquement pour leurs propriétés physiques (rétention de la biomolécule et perméabilité sélective). Du fait de leur propriété isolante, l'épaisseur de ces films doit être très faible (10 à 100 nm) ce qui permet de limiter en outre les impératifs dus à la diffusion des substrats et des produits liés à la catalyse enzymatique [27].

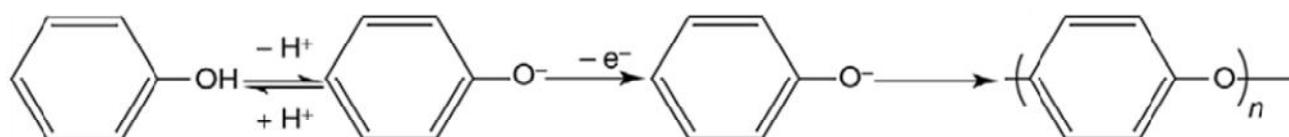


Figure III.3 : Mécanisme de polymérisation du phénol [6].

III.2.2. Les polymères conducteurs :

L'utilisation de films polymères conducteurs s'explique par leur capacité d'augmenter la sensibilité et la rapidité des électrodes. Ces polymères sont ceux qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux, notamment ceux concernant le poly (pyrrole) et ses dérivés. On peut néanmoins citer également d'autres types de polymères utilisés ces dernières années comme la poly (aniline) et le poly (thiophène).

Ces films, qui servent à la rétention de la biomolécule, présentent la capacité de passer de leur état oxydé à leur état réduit et inversement sous l'application d'un potentiel donné. Cette propriété peut permettre notamment le transfert direct des électrons entre le site actif de la biomolécule et le polymère si son potentiel est adapté. Il est possible de s'affranchir de l'utilisation du médiateur dans certains cas. Ainsi le polyneutal red joue le rôle de médiateur pour le glucose oxydase [6].

III.2.3. Le polyneutal red (PNR) :

Un grand nombre de films semi-conducteurs, notamment à base d'indicateurs colorés, ont été utilisés dans l'élaboration des bioélectrodes enzymatiques. En effet, leur propriété de réversibilité, passage de la forme oxydée à la forme réduite et inversement sans être altéré, en fait une cible privilégiée pour l'élaboration de ces systèmes. Des électrodes modifiées par l'électropolymérisation ont été étudiées ces dernières années. Dans certain cas, le film polymère, comme par exemple le bleu de méthylène ou encore le vert de méthylène peut être également utilisé comme médiateur dans les biocapteurs utilisant des enzymes NAD dépendantes.

Parmi ces espèces pouvant être utilisées comme médiateur, le poly (neutral red) est un candidat potentiel pour l'élaboration de bioélectrode. Les films de poly (neutral red) ont ainsi par exemple été utilisés en tant que médiateur pour la construction de biocapteurs pour la détection de glucose, de pyruvate ou d'alcool.

Le polyneutral red est un dérivé de la poly (aniline). Développé initialement comme indicateur de pH dans des systèmes biologiques, son utilisation a permis par la suite la détermination de l'ADN à l'aide de méthodes optiques et électrochimiques. Le bloc de phénazine du neutral red, grâce à sa structure en anneau conjugué, est très prometteur pour la construction de polymères conducteurs de bonne qualité [28].

L'équipe de Nikolskii a été la première à décrire l'obtention d'un film de polyneutral red par l'électropolymérisation en 1970. Au cours de la formation du film, il y a une formation d'un radical par l'oxydation du monomère. Ce radical va initier le processus de polymérisation. Le polymère se forme par un couplage C-N et une structure possible du polymère. Ce mécanisme de polymérisation a été démontré par spectroscopie infrarouge et RMN.

Les caractéristiques électrochimiques (allure du voltampérogramme et potentiel redox) du polyneutral red ne présente aucune modification en comparaison de celles du monomère. On peut donc en conclure que l'élaboration du film et sa croissance n'ont aucune incidence sur les propriétés du système aromatique. D'une façon générale, la nature des contre-ions est très importante dans la polymérisation de polymères conducteurs organiques, car ils peuvent améliorer sa conductivité. Il a été constaté que les ions nitrate sont très importants pour la formation des PNR, ils catalysent l'électropolymérisation de neutral red (NR) et stabilisent le polymère formé. En conclusion, le neutral red, à l'instar des anilines, contient un groupe amino primaire et peut être polymérisé par voie électrochimique dans des solutions acides, neutres ou basiques. L'électropolymérisation se fait plus précisément par voltampérométrie cyclique [29].

Du fait de ces différentes propriétés et de sa capacité à être utilisé comme médiateur de diverses enzymes, le neutral red (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine) a été très largement étudié pour l'élaboration de systèmes biocatalytiques et ce dans diverses configurations. En effet, il est capable aussi bien d'oxyder que de réduire le NAD, cofacteur d'un grand nombre d'enzymes. De ce fait, il a été proposé dans l'élaboration de nombreux biocapteurs (Tableau III.1) [6].

Tableau III.1 : Exemple de biocapteurs utilisant la molécule de neutral red comme médiateur d'enzymes [6].

Substrat	Enzyme	Limite de détection	Sensibilité ($\mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Méthode d'immobilisation
Glucose	Glucose oxydase	$5.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	26.5	Glutaraldéhyde
Glucose	Glucose oxydase	0.81 mmol.L	4	Sol gel
Glucose	Glucose oxydase	$22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.5	Glutaraldéhyde
H ₂ O ₂	Horseradish peroxydase	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	70	Greffage covalent
Pyruvate	Pyruvate oxydase	$34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.1	Glutaraldéhyde
Ethanol	Alcool oxydase	$29.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	8.5	Glutaraldéhyde

Comme nous l'avons signalé en introduction, il existe de nombreux points communs entre le développement d'un biocapteur électrochimique et une demi-cellule électrochimique de biopile à combustible : nécessité d'immobiliser le biorécepteur à l'électrode, d'optimiser le transfert d'électrons ou encore d'utiliser des médiateurs au potentiel redox optimum. De part ses propriétés électrochimiques, le polyneutral red a ainsi également été utilisé dans l'élaboration de biopiles à combustible.

La combinaison des propriétés de médiateur redox du neutral red avec son caractère filmogène en fait donc un très bon candidat pour la réalisation d'une électrode enzymatique en terme de transfert électronique élevé et de stabilité chimique. Dans ce travail, le glucose oxydase a été immobilisé par encapsulation dans un film de polyneutral red afin de mettre au point des bioélectrodes pour diverses applications.

En définitive, l'élaboration de systèmes biocatalytiques par l'encapsulation de biomolécules dans des films polymères est une voie qui a connu un fort essor ces dernières années, par exemple pour des applications médicales (biocapteurs) ou dans le domaine des bioénergies. Ces systèmes présentent l'avantage d'être simple à mettre en œuvre avec des coûts de revient relativement faibles, mais peuvent présenter des problèmes de biocompatibilité et nécessiter un étalonnage fréquent pour les applications in vivo en capteur [30].

III.3. Biocapteurs à base de polymères électrogénérés :

Comme nous l'avons suggéré un peu plus tôt, les films polymères électrogénérés permettent l'immobilisation de biomolécules et ils présentent des propriétés exceptionnelles comme une bonne stabilité chimique, la possibilité de travailler sur différents matériaux d'électrode, une bonne reproductibilité et précision des dépôts ou encore la possibilité illimitée de les façonner.

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour immobiliser des biomolécules grâce à des polymères électrogénérés; les principales techniques employées de nos jours (Figure III.4) en prenant pour exemple un biocapteur enzymatique et sont les suivantes : l'encapsulation, l'adsorption, le greffage chimique, l'ancrage par interactions affines ou encore l'électropolymérisation directe des biorécepteurs.

Ces techniques ainsi que leurs applications tirées de la littérature seront décrites par la suite et nous nous intéresserons principalement et plus en détail à celles correspondant à l'ancrage de biomolécules par interactions affines et par encapsulation puisque ce sont les deux qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail [31].

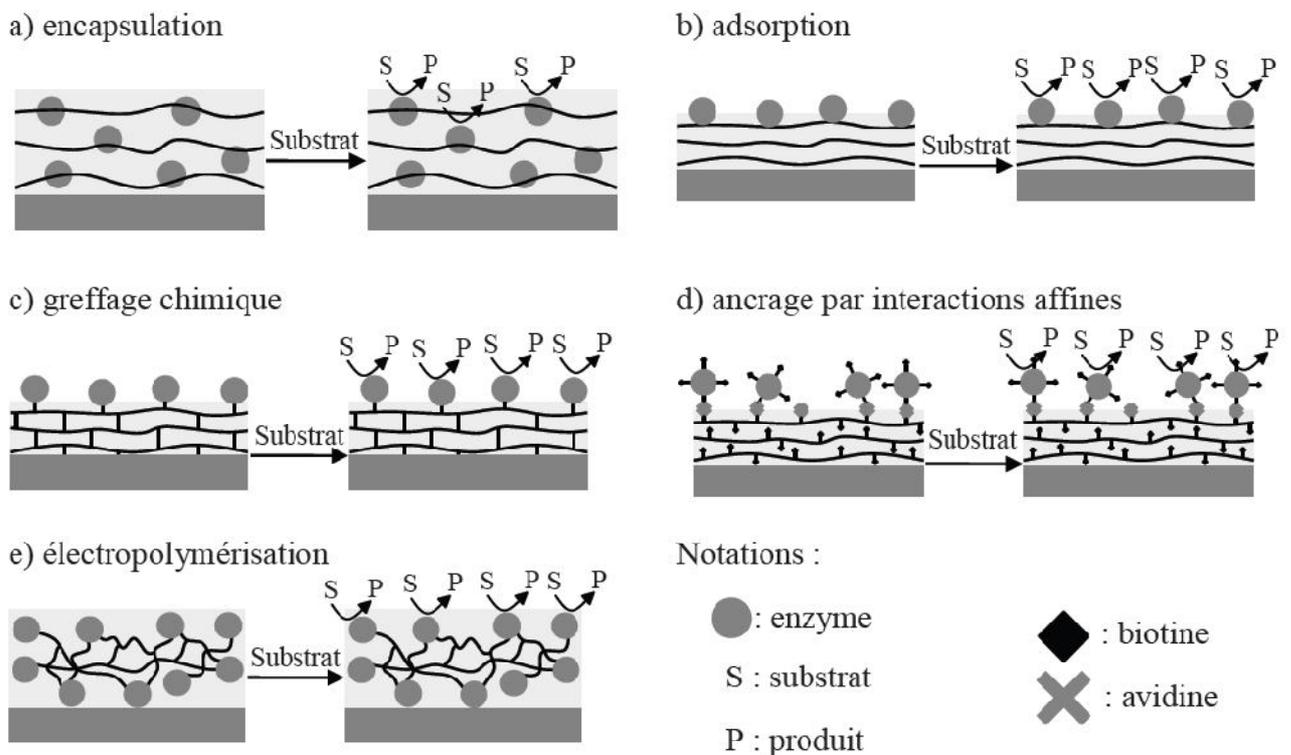


Figure III.4 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation à base de polymères électrogénérés illustrées pour un biocapteur enzymatique [31].

III.3.1. Encapsulation :

L'immobilisation par encapsulation (Figure III.4.a) est une méthode simple, réalisée en une seule étape, et applicable à de nombreuses macromolécules biologiques ; c'est aussi la plus populaire de nos jours. Cette technique permet d'éviter un étiquetage préalable des biorécepteurs et l'immobilisation d'une quantité importante de biomolécules en comparaison avec une monocouche puisque celle-ci va se faire dans le volume de polymère déposé.

Dans ce cas, deux méthodes sont possibles : la biomolécule est tout d'abord mélangée avec le monomère et une électrode est ensuite plongée dans cette solution pour faire la polymérisation ou on peut effectuer un dépôt de cette solution sur une électrode et réaliser la polymérisation après séchage. La première méthode utilise beaucoup de biomolécules et de monomères et paraît alors très coûteuse tandis que la seconde l'est beaucoup moins et donc plus prometteuse. Cette deuxième procédure pour réaliser l'encapsulation de biomolécules dans des films polymères a été développée par Cosnier et al. En 1997. La méthode d'encapsulation des biomolécules peut cependant souffrir d'une faible accessibilité des récepteurs pour interagir avec l'analyte correspondant.

Les premiers auteurs décrivant ce processus d'immobilisation sont Umana et Waller ainsi que Foulds et Lowe en 1986 en immobilisant le glucose oxydase dans des films de poly (pyrrole). Dès 1987, Bartlett et Whitaker publient des résultats concernant l'immobilisation de cette même enzyme dans un film de poly (pyrrole-N-méthyl) plus conducteur permettant d'obtenir de meilleures performances.

Les films de poly (pyrrole) ont ensuite connu un essor considérable pour réaliser l'immobilisation de cellules tout en conservant leur activité biologique ou encore pour l'élaboration d'immunocapteurs ou de capteurs à ADN. Depuis le début de ce type de biocapteurs élaborés par encapsulation, les différents groupes de recherche ont essayé de trouver des films de poly (pyrrole) les plus hydrophiles possibles malgré le caractère organique de ce type de polymères. Cette technique d'encapsulation est beaucoup utilisée dans le cas de biocapteurs nécessitant l'incorporation d'un médiateur redox, ce dernier peut être directement incorporé au polymère en greffant le médiateur sur le monomère avant polymérisation. Si la cible arrive à diffuser dans la couche de polymère, cette technique est très avantageuse puisque les médiateurs nécessaires au transfert d'électrons sont situés à proximité immédiate de la biomolécule. De nombreux exemples sont présents dans la littérature en utilisant. Cette technique d'ancrage peut aussi servir à retenir la biomolécule à la surface du transducteur et alors lui conférer une excellente stabilité [31].

III.3.2. Adsorption :

L'adsorption des macromolécules biologiques (Figure III.4.b) à la surface d'un polymère électrogénéré permet une bonne accessibilité des sites actifs des récepteurs par rapport à l'analyte mais ne permet pas d'immobiliser une grande quantité de biomolécules et souffre souvent d'une faible stabilité.

Cependant, l'utilisation de polymères conducteurs tels que la polyaniline dopée électrochimiquement a déjà permis l'élaboration d'un biocapteur à glucose performant. Ce type de polymère a pu être utilisé avec succès dans d'autres types de biocapteurs tels que les capteurs à ADN ou les immunocapteurs. De même, il existe plusieurs exemples d biocapteurs élaborés par adsorption sur des films de poly (pyrrole) dans la littérature que ce soit pour des enzymes, des ADN ou encore des anticorps [31].

III.3.3. Greffage chimique :

Le greffage chimique (Figure III.4.c) offre une meilleure stabilité que l'immobilisation par adsorption mais la création d'une liaison covalente entre la biomolécule et le polymère électrogénéré peut conduire à une mauvaise orientation du biorécepteur et/ou une partielle dénaturation de ce dernier due à l'utilisation de composés chimiques ; de plus le temps nécessaire à la formation de la liaison covalente peut être long et représenter un obstacle majeur.

Le premier biocapteur de ce type fut élaboré en 1990 par Schuhmann et al pour l'ancrage du glucose oxydase sur un film de poly (pyrrole) en présence d'agents de couplage. Ce même groupe a alors continué à développer ce type de biocapteurs avec d'autres polymères tels que le poly (azulène) ou le poly (thiophène). Plusieurs groupes de recherches ont ensuite voulu incorporer le groupement réactif permettant de réaliser la liaison entre la biomolécule et le polymère directement lors de l'électropolymérisation d'un monomère portant ce groupement chimique. On peut, par exemple, citer l'utilisation de polymères fonctionnalisés avec le N-hydroxysuccinimide.

Une autre approche pour l'immobilisation de biomolécules par greffage covalent sur des polymères électrogénérés réside dans l'utilisation de polymères photoactivables. Dans ce cas, le couplage est rapide et peut être précisément localisé par irradiation. Cosnier et al. Ont réalisé des travaux pionniers dans ce domaine en ancrant, pour la première fois, des protéines sur un film de poly (pyrrole-benzophénone) par irradiation à une longueur d'onde $\lambda = 345$ nm. Ce même polymère a ensuite été utilisé seul ou dans des matériaux composites dans le domaine des immunocapteurs mais aussi pour la détection d'analytes multiples [31].

III.3.4. Ancrage par interactions affines :

L'ancrage par interactions affines (Figure III.4.d) permet de conserver une bonne accessibilité des biomolécules puisqu'elle permet l'ancrage de la biomolécule par un point d'attache unique. Le seul obstacle reste la nécessité d'étiqueter les biomolécules au préalable mais cela peut aussi être un avantage puisque l'étiquetage peut être réalisé de façon à obtenir une bonne orientation du biorécepteur. Les systèmes d'affinité les plus utilisés de nos jours sont les suivants : avidine/biotine.

Les biocapteurs basés sur l'interaction avidine/biotine sont les plus nombreux dans la littérature du fait de la forte constante d'association entre ces deux molécules mais aussi de la grande disponibilité commerciale de biomolécules marquées avec des biotines ou des avidines. De plus, ce complexe est stable chimiquement et la réaction d'association est très rapide. L'avidine est une glycoprotéine de masse moléculaire élevée qui est composée de quatre sous unités qui peuvent interagir chacune avec une biotine. Les premiers exemples de biocapteurs enzymatiques élaborés sur des polymères modifiés avec des groupements biotine ont été publiés en 1998 avec des films de poly (pyrrolebiotine) ou de poly (phénol-biotine). Par la suite, d'autres polymères tels que le poly (dicarbazole-biotine) ont été décrits et les biocapteurs à base de poly (pyrrole-biotine) ont été étendus aux capteurs à ADN et aux immunocapteurs. Une autre approche intéressante réside aussi dans le fait que l'étiquetage des biomolécules par des groupements biotine ne permet pas de mettre une seule mais plusieurs biotines à la surface des biomolécules. Ceci est alors apparu comme un avantage permettant de réaliser des assemblages multi-couches en alternant les incubations avec les molécules biotinylées et l'avidine. Cette approche a été utilisée pour immobiliser différentes enzymes ayant des activités complémentaires sur une même électrode en 2001 par Mousty et al. Par la suite et dans le but de conférer des caractéristiques particulières telles qu'un meilleur caractère hydrophile, des propriétés redox ou encore une sensibilité photochimique, d'autres polymères biotinylés ont été élaborés. Cependant, le principal problème du système avidine/biotine vient du fait que, comparé aux autres systèmes, celui-ci nécessite une couche protéinique supplémentaire d'avidine pour réaliser l'ancrage de molécules biotinylées sur des films polymère aux aussi biotinylées. Cette couche de protéine a souvent un effet néfaste sur la sensibilité des biocapteurs et donc leurs performances électrochimiques [31].

III.3.5. Polymérisation de monomères bio-fonctionnalisés :

Enfin, l'électropolymérisation directe (Figure III.4.e) de monomères fonctionnalisés avec des macromolécules biologiques est aussi une méthode simple d'immobilisation mais requiert la synthèse d'un monomère électropolymérisable modifié par une biomolécule. Cette technique souffre des mêmes problèmes que l'immobilisation par greffage chimique.

Les premiers biocapteurs élaborés par cette technique ont concerné l'immobilisation du glucose oxydase grâce à la modification du pyrrole par cette enzyme.

Cependant, les trois systèmes rapportés sont soumis à controverse du fait qu'il s'agit, en réalité, d'une co-polymérisation en présence de pyrrole non-fonctionnalisé du fait de la taille de cette enzyme ; il est donc difficile dans ce cas de discriminer la partie immobilisée par encapsulation et celle réellement due à l'immobilisation par polymérisation d'un monomère bio-fonctionnalisé. Des biocapteurs à ADN sont ensuite apparus dans la littérature par polymérisation de dérivés du pyrrole fonctionnalisés par des oligonucléotides mais étaient toujours élaborés par co-polymérisation en présence de pyrrole. Le premier immunocapteur élaboré ainsi a été décrit en 1996 par Heiduschka et al en réalisant la polymérisation de films de poly (pyrrole) et poly (phénol) fonctionnalisés par un antigène et permettant de détecter les anticorps correspondants. Ce n'est qu'en 2008 que les biocapteurs basés sur la reconnaissance oligosaccharide/lectine ont fait leur apparition ; dans ceux-ci le monomère pyrrolique est alors fonctionnalisé par des structures oligosaccharidiques [31].

III.4. Intégration des polymères conducteurs dans les biocapteurs :

L'immobilisation stable des protéines à la surface d'un transducteur avec rétention totale de leurs propriétés biologiques demeure un problème crucial pour le développement commercial des biocapteurs. En effet, la majorité des méthodes d'immobilisation de protéines souffre d'une faible reproductibilité, d'une mauvaise résolution spatiale et engendre une forte perte d'activité biologique. Dans ce contexte, l'immobilisation de protéines sur des films de polymères constitue une alternative extrêmement prometteuse.

Dans le domaine des biocapteurs les polymères conducteurs sont utilisés en tant qu'outil d'amplification de signal (optique, électrique, électrochimique...) qui permet d'améliorer les caractéristiques et les performances des biocapteurs en termes de sensibilité, stabilité, limite de détection Une autre approche montre que ces polymères sont aussi utilisés en tant que matériau prometteur pour le maintien de la stabilité des biomolécules actives.

Ainsi, l'immobilisation des biomolécules actives dans ou sur les polymères conducteurs a été intensivement explorée en s'efforçant d'obtenir le meilleur contact entre ces deux éléments. L'immobilisation des biomolécules actives sur le polymère conducteur peut être réalisée suivant trois méthodes [32] :

- **L'incorporation des biomolécules dans un film électropolymérisé formé par un mélange des monomères et des biomolécules :**

Cette méthode présente l'avantage de la facilité de la procédure et le contrôle de la distribution spatiale des biomolécules. Cependant, la dénaturation des molécules est un inconvénient possible.

- **L'attachement électrostatique des biomolécules directement sur les groupes spécifiques produits sur la surface du polymère :**

Est une méthode commode pour immobiliser des protéines; cependant, l'inconvénient principal de cette méthode est la force de l'interaction, qui dépend de la solution environnante, et le changement de la concentration ionique et/ou pH peut causer la libération des biomolécules.

- **L'attachement covalent des biomolécules à des films électropolymérisés de polymère portant les groupements fonctionnels activés :**

C'est le plus prometteur, car la croissance du film de polymère et l'immobilisation des biomolécules peuvent être effectuée dans différentes conditions expérimentales, et en conséquence le problème de dénaturation peut être surmonté. De plus, la physisorption est minimum, donc réduisant les chances de lixivier les biomolécules capturées. En outre, pour cette méthode d'immobilisation, il est critique de maintenir l'activité des molécules, d'augmenter la stabilité, et d'assurer l'accessibilité de la cible pour que les interactions biologiques aient lieu telles que l'hybridation des oligonucléotides complémentaires, de l'interaction anticorps-antigène, ou les réactions catalysées par enzyme.

Conclusion :

Cette étude bibliographique nous a ainsi permis de comprendre ce qu'est un biocapteur, son principe de fonctionnement ainsi que les éléments constitutifs. Elle nous a permis également de comprendre les modes d'accroche du bioélément ; de recenser les techniques de fonctionnalisation de surface généralement utilisées dans l'immobilisation des biomolécules en identifiant leurs avantages et leurs inconvénients et enfin les techniques de caractérisation.

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

Références bibliographiques

- [1] G. Asch, les capteurs en instrumentation industrielle, Dunod, 5^{ème} édition, Paris, 1999.
- [2] P. Fabry, C. Gondran, Capteurs électrochimiques, Ellipses, Paris, 2008.
- [3] F. Baudoin, M. Lavabre, capteurs : principes et utilisation cours et exercices résolus, Editions Casteilla, Paris, 2007.
- [4] P. Tramobouze, Le raffinage du pétrole Matériels et équipements, Technip, Paris, P-667, 1999.
- [5] L.G Blum, P.R. Coulet, Biosensors principles and applications, Ed Marcel Dekker, New York, 1991.
- [6] H. Jarrar, Thèse de doctorat, Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier, 2011.
- [7] J. D. Newmana, A. P. F. Turner, Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development, In « Handbook of Biosensors and Biochips », R. S. Marks Ed, John Wiley&Sons, Sussex, 2007.
- [8] F. Scheller, F. Schubert, Biosensor, Elsevier Science Publishers, New York, 1992.
- [9] C. Tran-minh, Les biocapteurs : Principe, construction et application, Masson, Paris, 1991.
- [10] M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne, Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors, Biosensors and Bioelectronics 18, P (943-951), 2003.
- [11] J. J. Pancrazio, J. P. Whelan, D. A. Borkholder, W. Ma, D. A. Stenger, Development and Application of Cell-Based Biosensors, Annals of Biomedical Engineering 27, P (697-711), 1999.
- [12] B. R. Eggins, C. Hickey, S. A. Toft, D. M. Zhou, Determination of flavanols in beers with tissue biosensors. Analytica Chimica Acta 347, P (281-288), 1997.
- [13] D. A. Blake, R. M. Jones, R. C. Blake, Antibody-based sensors for heavy metal ions, Biosensors and Bioelectronics, Vol 16, P (799-809), 2001.
- [14] C. Ziegler, W. Göpel, Biosensor development, Current Opinion in Chemical Biology, Vol 2, P (585-591), 1998.
- [15] D. L. Wise, L. B. Wingard, Biosensors with fiber optics, Humana Press, New Jersey, 1991.
- [16] K. Ramanathan, B. Danielsson, Principles and applications of thermal biosensors. Biosensors and Bioelectronics 16, P (417-423), 2001.

- [17] K. Cherif, S. Hleli, A. Abdelghani, N. J. Renault, V. Matejec, Chemical detection in liquid media with a refractometric sensor based on a multimode optical fibre, *Sensors* 2, P-195, 2002.
- [18] M. Lahmani, P. Boisseau, P. Houdy, *Les nanosciences : Nanobiotechnologies et nanobiologies*, Edition Belin, Paris, 2007.
- [19] S. Storri, T. Santoni, M. Minunni, M. Mascini, Surface modifications for the development of piezoimmunosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, P (347-357), 1998.
- [20] M. Mehrvar, M. Abdi, Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors, *Analytical Sciences*, P (1113-1126), 2004.
- [21] A. A. Karyakin, O. A. Bobrova, L. V. Lukachova, E. E. Karyakina, Potentiometric biosensors based on polyaniline semiconductor films, *Sensors and Actuators B: Chemical* 33, P (34-38), 1996.
- [22] W. Limbut, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul, C. Limsakul, B. Wongkittisuks, *Biosensors Bioelectronics*, P-813, 2004.
- [23] C.M.A. Brett, A.M.O Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Ed Oxford University Press, P-224, 1993.
- [24] N. J. Renault, C. Martelet, P. Clechet, *Capteurs chimiques et biochimiques*, R420, P-360, Techniques de l'ingénieur, Paris, 1994.
- [25] K. M. Rosine Pélagie, Thèse de doctorat, Mise en œuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman, Université du Maine, 2011.
- [26] L. Chenghua, thèse de doctorat, Caractérisation électrique de polymères conducteurs intrinsèques Polyaniline/Polyuréthane dans une large gamme de fréquence (DC à 20 GHz) Université du Littoral Côte D'opale, P (8-11), 2010.
- [27] A. Guerrieri, G.E. De Benedetto, F. Palmisano, P. G. Zambonin, Electrosynthesized non-conducting polymers as permselective membranes in amperometric enzyme electrodes: a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer, *Biosensors and Bioelectronics* 13, P (103-112), 1998.
- [28] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, Development of Novel Glucose and Pyruvate Biosensors at Poly (Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes, Application to Natural Samples, *Electroanalysis* 18, P (748-756), 2006.
- [29] R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, Poly (neutral red): Electrosynthesis, Characterization, and Application as a Redox Mediator, *Electroanalysis* 20, P (1275-1285), 2008.

- [30] J.F. Liang, Y.T. Li, V.C. Yang, Biomedical application of immobilized enzymes, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89, P (979-990), 2000.
- [31] J. Baur, Thèse de doctorat, Autoassemblage de macromolécules biologiques via des Poly (pyrroles) et/ou des nanotubes de carbone fonctionnalisés, Université de Grenoble, 2010.
- [32] I. Hafaid, Thèse de doctorat, Etudes physico-chimique de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales, l'Université Claude Bernard Lyon, 2009.