



République Algérienne Démocratique Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Kasdi Merbah Ouargla
Faculté Des Sciences Appliquées
Département De Génie Des Procédés

Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences et Technologies

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Chimique

Présenté Par :

MOSBAH Sara

ZEGDOUD Tinhinane

Thème

**ELABORATION D'UN BIOCAPTEUR ELECTROCHIMIQUE
POUR LA DETECTION DE L'ACIDE CAFEIQUE**

Soutenu publiquement le :

Devant le jury composé de :

M^f

Université Ouargla

Président

Mr.

Université Ouargla

Examineur

Mr

Université Ouargla

Examineur

M^fAchi Fethi

Université Ouargla

Encadreur

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un effort acharné et de nombreux sacrifices. Nous remercions d'abord ALLAH qui nous a donné la force et de la patience pour terminer ce mémoire. Nous tenons également à exprimer nos remerciements à nos familles et surtout à nos parents et à nos frères et sœurs qui nous ont soutenus pour mettre fin à ce travail rendu possible grâce à leur soutien. Nous remercions également tous les professeurs et amis qui nous ont donné la réponse à nos différentes questions dans ce domaine afin de faciliter le développement de ce travail. Un merci spécial au docteur Achi Fethi qui nous a encadré tout au long de ce travail, et pour sa disponibilité et sa grande compréhension. Nous remercions sincèrement la doctorante Sabah Mennaa pour le soutien et les efforts qu'elle nous a fournis.

Nous remercions également tout particulièrement les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner notre travail. Nous tenons à remercier tous les enseignants de notre département génie des procédés qui ont contribué à notre formation. Un grand Merci à tous nos amis et nos collègues de l'université Kasdi Merbah Ouargla. Merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce projet.

Merci à tous

Dédicace

Nous dédions ce modeste travail en hommage aux : Deux êtres les plus chères, à ceux qui nous devons mes épanouissements dans la vie, nous n'oublierons jamais vos conseils et vos aides, ayez l'honneur de voir vos aimables filles réaliser son beau rêve ; acceptez nos chères mères et nos cher pères l'expression de notre sentiment les plus profonds.

Merci à toute notre famille pour votre soutien tout au long de mes voyages universitaire. À nos amis et professeurs, merci beaucoup pour vos encouragements et votre amour, et pour votre soutien tout au long de nos études.

Merci d'être toujours là.

Sommaire

Remerciements.....	2
Dédicace	3
<u>I.</u> Introduction Générale.....	1

Chapitre I Généralités sur les biocapteurs

I.1. Introduction	3
I.2. Définition d'un biocapteur.....	3
I.3. Classification des biocapteurs.....	4
I.4. Caractéristiques des biocapteurs.....	5
I.4.1.Étalonnage.....	5
I.4.2.Etendue de mesure.....	5
I.4.3Domaine de linéarité	5
I.4.4.Sensibilité.....	6
I.4.5.Temps de réponse	6
I.4.6.La sélectivité	6
I.4.7.Stabilité.....	6
I.4.8.Répétabilité et reproductibilité	6
I.4.9.Exactitude	7
I.4.10.La limite de détectionest	7
I.5. Transducteurs	7
I.5.1. Capteur thermique	7
I.5.2. Capteur optique.....	7
I.5.3. Capteur électrochimique	7
I.5.3.1. Impédimétrie.....	7
I.5.3.2.Biocapteurs ampérométriques.....	7
I.5.3.3. Potentiométrie	8
I.6. Biorécepteurs enzymatiques	9
I.7. Méthodes d'immobilisation.....	9
I.7.1. Immobilisation par Adsorption c	9
I.7.2. Immobilisation par Inclusion	9
I.7.3. Immobilisation par réticulation	10
I.7.4. Immobilisation par Couplage covalent	10

CHAPITRE II Généralités sur l'acide Caféique

II.1.Introduction.....	13
II.2.Définition	13

II.3.Les sources de l'acide caféique.....	13
II.4.Caractéristiques de l'acide caféique	13
II.5.Avantages revendiqués de l'acide caféique.....	14
II.6.Utilisation de l'acide caféique.....	15
Les utilisations du acide caféique se résument dans les points suivants [39]:	14
II.7.Propriétés physiques et chimiques de l'acide caféique	15
II.7.1Propriétés chimiques	15
II.7.2.Propriétés Physiques	15
II.8.Mécanismes réactionnels d'oxydoréduction de l'acide caféique	16
II.9.Caractéristiques des biocapteurs pour la détection de l'acide caféique	16
<i>CHAPITRE III Élaboration du biocapteur pour la détection de l'acide caféique</i>	
III.1.Mesures électrochimiques	18
III.1.1. Principe	18
III.2.Montage à trois électrodes.....	19
III.3. Préparation des biocapteurs.....	20
III.3.1 Nettoyage des électrodes.....	20
III.4. Immobilisation d'enzyme	21
III.5. Utilisation des nanotubes de carbone	21
Conclusion Générale.....	23
Références Bibliographique.....	24
Résumé	28

Liste des Figures

Chapitre I

Généralités sur les biocapteurs

Figure I.1	Présentation schématique d'un biocapteur	3
Figure I.2	Représentation schématique des différents types de biorécepteur	4
Figure I.3	Courbe d'étalonnage d'un capteur.	5
Figure I.4	Domaine de linéarité du capteur.	6
Figure I.5	Cellule électrochimique de trois électrodes pour les mesures ampérométriques	8
Figure I.6	Adsorption des enzymes sur un support.	9
Figure I.7	Méthode d'immobilisation des enzymes par encapsulation.	10
Figure I.8	Méthode d'immobilisation des enzymes par réticulation.	10
Figure I.9	Greffage covalent des enzymes.	11

Chapitre II

Généralités sur l'acide caféique

Figure II.1	Structure chimique de l'acide caféique	13
Figure II.2	Oxydation réaction pour H ₃ CAF	15
Figure II.3	Évolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la Concentration du substrat	16

Chapitre III

Élaboration du biocapteur pour la détection de l'acide caféique

Figure III.1.	Représentation schématique de mesure electrochimique	18
Figure III.2.	Schéma de la configuration à trois électrodes pour les mesures voltamétrique	19
Figure III.3.	Électrodes de référence	19
Figure III.4.	Électrode en or et en platine	20
Figure III.5.	Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone mono-feuillet (SWCNT) (A) et multi-feuillets (MWCNT) (B)	21

Liste des Tableaux

Chapitre I

Généralités sur les biocapteurs

Tableau I.1	Domaine d'application de biocapteur	4
Tableau I.2	Types des transducteurs utilisé pour la fabrication des biocapteurs	8
Tableau I.3	Les avantages et les inconvénients des immobilisation enzymatique	11

Chapitre II

Généralités sur l'acide caféique

Tableau II.1	Propriétés chimiques de l'acide caféique	15
Tableau II.2	Propriétés physiques de l'acide caféique	15

Introduction générale

De nombreux composés ont pénétré dans l'environnement en raison de l'utilisation extensive de produits chimiques par les industries, les traitements agricoles et les communautés urbaines. Donc, il est nécessaire de limiter et de contrôler ces produits toxiques.

Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce chimique sont généralement coûteux et complexes et leurs résultats sont très lents. Récemment, les biocapteurs ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche et de développement, permettant la transformation d'un signal biochimique en un signal électrique facilement exploitable.

Dans ce contexte, le travail est basé sur le développement d'un biocapteur à base d'enzyme pour la détection de l'acide caféique. Le premier objectif est d'optimiser le choix des nanomatériaux utilisés pour construire une couche adaptée à l'immobilisation de l'enzyme sur le transducteur électrochimique modifié est une étape primordiale pour construire un biocapteur très sensible à la détection.

Ce mémoire est reparti en trois chapitres. Le premier chapitre présente un rappel bibliographique sur les biocapteurs, leur classification et leur caractéristiques analytiques ainsi que les méthodes d'immobilisations. Le deuxième chapitre présente des généralités sur l'acide caféique : son source et sa structure chimique ainsi que les caractéristiques des biocapteurs pour la détection de l'acide caféique.

Le troisième chapitre présente l'élaboration du biocapteur pour la détection de l'acide caféique où nous avons présenté les mesures électrochimiques et le matériel utilisé pour la préparation des biocapteurs.

Chapitre I
Généralités sur les biocapteurs

I.1. Introduction

Le domaine de la détection des substances chimiques est très intéressant à cause des multiples rejets industriels qui contiennent une variété de substances toxiques. La meilleure détection de ces composés chimiques s'effectue par des outils analytiques, généralement connus sous le nom « capteurs ». Ils se classent selon le mode de transduction en capteurs électrochimiques ou optiques. Dans ce chapitre, on définit ces outils, puis on décrit leur principe de détection. On donne aussi leur caractéristique analytique, car chaque capteur doit être sensible et très rapide à la détection selon les conditions opératoires suivies.

I.2. Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est un outil analytique conçu pour transformer une interaction chimique ou biochimique en un signal électrique mesurable [1,2]. Il combine un composant biologique appelé "biorécepteur" et un "transducteur" représentant le mode de détection [3]. Dans le cas des biocapteurs électrochimiques, ce dispositif est fabriqué à partir de l'immobilisation d'un biorécepteur sur la surface d'un transducteur électrochimique. Ces outils peuvent fournir des mesures rapides, sensibles et peu coûteuses pour l'analyse et la quantification des substances chimiques qui se trouvent dans l'environnement, notamment dans les effluents liquides.

La sélectivité et la sensibilité sont les deux principales caractéristiques déterminant la performance de ces biocapteurs électrochimiques. L'élément de reconnaissance biologique possède une sélectivité naturelle envers la substance (analyte) à détecter.

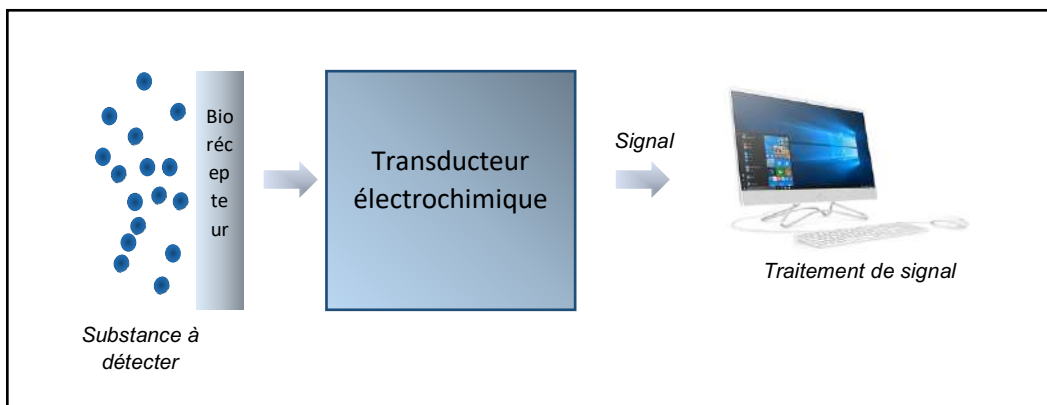


Figure.I.1 Présentation schématique d'un biocapteur.

Tableau I.1 Domaine d'application de biocapteur

Domaine	Applications	Ref.
Soins de santé	Médicaments administrés diagnostic des maladies infectieuses analyse des taux de glucose et d'hormones	[4]
Environnement	Analyse de l'eau et des sols pesticides et autres substances toxiques contrôlent des effluents industriels	[5]
Agriculture	Pesticides, maladies des cultures	[6]
Contrôle alimentaire	Détermination de la maturité des fruits par la teneur en glucose Quantification du cholestérol dans le beurre	[7]
Microbiologique	Analyse bactérienne et virale	[8]

I.3. Classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés en fonction de la nature de biorécepteur ou de transducteurs ou de l'espèce à détecter [9]:

- Nature de biorécepteur : biocapteur enzymatique, immunocapteur, aptamères, biocapteur microbienne.
- Type de transducteurs : électrochimique, optique, thermique.

En fait, nous pouvons poursuivre une activité analytique ou biologique directement ou indirectement en surveillant, par exemple, l'inhibition de l'activité catalytique.

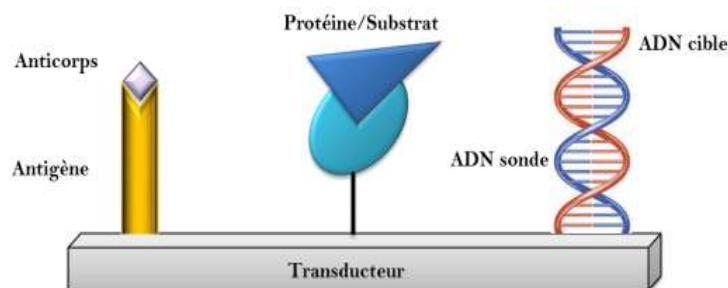


Figure.I.2. Représentation schématique des différents types de biorécepteur [10].

I.4. Caractéristiques des biocapteurs

La performance des biocapteurs est déterminée par des caractéristiques analytiques constituent les liens effectifs entre le capteur et la grandeur qu'il mesure [9] [11].

I.4.1 Étalonnage : Il permet d'ajuster et de déterminer, sous forme graphique, la relation entre la mesure et la grandeur électrique de sortie (figure 3).

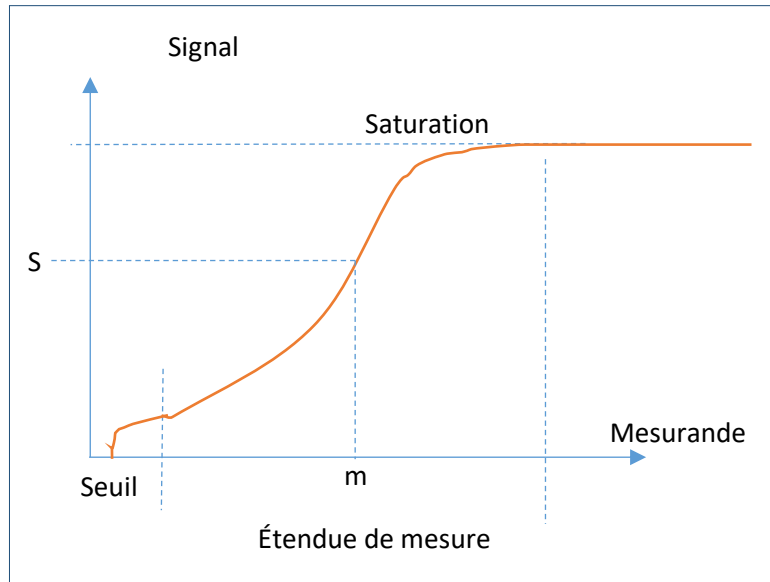


Figure.I.3. Courbe d'étalonnage d'un capteur [11].

I.4.2. Étendue de mesure : elle est définie sur la courbe d'étalonnage du capteur (figure3). Au-delà de cette zone se trouvent les valeurs des deux paramètres : le seuil et la saturation.

Saturation et seuil : même si la valeur du mesurande augmente, la grandeur de sortie ne peut dépasser une valeur maximale S_{max} . Le seuil ou limite de détection correspond à la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable.

I.4.3 Domaine de linéarité : C'est la gamme où la variation de la réponse en courant du capteur est linéaire avec la concentration de l'analyte à détecter.

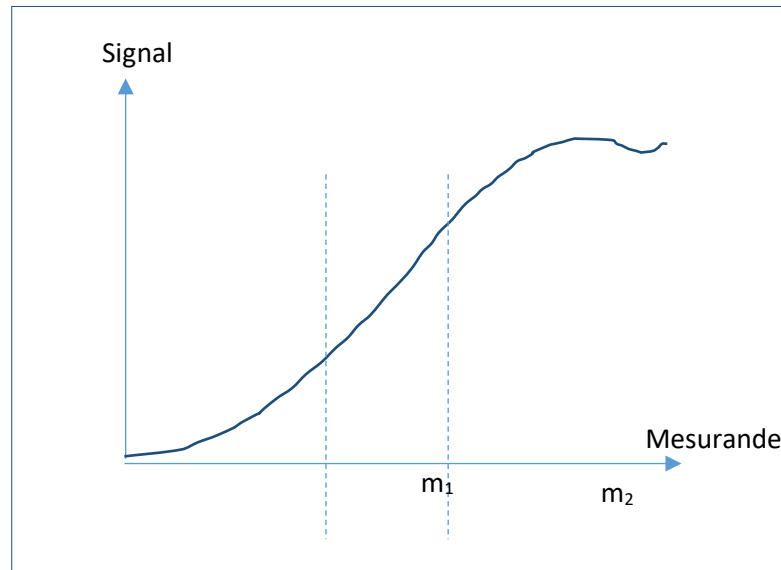


Figure.I.4. Domaine de linéarité du capteur [11].

I.4.4. Sensibilité : Ce paramètre mesure le rapport entre l'augmentation de la réponse du biocapteur et la concentration de l'analyte à mesurer [9]. Elle est définie comme étant la variation du signal de sortie (S) par rapport à la variation du mesurande (m), dans le cas d'un capteur linéaire, la sensibilité du capteur est constante et égale à la pente de la droite d'étalonnage et s'écrit : $S=ds/dm$.

I.4.5. Temps de réponse : C'est le temps durant lequel la réponse du capteur atteint son maximum. Cependant la valeur finale étant le plus souvent atteinte de manière asymptotique, elle correspond au temps nécessaire pour que le capteur délivre une certaine portion α de la pleine amplitude du signal. Le temps de réponse noté $t\alpha$ est tel que α vaut généralement 90%. La connaissance du temps de réponse d'un capteur est un élément essentiel lors de la réalisation de mesures [11].

I.4.6. La sélectivité : Ce paramètre caractérise la capacité du biorécepteur à distinguer le substrat, il dépend des sites actifs du biorécepteur et de la manière dont il est immobilisé sur la surface de l'électrode [9].

I.4.7. Stabilité : Ce paramètre qualifie la capacité d'un capteur à conserver ses performances pendant une longue durée. On peut distinguer la stabilité due au stockage et la stabilité relative à une utilisation en continu.

I.4.8. Répétabilité et reproductibilité : C'est l'aptitude du capteur à produire la même réponse pour des mesures successives de la même grandeur effectuée avec la même méthode, par le même expérimentateur, avec les mêmes instruments de mesure et à des intervalles de temps assez courts. Contrairement à la reproductibilité qui caractérise la variation de la réponse pour

des mesures successives de la même grandeur dans le cas où les mesures sont effectuées dans des conditions différentes.

I.4.9. Exactitude : Ce paramètre décrit la correspondance entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée avec un écart appelé erreur absolue [9].

I.4.10. La limite de détection : c'est la valeur minimale mesurable qui peut être détectée par le capteur.

I.5. Transducteurs

Le transducteur est la composante physique du biocapteur qui est utilisée pour exploiter la modification biochimique résultante de l'interaction entre l'analyseur et le biorécepteur pour la convertir en un signal électrique mesurable. Le type de transducteur sera choisi en fonction des changements biochimiques intervenant au niveau du récepteur biologique [12].

I.5.1. Transducteur thermique

Ce mode de transduction est basé sur la détermination de la concentration du substrat par variation d'enthalpie de la réaction. Cette méthode utilise la réaction exothermique où la variation est déterminée en degré thermique par échelle micrométrique [13].

I.5.2. Transducteur optique

Ce transducteur détecte les changements des propriétés optiques comme l'adsorption des rayons, la fluorescence et la luminescence qui sont les propriétés les plus utilisées pour les capteurs optiques [14][15].

I.5.3. Transducteur électrochimique

Les capteurs électrochimiques mesurent la variation de la concentration de l'analyte en fonction du courant issu de la réaction électrochimique de cet analyte, la réaction peut être d'oxydation ou de réduction selon le potentiel favorable appliqué [16].

I.5.3.1. Transducteur impédimétrique

Ce type de transduction s'intéresse aux phénomènes de transfert de charge à l'interface électrode / électrolyte en utilisant une cellule électrochimique de trois électrodes [16]. Pour mesurer la résistance du système électrochimique ce qui permet de savoir l'étape limitante de la réaction électrochimique à l'interface électrode / électrolyte. La diversité de ces paramètres dépend des différences d'interaction générées à la surface de l'électrode de travail.

I.5.3.2 Biocapteurs ampérométriques

Ce type de biocapteur est basé sur la mesure de l'intensité du courant traversant la cellule électrochimique avec un potentiel imposé [17]. La réaction de l'analyseur avec le biorécepteur

immobilisé sur la surface de l'électrode, fait changer le courant à un potentiel constant. Ce changement provient de la réduction ou de l'oxydation de la substance à détecter en un signal électrique engendré au niveau de la surface de l'électrode de travail. L'intensité du courant induit est proportionnelle à la concentration de l'analyte à détecter.

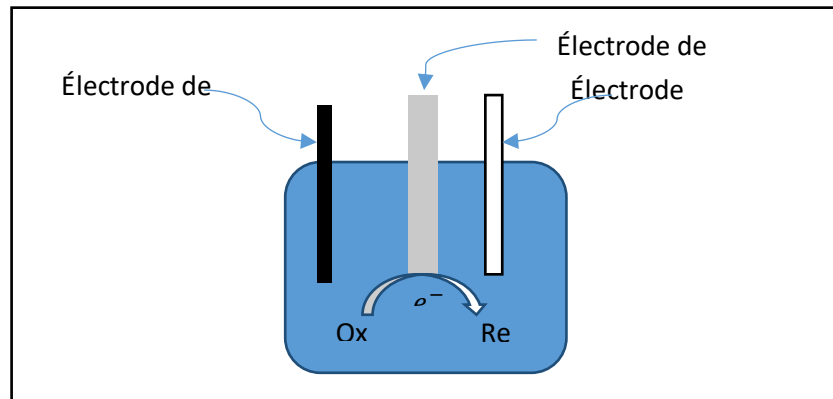


Figure I.5. Cellule électrochimique de trois électrodes pour les mesures ampérométriques [11].

I.5.3.3. Potentiométrie

Ce type des transducteurs mesure l'accumulation de charges électriques à la surface de l'électrode de travail. En pratique, cela se traduit par la mesure de la différence de potentiel entre le pôle de référence et le pôle de travail à un courant nul. La conception du potentiel de l'électrode permet une mesure directe de la concentration en analyte [18].

Tableau I.2 : Types des transducteurs utilisés pour la fabrication des biocapteurs

Transducteurs	Sensibles aux variations	Ref.
Électrochimique	Courant (ampérométrie) Conductivité Impédance	19
Calorimétrique	Température	20
Piézoélectrique	Masse	21
Optique	D'absorbance, de chimiluminescence, de fluorescence, de la résonance plasmonique de surface, de l'onde évanescente	22

I.6. Biorécepteurs enzymatiques

Les enzymes sont des éléments de reconnaissance les plus utilisés dans le domaine de la détection des substances à cause de leur stabilité et de leur sélectivité. Les biocapteurs électro-enzymatiques peuvent détecter un substrat directement ou par l'intermédiaire d'un médiateur qui joue le rôle d'un co-substrat [23]. L'immobilisation d'enzyme sur la surface solide est l'un des aspects les plus importants pour la conception des biocapteurs. La liaison covalente, le piégeage et la micro-encapsulation sont les méthodes d'immobilisation le plus couramment utilisés. Les avantages des biocapteurs à base d'enzymes immobilisés sont nombreux tels que : possibilité d'effectuer des mesures *in situ*, rapidité d'analyse, miniaturisation des outils de mesure [24][25].

I.7. Méthodes d'immobilisation

Différentes méthodes sont décrites dans la littérature pour attacher les biomolécules à la surface du transducteur. Les quatre méthodes principalement utilisées sont l'adsorption, l'inclusion, la réticulation et le couplage covalent.

I.7.1. Immobilisation par Adsorption

L'adsorption est une méthode d'immobilisation très simple, économique et rapide. L'enzyme est liée au matériau support par les liaisons hydrogènes, les interactions ioniques ou les forces de Vander Waals [26].

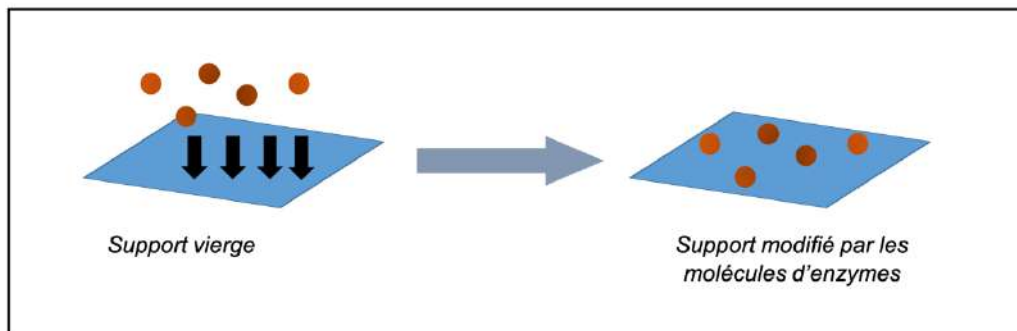


Figure.I.6. Adsorption des enzymes sur un support [27]

I.7.2. Immobilisation par inclusion

La méthode d'immobilisation par encapsulation utilise le plus souvent des polymères pour le confinement de l'enzyme dans le noyau des micro-organismes [27]. Le piégeage est un processus dans lequel le biomatériau est polymérisé dans un gel en le piégeant au sein de la matrice polymérique [28].

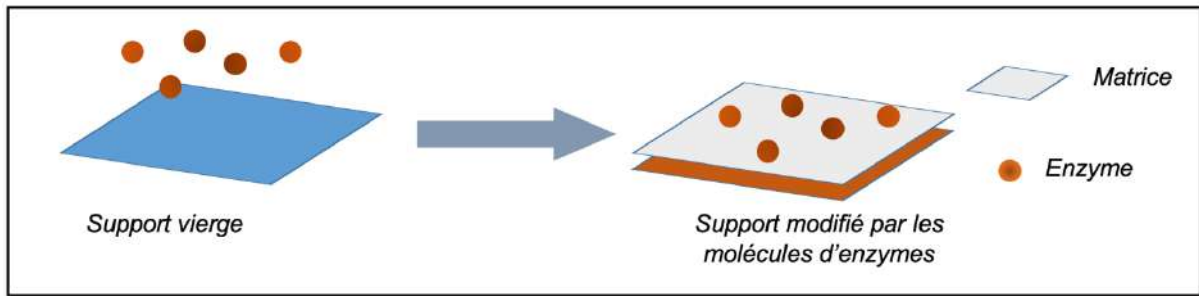


Figure I.7. Méthode d'immobilisation des enzymes par encapsulation [30].

I.7.3. Immobilisation par réticulation

Cette méthode d'immobilisation utilise des agents réticulant pour fixer l'enzyme sur la surface solide de l'électrode. Par exemple, le Glutaraldéhyde de formule $(C_5H_8O_2)$ et l'agent le plus utilisé, on peut aussi utiliser le nafion de formule $(C_7HF_{13}O_5S \cdot C_2F_4)$ qui a l'aptitude de former un film tout en fixant l'enzyme, comme on peut utiliser le chitosane [29]. Cette méthode présente l'avantage d'être simple à mise en œuvre, elle offre une stabilité plus au moins acceptable mais diminue l'affinité de l'enzyme due au présence de l'agent réticulant.

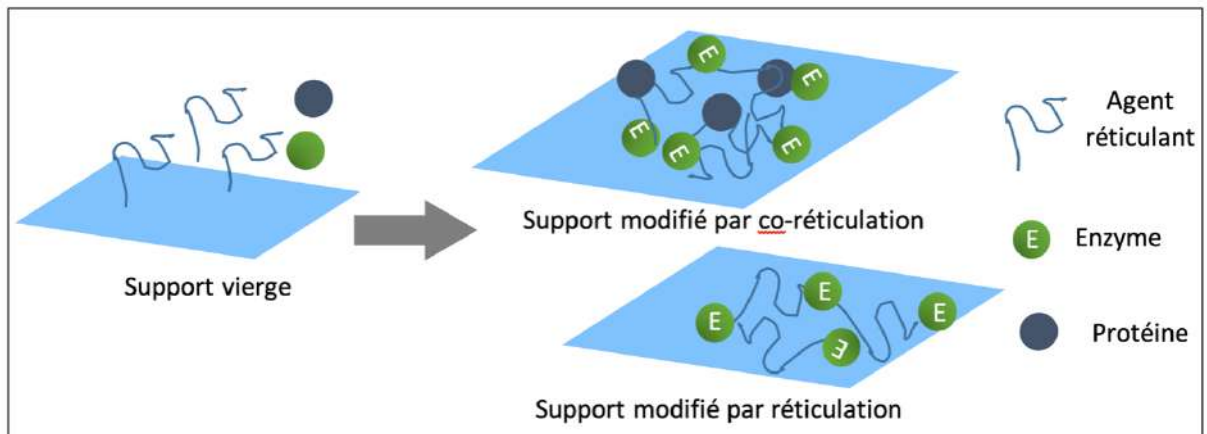


Figure I.8. Méthode d'immobilisation des enzymes par réticulation [30].

I.7.4. Immobilisation par couplage covalent

La conjugaison covalente de molécules biologiques dans un transducteur nécessite un groupe fonctionnel à la fois sur la biomolécule et sur la surface du transducteur, ce qui nécessite une fonctionnalité préalable. En général, les groupes fonctionnels présents à la surface sont les fonctions carboxylique, thiol, alcool ou amine [30].

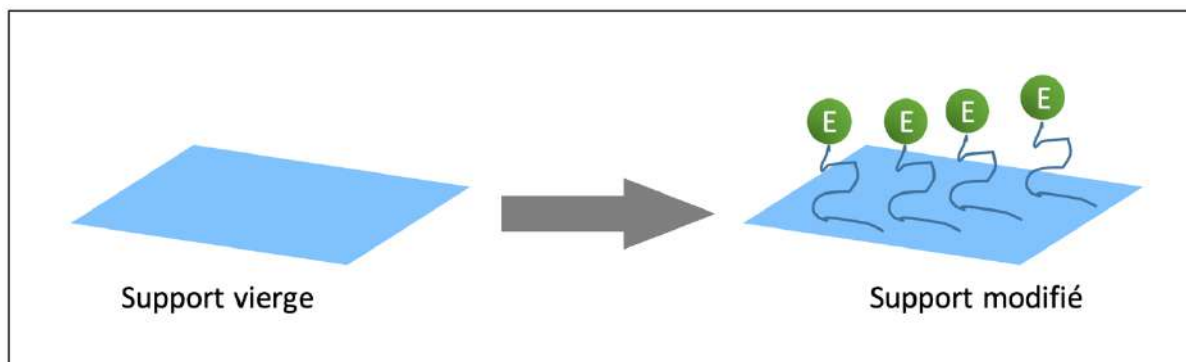


Figure I.9. Greffage covalent des enzymes [30]

Tableau.I.3. Avantages et les inconvénients des immobilisations enzymatiques [31].

Méthode	Avantages	Inconvénients
Adsorption	<ul style="list-style-type: none"> • Facile à mise en œuvre. • Possibilité de régénérer l'enzyme • Fixation rapide de l'enzyme sur le support solide. Méthode d'immobilisation non dénaturante.	<ul style="list-style-type: none"> • La fragilité de la fixation. • Surface bio-enzymatique non-uniforme
Inclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Applicable à une large gamme des éléments biologiques. • Obtention de supports de formes variées et adaptables. 	<ul style="list-style-type: none"> • Présence des agents dénaturants comme les radicaux due aux polymérisations. • Problème de transfère de masse. • Risque de fuite de l'enzyme à cause de la taille grande des pores. • Propriétés mécaniques des gels sont fragiles et non robustes.
Liaison covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité acceptable. • Grande variété de supports solides 	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes. • Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité).

CHAPITRE II

Généralités sur l'acide Caféique

II.1. Introduction

Dans ce chapitre on va présenter un état de l'art sur l'acide caféique et leur source et structures chimique. Par la suite on représente ses quelques propriétés physique et chimiques et les caractéristiques des biocapteurs pour la détection de l'acide caféique.

II.2. Définition

L'acide caféique (Fig. II.1) est un composé organique présent naturellement dans les plantes. L'acide caféique est une clé intermédiaire dans la biosynthèse de la lignine. L'acide caféique est un dérivé de l'acide cinnamique. Il a une structure proche de l'acide férulique et appartient à la famille des phénylpropanoïdes [32]. L'acide acétique est utilisé notamment dans les laboratoires ou l'industrie comme solvant [33].

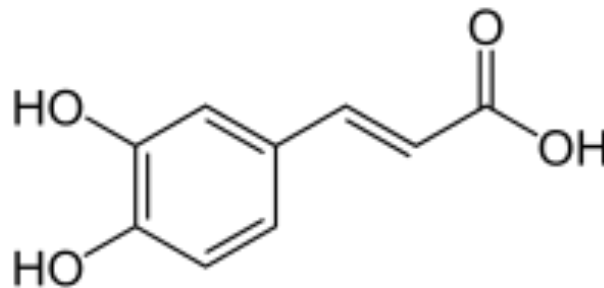


Figure II.1. Structure chimique de l'acide caféique [34].

II.3. Les sources de l'acide caféique

La source la plus courante de l'acide caféique dans l'alimentation humaine se trouve dans le café, thé. On le trouve également dans certains légumes, fruits et herbes. Voici quelques exemples d'aliments contenant de l'acide caféique [35] :

- Chou-fleur
- Café
- Vin
- Safran des Indes
- Basilic
- Thym

II.4. Caractéristiques de l'acide caféique

Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou réduisent les effets déclenchés par les radicaux libres et les composés oxydants [35].

Activité antimicrobienne

L'acide caféique a une capacité réduite à inhiber la *Listeria* par rapport aux autres dérivés de l'acide hydroxy cinnamique en raison de la présence d'un degré élevé d'hydroxylation [36].

Cytotoxicité

L'acide caféique et ses dérivés, tels que l'ester phénylique de l'acide caféique, ont une action contre le cancer du côlon et de la bouche, et ils sont des inhibiteurs de la cyclooxygénase [37].

II.5. Avantages revendiqués de l'acide caféique

L'acide caféique est un antioxydant connu, ce type aide à prévenir l'oxydation d'autres molécules dans le corps. L'oxydation produit des radicaux libres qui peuvent endommager les cellules ce qui entraîne une inflammation, une maladie cardiaque ou même un cancer [38].

Comme d'autres antioxydants, l'acide caféique peut être utile pour améliorer la santé globale à cause de ses propriétés antioxydantes qui peuvent aider à réduire les risques de développer un cancer, des maladies cardiaques et d'autres maladies de la vieillesse, comme la maladie d'Alzheimer.

II.6. Utilisation de l'acide caféique

Les utilisations de l'acide caféique se résument dans les points suivants [39] :

- Dans le secteur médical à cause de ses propriétés anticancéreuses qui inhibent la croissance des cellules réceptrices des œstrogènes.
- Le dérivé d'acide caféique inhibe la croissance des cellules cancéreuses du côlon.
- Il est utilisé pour le traitement de l'inflammation chronique.

II.7. Propriétés physiques et chimiques de l'acide caféique

II.7.1 Propriétés chimiques

L'acide caféique est sensible à l'auto – oxydation, par exemple les composés comme le glutathion et les thiols ont un effet protecteur sur le brunissement et la disparition de l'acide caféique. Ce brunissement est dû à la conversion de o-diphenols en réactif o-quinones. L'oxydation chimique de l'acide caféique dans de milieu acide en utilisant du periodate de sodium conduit à la formation de dimères avec une structure de furanne (isomères de 2,5- (3', 4'-dihydroxyphényl) tétrahydrofuranne de l'acide 3,4-dicarboxylique) [39].

Dans le tableau ci-dessous on représente quelques propriétés chimiques de l'acide caféique :

Tab II.1. Propriétés chimiques de l'acide caféique

Paramètres	Valeur
Formule brute	$C_9H_8O_4$
Masse molaire	$180,1574 \pm 0,009 \text{ g/mol}$
Constante d'acidité	4.62

II.7.2. Propriétés physiques

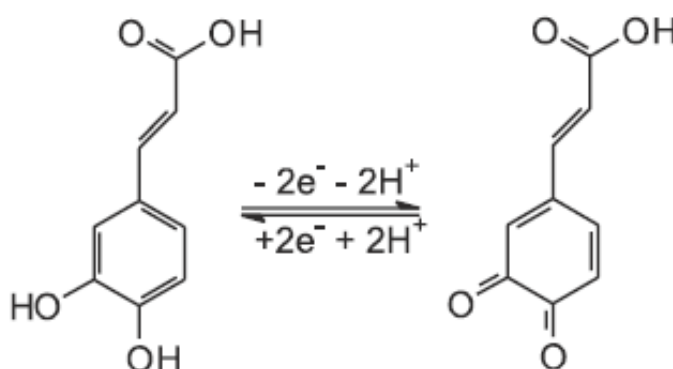
Les valeurs des paramètres physiques de l'acide caféique comme sa température de fusion, sa solubilité et sa masse volumique sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tab II.2. Propriétés physiques de l'acide caféique

Paramètres	Valeur
Température de fusion	234 à 237 °C
Solubilité	Peu soluble dans l'eau
Masse volumique	$1,478 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

II.8. Mécanismes réactionnels d'oxydo-réduction de l'acide caféique

L'oxydation électrochimique du H₃CAF dépend de l'effet du pH au cours de la formation d'o-quinone (o-HCAF). Lorsque le pH entre 3-8 l'oxydation a donné la quinone avec le transfert de deux électrons et deux protons (Figure II.2) [40].

Figure II.2. Oxydation réaction pour H₃CAF.

II.9. Caractéristiques des biocapteurs pour la détection de l'acide caféique

Comme décrit précédemment, ces caractéristiques servent à évaluer la performance analytique du biocapteur, les caractéristiques analytiques les plus couramment évaluées durant la fabrication des biocapteurs sont :

- **Sélectivité** : c'est la capacité du biocapteur à distinguer l'analyte à détecter entre plusieurs substrats. C'est un paramètre qui dépend principalement de l'affinité du biorécepteur envers le substrat à détecter.
- **Sensibilité** : Ce paramètre correspond au rapport entre l'accroissement de la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur à mesurée.
- **Limite de détection** : C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée par le biocapteur.
- **Paramètre d'affinité enzyme-substrat (K_m)** : La constante de Michaelis-Menten (K_m) est la valeur de la concentration de substrat capable de saturer la moitié des sites catalytiques de l'enzyme. Plus K_m est élevé, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible [9].

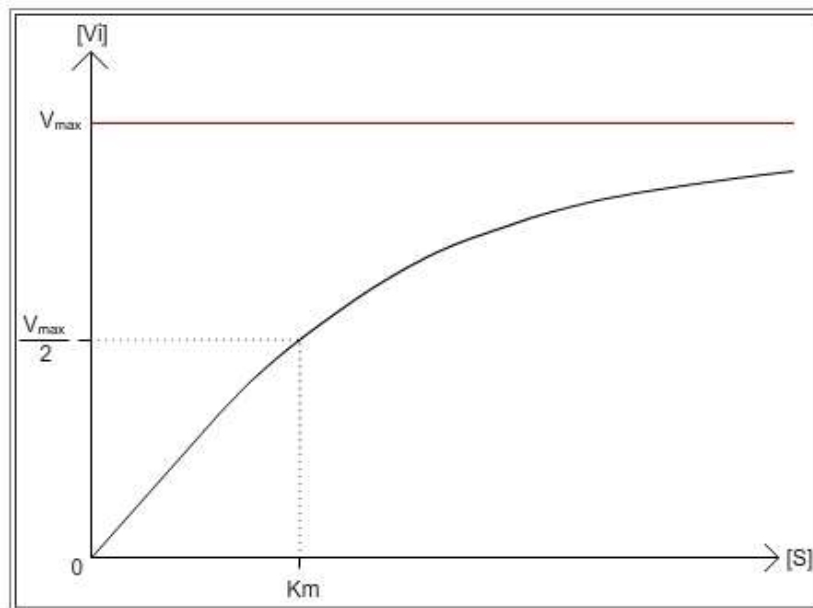


Figure II.3. Évolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat [9].

La stabilité opérationnelle : La stabilité opérationnelle est définie comme la rétention de l'activité enzymatique lors de son utilisation pendant une période bien déterminée. Dans de nombreux cas, la durée de vie d'un biocapteur est d'une grande importance comme dans le cas de la surveillance en continu de la diffusion d'une substance très nocive [9].

CHAPITRE III

Élaboration du biocapteur pour la détection de l'acide caféique

III.1. Mesures électrochimiques

La voltamétrie cyclique est une technique électrochimique couramment utilisée pour contrôler les processus qui se produisent sur la surface de l'électrode de travail. Cette technique est souvent employée en électrochimie pour caractériser les couches enzymatiques déposées sur la surface de l'électrode [31]. Les mesures électrochimiques par voltammétrie cyclique (CV) se réalisent en utilisant un potentiostat-galvanostat Voltalab PGZ 301 connecté à un ordinateur pour le traitement des données. Une cellule électrochimique en verre à trois électrodes de 100 ml de volume. Les trois électrodes sont une contre-électrode, une électrode de travail et une électrode de référence Figure III.2. Les mesures électrochimiques s'effectuent à température ambiante [11]. La figure III.1. montre les principales étapes pour avoir une réponse d'un capteur.

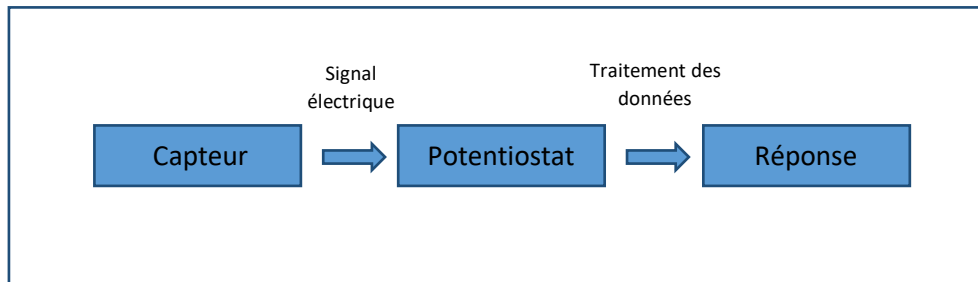


Figure III.1. Représentation schématique de mesure électrochimique.

III.1.1. Principe : La voltamétrie cyclique repose sur l'application d'une différence de potentiel électrique entre l'électrode de référence et l'électrode de travail. Le potentiel est appliqué sous la forme de balayage entre deux valeurs de potentiel E_1 et E_2 en fonction du temps à une vitesse de balayage bien déterminée dans une solution de tampon de phosphate ou d'acétate à pH favorable. Cette technique consiste à étudier les propriétés de la réaction d'oxydo-réduction qui se produit à l'interface de l'électrode de travail. La réponse du système se présente par une courbe de courant mesuré entre la contre électrode et l'électrode de travail en fonction du potentiel appliqué $I=f(E)$ [41].

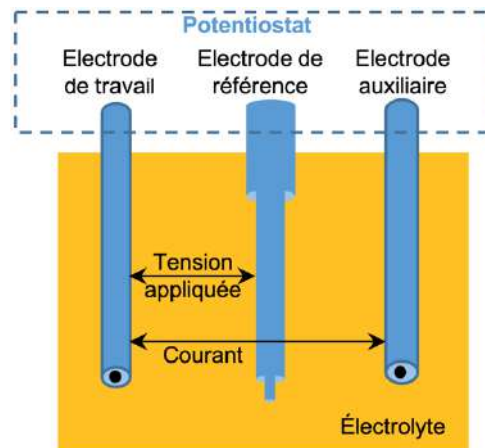


Figure III. 2. Schéma de la configuration à trois électrodes pour les mesures voltamétrique [43].

III.2. Montage à trois électrodes

Il est constitué des électrodes électrochimiques reliées par l'intermédiaire de collecteurs de courant à une alimentation électrique. Afin d'effectuer une réaction électrochimique donnée, le choix des matériaux des électrodes de travail de référence et auxiliaire est très important.

Une électrode de référence son potentiel est constant afin de créer une différence de potentiel avec l'électrode de travail ce qui permet de le contrôler. Cette électrode est placée près possible de l'électrode de travail afin de limiter les erreurs de mesures.

Il existe plusieurs types d'électrodes de références employées dans les cellules électrochimiques à trois électrodes à savoir [44]:

- Électrode à hydrogène.
- Électrode de référence cuivre-sulfate de cuivre saturé.
- Électrode de référence au calomel saturé.
- Électrode de référence argent-chlorure d'argent (Ag/AgCl) ; ce type utilise le chlorure d'argent (Ag/AgCl) avec un potentiel fixé par l'équilibre redox entre l'argent métallique (Ag) et les ions Ag^+ .

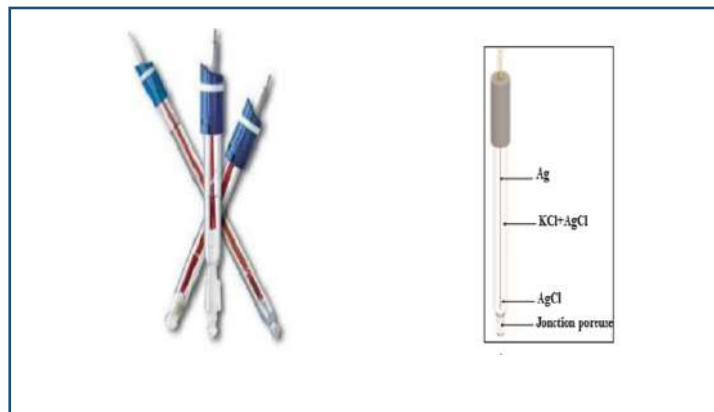


Figure III.3 : Électrodes de référence [11][43].

Une électrode de travail sur laquelle on immobilise l'enzyme et la matrice où la réaction électrochimique aura lieu [31][45].

L'électrode auxiliaire (la contre électrode) est utilisée spécialement dans une cellule électrochimique à trois électrodes pour les mesures électrochimiques. Son rôle est de maintenir une connexion avec l'électrolyte afin d'appliquer le courant à l'électrode de travail. Le matériau utilisé pour fabriquer une électrode auxiliaire doit être un matériau inerte tel que le graphite ou un métal noble comme l'or, le carbone ou le platine figure II.4.



Figure III.4. Électrodes en Or et en platine [46] [47].

III.3. Préparation des biocapteurs

Dans ce travail, nous n'avons pas préparé expérimentalement le biocapteur à cause de la pandémie. En revanche nous expliquerons ici, les principales étapes de la construction du biocapteur qui sont : nettoyage de l'électrode puis on détail les techniques d'immobilisation de l'enzyme.

III.3.1. Nettoyage des électrodes

La surface de l'électrode de travail doit être nettoyé ou autrement dit on effectue un polissage par des techniques chimiques ou physique. La première technique utilise une solution à base des acides tels que H_2SO_4 suivi par sonication. La deuxième technique utilise des nanoparticules d'alumine où l'utilisateur frotte la surface de l'électrode sur un papier très fin avec un mouvement très doux suivi par rinçage avec de l'eau distillée.

III.4. Immobilisation d'enzyme

On trouve dans la littérature plusieurs méthodes d'immobilisation de l'enzyme comme la méthode de réticulation en utilisant des agents réticulant comme le glutaraldehyde, la méthode d'encapsulation, ou immobilisation par adsorption (voir chapitre II).

Un volume d'une solution enzymatique mélangé avec d'autres additifs comme le bovine serum albumine (BSA) comme protéine ou les nanoparticules d'Or (AuNPs) est déposé sur la surface de l'électrode préalablement traitée. L'électrode modifiée est séchée pendant une heure ce qui forme une membrane puis l'électrode est stockée à 4°C jusqu'à son utilisation [11].

III.5. Utilisation des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont des tubes creux concentriques séparés de 0,34 nanomètre avec un diamètre interne de l'ordre du nanomètre et une longueur de l'ordre de quelques micromètres [54]. Les nanotubes de carbone sont subdivisés en deux : les nanotubes de carbone mono-feuillets, (en anglais Single-walled Carbon Nanotubes, SWNT) (figure 5. A) et les nanotubes de carbone multi-feuillets, (en anglais Multi-walled Carbon Nanotubes, MWCNTs) (Figure 5, B) [55-56].

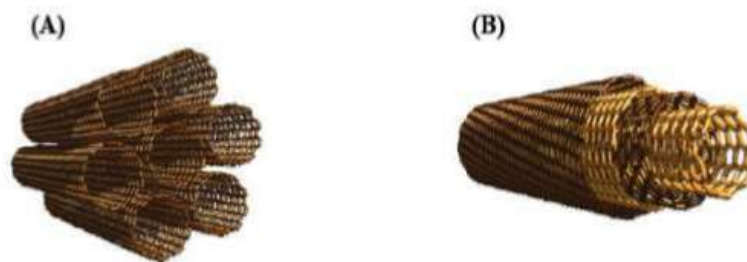


Figure III.5. Représentation schématique des deux classes de nanotube de carbone mono-feuillet (SWCNT) (A) et multi-feuillets (MWCNT) (B).

Les nanotubes de carbone possèdent des propriétés mécaniques, électriques, thermiques et chimiques exceptionnelles qui permettent d'envisager plusieurs applications telles que des dispositifs électroniques, des dispositifs à émission à effet de champ, le renforcement de matériaux composites et des capteurs.

L'utilisation de nanotubes de carbone pour le développement des biocapteurs minimise le problème de diffusion et augmente la surface catalytique et la densité de greffage des biomolécules. L'utilisation des biocapteurs à base de carbone nanotubes peut maintenir la stabilité et l'activité de la biomolécule plus longtemps [11].

Conclusion Générale

Ce travail est basé sur le développement du biocapteur pour la détection de l'acide caféique. Ce mémoire nous a permis d'acquérir des connaissances théoriques sur les techniques de construction des capteurs électrochimiques.

L'objectif principal de cette étude est de modifier une électrode en utilisant des nanomatériaux tels que les polymères conducteurs et les matériaux à base de carbone comme le graphène ou les nanotubes de carbone pour synthétiser un nanocomposite déposé sur la surface de l'électrode pour la détermination de l'acide caféique. Malheureusement, la situation d'urgence pendant cette pandémie nous a obligé de nous contenter au travail théorique. En effet, nous avons présenté dans ce mémoire les informations nécessaires pour développer un capteur électrochimique. Nous avons décrit le principe de la détection électrochimique en présentant un rappel théorique sur les mesures électrochimiques en utilisant un système de trois électrodes liées à une cellule où la substance à détecter se trouve dans un milieu aqueux.

Références Bibliographiques

- [1] Cui, T. J., Smith, D., Liu, R. Theory, Design, and Applications
- [2] Lowe, C. R. (1984). Biosensors. Trends in biotechnology, 2(3), 59-65
- [3] Tran-Minh, C. (1991). Les biocapteurs. Principes, construction et application. Edition Masson, Paris, 1-158.
- [4] Pacelli, M., Loriga, G., Taccini, N., Paradiso, R. (2006, September). Sensing fabrics for monitoring physiological and biomechanical variables: E-textile solutions. In 2006 3rd IEEE/EMBS International Summer School on Medical Devices and Biosensors (pp. 1-4). IEEE.
- [5] Marrazza, G. (2014). Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. Biosensors, 4(3), 301-317.
- [6] Verma, N., Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides—a review. Applied biochemistry and biotechnology, 175(6), 3093-3119.
- [7] Avramescu, A., Andreescu, S., Noguier, T., Bala, C., Andreescu, D., Marty, J. L. (2002). Biosensors designed for environmental and food quality control based on screen-printed graphite electrodes with different configurations. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 374(1), 25-32.
- [8] Shin, H. J. (2010). Development of highly-sensitive microbial biosensors by mutation of the nahR regulatory gene. Journal of biotechnology, 150(2), 246-250.
- [9] Marrakchi, M. (2006). Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et de micro-organismes sur microélectrodes interdigitées (Thèse de doctorat, Ecully, Ecole centrale de Lyon).
- [10] Palomar, Q. (2017). Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt (Thèse de doctorat, Grenoble Alpes).
- [11] Zehani, N. (2015). Étude et développement de biocapteurs électrochimiques pour la détection de polluants en milieu aqueux, Thèse de doctorat, Université de Lyon 1.
- [12] Tlili, C. (2006). Etude et réalisation de biocapteurs impédancemétriques en utilisant différentes approches d'immobilisation, Thèse de doctorat, Université de Paris 11).
- [13] Wang, L., Sipe, D. M., Xu, Y., Lin, Q. (2008). A MEMS thermal biosensor for metabolic monitoring applications. Journal of microelectromechanical systems, 17(2), 318-327.
- [14] Eltzov, E., Pavluchkov, V., Burstin, M., Marks, R. S. (2011). Creation of a fiber optic based biosensor for air toxicity monitoring. Sensors and Actuators B: Chemical, 155(2), 859-867.
- [15] Dai, C. Choi, S. (2013) Technology and Applications of Microbial Biosensor. Open Journal of Applied Biosensor, 2, 83-93

- [16] D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 334(1-2), 41-69.
- [17] Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'Skaya, A. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *Irbm*, 29(2-3), 171-180.
- [18] Kuralay, F., Özyörük, H., & Yıldız, A. (2007). Inhibitive determination of Hg^{2+} ion by an amperometric urea biosensor using poly (vinylferrocenium) film. *Enzyme and microbial technology*, 40(5), 1156-1159.
- [19] Heller, A. (1996). Amperometric biosensors. *Current opinion in biotechnology*, 7(1), 50-54.
- [20] Azevedo, A. M., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M., Fonseca, L. P. (2005). Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(2), 235-247.
- [21] Davis, K. A., Leary, T. R. (1989). Continuous liquid-phase piezoelectric biosensor for kinetic immunoassays. *Analytical chemistry*, 61(11), 1227-1230.
- [22] Daniels, P. B., Deacon, J. K., Eddowes, M. J., Pedley, D. G. (1988). Surface plasmon resonance applied to immunosensing. *Sensors and Actuators*, 15(1), 11-18.
- [23] Rebollar-Pérez, G., Campos-Terán, J., Ornelas-Soto, N., Méndez-Albores, A., Torres, E. (2016). Biosensors based on oxidative enzymes for detection of environmental pollutants. *Biocatalysis*, (1), 118-129.
- [24] Turdean, G. L. (2011). Design and development of biosensors for the detection of heavy metal toxicity. *International Journal of Electrochemistry*.
- [25] Bănică, F. G. (2012). *Enzymes and enzymatic sensors*. Chemical Sensors and Biosensors, ed., John Wiley et Sons, Ltd.
- [26] Brady, D., Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology letters*, 31(11), 1639.
- [27] Bryjak, J., Kruczkiewicz, P., Rekuć, A., Peczyńska-Czoch, W. (2007). Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate. *Biochemical engineering journal*, 35(3), 325-332.
- [28] Rochefort, D., Kouisni, L., Gendron, K. (2008). Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly (ethyleneimine) microcapsules. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 617(1), 53-63.
- [29] Quiocho, F. A., Richards, F. M. (1966). The enzymic behavior of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry*, 5(12), 4062-4076.
- [30] Anh, T. M., Dzyadevych, S. V., Prieur, N., Duc, C. N., Pham, T. D., Renault, N. J., Chovelon, J. M. (2006). Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor. *Materials Science and Engineering : C*, 26(2-3), 453-456.

- [31] Baali, S. (2015). Immobilisation d'enzyme dans des membranes polymérique en vue d'élaborer des capteurs biologique pour la détection des polluants organique, Thèse de doctorat, université de Badji Mokhtar-Annaba.
- [32] <https://www.espritsante.com/articles/acide-cafeique>.
- [33] <https://www.linternaute.fr/dictionnaire/fr/definition/acide-acetique/>
- [34] <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.alamyimages.fr%2Fphotosimages%2Facidef%25C3%25A9rulique.html&psig=AOvVaw1UY5zXiGI9mKfaKYFBZr1C&ust=1591363878272000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwjv9PGoujpAhUFRhoKHQIUAAoQr4kDegQIARA5>
- [35] <https://www.healthline.com/health/caffeic-acid>
- [36] Soares, D. G., Andrezza, A. C., Salvador, M. (2005). Avaliação de compostos com atividadeantioxidanteem células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1), 95-100.
- [37] Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P. (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 20(3), 305-311.
- [38] Weyant, M. J., Carothers, A. M., Bertagnolli, M. E., Bertagnolli, M. M. (2000). Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. *Clinical Cancer Research*, 6(3), 949-956.
- [39] <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319510#how-to-use-caffeic-acid>
<http://dictionnaire.sensagent.leparisien.fr/Acide%20caf%C3%A9ique/fr-fr/>
- [40] Giacomelli, C., Ckless, K., Galato, D., Miranda, F. S., Spinelli, A. (2002). Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(3), 332-338.
- [41] Sboui, D. (2016). Développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de *Legionellapneumophila* dans les échantillons environnementaux, Thèse de doctorat, université de Lyon.
- [42] Smaili, F. (2016). Mise au point d'électrodes chimiquement modifiées pour le dosage des cations métalliques, Thèse de doctorat, université USTHB.
- [43] El Hassani, N. E. A. (2018). Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Électrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire et pour l'Analyse Biomédicale Thèse de doctorat.
- [44] Shinwari, M. W., Zhitomirsky, D., Deen, I. A., Selvaganapathy, P. R., Deen, M. J., Landheer, D. (2010). Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications. *Sensors*, 10(3), 1679-1715.
- [45] Heineman, W. R. (Ed.). (1984). *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. Dekker.

- [46] <https://www.origalys.com/origasens-micro-electrode-d-or-25-m-c2x26461940>
- [47] <https://www.humeau.com/electrode-de-platine-hach-m231pt-9-03603100200.html>
- [48] Bourouina, M. (2018). Élaboration et optimisation de biocapteurs enzymatiques a détection ampérométrique de glucose et de phénol, Thèse de doctorat , université de Setif.
- [49] Montrose, A. (2013). Développement d'un immunocapteur impédimétrique pour la détection et la quantification d'une sous-population cellulaire : application au diagnostic précoce des infections, Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- [50] Liu, J., Tao, L., Yang, W., Li, D., Boyer, C., Wuhner, R., Davis, T. P. (2010). Synthesis, characterization, and multilayer assembly of pH sensitive graphene– polymer nanocomposites. *Langmuir*, 26(12), 10068-10075.
- [51] Liu, J., Wang, R., Cui, L., Tang, J., Liu, Z., Kong, Q., Gooding, J. (2012). Using molecular level modification to tune the conductivity of graphene papers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(33), 17939-17946.
- [52] Cui, L., Liu, J., Wang, R., Liu, Z., Yang, W. (2012). A facile “graft from” method to prepare molecular-level dispersed graphene–polymer composites. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50(21), 4423-4432.
- [53] Andrieux, C. P., Audebert, P., Bacchi, P., Divisia-Blohom, B. (1996). Parameters Regulating Kinetics of Amperometric Biosensor Made of Enzymatic Carbon Paste and Nafion® Gel. *Sensors and Materials*, 8(3), 137-146.
- [54] Iijima, S. (1991). Synthesis of carbon nanotubes. *Nature*, 354(6348), 56-58.
- [55] Smit, M. H., Rechnitz, G. A. (1993). Toxin detection using a tyrosinase-coupled oxygen electrode. *Analytical chemistry*, 65(4), 380-385.
- [56] Wang, J., Tian, B., Lu, J., MacDonald, D., Wang, J., Luo, D. (1998). Renewable-Reagent Enzyme Inhibition Sensor for Remote Monitoring of Cyanide. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 10(15), 1034-1037.

Résumé : Les biocapteurs sont des instruments d'analyse qui transforment une réaction d'une substance chimique en un produit électroactif. Ces outils sont constitués d'un élément de bioreconnaissance moléculaire et un transducteur. Les capteurs utilisant des transducteurs électrochimiques sont les plus utilisés pour la détection de substances en milieux aqueux. La détection ampérométrique qui mesure l'oxydation ou la réduction directe des produits d'une réaction chimique à potentiel fixe est le type le plus couramment utilisé pour la détection des substances. Ce travail est basé sur le développement d'un biocapteur à base d'enzyme (Horse Radishperoxidase) pour la détection de l'acide caféique. Le premier objectif est d'optimiser le choix des nanomatériaux utilisés pour construire une couche adaptée à l'immobilisation de l'enzyme. En outre, la maîtrise de la méthode d'immobilisation de l'enzyme sur le transducteur électrochimique modifié est une étape primordiale pour construire un biocapteur très sensible à la détection. L'étude des caractéristiques analytiques du biocapteur permet l'évaluation de sa performance pour la détection de l'acide caféique.

Mots clefs : Biocapteur, détection ampérométrique, électrodes, méthodes d'immobilisation, enzyme, acide caféique.

ملخص

المستشعرات الحيوية هي أدوات تقوم بتحليل تفاعل المادة الكيميائية إلى منتج نشط كهربياً. تتكون هذه الأدوات من عنصر التعرف البيولوجي الجزيئي ومحول الطاقة. تعتبر المستشعرات التي تستخدم محولات الطاقة الكهروكيميائية هي الأكثر استخداماً للكشف عن المواد في الوسط المائي. يعد الكشف عن قياس التيار الذي يقيس الأكسدة المباشرة أو الإختزال الناتج عن التفاعل الكيميائي بجهد ثابت أكثر الأنواع المستخدمة في الكشف عن المواد. يعتمد هذا العمل على تطوير جهاز استشعار حيوي بإستعمال الإنزيم للكشف عن حمض الكافيك. الهدف الأول هو تحسين اختيار المواد النانوية المستخدمة لبناء طبقة مناسبة للتفاعل الكيميائي. بالإضافة إلى ذلك ، فإن إتقان طريقة تثبيت الإنزيم الموجود على المسبار الكهروكيميائي المعدل يعد خطوة أساسية في بناء جهاز استشعار حيوي شديد الحساسية للكشف. كما تسمح دراسة الخصائص التحليلية لجهاز الاستشعار البيولوجي بتقييم أدائه في الكشف عن حمض الكافيين.

الكلمات المفتاحية: حساس حيوي، كشف قياس التيار، أقطاب كهربائية، طرق تثبيت، إنزيم، حمض الكافيين.