

## 1. DEFINITION.

Un capteur ou biocapteur enzymatique peut considéré comme la combinaison de tout type de transducteur avec une fine couche enzymatique destinée, en générale, à mesurer la concentration d'un substrat. La réaction enzymatique assure la transformation du substrat en produit de réaction détectable par le transducteur [15].

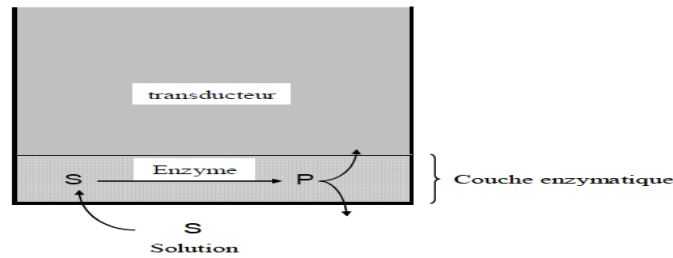
Les biocapteurs enzymatiques utilisent une variété de transducteurs, Le premier biocapteur a été décrit dans la littérature par Clarck et Lyons en 1962 [9] il se basait sur l'utilisation d'oxydase de glucose par détection électrochimique. Ce principe a été depuis largement étendu pour le développement de nouveaux biocapteurs en particulier basés sur les oxydoréductases (comme la tyrosinase, la peroxydase et la lactase) et les hydrolases (cholinestérases). Généralement ces biocapteurs ont été classés en deux catégories [16]:

- Ceux qui mesurent l'inhibition d'une enzyme spécifique due à la présence d'analytes cibles;
- Ceux qui mesurent la transformation catalytique d'analytes cibles par une enzyme spécifique.

## 2. FONCTIONNEMENT.

La représentation schématique d'un capteur enzymatique est donnée par la **figure 2.1** la surface sensible du transducteur est mise en contact avec la couche enzymatique. On suppose qu'il n'existe pas de transfert de masse à travers cette interface. La face externe de la couche enzymatique est trempée dans une solution contenant le substrat à doser. Ce substrat va migrer vers l'intérieur de cette couche et sera décomposé en produit de réaction dès qu'il entrera en contact avec l'enzyme immobilisée. Pour assurer une mise en équilibre rapide des concentrations, la membrane enzymatique doit être aussi fine que possible et la solution bien agitée pour assurer un apport constant en substrat. En résumé, les différentes étapes mises en jeu au cours du fonctionnement du capteur enzymatique sont :

- 1- Transport du substrat de la masse de la solution vers la couche enzymatique.
- 2- Diffusion du substrat dans cette couche, accompagnée de la transformation enzymatique du substrat en produit de réaction.
- 3- Migration du produit vers le transducteur.
- 4- Conversion de la concentration du produit à cette interface, par le transducteur, en signal électrique [15].



**Figure 2.1.** Représentation schématique de la diffusion du substrat S et du produit P dans une couche enzymatique fixée sur un transducteur [37, 4].

### 3. CLASSIFICATION SELON LES ENZYMES IMMOBILISES.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques, des protéines globulaires composées d'un nombre élevé d'acides aminés présentes dans les cellules de tous les êtres vivants. Elles jouent un rôle très important dans la catalyse des réactions se déroulant au sein des cellules; en permettant d'augmenter la vitesse d'une réaction jusqu'à dix millions de fois sans être consommées ou altérées [2].

Dans le cas du biocapteur, les enzymes jouent un rôle très important dans la catalyse des réactions se déroulant au sein de la couche chimiosélective [5]. Leurs propriétés fondamentales et leurs spécificités les rendent bien adaptées à la conception de biocapteurs sélectifs [2,7, 27].

La biodétection enzymatique est conditionnée par la nature de l'analyte et la gamme de sa concentration dans le milieu à analyser. En effet, l'analyte doit d'une part constituer un substrat dans une réaction enzymatique et d'autre part être à une concentration comprise entre  $10^{-1}$  et  $10^{-7}$ M [12]. Il existe plusieurs types d'enzymes regroupées selon le type de la réaction de catalyse. On distingue six groupes d'enzymes [2].

#### 3.1. Les oxydoréductases.

Ce sont des enzymes qui transfèrent des électrons, seuls ou accompagnés de protons d'un donneur à un accepteur. Ce dernier peut être de l'oxygène. Dans ce groupe, on différencie trois catégories :

**a- Les oxydases :** Elles oxydent le substrat à l'aide de l'oxygène de l'air.

**b- Les peroxydases :** Elles oxydent les substrats aux dépens des peroxydes, de sorte qu'il ne se dégage jamais d'oxygène dans ces réactions;

**c- Les déshydrogénases :** Elles détachent l'hydrogène du substrat (donneur) et peuvent le transférer à diverses molécules qui jouent le rôle d'accepteurs comme l'oxygène par exemple.

### 3. 2. Les hydrolases.

Ces enzymes interviennent dans les réactions d'hydrolyses et elles scindent divers composés. On distingue: les protéases, les carbohydrases, les estérases.

### 3. 3. Les transférases.

Ce sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe d'une molécule à une autre. Le groupe transféré peut être très variable: carboxyle, méthyle, amine, groupement phosphoré.

### 3. 4. Les isomérases.

Ces enzymes sont impliquées dans la catalyse des réarrangements intramoléculaires qui peuvent concerner une stéréoisomérisation (forme cis transformée en trans), aussi bien qu'une conversion d'un aldéhyde en cétone.

### 3. 5. Les lyases.

Ces enzymes catalysent la formation d'une double liaison sur un substrat en déplaçant un groupe chimique. La double liaison peut s'établir entre deux atomes de carbone ou un atome de carbone et un atome différent (oxygène, azote, soufre ou halogène).

### 3. 6. Les ligases

Ce type d'enzyme est impliqué dans la catalyse des réactions de synthèse, en utilisant les nucléosides phosphatases riches en énergie, ce qui s'accompagne de la formation d'une liaison entre deux atomes de carbone ou un atome de carbone et d'oxygène, de soufre ou d'azote.

Les enzymes de la classe **oxydoréductases** sont les plus impliquées dans les applications de biodétection. Pour catalyser les réactions d'oxydo-réduction des substrats, ces enzymes sont associées à des molécules appelées "coenzymes d'oxydoréduction" telles que la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et la flavine adénine dinucléotide (FAD). L'application la plus connue est celle du glucose oxydase pour mesurer la glycémie. Ce biocapteur a connu un développement très important dans les années quatre-vingts pour améliorer la performance de ces mesures [17] et la réalisation de bandelettes pour l'auto-surveillance de la glycémie chez les patients du diabète [22,20]. Durant la fin des années quatre-vingt et pendant les années quatre-vingt-dix, les efforts se sont concentrés d'une part sur l'amélioration de la qualité de l'électrode de mesure [32], et d'autre part sur le développement de dispositifs implantables pour la mesure en continu de la glycémie [35,12].

Après les oxydoréductases, les **hydrolases** sont les enzymes les plus exploitées pour des applications de biodétection enzymatiques [29]. Toutes les classes enzymatiques, à l'exception des **ligases**, ont été utilisées dans la conception de biocapteurs. Dans le **tableau 2.1**, sont présentés quelques exemples de biorécepteurs enzymatiques utilisés.

Il est parfois nécessaire de combiner les actions de plusieurs enzymes dans un seul biocapteur. Ainsi, les substances dont la production a été catalysée par une enzyme E1 constituent les substrats pour une autre enzyme E2. Cependant, l'intégration de plusieurs classes enzymatiques dans une application de biodétection n'est pas sans conséquence sur la qualité de l'analyse. En effet, on remarque que la capacité de détection, exprimée en limite de détection (LD) dans le **tableau 2.1**, est d'autant plus faible que le nombre de réactions enzymatiques exploitées est élevé.

Les enzymes pures restent à ce jour les biorécepteurs les plus largement utilisés pour la mise au point de biocapteurs [31], Néanmoins elles sont relativement coûteuses et pour la plupart souffrent d'un manque de stabilité au cours du temps [10].

**Tableau 2. 1.** Exemples de biorécepteurs enzymatiques [12].

Classe enzymatique	Enzyme	Analyte	LD
<b>Hydrolase</b>	Hydrolase d'organophosphorés	Paraoson	16nM
<b>Isomérase</b>	Protéine disulfide isomérase humaine	vincristine	ND
<b>Transférérase + oxydoréductase</b>	Glycérol kinase Glycérol-3-phosphate oxydase	ATP	200nM
<b>Lyase +lyase +oxydoréductase</b>	Citrate lyase Oxaloacétate décarboxylase Pyruvate oxydase	Acide citrique	15µM

LD : Limite de détection. ND : Non Déterminé. ATP : Adénosine triphosphate

#### 4. TECHNIQUES D'IMMOBILISATION DES ENZYMES.

Les méthodes d'immobilisation du biorécepteur un point essentiel pour la fabrication d'un biocapteur est l'immobilisation des entités biologiques actives sur la surface du transducteur [24]. Dans la construction d'un biocapteur, l'immobilisation du biorécepteur, en particulier celle des enzymes, sur du transducteur est une étape cruciale, En effet, le but principal est de fixer l'enzyme à la surface de l'électrode permettant de ce fait, une utilisation à long terme de l'enzyme tout en maintenant son activité biologique [2].

L'immobilisation est nécessaire à une bonne détection du signal biochimique issu du biorécepteur [26]. À la fixation des enzymes, plusieurs conditions doivent être respectées telles que :

- L'activité de l'enzyme doit être maintenue.
- Le substrat doit pouvoir pénétrer facilement dans la couche pour accéder à l'emplacement actif de l'enzyme.
- Le transfert de masse du substrat et des molécules de produit par la couche immobilisée ne doit pas être gêné [2].

Les enzymes peuvent être immobilisées par des méthodes chimiques et/ou physiques. Les qualités demandées à la membrane enzymatique sont nombreuses:

1. **Stabilité:** la capacité à conserver l'activité de l'enzyme pendant un temps nécessaire pendant les mesures;
2. **Sélectivité:** l'aptitude de l'enzyme à reconnaître un seul analyte défini.
3. **Reproductibilité:** l'aptitude de l'enzyme à retrouver l'activité initiale après des mesures.
4. **Sensibilité:** la capacité à détecter une concentration faible de l'analyte.
5. **Accessibilité de l'espèce de reconnaissance:** la capacité de l'analyte de passer facilement à travers la couche sensible vers l'enzyme [26].

Les techniques d'immobilisation peuvent être divisées en six classes principales [2].

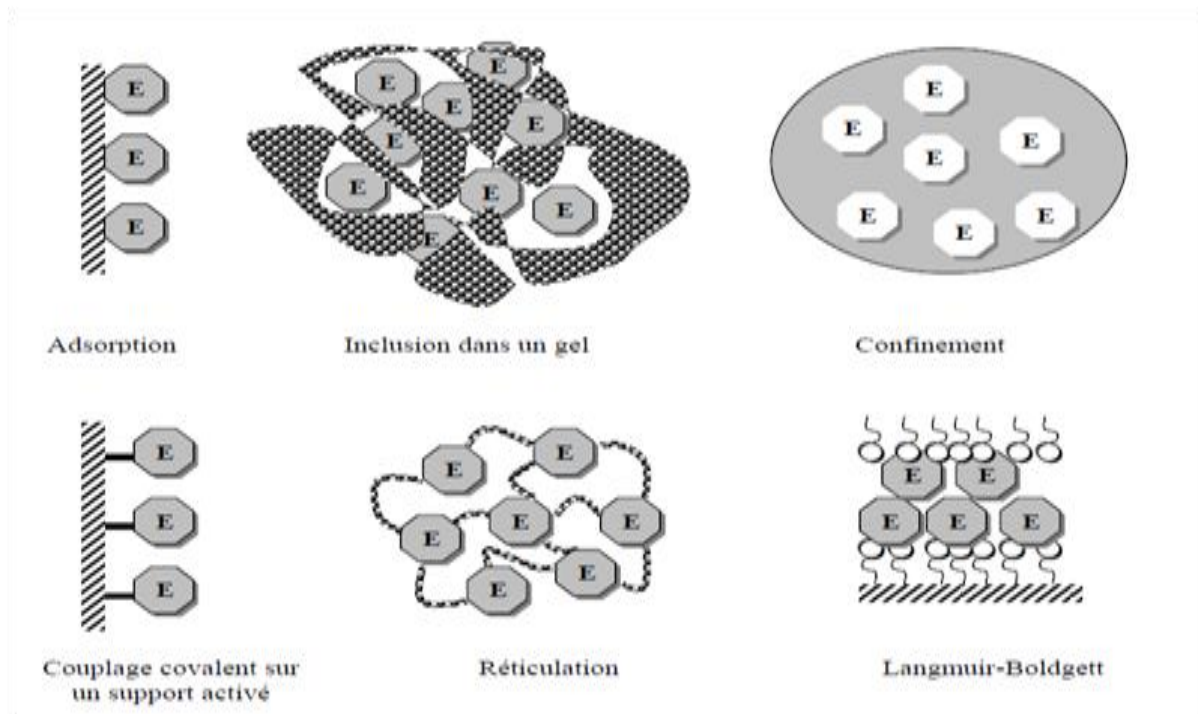


Figure 2.2. Méthodes d'immobilisation d'une enzyme [2].

#### 4.1. L'adsorption physique

La fixation des biomolécules par adsorption physique est la méthode la plus simple. Au début, cette méthode d'immobilisation a été largement employée pour fixer une molécule à la surface solide [2], par l'intermédiaire d'un matériau actif. Les matériaux actifs peuvent être des résines échangeuses d'ion anionique ou cationique, du charbon de bois actif, des gels de silice, de l'argile, de l'oxyde de l'aluminium, du verre poreux ou des céramiques [26].

L'adsorption repose sur les interactions physiques ou chimiques qui peuvent exister entre un composé biologique et une surface [27].

L'adhésion de l'enzyme à la surface du transducteur est basée sur des interactions électrostatiques multiples: électrostatique pur, hydrophobe, van-der-Waals ou des liaisons hydrogénéés [2,26].

#### 4.2. L'inclusion physique.

Cette technique consiste à incorporer la biomolécule dans un gel organique (polymère) [26] ou inorganique (argile) [2.26], un polymère (conducteur ou non conducteur) ou derrière une membrane semi-perméable [2]. Dans les deux cas, l'enzyme est mélangée au matériau, puis déposée à la surface d'un biocapteur sous certaines conditions [26].

Les pores du réseau polymère doivent être assez grands pour permettre la diffusion libre des substrats et des produits mais à condition de maintenir l'enzyme dans le réseau. Les polymères conducteurs peuvent être électroniquement conducteurs (le polypyrrole, le polyaniline...), conducteurs redox (hydrogel, nafion modifié,...) ou des polymères non conducteurs [2].

Par inclusion, l'enzyme se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques ou inorganiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de la biomolécule grâce à une porosité suffisante du gel. Cette technique est cependant limitée par la taille des pores du gel favorisant ainsi le relargage des biomolécules de faible poids moléculaire. Dans cette méthode, l'activité de l'enzyme dépend du microenvironnement local de l'entité biologique immobilisée (PH, force ionique, problèmes de diffusion, etc...) [2,26].

#### 4.3. Le couplage covalent.

Conduit à des liaisons fortes entre la biomolécule et la surface du transducteur [1]. En effet, cette technique d'immobilisation exige la présence de groupements fonctionnels sur la surface du transducteur, Ces groupements sont en général de type carboxylique (-COOH), amine (-NH<sub>2</sub>), hydroxyle (-OH) ou thiol (-SH) et n'étant que peu réactifs chimiquement, d'où la nécessité de les activer ou les traiter par des réactifs appropriés pour réagir dans des conditions douces avec les groupements fonctionnels de la biomolécule n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire [2, 26, 27]. On peut aussi procéder à la salinisation de support portant des groupements M-OH pour changer la nature des groupements de surface [27]. Les principaux agents activateurs sont les carbodiimides, le bromure de cyanogènes, les sels de diazonium, les isocyanates, les thiols [2]. Cette technique est particulièrement intéressante car la réaction, irréversible, assure une fixation durable de l'enzyme, condition requise pour garantir une certaine durée de vie aux sondes biologiques [27].

#### 4.4. La réticulation.

Des biomolécules à la surface d'un support solide ou à d'autres biomolécules par l'utilisation d'un agent de réticulation augmente la stabilité du biocapteur [2]. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amine des enzymes pour former des pontages covalents (*cross-linking*) "enzyme-enzyme". Cependant, on distingue deux modes de réticulation des biomolécules; soit entre elle, soit en faisant intervenir d'autres protéines inactives, Le couplage enzyme-enzyme aboutit à des biocapteurs stables mais les biomolécules immobilisées de cette manière perdent une partie de leurs activités du fait de la rigidification de la structure tridimensionnelle. Pour remédier à ce problème, une nouvelle stratégie consiste à co-réticuler, par exemple, l'enzyme (E) avec une autre protéine inactive (P) telle que l'albumine, L'introduction de cette protéine améliore la répartition des masses des différentes protéines et permet une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues [2, 26].

#### 4.5. La technique de Langmuir-Boldgett (LB).

Consiste à emprisonner des molécules d'enzymes entre deux monocouches de composés amphiphiles (tensio-actifs) grâce à la force électrostatique.

Les films sont constitués d'une à plusieurs monocouches assemblées en un arrangement ordonné de molécules amphiphiles. Ces films ordonnés créent une matrice inerte dans laquelle, l'enzyme peut être immobilisée. Cette méthode est une technique douce pour l'immobilisation d'enzyme; elle permet de contrôler les édifices moléculaires mais des problèmes de stabilité peuvent être constatés (durée de vie de seulement quelques jours) [2].

#### 4.6. Le confinement.

Cette technique est purement physique, elle consiste à incorporer la biomolécule dans une matrice organique ou inorganique comme les argiles, les HDL, des polymères (le polypyrrole, la polyaniline...), des hydrogels (nafion, alginate). Cette méthode permet d'immobiliser une grande quantité de biomolécules. Cependant, la matrice d'immobilisation doit être suffisamment poreuse pour permettre la diffusion des espèces (substrats et des produits) tout en évitant le relargage de la biomolécule. L'activité de la biomolécule encapsulée est dépendante de son microenvironnement (diffusion, PH, force ionique) [8].

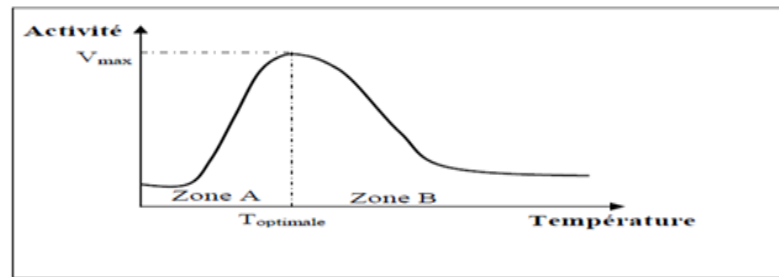
**Tableau 2.2.** Les avantages et les inconvénients des méthodes d'immobilisation [3,23].

Méthodes	Avantages	Inconvénients
<b>Adsorption</b>	Réutilisation possible de la matrice. Traitement peu dénaturant, pas de modification de l'élément biologique.	Fixation très fragile. La moindre variation de PH, de la force ionique, de la température, peut provoquer la désorption.
<b>Couplages covalents</b>	Faible contrainte diffusionnelle, Liaisons fortes entre l'élément biologique et la matrice, résistance aux changements de PH et de force ionique.	Matrice non réutilisable; Toxicité des molécules utilisées.
<b>Réticulation</b>	Utilisation conjointe à la rétention physique pour éviter le relargage de l'élément biologique.	Les liaisons covalentes sont majoritairement formées entre les éléments biologiques et les protéines de charge plutôt qu'entre l'élément biologique et la matrice; toxicité des molécules utilisées.
<b>Rétention physique</b>	Traitement doux, pas de modification de l'élément biologique.	Contraintes diffusionnelles potentiellement importantes, relargage possible de l'élément Biologique.
<b>Langmuir-Boldgett</b>	Technique « douce » Obtention d'édifices supramoléculaires bien contrôlés.	Stabilité de l'édifice moléculaire médiocre en solution réservé aux transducteurs plans.
<b>Confinement</b>	Le biorécepteur restant libre en solution à l'intérieur d'un compartiment fermé par une membrane sélective conserve une activité maximale.	Technique complexe.

## 5. PARAMETRES AFFECTANT LA BIOFONCTIONNALISATION.

### 5.1. Effet de la température.

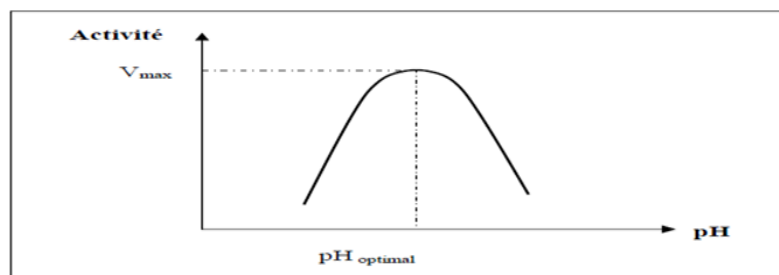
En général, une élévation de la température entraîne une augmentation de la vitesse de la réaction enzymatique. Cependant, il existe une zone de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température est déterminée par la mesure des variations de la vitesse de la réaction en fonction de la température du milieu (**Figure 2.3**). Le changement d'activité enzymatique en fonction de la température résulte de deux effets antagonistes. D'une part, l'activation des réactions chimiques par la chaleur se traduit par l'augmentation de l'agitation des molécules qui, avec l'élévation de la température, va accroître la fréquence de collisions entre le substrat et l'enzyme (zone A); D'autre part, la dénaturation de la protéine enzymatique par la chaleur va modifier, voire détruire, les structures tertiaires et quaternaires de la protéine globulaire et donc faire passer l'enzyme d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité (zone B) [1].



**Figure 2. 3.** Effet de la température sur l'activité enzymatique. Activation par la chaleur (zone A), Dénaturation thermique (zone B) [2].

### 5.2. Effet du PH.

L'enzyme est une macromolécule constituée par des acides aminés ayant des groupements fonctionnels ionisables. L'état d'ionisation de ces acides aminés dépend du PH. Ce dernier a une influence sur la nature des réactifs et des produits. Lorsque les groupes catalytiques de l'enzyme sont altérés, la réaction enzymatique n'atteint pas son état de transition normale, et ceci peut provoquer le blocage du processus de catalyse. La **figure 2.4.** Montre l'effet du PH sur l'activité de l'enzyme, Dans le cas où le PH est égal au  $PK_a$  de la réaction de l'un des groupes catalytiques d'un site enzymatique, les molécules d'enzymes sont actives à 50% [2].



**Figure 2.4.** Effet du PH sur l'activité enzymatique [2].

## 6. AVANTAGES ET INCONVENIENTS.

Malgré le coût relativement important des enzymes, de nombreux biocapteurs enzymatiques ont été développés en laboratoire et certains ont été commercialisés. Chaque type de biocapteur comporte à la fois des points forts et des points faibles. Le manque de stabilité durable dans le temps et la difficulté de fabrication sont les problèmes les plus souvent cités [4, 26]. Le nombre important d'enzymes commercialement disponibles a contribué au développement des biocapteurs enzymatiques. Leur contribution permet d'élargir l'application des biocapteurs dans des domaines différents [26]. L'intérêt d'une telle électrode réside dans la possibilité d'un dosage spécifique d'une substance dans un milieu complexe avec une très faible consommation d'enzyme, donc à moindre coût. De plus, la mesure peut être effectuée rapidement et simplement, sans nécessiter de prétraitements

de l'échantillon. Enfin, la nature amplifiable du signal électrique permet une haute sensibilité de détection avec une bonne précision [25].

### **6.1. Temps de réponse.**

La réponse d'une électrode à enzyme n'est pas immédiate; il est nécessaire pour que le signal de sortie soit fiable, qu'un état d'équilibre s'installe. Le temps de réponse varie de quelques dizaines de secondes à plusieurs minutes. Il dépend notamment des limitations de transfert de masse (épaisseur de la couche enzymatique, perméabilité des membranes, vitesse d'agitation) que l'on cherche à minimiser [25].

### **6.2. Sensibilité et gamme de concentration.**

Ces paramètres dépendent de chaque type d'électrodes et de leur conception mais surtout des caractéristiques cinétiques de l'enzyme. La sensibilité de réponse dépend surtout de la capacité réactionnelle de la couche enzymatique. L'existence d'une limite de linéarité entre l'amplitude du signal et la concentration en substance dosée dans le milieu réactionnel s'explique essentiellement par la disparition de la proportionnalité entre la vitesse de la réaction enzymatique et la concentration en substrat [25].

### **6.3. Temps de lavage.**

Ce type d'électrode permet la réalisation d'ajouts successifs d'échantillons à doser dans un volume donné de solution tampon, ceci jusqu'à une valeur limite de concentration déterminée. Dans ces conditions, le lavage pour retourner à la ligne de base n'est nécessaire que tous les 20 ou 30 essais. Le temps nécessaire dépend du type du capteur [25].

### **6.4. Interférences.**

Les interférences peuvent être dues à l'enzyme ou au capteur. En effet, la spécificité de la réaction catalysée est une propriété enzymatique. Certaines enzymes sont très spécifiques du substrat alors que pour d'autres il existe un groupe de substrats possibles. La présence éventuelle d'inhibiteurs de l'enzyme dans l'échantillon à doser peut être une cause d'erreur. D'autres interférences peuvent par contre être dues au capteur électrochimique qui est sélectif mais non spécifique [25].

### **6.5. Stabilité.**

La stabilité, essentiellement la stabilité thermique de l'enzyme est une caractéristique essentielle compte-tenu de sa répercussion sur le coût des analyses. Le nombre d'analyses réalisables avec le même film enzymatique dépend de la température de travail et de la fréquence d'utilisation. La durée de vie d'une membrane est généralement de quelques jours à quelques mois [25].