



Contribution des argiles ferrifères à l'élaboration de biocapteurs ampérométriques : Etude de l'interaction de l'Hémoglobine avec des Argiles et des Hydroxydes Doubles Lamellaires.

Khaled Charradi, Chantal Gondran, Jean-Claude Moutet, Claude Forano, Prévot Vanessa, Mousty Christine

► **To cite this version:**

Khaled Charradi, Chantal Gondran, Jean-Claude Moutet, Claude Forano, Prévot Vanessa, et al.. Contribution des argiles ferrifères à l'élaboration de biocapteurs ampérométriques : Etude de l'interaction de l'Hémoglobine avec des Argiles et des Hydroxydes Doubles Lamellaires.. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. <tel-00508048>

HAL Id: tel-00508048

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00508048>

Submitted on 2 Aug 2010

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

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

Université de Grenoble



Université 7 Novembre de Carthage



Thèse en Co-tutelle

dirigée par Mme Christine Mousty et Mr. Abdesslem Ben Haj Amara

Présentée pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université 7 Novembre de Carthage et de l'Université de Grenoble

(Spécialités : Biologie – Chimie Inorganique et Bio Inorganique)

Par

Khaled Charradi

***Contribution des argiles ferrifères à l'élaboration de biocapteurs
ampérométriques :
Etude de l'interaction de l'Hémoglobine avec des Argiles
et des Hydroxydes Doubles Lamellaires.***

Soutenue publiquement le 11 Juin 2010, devant la commission d'examen :

Président :

Jean-Claude Moutet

Pr. Université Joseph Fourier

Rapporteurs :

Nicole Jaffrezic-Renault

Directrice de Recherche CNRS

Mohamed El Maoui

Pr. Faculté des Sciences de Tunis

Examineurs :

Hafedh Abdelmelek

M. C. Faculté des Sciences de Bizerte

Christine Mousty-Desbuq

Directrice de Recherche CNRS

Abdesslem Ben Haj Amara

Pr. Faculté des Sciences de Bizerte

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Département de Chimie Moléculaire (DCM) de Grenoble, le Laboratoire de Matériaux Inorganiques (LMI) de Clermont-Ferrand et le Laboratoire de Physique de Matériaux Lamellaires et Nanomatériaux Hybrides (LMNH) de Bizerte. Je remercie les directeurs du DCM et du LMI, respectivement Mrs Pascal Dumy et Rachid Mahiou, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires.

Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de thèse Madame Christine Mousty, Directrice de recherche au CNRS, pour la qualité de son encadrement, ses compétences, ses conseils, sa disponibilité et ses qualités humaines qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. J'exprime ma gratitude au Professeur Abdesslem Ben Haj Amara pour avoir accepté la responsabilité de co-encadrer ce travail de thèse et pour son soutien pendant ces quatre années.

Je tiens à remercier Madame Nicole Jaffrezic-Renault, Directrice de recherche au CNRS à Lyon, et Monsieur Mohamed El Maaoui, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie aussi Monsieur Jean-Claude Moutet, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury et Monsieur Hafed Abdelmelek, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Bizerte, pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Mes plus vifs et sincères remerciements vont à :

Mademoiselle Chantal Gondran, Maître de Conférences au DCM, pour m'avoir aidé à faire les expériences d'impédance.

Madame Vanessa Prévot, Chargée de recherche CNRS au LMI, pour son aide précieuse en microscopie électronique.

Monsieur Claude Forano, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, pour son aide dans la synthèse des matériaux inorganiques.

Monsieur Dominique Madern de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble pour la réalisation des expériences de dichroïsme circulaire.

Madame Jocelyne Brendlé du laboratoire des Matériaux à Porosité Contrôlée de Mulhouse, Monsieur Jean-Louis Robert de l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés de Paris et Madame Sabine Petit de l'Université de Poitiers pour nous avoir fourni des échantillons d'argiles cationiques synthétiques.

J'exprime toute ma reconnaissance envers les responsables des programmes CMCU06/1270 et Mira d'avoir accepté de financer ma thèse.

Je n'oublie pas de citer les étudiants des laboratoires DCM, LMI et PLMNH qui ont pris une grande place pendant mes années de thèse. Merci enfin à toute ma famille et à tous mes amis, qui m'ont toujours soutenu pendant mes années d'études.

Sommaire

<u>Introduction générale</u>	1
---	---

Chapitre I : Positionnement du sujet

I.1- Les argiles	5
I.1.1- Les argiles cationiques	5
I.1.2- Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL).....	10
I.2- Les Biocapteurs	16
I.2.1- Les bio-récepteurs	16
I.2.1.1- Les hémoprotéines.....	17
I.2.1.2- Principales méthodes d'immobilisations des enzymes	18
I.2.2.- Les transducteurs.....	20
I.3- Le transfert électronique direct des hémoprotéines.....	22
I.3.1- Généralités.....	22
I.3.2- L'immobilisation des hémoprotéines dans les argiles.....	24
I.3.3- Biocapteurs à peroxyde d'hydrogène	26
I.4- Conclusion.....	27
I.5- Références	28

Chapitre II : Les argiles cationiques

II.1- Introduction.....	38
II.2- Caractérisation physico-chimique des argiles utilisées.....	39
II.3- Caractérisation électrochimique des argiles.....	43
II.3.1- Mesures de la perméabilité des films d'argiles	43
II.3.2- Mesures d'impédances électrochimiques	48
II.3.3- Voltammétrie cyclique.....	51
II.4- Comportement électrochimique des argiles en présence d'un médiateur redox (MV ²⁺)	53
II.5- Immobilisation de l'hémoglobine dans les argiles.....	57
II.5.1- Isothermes d'adsorption.....	57
II.5.1.1- Cinétique d'adsorption.....	60
II.5.1.2- Isothermes d'adsorption de l'Hb	61
II.5.2- Caractérisations physico-chimiques de Hb/argiles	63
II.5.2.1- Caractérisation par DRX.....	63
II.5.2.2- Spectroscopie Infra-rouge.....	65
II.5.2.3- Spectroscopie UV	66

II.5.2.4- Imagerie par microscopie à balayage.....	67
II.5.3- Etude électrochimique de Hb/argiles.....	68
II.5.3.1- Adsorption d'Hb par l'électrode modifiée par les argiles.....	68
II.5.3.2- Etude électrochimique de Hb/argiles.....	72
II.6- Dosages ampérométriques du peroxyde d'hydrogène.....	77
II.6.1- Dosage en milieu acide.....	77
II.6.2- Dosage avec un médiateur chimique (MV ²⁺ /Argiles).....	79
II.6.3- Dosage par des biocapteurs Hb/Argile.....	80
II.7- Conclusion.....	82
II.8- References.....	83

Chapitre III : Les Hydroxydes Doubles Lamellaires

III.1- Introduction.....	88
III.2- Préparation des HDL de référence.....	89
III.2.1- Caractérisation par DRX.....	90
III.2.2- Caractérisation par spectroscopie infrarouge.....	92
III.3- Etude de l'interaction Hb/HDL.....	93
III.3.1- Interaction Hb/HDL à base de Mg.....	93
III.3.1.1- Détermination du potentiel Zêta.....	93
III.3.1.2- Etablissement des isothermes d'adsorption.....	94
III.3.1.3- Caractérisation structurale des phases Hb/HDL adsorbées.....	97
III.3.1.4- Caractérisation morphologique.....	101
III.3.2- Interaction Hb/ZnAl.....	103
III.4- Coprécipitation des matériaux biohybrides.....	104
III.4.1- Synthèse par coprécipitation Mg ₂ Al-Hb.....	105
III.4.2- Caractérisation par DRX.....	106
III.4.3- Spectroscopie Infrarouge.....	107
III.4.4- Spectroscopie UV-Visible.....	108
III.4.5- Dichroïsme circulaire.....	109
III.4.6- Analyse morphologique.....	110
III.4.7- Coprecipitation de Zn ₂ Al-Hb.....	112
III.5- Caractérisations électrochimiques des biohybrides.....	113
III.5.1- Perméabilité des films d'HDL.....	114
III.5.2- Comportement électrochimique de Mg ₂ FeCl en milieu neutre.....	116
III.5.3- Etude électrochimique des biohybrides Hb/HDL.....	117
III.5.3.1- Etude des phases adsorbées Hb/HDL.....	117
III.5.3.2- Etude électrochimique des phases coprécipitées.....	119
III.5.4- Dosages ampérométriques de peroxyde d'hydrogène.....	121
III.6- Conclusion.....	125
III.7- Références :.....	126

Chapitre IV : Immobilisation d'une porphyrine au fer par les Hydroxydes Doubles Lamellaires

IV.1- Introduction	130
IV.2- La coprécipitation de HDL-FeTSPP	133
IV.3- Caractérisations physicochimiques des HDL-FeTSPP	134
IV.3.1- Caractérisation par DRX	134
IV.3.2- Spectroscopie Infra-Rouge	136
IV.3.3- Spectroscopie UV-Vis.....	138
IV.4-Electrochimie des HDL-FeTSPP.....	141
IV.4.1- Voltammétrie cyclique	141
IV.4.2- Biocapteurs à peroxyde d'hydrogène	143
VI.5- Conclusion.....	144
VI.6- Références	145

<u>Conclusion générale</u>	148
---	-----

<u>Annexes</u>	152
-----------------------------	-----

Introduction générale

Le fer est le quatrième élément minéral le plus abondant dans la couche terrestre (6% de masse) après l'oxygène, le silicium et l'aluminium. Il constitue un élément essentiel dans le règne animal car il est une source de transfert d'électrons. Il est présent dans les minéraux sous forme d'oxy-hydroxydes et de silicates lamellaires. Ainsi dans les argiles naturelles le fer, au degré d'oxydation deux ou trois, se situe soit dans leurs feuillets ou sous la forme de cation compensateur dans l'espace inter-feuillet. La présence du fer modifie leurs propriétés structurales et électrochimiques. Notamment, il a été suggéré que le fer, présent à l'état de trace dans des argiles naturelles, intervenait dans la décomposition électrochimique ou photochimique du peroxyde d'hydrogène. Beaucoup d'enzymes produisent ou consomment le peroxyde d'hydrogène dans leur cycle catalytique, il est donc important de comprendre le rôle des argiles au fer dans ce cycle.

L'immobilisation des protéines sur des supports organiques ou inorganiques est à l'origine d'un grand nombre de travaux de recherche avec des applications en catalyse ou en chimie analytique. Parmi les différentes matrices inorganiques, on trouve les argiles. L'intérêt accordé à ces matériaux se justifie par leur abondance naturelle, leur capacité d'échange, leur porosité, leur biocompatibilité. Ces matériaux sont de très bonnes matrices d'immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs électrochimiques. Ainsi des interactions spécifiques entre des hémoprotéines ou enzymes et des argiles cationiques favorisent le transfert direct d'électrons entre l'électrode et le site actif de la biomolécule. Cette propriété très particulière et rare permet de concevoir des biocapteurs ampérométriques de troisième génération. Parallèlement des matériaux synthétiques, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) aussi appelés argiles anioniques, ont également été utilisés pour immobiliser des enzymes.

Dans ce travail nous tâcherons de mettre en évidence le rôle éventuel du fer dans le transfert électronique se produisant à la surface des électrodes modifiées par des argiles ou des HDL. Les propriétés redox de ces matériaux inorganiques riches en fer comme matrices d'immobilisation d'hémoprotéines pourraient contribuer à l'amélioration du transfert électronique entre l'électrode et l'hème et par conséquent augmenter les performances des biocapteurs par un phénomène d'électrocatalyse. Comme hémoprotéine, nous avons choisi l'hémoglobine. Les différentes argiles et HDL utilisés ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques et électrochimiques avant d'être utilisés comme matrices d'immobilisation de l'hémoglobine. Les propriétés électro-catalytiques de l'hémoglobine immobilisée ont été

étudiées pour la réduction du peroxyde d'hydrogène, pour terminer par la réalisation de biocapteurs ampérométriques.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une revue bibliographique où nous décrirons les propriétés structurales et morphologiques des argiles cationiques et des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) et leur utilisation comme matrices d'immobilisation de protéines et d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs. Le principe de fonctionnement des biocapteurs ampérométriques sera expliqué. Enfin, l'état de l'art des études de l'interaction argiles-hémoprotéines et leurs applications comme biocapteurs sera résumé.

Dans le deuxième chapitre nous étudierons les propriétés électrochimiques du fer structural dans des argiles cationiques, en relation avec leurs propriétés structurales et physico-chimiques. Cette étude sera réalisée dans différents milieux (pH acide et neutre) en présence ou non d'un médiateur rédox (le méthyle viologène). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aussi à l'adsorption de l'hémoglobine par des argiles cationiques. Cette étude nous a permis la réalisation de différents capteurs ampérométriques à H_2O_2 .

Le troisième chapitre est dédié à l'utilisation des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) comme matrices d'immobilisation de l'hémoglobine. Au moment où nous avons commencé cette étude, aucun article dans la littérature ne décrivait l'immobilisation de l'hémoglobine dans les HDL. Nous avons synthétisé des HDL de différentes compositions contenant ou pas du fer. Ces HDL ont ensuite été utilisés pour immobiliser l'hémoglobine. L'interaction hémoglobine-HDL sera caractérisée par différentes méthodes physico-chimiques. La dernière partie du chapitre sera consacrée à l'étude du comportement électrochimique de l'hémoglobine immobilisée des les différents HDL et à la réalisation de biocapteurs à H_2O_2 avec ces matériaux biohybrides.

Le quatrième et dernier chapitre de ce travail de thèse sera consacré à l'immobilisation d'une métalloporphyrine anionique au fer, modèle du site actif de l'hémoglobine, dans différentes matrices HDL et à leur caractérisation par des techniques physico-chimiques et électrochimiques. Cette étude sera achevée par la réalisation d'un capteur à H_2O_2 .

Nous terminerons par les conclusions et perspectives.

Chapitre I :

Positionnement du sujet

I.1-Les argiles

I.1.1-Les argiles cationiques

D'un point de vue géologique, l'argile se rapporte à la terre grasse et molle contenant un ensemble de particules fines dont la taille est inférieure à $2 \mu\text{m}$ [1]. Comme matériaux, les argiles sont utilisées dans différents domaines industriels : dans la fabrication des matériaux de construction, dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

La classification des argiles et leur nomenclature dépendent de leur composition chimiques et de l'ordre structural. La classification adoptée par le comité de nomenclature de l'Association Internationale pour l'Etude des Argiles (AIPEA) varie avec les données structurales. Ce sont des matériaux lamellaires constitués par l'empilement de feuillets. Un feuillet est formé par l'association de couches tétraédriques (T) à base de tétraèdres SiO_4 et de couches octaédriques (AlO_6) (O) (figure I-1). Suivant le mode d'agencement des tétraèdres et des octaèdres on distingue 2 grandes familles de minéraux :

- 1) Les minéraux fibreux qui sont des espèces à pseudo feuillets, par exemples les palygorskites (attapulgite) et les sépiolites.
- 2) Les minéraux phylliteux à structures lamellaires. Ces derniers sont les plus répandus et les plus étudiés. Leur classification est basée sur le mode d'association des couches structurales et le degré d'occupation des sites de la couche octaédrique (di ou tri octaédrique). Selon la séquence d'empilement des couches tétraédriques et octaédriques on distingue des minéraux de type 1/1 (T-O), 2/1 (T-O-T) et 2/1/1(T-O-T-O).

➤ Les minéraux 1/1

Ces minéraux sont constitués par l'empilement suivant la normale des feuillets formés par l'association d'une couche tétraédrique et d'une couche octaédrique. Les tétraèdres sont liés par trois sommets et le quatrième sommet du tétraèdre sert de lien avec la couche octaédrique. La distance basale est de l'ordre de 7 \AA . L'ensemble des charges est repartit de telle sorte que le feuillet est électriquement neutre. La cohésion des feuillets est assurée par des

ponts hydrogènes. Dans ce sous-groupe d'argiles, on peut citer la famille des kaolinites (la kaolinite, la dickite et la nacrite) et l'halloysite.

➤ Les minéraux 2/1

Ces phyllosilicates comptent plus de 200 variétés de minéraux différents [1], parmi lesquelles on trouve les groupes des micas et des smectites [2]. Ces argiles sont composées d'agglomérats, ces agglomérats sont composés de particules, chacune des particules est composée d'un empilement de feuillets ayant une grande extension dans le plan (a,b). Un feuillet est composé d'une couche planaire formée par un cation en coordinance octaédrique encadrée de deux couches planaires de silicium en coordinance tétraédrique (le feuillet est dit TOT) (figure I-2). Les sites octaédriques, quant à eux, peuvent être occupés soit par des cations trivalents Al^{3+} ou éventuellement Fe^{3+} , ces phyllosilicates 2/1 sont alors définis comme dioctaédriques, ou par un cation bivalent Mg^{2+} , le phyllosilicate est alors appelé trioctaédrique.

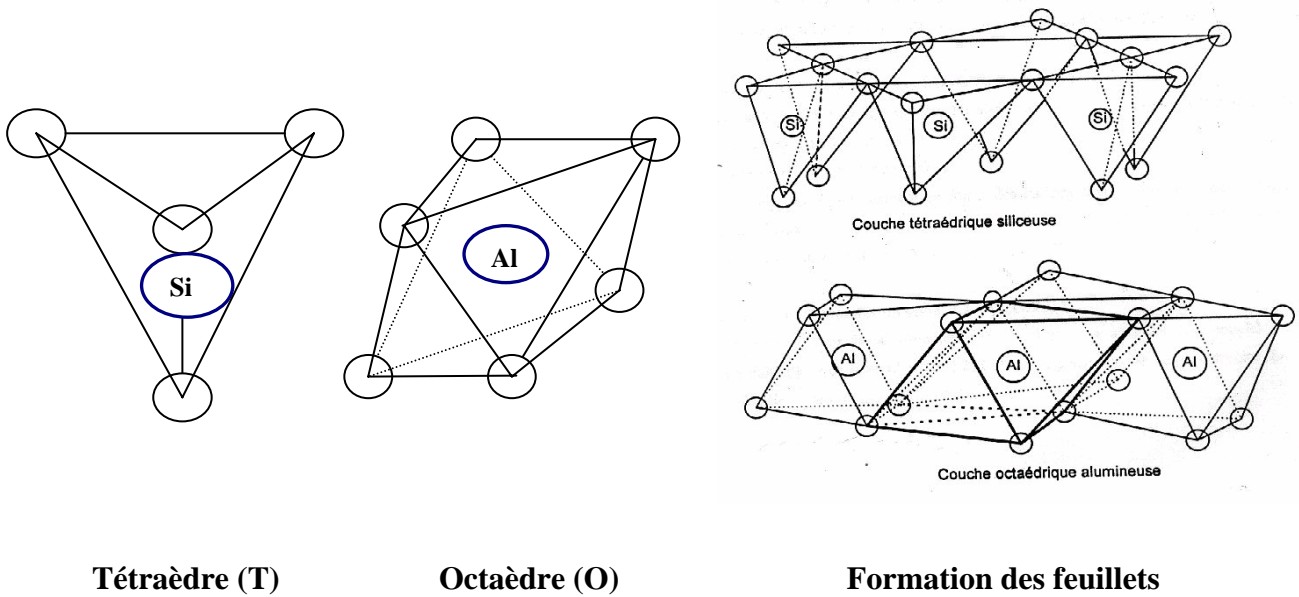


Figure I-1 : Les différents constituants des argiles cationiques.

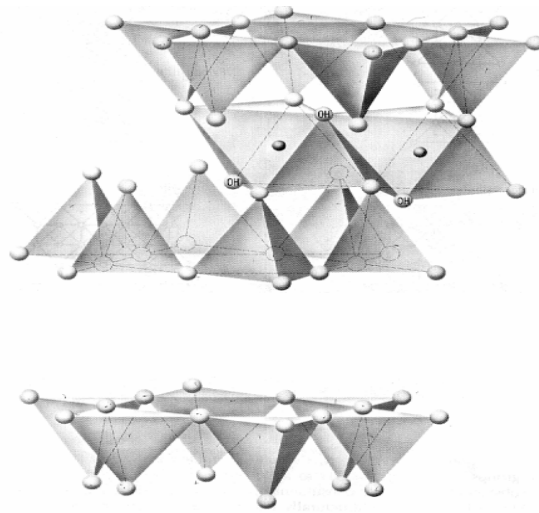


Figure I-2 : Représentation des feuilles de phyllosilicate (2/1).

Les smectites ont des charges variables induites par des substitutions dans la couche tétraédrique ($\text{Si}^{4+} \rightarrow \text{Al}^{3+}$) et/ou dans la couche octaédrique ($\text{Al}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, Mg^{2+} ou $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Li}^+$). Les feuillets 2/1 ayant subi des substitutions isomorphiques sont chargés négativement et ont tendance à se repousser mutuellement. La présence d'un cation compensateur en position interfoliaire induit des interactions attractives entre les deux feuillets adjacents, provoquant un rapprochement des feuillets 2/1 et donc une diminution de l'espace basal. Le cation interlamellaire peut être plus ou moins hydraté ou solvaté par des molécules polaires comme l'éthylène glycol ou le glycérol qui peuvent être intercalées dans l'espace interfoliaire. La nature et la localisation du déficit de charge au niveau du feuillet, ainsi que la nature du cation compensateur, sont utilisés pour faire une classification des smectites (Tableau I-1).

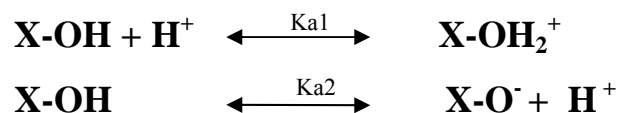
Tableau I-1: Classification des smectites.

Localisation de la charge	Smectites Dioctaédriques	Smectites Trioctaédriques
Octaédrique	Montmorillonite $\text{Si}_4[(\text{Al}, \text{Fe}^{3+})_{2-x} \text{Mg}_x] \text{O}_{10}(\text{OH})_2 \text{M}^+_x$	Hectorite $\text{Si}_4[(\text{Mg})_{3-x} \text{Li}_x] \text{O}_{10}(\text{OH})_2 \text{M}^+_x$
Tétraédrique	Beidellite $(\text{Si}_{4-x} \text{Al}_x)[\text{Al}_2] \text{O}_{10}(\text{OH})_2 \text{M}^+_x$ Nontronite $(\text{Si}_{4-x}(\text{Al}, \text{Fe}^{3+})_x (\text{Fe}^{3+})_2) \text{O}_{10}(\text{OH})_2 \text{M}^+_x$	Saponite $(\text{Si}_{4-x} \text{Al}_x)(\text{Mg}_3) \text{O}_{10}(\text{OH})_2 \text{M}^+_x$

La charge électrique des particules argileuses se manifeste essentiellement lorsque le matériau est en suspension dans l'eau. La charge à la surface du solide est compensée par des contre-ions de signe opposé apportés par la solution. Les charges portées par le solide sont soit localisées au niveau des groupements fonctionnels ionisés (par exemple des groupements silanol ou aluminol en bordure des feuillets d'argile pouvant s'ioniser plus ou moins selon la valeur du pH de la solution), soit délocalisées (par exemple la charge permanente résultante de la substitution dans les feuillets d'argile) [3]. Les zones de surface où sont concentrées les charges constituent des sites d'échange d'ions. Le nombre de sites d'échange X_i , est appelé capacité d'échange des sites de type i . La capacité d'échange cationique CEC permet de quantifier les propriétés d'échange d'un minéral argileux vis-à-vis des cations. Elle est exprimée en milli-équivalent (meq) pour 100 g d'argile, sachant que le milliéquivalent est égal au rapport (charge/masse molaire)*1000. Cette grandeur expérimentale est admise comme une mesure du nombre total de sites superficiels disponibles aux cations. La valeur de CEC varie entre 80 et 150 meq/100g pour les smectites, par contre elle est très faible pour la kaolinite 3-15 meq/100g [1].

L'interaction entre les feuillets des argiles et les cations dépend de leur nature. Ainsi, un faible rayon ionique, une charge cationique élevée ou une énergie d'hydratation importante sont généralement à l'origine de liaisons fortes entre un cation et la surface négativement chargée des argiles. L'accessibilité relative de la surface des particules argileuses est généralement influencée par la force ionique I (mol/l) : $I = 1/2 \sum Z_i^2 [C_i]$ où Z_i et C_i sont respectivement la charge et la concentration des ions i dans la solution électrolytique.

Le caractère acido-basique des argiles est généralement assigné aux groupements X-OH (silanol ou aluminol) superficiels de bordure. Il s'agit d'une propriété d'acido-basicité au sens de Brønsted liée aux caractéristiques amphotères des sites superficiels X-OH :



En milieu acide la forme $X-OH_2^+$ est prédominante alors qu'en milieu basique c'est plutôt le groupement $X-O^-$ qui existe. En fonction du pH de la solution, la surface de l'argile acquiert une charge positive, nulle ou négative.

Les argiles naturelles renferment des impuretés, il s'agit de matières organiques, de minéraux ferrifères, alumineux, siliceux. La présence de ces impuretés peut modifier leurs propriétés physico-chimiques comme l'adsorption, ce qui explique le recours dans certain cas à l'utilisation des argiles synthétiques. Parmi les argiles naturelles, la nontronite est la plus riche en fer. Dans la nontronite de Garfield, le fer représente environ 9 % de sa masse molaire [4].

Toutes ces caractéristiques confèrent aux smectites un certain nombre de propriétés remarquables comme la plasticité, l'hydratation et la capacité d'adsorption. Elles sont utilisées comme adsorbants de polluants, de métaux lourds et d'enzymes avec des applications comme capteurs et biocapteurs [5,6]. De plus, des travaux d'Anson ont montré que le fer présent dans les argiles cationiques pouvait intervenir dans des mécanismes de catalyse redox [7].

Le fer est le quatrième élément minéral le plus abondant dans la couche terrestre (6% de masse) après l'oxygène, le silicium et l'aluminium. Il possède trois degrés d'oxydation Fe(0), Fe(II) et Fe(III). Dans la nature, le fer est essentiellement présent dans les minéraux, sous forme d'oxyhydroxydes et de silicates lamellaires présents dans les sols. Il constitue un élément essentiel dans l'organisme animal et la nutrition végétale, car il est une source de transfert d'électrons [8]. Par exemple, la réduction du fer par les bactéries est un phénomène important en géochimie, dans les processus de bioremédiation. Citons également, l'importance de la réaction de Fenton, avec la formation du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, dans les processus de photo-transformation.

L'interaction argile-protéine se fait par des liaisons de type électrostatique et hydrophobe. Elle dépend de nombreux paramètres comme le point isoélectrique (PI) de la protéine, le pH et la force ionique du milieu, ainsi que de la composition de l'argile [9]. La charge négative à la surface des particules d'argiles cationiques favorise l'adsorption des enzymes et des protéines de charge opposée (point isoélectrique ≥ 7), comme l'hémoglobine (Hb) ou la myoglobine (Mb). L'adsorption de la Mb, l'Hb et de la peroxydase de raifort (HRP) par des particules d'argiles a été faite par la méthode de couche par couche à la surface d'une électrode [10]. L'interaction de ces différentes protéines avec la bentonite a été étudiée par la diffraction des rayons (DRX). Cette étude a montré que seules la Mb et l'Hb sont partiellement intercalées ($d_{\text{Mb}} = 3,6 \text{ nm}$, $d_{\text{Hb}} = 4,7 \text{ nm}$) dans l'argile et un désordre structural est introduit en présence de HRP [11].

I.1.2- Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL)

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont, en majorité, des matériaux synthétiques appelés aussi argiles anioniques. Dans la nature ces argiles sont très rares, on y trouve les hydrotalcites ayant une composition chimique : $Mg_6Al_2(OH)_6CO_3 \cdot 4H_2O$ [12,13]. L'hydrotalcite est constituée d'une couche de brucite chargée positivement. La neutralité des feuillets brucitiques est assurée par un anion placée dans l'espace interlamellaire, comme les carbonates [14].

Les feuillets des HDL sont constitués de cations métalliques entourés des six atomes d'oxygène des groupes hydroxyles, formant des octaèdres $M(OH)_6$. Ces octaèdres s'assemblent par leurs arêtes de façon coplanaire et constituent alors un feuillet. La substitution des cations métalliques divalents par des cations trivalents génère une charge positive variable dans le feuillet. Pour compenser l'excès de charge positif, des anions et des molécules d'eau s'insèrent entre les feuillets et permettent l'électroneutralité de l'édifice. La formule générale des hydroxydes doubles lamellaires est $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+} [X^{m-}_{x/m} \cdot nH_2O]^{x-}$ où M^{II} et M^{III} sont respectivement les cations divalents et trivalents et X est l'anion assurant la neutralité de l'édifice. Dans la figure I-3 nous donnons un schéma de la structure des HDL.

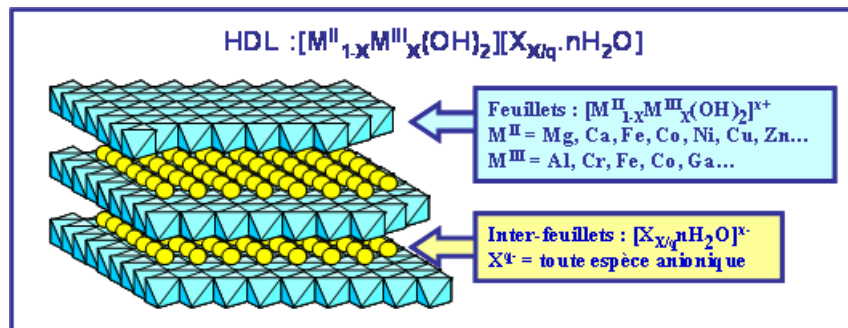


Figure I-3 : Représentation schématique des HDL.

Les HDL ont des propriétés physico-chimiques et morphologiques modulables, qui dépendent de leur mode de synthèse. Leur diversité dépend de la nature des cations métalliques divalents et trivalents utilisés, de leur rapport, des conditions de précipitations, ainsi que la nature l'anion utilisé pour compenser la charge du feuillet. Parmi les méthodes de synthèse les plus utilisées pour ces matériaux, il y a la coprécipitation qui est une méthode de synthèse de chimie douce [15]. Elle se fait par l'addition dans un réacteur contenant de l'eau d'un mélange de sels divalent et trivalent dans des proportions adéquates pour avoir un rapport M^{II}/M^{III} fixé

(Figure I-4). Une solution basique (NaOH, KOH) est ajoutée afin de maintenir le pH constant pendant toute la durée de la synthèse pour permettre la coprécipitation des deux sels métalliques sous forme d'une phase homogène d'hydroxydes. La valeur du pH dépend de la nature des cations métalliques utilisés. Cette méthode permet aussi de choisir la nature de l'anion à intercaler lors de la formation du matériau. D'autres paramètres peuvent influencer les propriétés des HDL tel que la température, le pH, la vitesse d'ajout des sels et l'agitation.

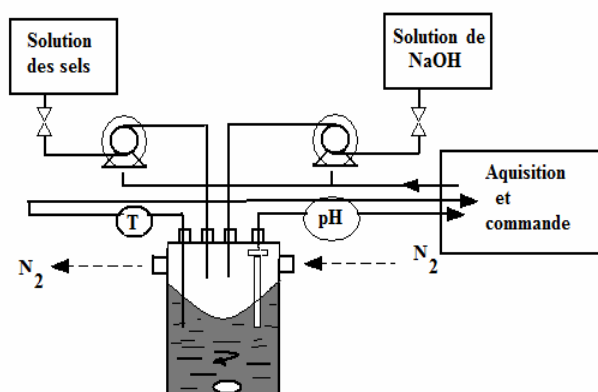


Figure I-4 : Dispositif expérimental de la synthèse des HDL par coprécipitation.

En comparaison avec les argiles cationiques, les HDL ont des capacités d'échange anioniques (C.E.A.) importantes comprises entre 200 et 400 meq/100g alors que la CEC des smectites est de l'ordre de 100 meq/100g. Ils ont également une densité de charge plus importante que les argiles cationiques (jusqu'à 0,24e/u.s.) et ne présentent pas de propriétés de gonflement. L'affinité des anions monovalents pour les feuillets HDL varie dans le sens $\text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ et pour les anions divalents $\text{CO}_3^{2-} > \text{C}_{10}\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_8\text{S}^{2-} > \text{SO}_4^{2-}$. Plus la densité de charge de l'anion est élevée plus sa stabilité dans l'espace interlamellaire est importante, c'est pourquoi il est important de travailler avec des phases nitrates ou chlorées. La synthèse de ces HDL est réalisée sous atmosphère inerte (N_2) afin d'éviter l'intercalation de carbonates.

Il est possible d'intercaler des molécules organiques chargées négativement dans les HDL, soit par une réaction d'échange, soit par une réaction de coprécipitation en présence de l'anion organique à intercaler. Une autre possibilité consiste à utiliser une phase HDL-dodécyl sulfate (DDS) délaminiée dans du butanol et à la reconstituer dans l'eau en présence de l'anion à échanger [16]. Il s'agit de la méthode délamination-reconstruction.

Les HDL constituent une famille de matériaux aux propriétés chimiques et physico-chimiques uniques, ce qui leur confère des potentialités d'application larges et diverses. Leurs propriétés d'échangeurs anioniques et de composés d'intercalation leur permettent l'insertion d'anions (oxo-anions, polyoxo-anions, complexes métalliques (porphyrines, phthalocyanines), d'anions organiques, de polymères chargés négativement et de molécules très variées, dans l'espace interlamellaire. Il est donc possible d'apporter de nouvelles fonctionnalités aux HDL par un choix approprié d'intercalants : catalyse, électro-activité, conduction, coloration, bioactivité. Les HDL présentent en particulier une chimie d'intercalation très riche vis-à-vis des molécules organiques et des biomolécules. Ces matériaux sont utilisés pour la vectorisation de molécules actives comme des médicaments, des vitamines, des biomolécules (ATP, ADN, acides aminés) [5,6,17,18,19,20,21,22,23,24].

Les HDL apparaissent comme des matériaux uniques pour l'immobilisation d'enzymes qui présentent dans la majorité des cas des points isoélectriques bas et des charges de surfaces globalement négatives. Comme le montre la figure I-5, différents procédés sont décrits dans la littérature pour la préparation des nanohybrides Enz-HDL en fonction des matrices HDL, des enzymes et de leur application [25]. Le challenge consiste dans l'immobilisation d'une grande quantité d'enzyme avec le maintien de son intégralité structurale et donc de son activité et de permettre la diffusion du substrat de l'enzyme. La versatilité de propriétés acido-basiques, dépendante du couple M^{II}/M^{III} , permet de choisir la matrice d'immobilisation la mieux adaptée au pH d'activité optimum de l'enzyme. Ces différentes méthodes d'immobilisation peuvent être résumées comme étant :

- L'adsorption des biomolécules à la surface des plaquettes d'HDL du type ZnAl-Cl, MgAl-Cl ou HDL-dodecylsulfate et dodecylsulfonate. L'utilisation de particules colloïdales d'HDL (MgAl-lactate, NiAl-NO₃) favorise l'adsorption des biomolécules. La biomembrane peut être stabilisée par une étape supplémentaire de réticulation chimique des biomolécules. Des composites HDL/(chitosan, polyacrylic acide-co-acrylamide) ont également été utilisés comme matrices d'immobilisation d'enzymes.
- Les méthodes de reconstruction à partir de phases HDL délaminées ou calcinées.
- Le greffage chimique avec un HDL intercalé par du glutamate.
- Le confinement des biomolécules lors de la préparation du matériau par coprécipitation ou électrogénération.

Toutes ces méthodes ont permis d'immobiliser une grande variété d'enzymes avec pour objectifs le développement de biocapteurs ou la biocatalyse (Tableau I-2).

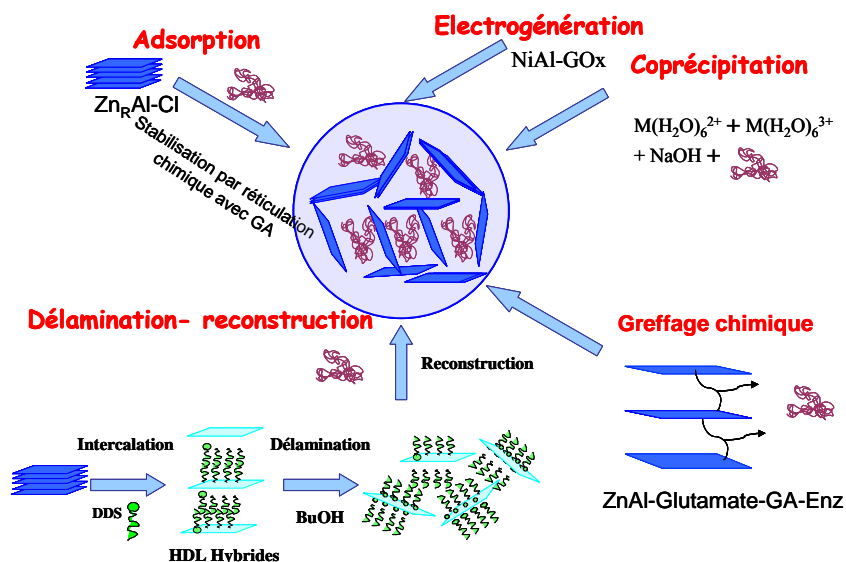


Figure I-5 : Méthodes d'immobilisation des enzymes dans les HDL.

Tableau I-2 : Immobilisation des enzymes dans les HDL.

HDL	Enzyme	Méthode	Application	Références
ZnCr-Cl	GOD	Adsorption	Biocapteurs	[26]
ZnAl-Cl				[27]
ZnAl-Cl				[28]
MgAl-FcSO ₃				[29]
MgAl-FcCO ₂				[29]
FcMeOH/ZnAl-Cl				[30]
ZnCr-FcPSO ₃				[31]
ZnAl-Cl/Chitosan				[32]
NiAl-NO ₃				[33]
NiAl-NO ₃				Electrodéposition
ZnAl-Glut-GA		Greffage		[25]
ZnCr-ABTS		HRP/GOD		Adsorption
NiAl-NO ₃	HRP	Adsorption	Biocapteurs	[36]
ZnCr-ABTS	HRP/catalase	Adsorption	Biocapteurs	[37]
ZnAl-Cl	PPO	Adsorption	Biocapteurs	[38,39]
ZnAl-Cl/Chitosan				[40]
ZnAl-Cl	PPO/AcP	Adsorption	Biocapteurs	[41]
ZnCr-ABTS	Laccase	Adsorption	Biocapteurs	[42]
ZnCr-AQS	NiR	Adsorption	Biocapteurs	[43]
ZnAl-Cl	AIP	Adsorption	Biocapteurs	[44]
MgAl-Cl		Coprécipitation		[45]
ZnAl-Cl	Uréase	Adsorption	Biocapteurs	[46]
ZnAl-Cl		Délamination/Reconstruction		[47,48]
ZnAl-Cl		Coprécipitation		[49,50]

ZnAl-Cl	Trypsine	Adsorption	Biocapteurs	[51]	
MgAl-Cl		Copécipitation			
ZnAl-DDsulfonate	Hémoglobine	Adsorption	Biocapteurs	[52]	
MgAl-NO ₃	PGA	Calcination/Reconstruction	Biocatalyse	[53]	
MgAl-Glutamate		Greffage		[54]	
ZnAl-NO ₃	Lipase	Adsorption	Biocatalyse	[55]	
ZnAl-DDS					
MgAl-NO ₃				[55]	
MgAl-DDS					
NiAl-NO ₃					[56]
MgAl-NO ₃					[57]
MgAl-NO ₃	[58]				
MgAl-lactate	Lipase, BSA, Hb	Adsorption	Biocatalyse	[59]	
MgAl-NO ₃	Bromelain	Calcination/Reconstruction	-	[60]	
ZnAl-Azelate	LOX	Adsorption	Biocatalyse	[61]	
ZnAl-Cl	Chymotrypsine	Adsorption	Biocatalyse	[25]	
NiAl-NO ₃ _{Br}	Myoglobin	Adsorption	Biocatalyse	[62]	
MgAl-NO ₃ /PAA-Aam	CA	Adsorption	Biocatalyse	[63]	

Abréviations :

ABTS : 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate, AcP : Acid phosphatase, AIP : Alcaline phosphatase, BSA : Serum bovine albumine, CA : carbonique anhydrase, DDS : dodécylsulfonate, Fc : Ferrocene, GOD : glucose oxydase, HRP, peroxydase de raifort, Hb : Hémoglobine, LOX : lipoxygénase, NiR : Nitrite réductase PAA-Aam : poly(acrylic acide-co-acrylamide, PGA : Pénicilline G acylase, PPO : Polyphenol oxydase ou tyrosinase.

En général, l'immobilisation des enzymes dans les phases HDL ne modifie pas la distance interlamellaire mais provoque une désorganisation de la structure qui est très clairement observée sur les clichés de microscopie électronique à balayage (Figure I.6). Cependant des travaux très récents ont montré que l'utilisation de phases colloïdales MgAl-lactate ont permis l'immobilisation de l'hémoglobine avec une augmentation de la distance interlamellaire à 8,5 nm **[59]**. De même, la peroxydase de raifort (HRP) a été intercalée dans un HDL de type NiAl avec la distance basale de 6,4 nm **[36]**.

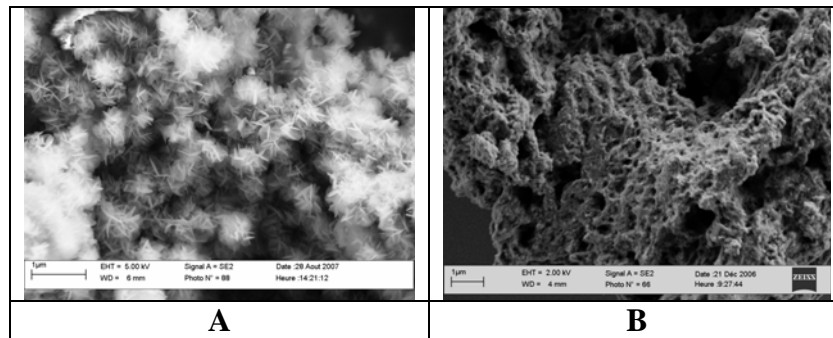


Figure I-6 : Clichés MEB de A) MgAl-CO₃ et B) MgAl-AlP [45].

I.2-Les Biocapteurs

Les premiers biocapteurs sont apparus en 1960 avec les travaux de Clark et Lyon sur la détection du glucose [64]. Depuis les vingt dernières années, la recherche sur les biocapteurs, qui se situe à l'interface entre différentes disciplines (physique, chimie et biologie), a connu un développement important que ce soit d'un point de vue fondamental et industriel. En effet, ces dispositifs analytiques suscitent de très nombreux espoirs d'applications, en particulier dans le domaine biomédical, l'industrie agroalimentaire et l'environnement.

Un biocapteur est constitué de macromolécules biologiques (enzyme, anticorps,...), appelées aussi bio-récepteur, immobilisées à la surface d'un transducteur qui convertit le signal de reconnaissance biologique d'une substance cible en un signal électrique mesurable après amplification (Figure I-7).

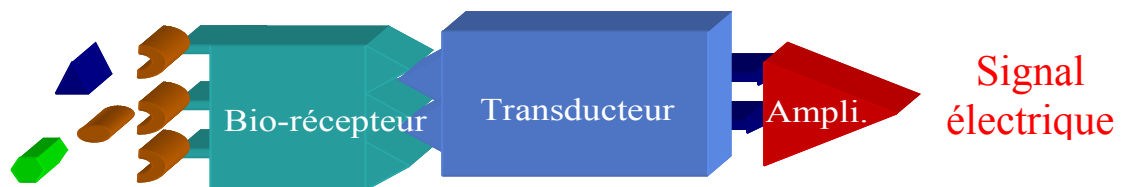


Figure I-7 : Différents constituants d'un biocapteur.

I.2.1- Les bio-récepteurs

Dans un biocapteur, le bio-récepteur sert à identifier et/ou à quantifier une espèce grâce à une reconnaissance biologique. Différents types de biomolécules comme, des anticorps, des acides ribonucléiques, des enzymes et même des micro-organismes (bactéries, algues) sont utilisés comme bio-récepteurs. Dans les deux premiers cas, la reconnaissance se fera par une interaction spécifique entre des structures complémentaires cibles comme des antigènes ou des

brins d'ADN; alors que les enzymes et les bactéries vont catalyser des réactions de bio-transformation spécifiques des molécules à doser. Parmi toutes ces dispositions, les biocapteurs enzymatiques sont les plus étudiés. Pour fabriquer un biocapteur, il faudra donc immobiliser ces espèces biologiques à la surface d'un transducteur (électrode, fibre optique, ...).

I.2.1.1-Les hémoprotéines

Une protéine est une macromolécule biologique composée par une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liées entre elles par des liaisons peptidiques. On parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de cent acides aminés. Dans le cas contraire, on parle de peptides et de polypeptides. La structure primaire des protéines correspond à la succession linéaire des acides aminés. La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne peptidique stabilisée par des liaisons hydrogènes. Parmi les structures secondaires on trouve l'hélice α et les feuillets β . La structure tridimensionnelle formée par le repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace est appelée structure tertiaire. La structure quaternaire des protéines regroupe l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques.

L'hémoglobine (Hb) est un exemple de structure quaternaire ; elle est constituée de 4 sous-unités : 2 sous-unités α (de 141 acides aminés) et 2 sous-unités β (de 146 acides aminés). Elle est une métalloprotéine qui contient des porphyrines au fer (l'hème) comme sous-unité prosthétique (Figure I-8). Ce groupe hémique est localisé dans la crevasse proche de la surface de la biomolécule. L'Hb est le constituant principal des globules rouges. Dans le système vasculaire elle transporte l'oxygène au tissu, aide directement ou indirectement dans le transport du CO_2 et régule le pH du sang. Dans le tableau I-3 sont résumées les propriétés physico-chimiques de l'Hb, en particulier celles de la bovine Hb qui sera utilisée dans ce travail.

De manière générale, les hémoprotéines, comme l'hémoglobine, la myoglobine, la neuroglobine, la cytoglobine et leghémoglobine, interviennent dans le transport ou la fixation de l'oxygène. Le cytochrome c, une autre hémoprotéine, est également un composant essentiel de la chaîne respiratoire. Il transfère les électrons sans liaison avec l'oxygène. Certaines hémoprotéines ont une activité catalytique, notamment vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (peroxydase, catalase et cytochrome P450). On les appelle alors hémoenzymes. Toutes ces hémoprotéines ont été utilisées pour fabriquer des biocapteurs.

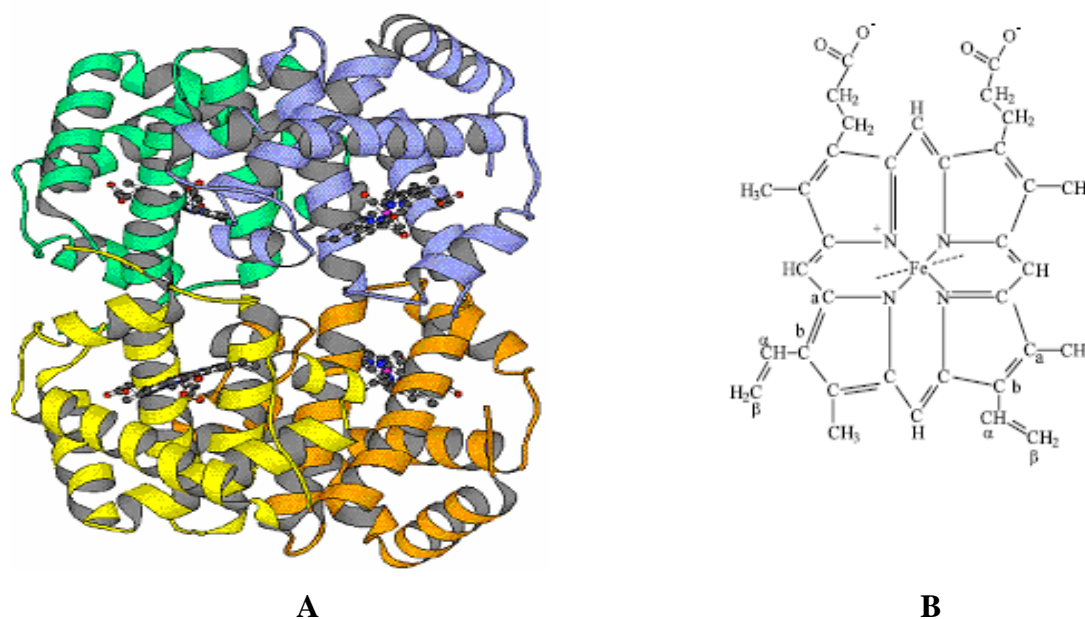


Figure I-8 : Structure tridimensionnelle de l'Hb (A) et composition chimique de l'hème (B).

Tableau I-3 : Caractéristiques physiques de l'Hb

Bovine hémoglobine		Références
Masse moléculaire (Da)	68000	[65]
Rayon équivalent (nm)	3,1	[66]
Diamètre ellipsoïdale (nm)	7*5,5*5,5	[65]
Point isoélectrique	7,1	[65]
Charge à pH 7,4	-4	[65]
Masse des acides aminés hydrophobes (g/100 g de protéine)	54,16	[67]
Masse des acides aminés hydrophiles (g/100 g de protéine)	43,13	[67]

I.2.1.2- Principales méthodes d'immobilisation des enzymes

Les différentes contraintes liées à l'immobilisation des enzymes à la surface des transducteurs sont la nécessité d'immobiliser une grande quantité de biomolécules sans les dénaturer et en gardant l'accessibilité de leur site actif et également de permettre la diffusion du substrat et des produits de la réaction enzymatique à travers cette couche d'enzymes. Différents modes d'immobilisation sont rapportés dans la littérature. Il s'agit principalement de l'adsorption, du greffage covalent et du confinement (Figure I-9).

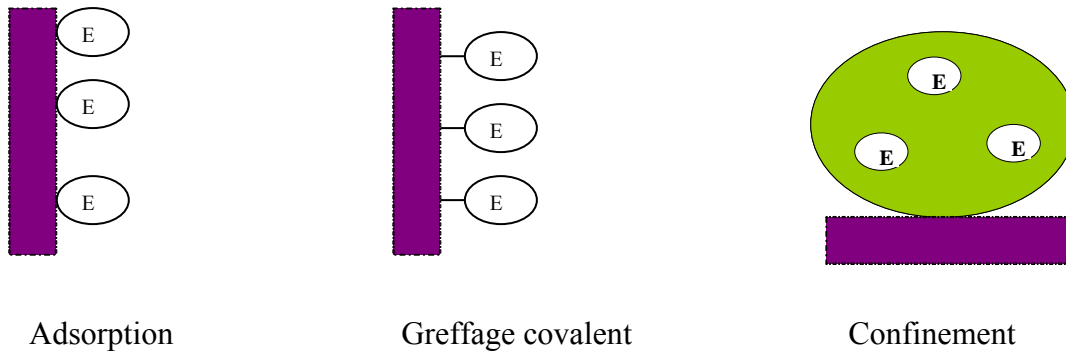


Figure I-9 : Les principales méthodes d'immobilisations des enzymes (E).

a) L'adsorption

C'est la méthode la plus simple qui correspond à utiliser des liaisons faibles comme des interactions électrostatiques de type Van der Waals, hydrophobes ou des liaisons hydrogènes pour immobiliser la biomolécule à la surface du transducteur. Les inconvénients de cette méthode sont la faible quantité de biomolécules immobilisées et leur désorption possible suite aux changements de la température et de la force ionique du milieu.

b) Le couplage covalent

Cette méthode d'immobilisation est réalisée par la formation de liaisons fortes entre l'espèce biologique et la surface solide à travers des groupements fonctionnels tels que les groupements carboxylique (-COOH), amine (-NH₂), hydroxyle (-OH) ou thiol (-SH) à la surface solide. Ces groupements doivent être activés avant leurs interactions avec l'espèce biologique. Les principaux agents d'activation sont les carbodi-imides et le bromure de cyanogène. Cette technique d'immobilisation permet d'obtenir des liaisons stables pouvant parfois dénaturer la biomolécule. Un autre inconvénient de cette méthode est de trouver une surface de solide facilement fonctionnalisable.

c) 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).

La réticulation chimique est couramment utilisée pour stabiliser les biomembranes préparées par encapsulation. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels d'un agent réticulant avec les groupements amine des enzymes pour former des pontages covalents (cross-linking) enzyme-enzyme. On distingue deux modes de réticulation soit entre les enzymes elles mêmes, soit en faisant intervenir d'autres protéines inactives, comme par exemple l'albumine (BSA), ce qui minimise la dénaturation des enzymes impliquées dans les pontages covalents. Le glutaraldehyde est couramment utilisé comme agent réticulant soit sous forme de liquide ou de vapeur [68].

I.2.2- Les transducteurs

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exprimer la modification biochimique issue d'une interaction entre l'analyte et le biorécepteur pour la transformer en un signal électrique qui sera amplifié et mesuré. Le transducteur sera choisi en fonction des modifications biochimiques qui se produisent au niveau de l'interaction entre le biorécepteur et l'analyte. Il y a plusieurs types de transducteurs : thermique, optoélectronique, à effet piézoélectrique et électrochimique. Par rapport aux autres dispositifs de transduction, les biocapteurs électrochimiques sont peu coûteux, rapides, simples d'utilisation et présentent en général une sensibilité importante et une bonne sélectivité [69]. Trois types de mesures peuvent être effectuées avec des transducteurs électrochimiques :

- La conductimétrie qui est basée sur la mesure des variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques.
- La potentiométrie est une méthode basée sur la mesure de variation de potentiel entre le transducteur et une électrode de référence. Les transducteurs sont soit des électrodes sélectives à ions (ISE) ou des transistors à effet de champ (FET-Field-Effect Transistor).
- L'ampérométrie repose sur la mesure de l'intensité du courant issu d'une réaction d'oxydo-réduction se produisant à un potentiel donné. Elle est fonction de la concentration de l'espèce électro-active oxydée ou réduite à la surface de l'électrode. Les biocapteurs ampérométriques peuvent être repartis en trois générations selon le type

de réactions électro-enzymatiques se produisant à la surface de l'électrode (Figure II-10).

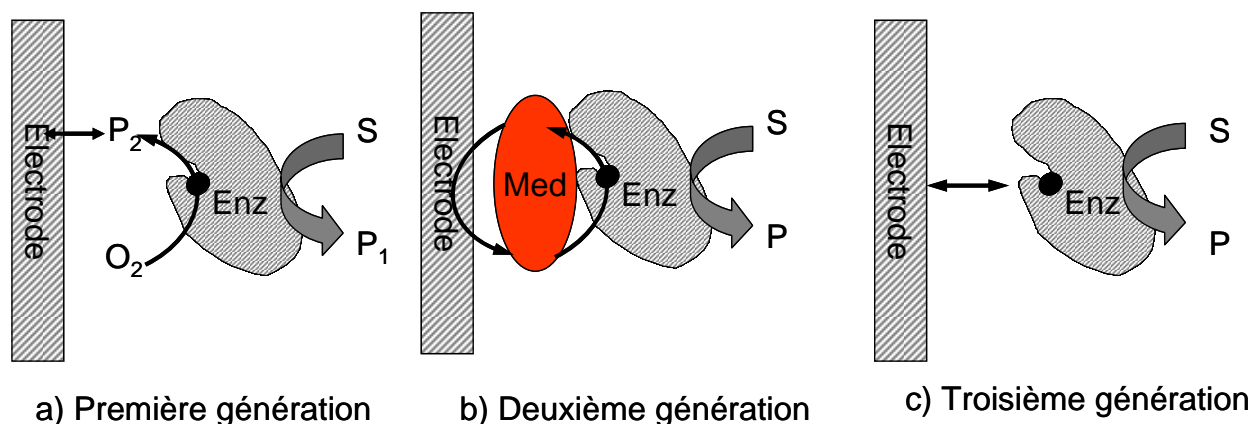
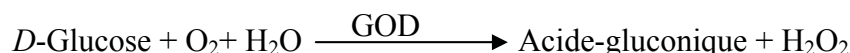
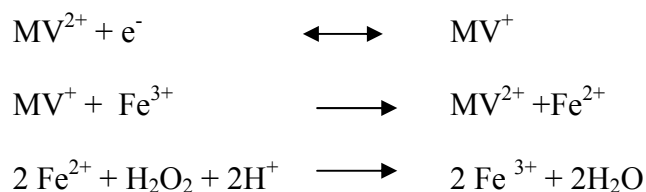


Figure I-10 : Schéma de fonctionnement des biocapteurs ampérométriques.

Le biocapteur de première génération le plus connu est le capteur à glucose développé par Clark [64] où le glucose oxydase (GOD) oxyde le glucose, l'enzyme étant régénérée par son cofacteur, le dioxygène, suivant la réaction :



La détection ampérométrique se fait soit par le suivi de la consommation d'oxygène, soit par l'oxydation électrochimique du peroxyde d'hydrogène. D'une manière générale avec les biocapteurs de première génération, l'espèce enzymatiquement générée est directement oxydée ou réduite à la surface de l'électrode. Dans certain cas, un médiateur redox facilite l'oxydation ou la réduction du produit de la réaction catalytique. Ainsi des biocapteurs à GOD ont été réalisés par modification d'argiles par des médiateurs redox comme le $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ [70] ou le méthyle viologène (MV^{2+}) [71] pour permettre la réduction de H_2O_2 . Il a été proposé que le fer présent dans l'argile joue un rôle de relais d'électron suivant le mécanisme :



Pour les biocapteurs de deuxième génération, la détection s'effectue par l'oxydation ou la réduction d'un médiateur redox qui régénère le groupe prosthétique de l'enzyme. Ce principe permet d'abaisser le potentiel de détection de l'analyte et d'éviter ainsi les phénomènes

d'interférences. Par exemple, le dosage de H_2O_2 a pu être réalisé par des biocapteurs à base de peroxydase de raifort (HRP), où l'enzyme immobilisée dans des argiles cationiques est régénérée par des médiateurs rédox comme le méthylène green (MG) [72] ou le (Poly 3,4 dihydroxybenzaldehyde : DHB) [73]. Un autre médiateur, le 2,2'azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6 sulfonate (ABTS) co-immobilisé dans un HDL joue le rôle de relais d'électron entre la HRP et l'électrode [26].

Enfin dans les biocapteurs de troisième génération, l'enzyme est régénérée par un transfert direct d'électron entre l'électrode et le site actif de l'enzyme. Ce type de biocapteurs est plus rare, ils concernent essentiellement des biocapteurs à base d'hémoprotéines ou des hémoenzymes, comme l'hémoglobine (Hb), la myoglobine (Mb), le cytochrome c, la peroxydase de raifort (HRP), le cytochrome P450.

I.3- Le transfert électronique direct des hémoprotéines

I.3.1- Généralités

Les mécanismes de transfert d'électrons dans des systèmes biologiques peuvent être étudiés grâce à l'électrochimie. Dans la mitochondrie, le cytochrome attaché à la membrane contient un site porphyrinique complexé avec du fer (hème) impliqué dans les échanges d'électrons lors de la respiration. La première étude par électrochimie du transfert direct d'électrons sur une protéine a été réalisée en 1977 par Eddows et Hill [74]. Des courbes intensités de courant/potentiel enregistrées en voltammétrie cyclique du cytochrome c (Cyt c) adsorbé à la surface d'électrodes en or et de TiO_2 , montraient un signal électrochimique réversible correspondant à un processus de transfert d'électron sur le site Fe/porphyrine de la biomolécule. Le potentiel formel (E°) du couple redox Fe^{2+}/Fe^{3+} peut varier fortement d'une protéine à l'autre avec par exemple 0,26 V/ENH pour Cyt et -0,27 V pour HRP [75]. Par la suite, le cytochrome c, mais aussi d'autres hémoprotéines (Hb, Mb, HRP, Cytochrome P450) ont été utilisées pour la préparation de biocapteurs de 3^{ème} génération. Les travaux sur le transfert direct d'électrons entre les hémoprotéines et l'électrode et leurs applications dans le développement de biocapteurs de troisième génération ont été résumés dans plusieurs articles de revues, notamment par le groupe de Freider W. Scheller [76,77,78]. Un transfert direct d'électrons rapide nécessite certaines conditions comme une orientation privilégiée des biomolécules, une proximité entre le site actif, qui se trouve plus ou moins replié à l'intérieur de la chaîne polypeptidique, et l'électrode et son accessibilité par le substrat (Figure I-11). Le

microenvironnement de la protéine à la surface de l'électrode aura donc une influence très importante. Les électrodes les plus efficaces sont des électrodes de carbone ou d'oxyde de métaux, ayant leurs propres fonctionnalités ou des électrodes de métaux nobles ou de carbone modifiées par des adsorbats, comme des thiols, des tensio-actifs, des polyélectrolytes, des nanotubes de carbones, des nanoparticules métalliques ou d'oxydes de métaux, etc ... L'immobilisation des biomolécules à la surface de ces électrodes se fera par simple adsorption, par des assemblages couche par couche et par confinement.

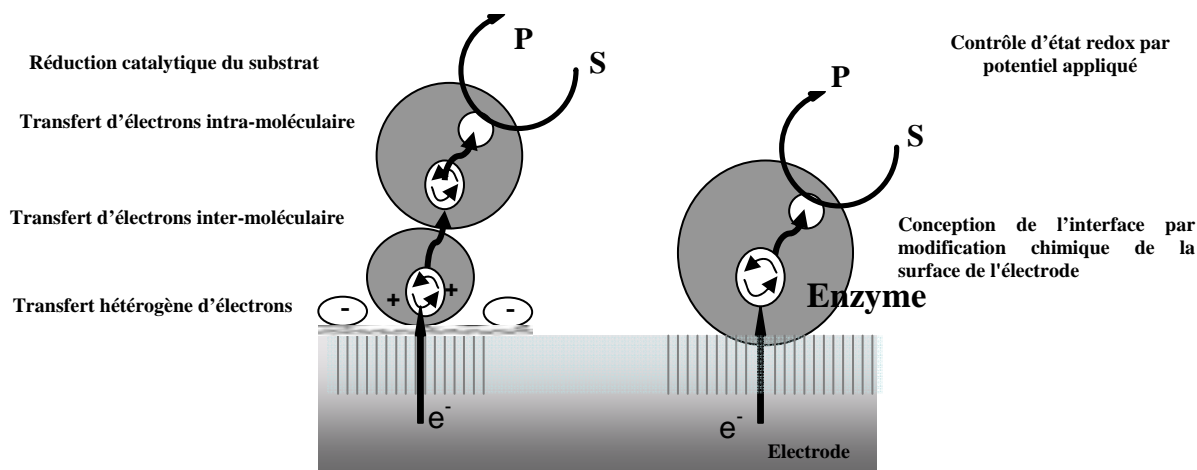


Figure I-11 : Schéma des conditions de transfert direct d'électrons entre une protéine et l'électrode [78]

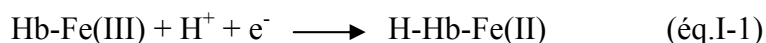
Le choix de la matrice d'immobilisation est donc primordial. En effet, certaines matrices comme des liquides ioniques ou des polymères ont montré des effets néfastes sur la structure de l'hémoglobine [79,80]. A cela s'ajoute le coût élevé de synthèse de certains polymères. Tous ces problèmes ont orienté les recherches vers d'autres matrices plus rentables et moins coûteuses. Des matériaux inorganiques comme des matériaux sol-gel à base de silice [81,82,83], des zéolithes [84], des matériaux lamellaires comme le phosphate de zirconium (α -ZrP) [85,86,87], les argiles [5,6] et les hydroxydes doubles lamellaires [52], ont également été utilisés pour immobiliser les hémoprotéines à la surface d'électrodes et permettre le transfert direct d'électrons avec différentes applications comme biocapteurs de troisième génération. Dans la suite, nous présenterons une revue détaillée de la littérature concernant l'immobilisation des hémoprotéines dans les argiles et les HDL avec des applications en électrochimie.

I.3.2- L'immobilisation des hémoprotéines dans les argiles

Les argiles cationiques de types smectites présentent des propriétés physico-chimiques favorables à l'interaction avec les hémoprotéines (charge de surface, hydrophobicité, capacité de gonflement et d'adsorption). Les hémoprotéines (Hb, Mb) et hémoenzymes (HRP cytochrome P450) ont un point isoélectrique (PI) situé entre 7 et 8, sauf le Cyt c qui a un PI de 10,5. Les hémoprotéines immobilisées dans les argiles gardent généralement leur structure naturelle sans dénaturation de leur site prosthétique, ce qui peut être vérifié par la position de la bande de Soret située autour de 410 nm en spectroscopie UV-Vis.

Différents types d'argiles ou analogues ont été utilisés pour immobiliser des hémoprotéines à la surface d'une électrode (Tableau I-4). Dans tous les cas un transfert direct d'électrons entre l'hémoprotéine immobilisée et l'électrode a été observé.

Les électrodes modifiées par l'Hb ont été les plus étudiées. Cette protéine a été immobilisée dans des argiles pures comme la montmorillonite, la bentonite, l'attapulgitite, mais aussi dans des dépôts de composites à base d'argiles. Dans tous les cas, l'Hb immobilisée se manifeste en voltammétrie cyclique par un signal électrochimique quasi-réversible situé entre $-0,30 \leq E^o \leq -0,36$ V/ESC gouverné par un processus de transfert d'électrons et de protons de surface (adsorption) et non de diffusion et correspondant à la réaction :



Certains auteurs ont modifié des argiles par des polyélectrolytes. L'attraction électrostatique entre les polyions et l'argile de charge opposée a permis de former des complexes neutres. Ces complexes peuvent être organisés à la surface de l'électrode en une structure multicouche stable. Les films ainsi obtenus confèrent un microenvironnement favorable à l'encapsulation des biomolécules. Parmi les polyions utilisés on peut citer le polystyrènesulfonate (PSS), l'acide polyacrylique (PAA), le polyvinyle sulfate (PVS), et le bromure de dimethyldidodecylammonium (DDAB) (Tableau I-4). L'électrode modifiée bentonite-DDAB-Hb est particulièrement performante avec un signal réversible situé -0,25V à pH 5,5 et la quantité d'Hb électroactive de 12,5% [88]. Ce pourcentage ne dépasse pas 10 % pour un rapport en masse Hb/argile de 1 [89].

Tableau I-4 : Différentes configurations des électrodes modifiées par des argiles et des hémoprotéines.

Hémoprotéine	Argiles	Autre composant	Références
Hémoglobine (Hb)	Montmorillonite	Polystyrenesulfonate	[90]
	Montmorillonite		[91]
	Montmorillonite	Polyvinyl alcohol	[92]
	Montmorillonite	Pt colloïdes	[93]
	Montmorillonite		[94]
	Bentonite		[11]
	Bentonite		[95]
	Bentonite	Liquide ionique	[96]
	Bentonite	DDAB	[88]
	Attapulgite		[89]
	Laponite	Chitosan	[97]
	ZnAl-	Dodecylsulfonate	[52]
Myoglobine (Mb)	Montmorillonite	Au/Chitosan	[98]
	Bentonite		[11]
	Montmorillonite		[10]
Peroxydase (HRP)	Montmorillonite		[10]
	Montmorillonite	Au/Chitosan	[99]
	Bentonite		[11]
Cytochrome c (Cyt c)	Attapulgite		[100]
	Montmorillonite		[101]
Cytochrome c ₃	Montmorillonite Kaolinite		[102]
	Montmorillonite Kaolinite Goethite		[103]
Cytochrome P ₄₅₀	Montmorillonite		[104]

Très récemment, des HDL ont également été utilisés pour préparer des électrodes modifiées à base d'Hb et de HRP. L'utilisation d'un HDL intercalé avec un tensio-actif négatif le dodecylsulfonate, comme matrice d'adsorption de l'Hb permet le transfert direct d'électron alors qu'avec des HDL non traités (ZnAl-Cl) ou traités par un tensio-actif neutre (le polyéthylène oxyde, PEO) ou un tensio-actif cationique (cétyltriméthylammonium, CTA) aucun signal électrochimique n'est observé [52]. Ce fait illustre clairement le rôle de la charge de surface de la matrice d'immobilisation sur l'orientation de la biomolécule et par conséquent sur son électroactivité. Le transfert direct d'électrons a également été rapporté pour la HRP immobilisée dans un HDL du type NiAl-NO₃ [36].

Finally, we signal that the direct electron transfer with two enzymes which are not hemo-enzymes (the glucose oxidase and the xanthine oxidase) has been reported when they are immobilized in the laponite, a cationic clay [105,106].

These different configurations of modified electrodes by hemoproteins and clays have been used as third generation biosensors for the determination of hydrogen peroxide, nitrite, O₂, NO and trichloroacetic acid [11,52,88-97,101].

I.3.3- Biocapteurs à peroxyde d'hydrogène

The determination of H₂O₂ is important in several industrial domains (biological and clinical diagnosis). In table I-5, we have given some recent examples of H₂O₂ biosensors realized by the immobilization of Hb in different membranes. According to Ferapontova [107] the reactions in play are :



She reports that in the case of HRP, the proton would be localized in the active site, fixed to an amino acid residue.

The presence of H₂O₂ causes an increase in the cathodic current of Fe(III) reduction. This increase in current is proportional to the concentration of H₂O₂ and can be quantified by cyclic voltammetry or more precisely by chronoamperometry at a fixed potential using a rotating electrode.

Tableau I-5 : Exemples de biocapteurs à H₂O₂ à base d'hémoglobine

Matrice d'immobilisation	S (A M ⁻¹ cm ⁻²)	GL (μM)	Références
Electrode sérigraphiée	0,60	10-320	[108]
Kieselguhr	0,27	5-300	[109]
Egg-Phosphatidyloline	0,14	10-100	[110]
Zéolithe	1,02	50-1000	[84]
Laponite-chitosan	-	6,2-2550	[97]
Attapulgite	-	5,4-400	[96]
Zn ₂ Al ₂ (OH) ₆ Cl ₂ ·2H ₂ O	-	1,8-225	[52]

I.4-Conclusion

Dans ce chapitre nous avons rappelé les différences de structure et de composition qui existent entre les argiles et les hydroxydes doubles lamellaires. Nous avons défini la notion de biocapteurs, notamment de biocapteurs de troisième génération impliquant des hémoprotéines. Un état de l'art concernant l'immobilisation des enzymes, en particulier les hémoprotéines dans ces matériaux et leur utilisation comme matériau d'électrode a été retracé. Par contre, le rôle éventuel du fer structural des argiles dans les processus de bioélectrochimie impliquant des hémoprotéines n'a jamais été évoqué dans la littérature. Dans ce travail nous tacherons de mettre en évidence le rôle éventuel du fer dans le transfert électronique se produisant à la surface des électrodes modifiées par des argiles ou des HDL.

I.5-Références

-
- [1] Caillère S. Henin S. and Rautureau M., *Minéralogie des argiles : Classification et nomenclature* (Tome 2) Ed. Masson, pp 9, 107 et 114 Paris (1982).
- [2] Besson G., *Structures des smectites dioctaédriques. Paramètres conditionnant des fautes d'empilement des feuillets* : Thèse de l'Université d'Orléans pp 153, (1980).
- [3] Tombacz E., Libor Z., illes E., Majzik A. and Klumpp E., *The role of reactive surface sites and complexation by humic acids in the interaction of clay mineral and iron oxide particles* Org. Geochem. 35 (2004), 257.
- [4] Johnston J. H. and Cardile C. M., *Iron sites in nontronite and the effect of interlayer cations from Mossbauer spectra*, Clays Clay Miner. 33 (1985), 21.
- [5] Mousty C., *Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes- new trends*, Appl. Clay Sci. 27 (2004), 159.
- [6] Mousty C., *Biosensing applications of clay-modified-electrodes: a review*, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010), 315.
- [7] Oyama N. and Anson F. C., *Catalysis of the electroreduction of hydrogen peroxide by montmorillonite clay coatings on graphite electrodes*, J. Electroanal. Chem. 199 (1986), 467.

- [8] Amonette J. E., *Iron redox chemistry of clays and oxides: environmental applications*. In *Electrochemical Properties of Clays*, pp 89-147 (A. Fitch) CMS Workshop 12, the Clay Minerals Society, Aurora Colorado (2002).
- [9] Quiquampoix H., Servagent-Noinville S. and Baron M.H., *Enzymes in the environment activity, ecology and applications*, R.G. Burns, R.P. Dick (Eds). pp 285, Marcel Dekker, INC New York (2002).
- [10] Li Z. and Hu N. *Direct electrochemistry of heme proteins in their layer-by-layer films with clay nanoparticles*, J. Electroanal. Chem. 558 (2003), 155.
- [11] Zhou Y., Hu N., Zeng Y., and Rusling J.F., *Heme protein-clay films: direct electrochemistry and electrochemical catalysis*, Langmuir 18 (2002), 211.
- [12] Frondel C., *Constitution and polymorphism of the pyroaurite and sjogrenite groups*, Am. Mineral. 26 (1941), 295.
- [13] Gastuche M.C., Brown G. and Mortland M. M., *Mixed magnesium-aluminium hydroxides* Clay Miner. 7 (1967), 177.
- [14] V. Rives, *Layered double hydroxides: Present and Future*, Nova Science Publishers, Inc. (2003), 139.
- [15] De Roy A., Forano C., El Malki M. and Besse J.-P., *Anionic clays: trends in pillaring chemistry*, in: M.L. Occelli, H.E. Robson (Eds.), *Synthesis of Microporous Materials Expanded Clays and Other Microporous Solids*, Van Nostrand Reinhold, pp108 New York, (1992).
- [16] Leroux F., Adachi-Pagano M., Intissar M., Chanvière S., Forano C. and Besse J.-P. *Delamination and restacking of layered double hydroxides*, J. Mater. Chem. 11 (2001), 105.
- [17] U. Constantino, Ambrogi V., Nocchetti M. and Periolo L., *Hydrotalcite-like compounds: versatile layered hosts of molecular anions with biological activity*, Micro. Meso. Mater. 107 (2008), 149.
- [18] Choy J.-H., Choi S.-J., Oh J.-M. and Park T., *Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications*, Appl. Clay Sci. 36 (2007), 122.
- [19] Tamura H., Chiba J., Ito M., Takeda T. and Kikkawa S., *Self-Assembly and Characterization of Layered Double Hydroxide/DNA Hybrids*, Solid. State Ionics 172 (2004) 607.
- [20] Desigaux L., Ben Belkacem M., Richard P., Cellier J., Léone P., Cario L., Leroux F. Taviot-Guého C., and Bruno P., *Self-Assembly and characterisation of layered double hydroxide/DNA hybrids*, Nano. Lett. 6 (2006), 199.

- [21] Choy J.-H., Kwak S.Y., Park J.S., Jeong Y.J. and Portier J., *Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide*, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999), 1399.
- [22] Choy J.-H., Kwak S.-Y., Jeong Y.-J. and Park J.-S., *Inorganic layered double hydroxides as nonviral vectors*, Angew. Chem. 22 (2000), 112.
- [23] Aisawa S., Hirahara H., Takahashi S., Umetsu Y. and Narita E., *Stereoselective intercalation of hexose for layered double hydroxide by calcination-rehydration reaction* Chem. Lett. 33 (2004), 306.
- [24] Nakayama H., Wada N. and Tsuchioka M., *Intercalation of amino acids and peptides into Mg-Al layered double hydroxide by reconstruction method*, Inter. J. Pharm. 269 (2004), 469.
- [25] Forano C., Vial S. and Mousty C., *Nanohybrid Enzymes-layered double hydroxides: potential applications*, Curr. Nanosci. 2 (2006), 283.
- [26] Shan D., Cosnier S. and Mousty C., *HRP wiring by redox active layered double hydroxides : application to the mediated H₂O₂ detection* , Anal. Lett. 36 (2003), 909.
- [27] Cosnier S., Mousty C., Gondran C. and Lepellec A., *Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: Comparative study*, Mater. Sci. Eng. C 26 (2006), 442.
- [28] Shan D., Yao W. and Xue H., *Amperometric Detection of Glucose with Glucose Oxidase Immobilized in Layered Double Hydroxides*, Electroanalysis 18 (2006), 1485.
- [29] Colombari M., Ballarin B., Carpani I., Guadagnini L., Mignani A., Scavetta E. and Tonelli D., *Glucose biosensors based on electrodes modified with ferrocene derivatives intercalated into Mg/Al layered double hydroxides*, Electroanalysis 19 (2007), 2321.
- [30] Shan D., Yao W. and Xue H., *Electrochemical study of ferrocenemethanol-modified layered double hydroxides composite matrix: Application to glucose amperometric biosensor* Biosens. Bioelectron. 23 (2007), 432.
- [31] Mousty C., Forano C., Fleutot S. and Dupin J.-C., *Electrochemical study of anionic ferrocene derivatives intercalated in layered double hydroxides: application to glucose amperometric biosensors*, Electroanalysis 21 (2009), 399.
- [32] Shi Q, Han E., Shan D., Yao W., and Xue H., *Development of a high analytical performance amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in a composite matrix : layered double hydroxides/chitosan*, Bioprocess. Biosyst. Eng. 31 (2008) 519.

- [33] Scavetta E., Guadagnini L., Mignani A. and Tonelli D., *Anti-interferent properties of oxidized nickel based on layered double hydroxide in glucose amperometric biosensors* Electroanalysis 20 (2008), 2199.
- [34] Mignani A., Scavetta E. and Tonelli D., *Electrodeposited glucose oxidase/anionic clay for glucose biosensors design*, Anal. Chim. Acta 577 (2006), 98.
- [35] Shan D., Cosnier S. and Mousty C., *HRP/Zn-Cr-ABTS redox clay-based biosensor: design and optimization for cyanide detection*, Biosens. Bioelectron. 20 (2004), 390.
- [36] Chen X., Fu C., Wang Y., Yang W. and Evans D.G., *Direct electrochemistry and electrocatalysis based on a film of horseradish peroxidase intercalated into Ni-Al layered double hydroxide nanosheets*, Biosens. Bioelectron. 24 (2008), 356.
- [37] Chen H., Mousty C., Chen L. and Cosnier S., *A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor*, Mater. Sc. Eng. C 28 (2008), 726.
- [38] Shan D., Cosnier S. and Mousty C., *Layered double hydroxides: an attractive material for electrochemical biosensor design*, Anal. Chem. 75 (2003), 3672.
- [39] Shan D., Mousty C. and Cosnier S., *Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors*, Anal. Chem. 76 (2004), 178.
- [40] Fan Q., Shan D., Xue H., He Y. and Cosnier S., *Amperometric phenol biosensor based on laponite clay-chitosan nanocomposite matrix*, Biosens. Bioelectron. 22 (2007), 816.
- [41] Cosnier S., Mousty C., Cui X., Yang X. and Dong S., *Specific Determination of As(V) by an Acid Phosphatase-Polyphenol Oxidase Biosensor*, Anal. Chem. 78 (2006), 4985.
- [42] Mousty C., Vieille L. and Cosnier S., *Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides : a reagentless amperometric biosensor*, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 1733.
- [43] Chen H., Mousty C., Cosnier S., Silveira C., Moura J.J.G. and Almeida M.G., *Highly sensitive nitrite biosensor based on the electrical wiring of nitrite reductase by [ZnCr-AQS] LDH*, Electrochem. Comm. 9 (2007), 2240.
- [44] Geraud E., Prevot V., Forano C. and Mousty C., *Spongy gel-like layered double hydroxide-alkaline phosphatase nanohybrid as a biosensing material*, Chem. Comm. (2008), 1554.
- [45] Mousty C., Kaftan O., Prevot V., and Forano C., *Alkaline phosphatase biosensors based on layered double hydroxides matrices: Role of LDH composition*, Sens. Actuators, B 133 (2008), 442.

- [46] De Melo V., Cosnier S., Mousty C., Martelet C. and Jaffrezic-Renault N., *Urea biosensors based on immobilization of urease into two oppositely charged clays Laponite and Zn-Al Layered Double Hydroxides*, Anal. Chem. 74 (2002), 4037.
- [47] Barhoumi H., Maaref A., Rammah M., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Mousty C. Cosnier S., Perezet E. and Rico-Lattes I., *Insulator semiconductor structures coated with a biodegradable latex as an encapsulation matrix for urease*, Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 2318.
- [48] Barhoumi H., Maaref A., Rammah M., Martelet C., Jaffrezic N., Mousty C., Vial S. and Forano C., *Urea biosensor based on Zn₃Al-urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures*, Mater. Sci. Eng. C 26 (2006), 328.
- [49] Vial S., Forano C., Shan D., Mousty C., Barhoumi H., Martelet C. and Jaffrezic N. *Nanohybrid-layered double hydroxides: urease materials: synthesis and application to urea biosensors*, Mater. Sc. Eng., C 26 (2006), 378.
- [50] Vial S., Prevot V., Leroux F. and Forano C., *Immobilization of urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by soft chemistry routes*, Microporous Mesoporous Mater. 107 (2008), 190.
- [51] Mansouri H., Forano C., Prevot V., Jaffrezic R.N. and Ben Haj Amara A., *Layered double hydroxides/trypsin based conductometric biosensors*, Sens. Lett. 7 (2009), 1.
- [52] Li M., Chen S., Ni F., Wang Y. and Wang L., *Layered double hydroxides functionalized with anionic surfactant: Direct electrochemistry and electrocatalysis of haemoglobin* Electrochim. Acta 53 (2008), 7255.
- [53] Ren L., He J., Evans D.G., Duan X. and Ma R., *Some factors affecting the immobilization of penicillin G acylase on calcined layered double hydroxides*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 16 (2001), 65.
- [54] Ren L., He J., Zhang S., Evans D.G. and Duan X., *Immobilization of penicillin G acylase in layered double hydroxides pillared by glutamate ions*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 18 (2002), 3.
- [55] Basyarudin M., Rahman A., Basri M., Hussein M. Z., Noor Hatta Idris M., Zaliha R.N. Abdul Rahman R., Salleh A.B., *Immobilisation of lipase from candida rugosa on layered double hydroxides of Mg/Al and its nanocomposite as biocatalyst for the synthesis of ester* Catal. Today 93-95 (2004), 405.
- [56] Basyaruddin M. Abdul Rahman, Hasanah U. Zaidan, Basri M., Zobir M. Hussein, Noor Zaliha R., Rahman A. and Salleh A. B., *Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using*

lipase from candida rugosa immobilised on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides (LDHs) J. Mol. Catal. B: Enzym. 50 (2008), 33.

[57] Yagiz F., Kazan D., Nilgun Akin A., *Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites*, Chem. Eng. J. 134 (2007), 262.

[58] Hong-Yang Z., Kai-Bo L., Deng X., Jiang H. and Zhang F., *Characterization of the lipase immobilized on Mg-Al hydrotalcite for biodiesel*, Proc. Biochem. 44 (2009), 791.

[59] An Z., Lu S., He J. and Wang Y., *Colloidal assembly of proteins with delaminated lamellas of layered metal hydroxide*, Langmuir 25 (2009), 10704.

[60] Shi W., Wei M., Jin L. and Li C., *Calcined layered double hydroxides as a “ biomolecular vessel” for bromelain: Immobilization, storage and release*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 47 (2007), 58.

[61] Morales Borges R., Guadalupe Carbajal Arizaga G. and Wypych F., *Immobilization of enzymatic extract from penicillium camemberti with lipoxygenase activity onto a hybrid layered double hydroxide*, J. Biochem. Eng. 48 (2009), 93.

[62] Bellezza F., Cipiciani A., Latterini L., Posati T. and Sassi P., *Structure and catalytic behavior of myoglobin adsorbed onto nanosized hydrotalcites*, Langmuir 25 (2009), 1098.

[63] Zhang Y.-T., Fan L.-H., Zhi T.-T., Zhang L., Huang H. and Chen H.-L., *Synthesis and characterization of poly(acrylic acid-co-acrylamide)/Hydrotalcite nanocomposite hydrogels for carbonic anhydrase immobilization*, J. Polym. Sci. Part A: Polym Chem. 47 (2009), 3232.

[64] Clark L.C. and Lyons C., *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery* Ann. NY Acad. Sci. 102 (1962), 29.

[65] Palecek S. P. and Zydney A.L., *Hydraulic permeability of protein deposits formed during micro-filtration: effect of solution pH and ionic strength*, J. Membr. Sci. 95 (1994), 71.

[66] Tanford C. (Ed.), *Physical chemistry of macromolecules*, Wiley, New York (1961).

[67] Musale D. A. and Kulkarni S. S., *Relative rates of protein transmission through poly (acrylonitrile)-based ultra-filtration membranes*, J. Membr. Sci. 136 (1997), 13.

[68] Albareda-Sirvent M., Merkoçi A. and Alegret S., *Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors, A review*, Sens. Actuators, B 69 (2000), 153.

[69] *Biosensors for environmental monitoring*, Edited by U. Bilitewski and A. P. F. Turner (2000) Harwood Academic Publishers.

- [70] Ohsaka T., Yamaguchi Y. and Oyama N., *A new amperometric glucose sensor based on bilayer film coating of redox active clay film and glucose oxydase enzyme film*, Bull. Chem. Soc. Jpn 63 (1990), 2646.
- [71] Zen J.-M. and Lo C.-W., *Glucose sensor made of an Enzymatic Clay-Modified Electrode and Methyl Viologen Mediator*, Anal. Chem. 68 (1996), 2635.
- [72] Lei C. and Deng J., *Hydrogen peroxide sensor based on coimmobilized methylene green and horseradish peroxidase in the same montmorillonite modified bovine serum albumin glutaraldehyde matrix on a glassy carbon electrode surface*, Anal. Chem. 68 (1996), 3344.
- [73] Cosnier S., Lambert F. and Stoytcheva M., *A composite clay glucose biosensor based on an electrically connected HRP*, Electroanalysis 12 (2000), 356.
- [74] Eddowes M. J. and Hill H. A. O., *Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c*, Chem. Comm. 21 (1977) 771.
- [75] Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T. and Gazaryan I., *Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors*, Anal. Chim. Acta 400 (1999), 91.
- [76] Scheller F. W., Bistolas N., Liu S., Janchen M., Katterle M. and Wollenberger U., *Thirty years of haemoglobin electrochemistry*, Adv. Colloid Interface Sci. 116 (2005), 111.
- [77] Wu Y. and Hu S., *Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins* Microchim. Acta 159 (2007), 1.
- [78] Wollenberger U., Spricigo R., Leimkühler S, and Schröder K, *Protein electrodes with direct electrochemical communication*, Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. 109 (2008), 19.
- [79] Das T. K., Mazumdar S. and Mitra S., *Micelle induced reduced release of heme NO from nitric oxide complex of myoglobin*, Chem. Comm. (1993), 1447.
- [80] Das T. K. Mazumdar S. and Mitra S., *Characterization of a partially unfolded structure of cytochrome c induced by sodium dodecyl sulphate and the kinetics of its refolding*, Eur. J. Biochem. 254 (1998), 662.
- [81] Ma L., Tian Y. and Rong Z., *Direct electrochemistry of haemoglobin in the hyaluronic acids films*, J. Biochem. Bioph. Methods 70 (2007), 657.
- [82] Liu H. and Hu N., *Interaction between Myoglobin and Hyaluronic Acid in Their Layer-by-Layer Assembly: Quartz Crystal Microbalance and Cyclic Voltammetry Studies*, J. Phys. Chem. B 110 (2006), 14494.

- [83] Wang Q., Lu G. and Yang B., *Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on carbon paste electrode by silica sol-gel film*, Biosens. Bioelectron. 19 (2004) 1269.
- [84] Xie Y., Liu H. and Hu N., *Layer-by-layer films of hemoglobin or myoglobin assembled with zeolite particles : electrochemistry and electrocatalysis*, Bioelectrochem. 70 (2007), 311.
- [85] Yang X., Chen X., Yang L. and Yang W., *Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase in α -zirconium phosphate nanosheet film*, Bioelectrochem. 74 (2008), 90.
- [86] Zhang Y., Chen X. and Yang W., *Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized in zirconium phosphate nanosheets film*, Sens. Actuators, B 130 (2008) 682.
- [87] Feng J. J., Xu J. J. and Chen H.Y., *Synergistic effect of zirconium phosphate and Au nanoparticles on direct electrons transfer of haemoglobin on glassy carbon electrode*, J. Electroanal. Chem. 585 (2005), 44.
- [88] Chen X., N. Hu, Y. Zeng, J. F. Rusling and J. Yang, *Ordered Electrochemically Active Films of Hemoglobin, Didodecyldimethylammonium Ions, and Clay*, Langmuir 15 (1999), 7022.
- [89] Xu J., Li W., Yin Q., Zhong H., Zhu Y. and Jin L., *Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of haemoglobin on nano-structural attapulgite clay-modified glassy carbon electrode*, J. Colloid Interface Sci. 315 (2007), 170.
- [90] Liu Y., Liu H. and Hu N., *Core-shell nanocluster films of hemoglobin and clay nanoparticle: direct electrochemistry and electrocatalysis*, Biophys. Chem. 117 (2005), 27.
- [91] Fan C., Zhuang Y., Li G., Zhu J. and Zhu D., *Direct Electrochemistry and Enhanced Catalytic Activity for Hemoglobin in a Sodium Montmorillonite Film*, Electroanalysis 12 (2000), 14.
- [92] Pan G., Fan C., Liu X., Chen T. and Li G., *A nitric oxide biosensor based on the multi-assembly of hemoglobin/montmorillonite/polyvinyl alcohol at a pyrolytic graphite electrode* Biosens. Bioelectron. 19 (2003), 441.
- [93] Lei C., Wollenberger U. , Bistolas N., Guiseppi-Elie A. and Scheller F. W., *Electron transfer of hemoglobin at electrodes modified with colloid clay nanoparticles*, Anal. Bioanal. Chem. 372 (2002), 235.

- [94] Fan C., Liu X., Pang G. Li G. and Scheer H., *Highly sensitive voltammetric biosensor for nitric oxide based on its high affinity with haemoglobin*, Anal. Chim. Acta 523 (2004), 225.
- [95] Zhou H., Li Z., Hu N., Zeng Y., and Rusling J. F., *Layer by layer Assembly of ultrathin films of haemoglobin and clay nanoparticles with electrochemical and catalytic activity* Langmuir 18 (2002), 8573.
- [96] Sun H., *Direct electrochemical and electrocatalytic properties of heme protein immobilized on ionic liquid- clay-nanoparticle-composite films*, J. Porous Mater. 13 (2006), 393.
- [97] Shan D., Han E., Xue H. and Cosnier S., *Self-assembled films of haemoglobin/laponite/chitosan: application for the direct electrochemistry and catalysis to hydrogen peroxide*, Biomacromolecules 8 (2007), 3041.
- [98] Zhao X., Mai Z., Kang X., Dai Z. and Zou X., *Clay-chitosan-gold nanoparticle nanohybrid: preparation and application for assembly and direct electrochemistry of myoglobin*, Electrochim. Acta 53 (2008), 4732.
- [99] Zhao X., Mai Z., Kang X. and Zou X., *Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on clay-chitosan-gold nanoparticle nanocomposite*, Biosens. Bioelectron. 23 (2008), 1032.
- [100] Xu J.-M., Li W., Yin Q.-F. and Zhu Y.-L., *Direct electrochemistry of cytochrome c on natural nano-attapulgite clay modified electrode and its electrocatalytic reduction for H₂O₂* Electrochim. Acta 52 (2007), 3601.
- [101] Lei C., Lisdat F., Wollenberger U. and Scheller F.W., *Cytochrome c/Clay-modified electrode*, Electroanalysis 4 (1999), 11.
- [102] Lojou E., Giudici-Ortoni M.T. and Bianco P., *Direct electrochemistry and enzymatic activity of bacterial polyhemic cytochrome C₃ incorporated in clay films*, J. Electroanal. Chem. 579 (2005), 199.
- [103] Sallez Y., Bianco P. and Lojou E., *Electrochemical behavior of c-type cytochromes at clay –modified carbon electrodes: a model for the interaction between proteins and soils*, J. Electroanal. Chem. 493 (2000), 37.
- [104] Bistolas N., Wollenberger U., Jung C. and Scheller F. W., *Cytochrome P450 biosensors- review*, Biosens. Bioelectron. 20 (2005), 2408.
- [105] Shan D., Wang Y.-N., Xue H.-G., Cosnier S. and Ding S.-N., *Xanthine oxidase/laponite nanoparticles immobilized on glassy carbon electrode: direct electron transfer and multielectrocatalysis*, Biosens. Bioelectron. 24 (2009), 3556.

-
- [106] Dan S., Zhang J., Xue H-G., Ding S-N. and Cosnier S., *Colloidal laponite nanoparticles: Extended application in direct electrochemistry of glucose oxidase and reagentless glucose biosensing*, Biosens. Bioelectron. 25 (2010), 1427.
- [107] Ferapontova E. E., *Direct peroxidase bioelectrocatalysis on a variety of electrode materials*, Electroanalysis 16 (2004) 1101.
- [108] Xu X. Liu S. and Ju H., *Disposable biosensor based on a hemoglobin colloidal gold-modified screen-printed electrode for determination of hydrogen peroxide*, Sensors 4 (2004), 390.
- [109] Wang H. Y., Guan R., Fan C. H., Zhu D. X., and Li G. X., *A hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of hemoglobin incorporated in a kieselguhr film* Sens. Actuators, B 84 (2004), 214.
- [110] Han X. J., Huang W. M., Jia J. B., Dong S. J., and Wang E. K., *Direct electrochemistry of hemoglobin in egg-phosphatidylcholine films and its catalysis to H_2O_2* , Biosens. Bioelectron. 17 (2002), 741.

Chapitre II :

Les argiles cationiques

II.1- Introduction

Les argiles cationiques ont des propriétés structurales et morphologiques spécifiques ouvrant sur un très vaste domaine d'applications comme dans l'industrie pharmaceutique ou en agriculture. La présence de fer par substitution isomorphique dans la couche tétraédrique et/ou octaédrique des feuillets des argiles influence les propriétés physico-chimiques, photo-catalytiques et électro-catalytiques des argiles, comme par exemple la photo-dégradation de polluants adsorbés dans les sols.

Les techniques électrochimiques permettent de suivre le transfert électronique dans les argiles [1]. Cependant, les études s'intéressant à la réduction directe du fer dans les argiles sont assez rares. Villemure et coll. ont montré que la réduction directe du fer peut être observée en voltammétrie cyclique en milieu neutre en utilisant des argiles synthétiques riches en fer [2,3]. De même, le groupe de Wang a montré que le transfert électronique direct dans des argiles naturelles riches en fer pouvait être mis en évidence en milieu acide [4]. L'activité d'oxydo-réduction du fer dans les argiles est facilitée par la présence de médiateurs redox ou de photo-sensibilisateurs [4,5]. Ainsi, Oyama et Anson ont été les premiers à suggérer que le fer structural présent dans les montmorillonites naturelles jouait un rôle dans la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [6]. Cette activité électro-catalytique est observée en utilisant des médiateurs redox chargés positivement comme le $Ru(NH_3)_6^{2+}$, $Fe(bpy)_3^{3+}$ et le méthyl viologène (MV^{2+}) [6,7,8]. D'autres méthodes photochimiques et d'électroluminescence confirment que le fer présent dans la nontronite naturelle joue un rôle important dans la catalyse de transformation de H_2O_2 [9,10,11,12]. Cependant, ces argiles ferrifères n'ont jamais été utilisées pour le développement de capteur à H_2O_2 .

D'autre part, la détection de H_2O_2 a été réalisée en utilisant l'hémoglobine (Hb) comme biocatalyseur immobilisé à la surface d'électrodes modifiées par des argiles [13,14]. En effet, différentes études se sont intéressées au transfert direct d'électrons entre l'électrode et l'hème des protéines redox immobilisées dans des argiles naturelles [15,16,17,18] ou modifiées [14,19,20]. Par contre, le rôle éventuel du fer structural dans ce processus n'a jamais été étudié.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux propriétés physico-chimiques et électrochimiques des argiles cationiques ferrifères. Le but est de mettre en évidence le rôle éventuel du fer dans le transfert électronique se produisant à la surface des électrodes

modifiées par les argiles. Leur comportement électrochimique a été étudié en milieu acide et en milieu neutre, en présence ou non d'un médiateur redox, le méthyl viologène, ou d'une biomolécule, l'hémoglobine. Des capteurs et biocapteurs ampérométriques à H_2O_2 ont finalement été préparés en utilisant les différentes configurations d'électrodes modifiées.

II.2- Caractérisation physico-chimique des argiles utilisées

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé différentes argiles naturelles ou synthétiques contenant du fer, présent en proportions différentes et dans des sites différents. Les argiles naturelles sont la nontronite de Garfield (NontG) et la montmorillonite de Wyoming (Swy₂). Les argiles synthétiques sont une montmorillonite ferrifère en site octaédrique (MSF), une saponite au fer en site tétraédrique (SapSF) et une nontronite (NontS). Une montmorillonite synthétique ne contenant pas de fer nous a servi de référence (MS). Le tableau II-1 reprend les formules chimiques de ces différentes argiles et leurs principales caractéristiques physico-chimiques.

La capacité d'échange cationique (CEC) rapportée dans la littérature varie de 85 meq /100g pour la Swy₂ à 148 dans le cas de la SapSF. Les tailles des particules varient entre 400 et 750 nm et leurs surfaces spécifiques (BET) varient entre 31 et 142 m²/g.

La substitution de l'aluminium en couche octaédrique ou de silicium en couche tétraédrique par du fer modifie la localisation de la charge dans les feuillets de l'argile. La charge et la localisation du fer ont été recalculées à partir des formules théoriques des argiles. On note d'après ce tableau que la NontG est l'argile la plus riche en fer octaédrique et que la NontS et la SapSF sont plus riches en fer tétraédrique. Dans la NontG, le fer constitue l'élément le plus abondant après le silicium. Une analyse chimique par EDX de sa composition chimique a permis la comparaison du rapport molaire de Fe/Si théorique: $R_{th}Fe/Si = 0,5$ et expérimental $R_{exp} = 0,43$.

Tableau II-1 : Caractérisation physico-chimiques des argiles cationiques utilisées

Argiles	Composition	CEC (meq/100g)	Taille (nm)	S _{BET} (m ² /g)	Fer Tetra. (mmole/g)	Fer Octa. (mmole/g)	Charge Tetra.	Charge Octa.
NontG	(Si _{7,22} Al _{0,78})(Fe _{3,64} Al _{0,32} Mg _{0,04})O ₂₀ (OH) ₄ Na _{0,82}	104 [21]	750	57	0	4,2	0,78	-0,04
MSF	Si ₈ (Al ₃ Fe _{0,34} Mg _{0,66})O ₂₀ (OH,F) ₄ Na _{0,66}	-	600	142	0	0,41	0	-0,66
MS	Si ₈ (Al _{3,2} Mg _{0,8})O ₂₀ (OH,F) ₄ Na _{0,8}	90	550	60	0	0	0	-0,80
SapSF	(Si _{6,8} Fe _{0,8})Al _{0,4} Mg ₆ O ₂₀ (OH) ₄ Na _{1,2}	148 [22]	635	-	1,2	0	1,2	0
NontS	(Si _{6,5} Fe ³⁺ _{1,5})Fe ₄ O ₂₀ (OH) ₄ Na _{1,5}	95 [23]	500	140 [23]	6	1,6	1,5	0
Swy ₂	(Si _{7,92} Al _{0,08})(Al _{3,06} Fe ³⁺ _{0,36} Mg ²⁺ _{0,52} Ti ⁴⁺ _{0,02})O ₂₀ (OH) ₄ (Na ⁺ _{0,70})	85 [24]	400	31 [24]	0	0,27	0,08	-0,54

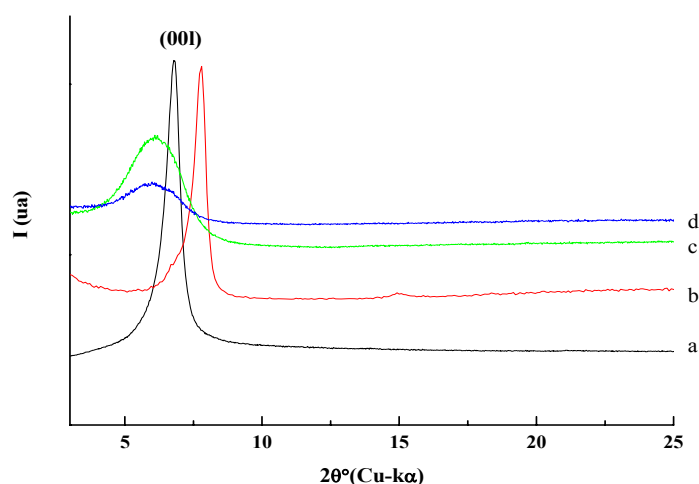


Figure II-1: Diffractogrammes de RX de NontG (a) SapSF (b) MSF (c) et MS (d).

Les diffractogrammes de RX (Figure II-1) des différentes argiles utilisées montrent une raie 001 caractéristique d'une distance basale d_{001} variant entre 11,5 et 15,6 Å selon la nature de l'argile (Tableau II-2). La largeur à mi-hauteur de la raie 001 augmente dans l'ordre suivant : NontG > SapSF > MSF > MS. A partir de la formule de Scherrer on peut calculer la taille du domaine cristallisé à partir des données cristallographiques (largeurs des raies à mi-hauteur) obtenues sur les diagrammes de DRX :

$$L = 0,94 (\lambda / \cos\theta) * (1/\beta) \quad (\text{éq.II-1})$$

$$\text{Avec } \beta = B'_{\text{Scherrer}} - b'$$

Où L est la longueur de cohérence (\AA) du cristal ; λ la longueur d'onde (\AA) de la raie excitatrice ($K_{\alpha\text{Cu}} = 1,5418 \text{\AA}$) ; θ , l'angle de diffraction du plan (hkl) ; B'_{scherrer} la largeur angulaire (radian) à mi-hauteur de la figure de diffraction de (hkl) ; b' la largeur instrumentale (radian) de la raie de diffraction de Laue-Scherrer (elle dépend de l'appareil, dimension de la chambre, absorption de l'objet).

Nous avons calculé le nombre moyen de feuillets (N) constituant les cristallites (Tableau II-2). Notons la faible valeur de N pour les deux montmorillonites synthétiques (MSF et MS). Généralement pour les montmorillonites naturelles (Wyoming sodique) on trouve une valeur de N de l'ordre de 8 [25].

Tableau II-2 : Distances basales (d) des argiles cationiques utilisées.

Argiles	d_{001} (\AA)	$N_{\text{Feuillets}}$
NontG	12,8	22
SapSF	11,5	15
MSF	13,8	4
MS	15,6	2

Les photos de microscopie électronique à transmission (MET) des argiles utilisées montrent que les montmorillonites MSF (Figure II-2-a) et MS (Figure II-2-b) se présentent sous forme d'amas de particules plus ou moins homogènes et compacts, ce qui confirme le résultat obtenu par la DRX. Par contre, la NontG (Figure II-2-c) et SapSF (Figure II-2-d) sont constituées de plaquettes bien empilées de taille pouvant atteindre quelques centaines de nm.

Dans la suite de ce chapitre nous utiliserons principalement les quatre premières argiles mentionnées dans le tableau II-1. Parfois d'autres argiles, NontS, Swy₂ et laponite (Lap) ont été utilisées pour confirmer des résultats.

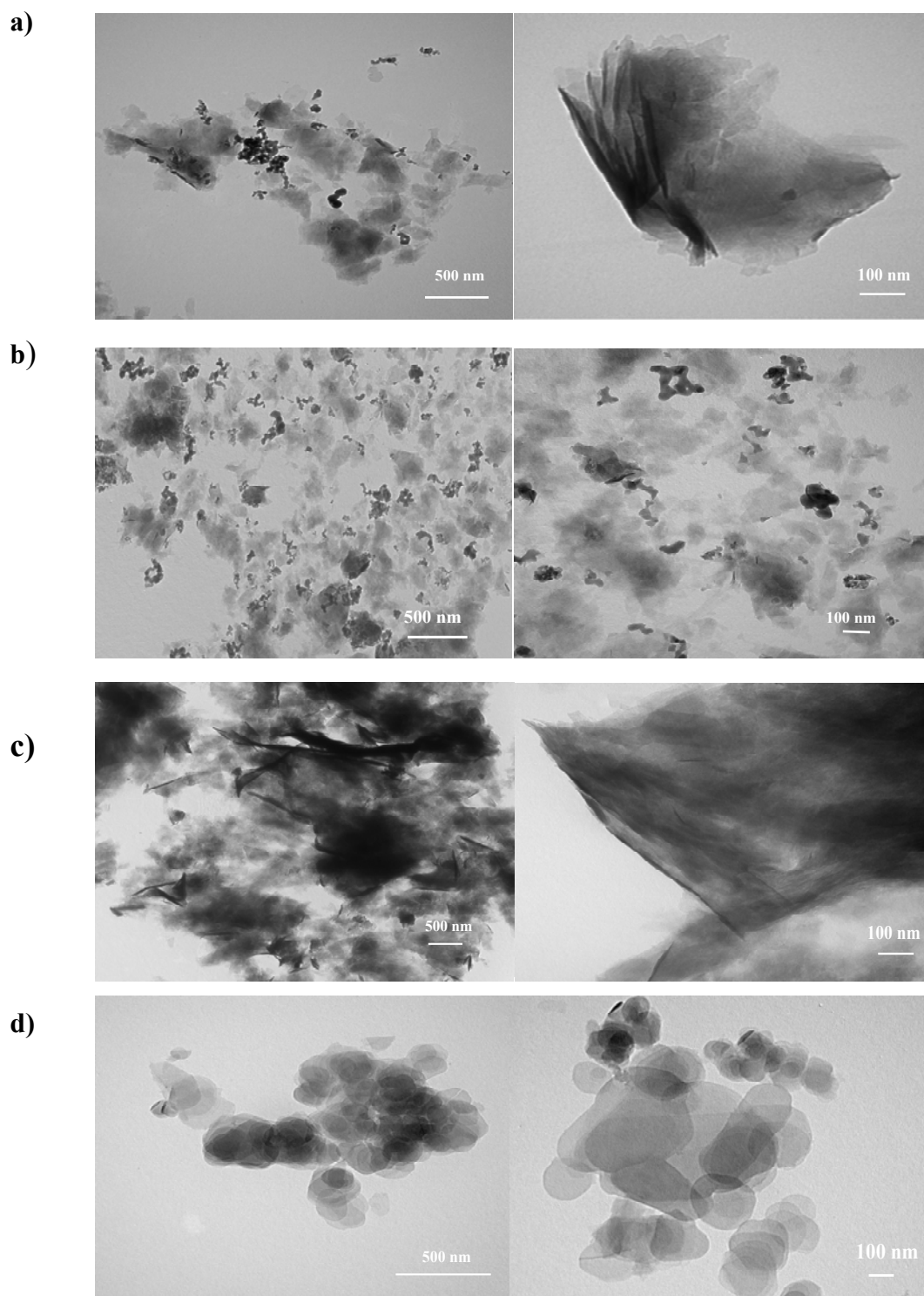


Figure II-2 : Clichés MET de MS (a), MSF (b), NontG (c) et SapSF (d)

II.3- Caractérisation électrochimique des argiles

Nous avons caractérisés les argiles par différentes techniques électrochimiques : la voltammétrie linéaire ou cyclique et la spectroscopie d'impédance complexe. Afin de réaliser ces caractérisations, nous avons préparés des films d'argile sur des électrodes de carbone vitreux en déposant une quantité définie d'une solution colloïdale d'argile (20 ou 40 μg) sur la surface de l'électrode, qui est ensuite séchée. L'épaisseur des films (40 μg) a été mesurée au profilomètre. Ces valeurs sont reprises dans le tableau II-3. La cellule électrochimique est constituée de trois électrodes : l'électrode de travail décrite ci-dessus, d'une contre électrode en platine et d'une référence Ag-AgCl.

II.3.1-Mesures de la perméabilité des films d'argiles

La diffusion d'une espèce électroactive à travers une membrane inerte peut être étudiée par voltammétrie linéaire. La voltammétrie linéaire est une méthode stationnaire qui nécessite l'utilisation d'une électrode tournante, afin d'assurer une parfaite reproductibilité des conditions de transport de matière à la surface de l'électrode (Figure II-3a). Ainsi, l'utilisation d'une électrode tournante entraîne une convection forcée, on parle alors de systèmes hydrodynamiques. La façon la plus simple de décrire les systèmes convectifs repose sur la notion de couche de diffusion. Cette notion suppose que la convection maintienne la concentration de chaque espèce chimique uniforme et égale à celle que l'on a au sein de la solution, jusqu'à une distance δ_d de l'électrode. A l'intérieur, de la couche de diffusion ($\delta_m < x < \delta_d$) et à l'intérieur de la couche d'argile dans notre cas ($0 < x < \delta_m$), on admet qu'aucun mouvement de convection ne se produit et que le transfert de masse s'effectue uniquement par diffusion (Figure II-3b). Il s'agit maintenant de déterminer le courant de diffusion passant à travers la couche de diffusion et du film d'argile.

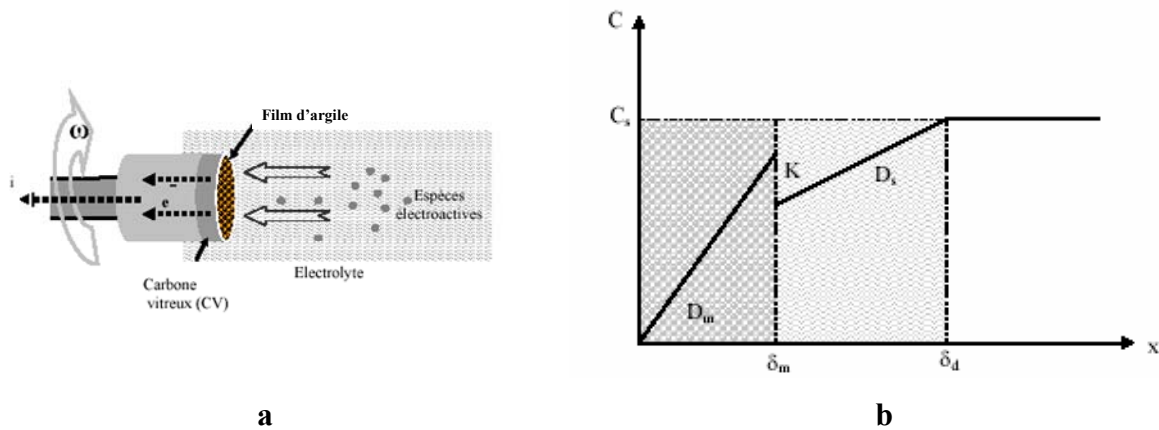


Figure II-3 : a) Schéma de principe de la technique de voltammétrie linéaire sur électrode tournante.

b) Profil de concentrations pour une électrode tournante modifiée par un film d'argile.

Le principe consiste dans la mesure du courant limite de diffusion d'une espèce électroactive en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode. Ce courant limite comprend de deux composantes :

- Le courant de Levich est le courant mesuré en absence de film sur l'électrode. Il est donné par l'équation suivante :

$$i_{\text{lim}} = 0,62nFAC_s D_s^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (\text{éq.II-2})$$

Où n , F , A , C_s , D_s , ν , et ω sont respectivement le nombre d'électrons échangés lors de la réaction redox, la constante de Faraday qui est égale à 96500 C, la surface active de l'électrode tournante en contact avec la solution (cm^2), la concentration de l'espèce électroactive en solution (mol cm^3), le coefficient de diffusion de l'espèce considérée dans la solution ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), la viscosité cinématique du solvant ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) et la vitesse de rotation de l'électrode (rad s^{-1}).

- Le composante du courant limite dû à la présence de la membrane s'écrit :

$$i_{\text{lim}} = \frac{nFAC_s D_m}{\delta_m} \quad (\text{éq.II-3})$$

La perméabilité de l'espèce électroactive dans le film d'argile est définie comme étant :

$$P_m = \frac{KD_m}{\delta_m} \quad (\text{éq.II-4})$$

Où K représente le coefficient de partage

D_m est le coefficient de diffusion de l'espèce considérée dans le film

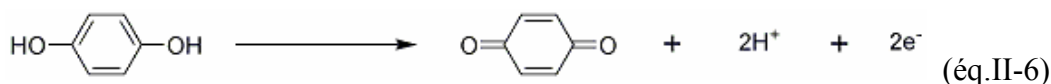
δ_m est l'épaisseur du film

La méthode utilisée pour déterminer la perméabilité est celle proposée par Gough et Leypoldt [26,27]. Cette méthode est basée sur l'approche de Koutechy-Levich décrite par

$$\text{l'équation : } \frac{1}{i_{\text{lim}}} = \frac{1}{0,62nFAC_s D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2}} + \frac{\delta_m}{nFAK C_s D_m} \quad (\text{éq.II-5})$$

On constate que l'équation II-5 est la somme de deux termes dont l'un varie avec l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode. Le tracé de la courbe $1/i_{\text{lim}} = f(1/\omega^{1/2})$ donne une droite dont la valeur de l'ordonnée à l'origine permet de déterminer la perméabilité de la membrane.

Le courant limite est déterminé en utilisant une électrode modifiée par l'argile dans une solution d'hydroquinone (1 mM HQ) dont l'oxydation est donnée par la réaction suivante :



Les mesures de courant limite sont réalisées pour un potentiel variant entre 0 et 0,8 V avec une vitesse de balayage égale à 10 mV/s. Les vitesses de rotation de l'électrode sont 250, 500, 1000, 1500 et 2000 tr/mn (Figure II-4). Pour s'assurer de la réversibilité du phénomène de diffusion, la mesure est réalisée à des vitesses croissantes (aller) et décroissantes (retour). La présence du film d'argile déposé à la surface de l'électrode déplace le potentiel de demi-vague de HQ vers des valeurs plus anodiques par rapport à celui de l'HQ en solution ($E_{1/2} = 0,212$ mV). Cependant ce déplacement dépend de la nature de l'argile, avec un déplacement plus faible pour les argiles contenant du fer ($\Delta E = 20-50$ mV) que pour les argiles sans fer ($\Delta E = 170$ mV) (Tableau II-2). Comme l'oxydation de l'HQ dépend du pH, cette variation pourrait être due à une variation du pH local au voisinage de l'électrode selon la nature de l'argile.

Tableau II-3 : Perméabilités et épaisseurs des films d'argiles.

Argile	$E_{1/2}$ HQ (mV)	P_m 10^{-3} (cm s ⁻¹)	Epaisseur du film (μm)
NontG	233	$1,7 \pm 0,1$	$0,63 \pm 0,5$
MSF	266	$9,0 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,5$
MS	379	$37 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,5$
SapSF	261	$3,5 \pm 0,7$	$0,70 \pm 0,5$

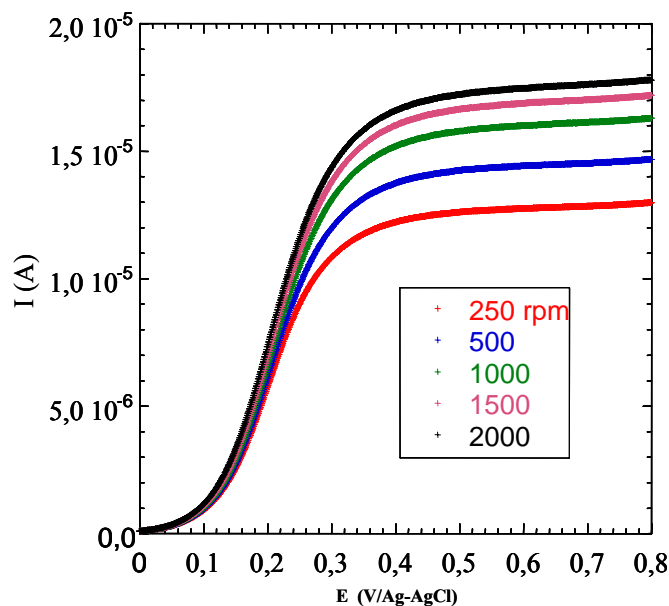


Figure II-4: Voltammétrie linéaire ($v = 10 \text{ mV /s}$) d'électrode modifiée par NontG dans une solution d'HQ (1 mM dans 0,1 M TP pH 7,0) à différentes vitesses de rotation ω (r/pm).

La droite de Koutechy-Levich ainsi obtenue est représentée sur la Figure II-5 et les valeurs de perméabilité calculées pour les différents films d'argile sont reprises dans le tableau II-3.

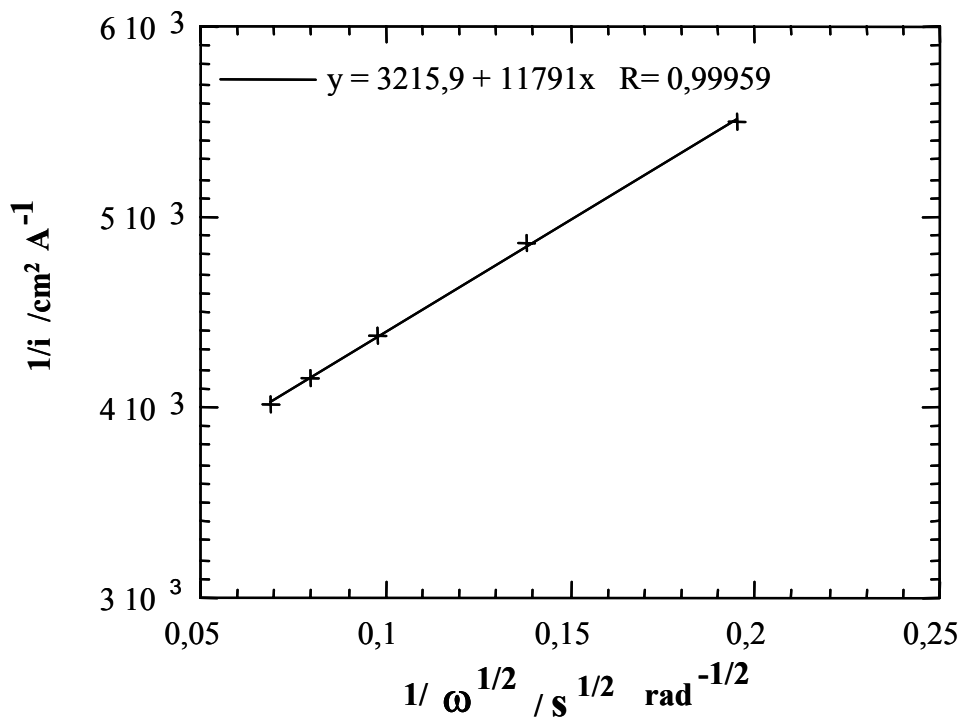


Figure II-5 : Caractéristiques de Koutechy-Levich d'une électrode modifiée par NontG ($v = 10 \text{ mVs}^{-1}$, 1 mM d'HQ dans 0,1 M deTP pH 7,0).

Les perméabilités varient dans l'ordre croissant : NontG < SapSF < MSF < MS. La valeur minimale obtenue par la NontG est similaire à celle obtenue pour la laponite [28]. Cette différence de perméabilité peut être expliquée par les propriétés des argiles. Ainsi on constate que les épaisseurs des films varient fortement suivant la nature des argiles. Les deux montmorillonites (MSF et MS) donnent une épaisseur de film de 1,5 et 1,4 μm , alors que la NontG et la SapSF forment des films deux fois plus minces. La distribution de charge est tétraédrique pour la NontG et la SapSF et localisée sur les oxygènes du tétraèdre provoquant une saturation et une forte cohésion des feuillets, comme le montre la microscopie (TEM) (Figure II-2). La NontG et la MS ont la même charge (0,8) et (0,78) mais l'une tétraédrique et l'autre octaédrique. Dans les montmorillonites MS et MSF, la charge négative est octaédrique et délocalisée à la surface des oxygènes, la cohésion des feuillets est plus faible, ce qui provoque la formation de films plus désordonnés et moins compacts favorables à la diffusion des espèces entre les plaquettes d'argiles. Les résultats obtenus montrent que la formation des films plus ou moins compacts et denses dépend de la charge et de sa localisation dans les feuillets d'argile, ce qui donne des épaisseurs de films différentes et des perméabilités différentes.

II.3.2- Mesures d'impédances électrochimiques

La spectroscopie d'impédance est utilisée pour déterminer le comportement électrique des matériaux. C'est une technique électrochimique considérée comme une technique complémentaire aux mesures de perméabilité. C'est une méthode non stationnaire qui permet d'avoir des informations sur les étapes élémentaires constituant le processus électrochimique global. Le principe consiste à superposer au potentiel de l'électrode une modulation de potentiel sinusoïdal de faible amplitude et à suivre la réponse du courant pour différentes fréquences du signal perturbateur. A l'instant t la valeur du potentiel de l'électrode est exprimée en fonction de sa composante stationnaire E_0 et d'un terme sinusoïdal $E_t = E_0 + |\Delta E| \sin(\omega t)$, où ω représente la pulsation du signal ($\omega = 2\pi f$) et ΔE son amplitude. La perturbation sinusoïdale du potentiel induit un courant sinusoïdal, superposé au courant stationnaire et déphasé d'un angle ϕ , sa valeur est donnée par $I_t = I_0 + |\Delta I| \sin(\omega t - \phi)$ (Figure II-6).

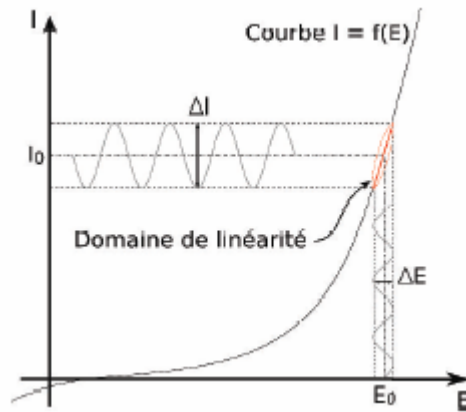


Figure II-6: Schéma de principe de l'impédance électrochimique.

Pour une fréquence donnée, l'impédance électrochimique est définie par le rapport :

$$Z(\omega) = \frac{E_t}{I_t} \quad (\text{éq.II-7})$$

Dans le plan complexe, l'impédance, notée $Z(\omega)$, représente un vecteur caractérisé par le module $|Z|$ et l'angle de déphasage φ . On peut aussi l'écrire comme une somme vectorielle d'une partie réelle et d'une partie imaginaire : $Z = R_z + jX_z$ (éq.II-8)

Où : R_z est la partie réelle de l'impédance définie par : $R_z = |Z|\cos \varphi$ (éq II-9)

X_z est la partie imaginaire ou réactance $X_z = |Z|\sin \varphi$ (éq II-10)

On démontre que $|Z| = \sqrt{(Z_{re}^2 + Z_{im}^2)}$ et $\tan \varphi = Z_{im} / Z_{re}$. (éq II-11,12)

Traditionnellement, ces grandeurs sont représentées sous la forme d'un diagramme de Bode qui consiste à porter le logarithme du module et l'angle de déphasage de l'impédance en fonction du logarithme de la fréquence. La représentation de Nyquist correspond à la représentation graphique d'une impédance $Z = Z_{re} + j Z_{im}$ dans le plan complexe pour différentes fréquences. Les diagrammes de Nyquist se présentent fréquemment sous la forme d'arcs de cercle et de portions de droite.

L'analyse en fréquence de l'impédance électrochimique permet de différencier les divers phénomènes élémentaires en fonction de leur fréquence caractéristique (ou constante de temps). A hautes fréquences, on sollicite la conduction ionique et à basse fréquence des phénomènes lents sont exploitables comme la diffusion, l'adsorption et le transfert de charge. Entre les deux, dans le domaine des fréquences intermédiaires, des phénomènes transitoires plus ou moins rapides se manifestent (changement de milieu). La première étape est de modéliser le spectre par un circuit équivalent modèle, ensuite c'est de donner une

signification physique au modèle établi, à savoir la résistance de l'électrolyte R_e , la résistance de transfert de charge R_{TC} , la capacité de double couche C_{DC} , etc....

Les mesures d'impédance ont été réalisées dans une solution de tampon phosphate (0,1 M à pH 7) contenant l'HQ (1 mM) en utilisant une tension continue égale à 0,4 V et en appliquant une tension alternative de faible amplitude (5 mV) dans un domaine de fréquence entre $5 \cdot 10^5$ et 0,1 Hz. Nous avons choisi une amplitude suffisamment faible pour avoir une fonction $I = f(E)$ linéaire. Les graphes obtenus ont été simulés en utilisant un logiciel appelé FRA (*Frequency Response Analysis*) (Figure II-7). Ils montrent un diagramme de Nyquist caractérisé par une courbe finie (demi-cercle). Un circuit électrique équivalent qui en est déduit est présenté dans la Figure II-8 et les valeurs qui en résultent sont reprises dans le tableau II-4.

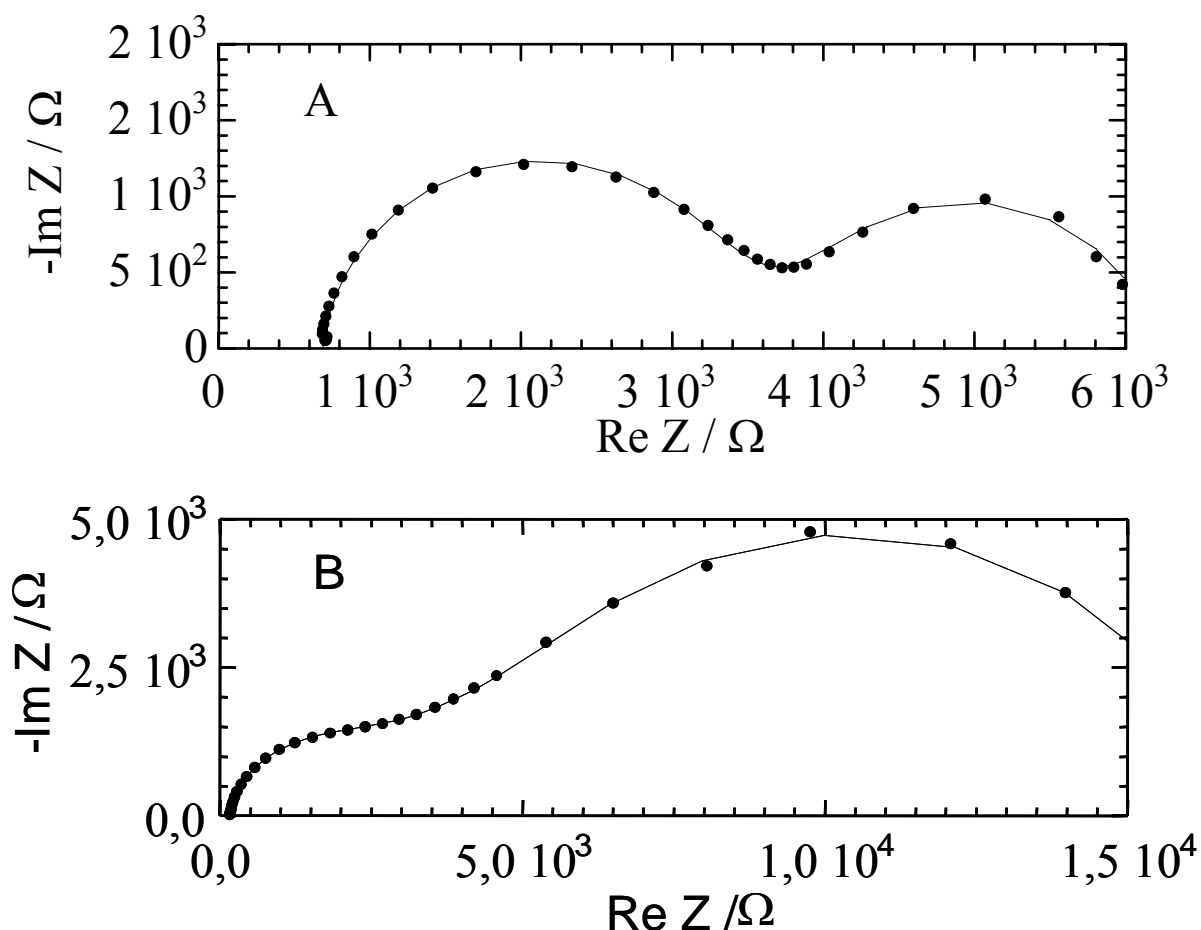


Figure II-7 : Diagrammes de Nyquist de l'impédance de MS (A) et MSF (B) dans une solution contenant 1 mM d'HQ pH 7 ($\omega = 500$ r/mn et $E_{\text{appl}} = 0,4$ V).

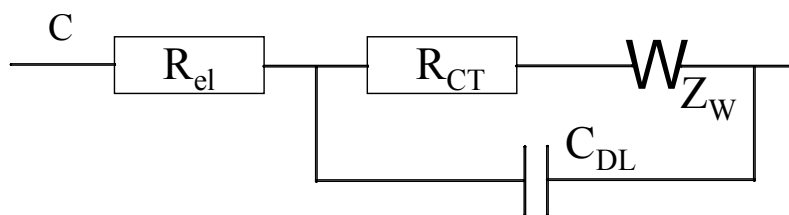


Figure II-8 : Circuit électrique équivalent, où R_{el} : est la résistance d'électrolyte, R_{CT} : est la résistance de transfert de charge, C_{DL} : c'est la capacité de double couche, Z_W : est l'impédance de Warburg.

Tableau II-4 : Paramètres des mesures d'impédance

Argile	R_{CT} (Ωcm^2)	C_{DL} (μFcm^{-2})	F (Hz)	α ($^\circ$)	R_δ (Ωcm^2)	W-T (s)	W-P ($^\circ$)
NontG	300 ± 9	$6,7 \pm 0,2$	80,2	85	4375 ± 131	1,57	44,1
MSF	141 ± 5	$5,9 \pm 0,2$	190	84	1039 ± 32	1,06	36,9
MS	192 ± 6	$4,1 \pm 0,2$	20,3	81	198 ± 6	0,79	38,7
SapSF	386 ± 12	$7,7 \pm 0,3$	53,6	74	1676 ± 51	0,95	36,3

L'impédance de Warburg est l'impédance résultant de la diffusion d'une espèce à l'électrode. C'est un élément électrochimique qui décrit l'impédance semi-infinie. Les paramètres liés à l'impédance de Warburg sont donnés dans les trois dernières colonnes du tableau II-4. Les résistances à la diffusion (R_δ) déterminées pour la série d'échantillons suivent la séquence NontG > SapSF > MSF > MS, en bon accord avec les valeurs de la perméabilité déterminées précédemment. La constante de temps WT vaut δ^2/D où δ correspond à l'épaisseur de film d'argile et D le coefficient de diffusion. On constate que WT varie de 0,79 pour la MS à 1,57 pour la NontG. On constate que les constantes de temps les plus faibles sont obtenues avec les argiles les plus perméables. Inversement les constantes de temps les plus élevées sont obtenues avec les argiles les moins perméables. La résistance de transfert de charge (R_{CT}) dépend de la réaction électrochimique d'oxydo-réduction se produisant à la surface de l'électrode. Dans le cas présent, ce coefficient reflète également la diffusion limitée de l'HQ à travers la couche d'argile. En effet, les valeurs plus élevées de R_{CT} obtenues pour la NontG et la SapSF peuvent s'expliquer par la limitation de la diffusion de l'HQ à travers les couches compactes d'argile. Il convient de noter que la MSF a une perméabilité inférieure à celle de MS, alors que leurs R_{CT} ont des valeurs assez proches. Ce résultat suggère que le transfert d'électrons est plus rapide dans le film d'argile qui a le pourcentage de fer structural plus élevé. La capacité de la double couche est d'environ $6 \mu\text{F cm}^{-2}$. Cette valeur peut être modulée par la rugosité de l'interface argile électrolyte.

II.3.3-Voltammétrie cyclique

Le fer dans les argiles naturelles existe sous différentes formes soit dans la couche octaédrique ou tétraédrique, ou bien adsorbé en surface des plaquettes ou faiblement intercalé dans l'espace l'interfeuillet. Dans le cas des argiles synthétiques que nous avons utilisées le fer se situe théoriquement dans le feuillet en site soit octaédrique (MSF) ou tétraédrique (SapSF). D'une manière générale, le fer structural peut exister sous deux formes, ferreux ou ferrique, le Fe^{II} étant plus réactif que le Fe^{III} [29,30]. Dans la couche octaédrique des argiles, le fer se transforme réversiblement du Fe^{II} en Fe^{III} [31]. Ces réactions d'oxydo-réduction sont notamment utiles dans des réactions de dégradation du type Fenton [32].

Les courbes intensité-potentiel enregistrées en voltammétrie cyclique permettent d'étudier les processus d'oxydo-réduction se produisant à la surface de l'électrode. La figure II-9 montre les courbes de voltammétrie cyclique obtenues avec une électrode de carbone vitreux (CV) modifiée par un film de MSF dans une solution tampon phosphate à pH 7. Quelque soit l'épaisseur du film (20 ou 40 μg) aucun signal n'est observé. En effet, aucun signal électrochimique correspondant au transfert direct d'électron sur les sites du fer des argiles naturelles n'avait été observé précédemment en milieu neutre [3]. Cependant, leurs comportements électrochimiques semblent dépendre fortement du pH du milieu électrolytique avec l'apparition de pics en milieu acide [4].

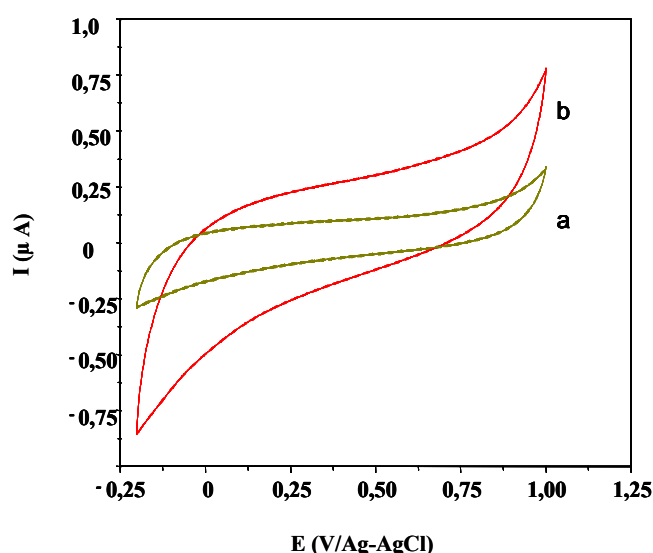


Figure II-9 : Courbes de voltammétrie cycliques des électrodes modifiées par la MSF a) 20 μg et b) 40 μg dans la solution TP pH 7 à 0,1 M à $\nu = 50 \text{ mV/s}$.

Nous avons donc enregistré les voltammogrammes des différentes électrodes de carbone vitreux modifiées par les argiles en utilisant un milieu acide. Les courbes intensité-potentielle ont été enregistrées dans une solution à pH 3 constituée par 0,1 M de Na_2SO_4 et 50 mM H_2SO_4 . On constate que l'argile MS, ne contenant pas de fer, ne présente pas de signal électrochimique (Figure II-10A), par contre avec l'électrode modifiée par la MSF on obtient un signal quasi-réversible à $E_{1/2} = 0,34$ V (Figure II-10B), correspondant au potentiel rapporté dans la littérature pour le fer présent dans les argiles [4,12]. Contrairement à l'argile MSF où le fer est dans la couche octaédrique, la SapSF caractérisée par un taux élevé de fer localisé en site tétraédrique ne présente pas de signal électrochimique (Figure II-10C). Ce résultat confirme la différence d'électroactivité du fer en site octaédrique et tétraédrique.

Dans le cas des argiles naturelles le signal du fer est difficile à mettre en évidence même dans un milieu très acide [3]. Ainsi, pour la NontG nous n'avons pas observé de signal bien défini du fer malgré la quantité importante de fer dans le feuillet octaédrique. Une hypothèse est que le transfert électronique sur le fer serait plus facile à réaliser lorsque cet atome est dispersé dans un feuillet octaédrique contenant majoritairement de l'aluminium, ce qui est le cas pour la MSF [33].

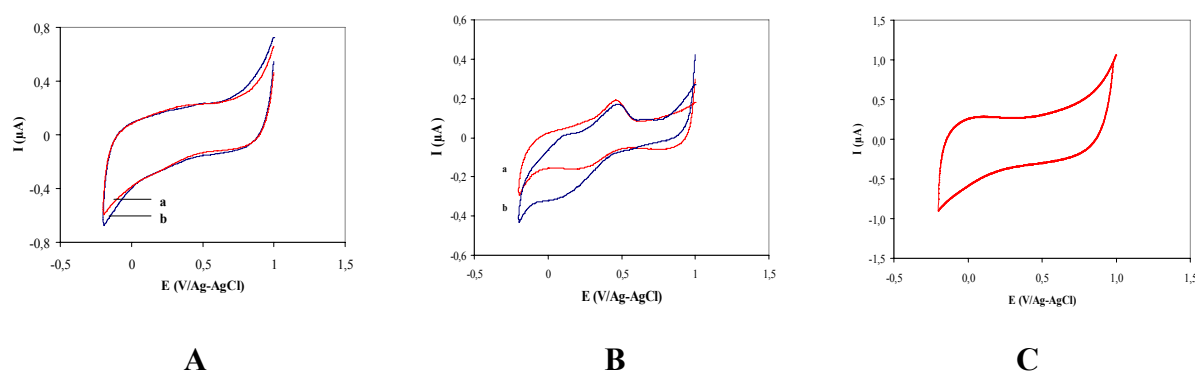


Figure II-10 : Courbes de voltammétrie cyclique ($v = 10$ mV/s) d'électrodes CV modifiées par 40 μg de MS (A) et MSF (B) et SapSF (C) dans une 0,1 M de Na_2SO_4 et 50 mM H_2SO_4 (pH = 3) sans (a) et en présence de H_2O_2 (b).

En présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), on observe une augmentation du courant de réduction avec l'électrode MSF/CV (Figure II-10-B). Par contre, nous n'avons observé aucune modification avec l'électrode MS/CV (Figure II-10-A). Cette augmentation du courant cathodique en présence de H_2O_2 suggère sa réduction électro-catalytique. En effet, il a

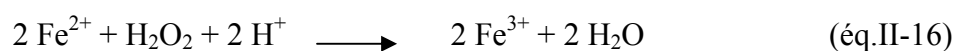
été rapporté que le fer présent dans les argiles catalyse la décomposition de H_2O_2 sous irradiation UV, la présence du Fe(II) étant nécessaire à la réaction [34]:



Dans notre cas, la réduction du fer se fait par voie électrochimique. Cette propriété électrocatalytique de fer peut être utilisée pour le dosage de H_2O_2 en milieu acide (voir II.6.1). On peut cependant se poser la question de la stabilité des argiles dans ce milieu très acide.

II.4-Comportement électrochimique des argiles en présence d'un médiateur redox (MV^{2+}).

La présence de colorants ou de médiateurs redox facilite la réduction du fer structural présent dans les feuillets des argiles et provoque ainsi la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Ainsi des espèces photosensibles comme le N,N-diméthylaniline, la rhodamine, la malachite verte [34], le luminol [6], l'amplex rouge [35] et le méthyl viologène (N, N' diméthyl 4,4 bipyridium, MV^{2+}) [36] ont été utilisées pour la décomposition de H_2O_2 par un cycle photochimique impliquant le fer présent dans des argiles. De plus, une réduction électrocatalytique très efficace de H_2O_2 a également été rapportée lorsque du $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ou du MV^{2+} sont incorporés dans argiles ferrifères de type smectite [6,7,8]. Ainsi, Anson a été le premier à mettre en évidence la réduction électrochimique de H_2O_2 à l'électrode modifiée par la montmorillonite, le médiateur redox ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ chargé positivement étant adsorbé par l'argile [6]. Ces premiers résultats suggéraient l'intervention du fer, présent dans les sites octaédriques des feuillets de l'argile, dans le processus électro-catalytique de la réduction de H_2O_2 . Par la suite, Zen et coll. ont vérifié cette hypothèse en comparant le comportement de la montmorillonite (Swy1) et de la nontronite (Swa), deux argiles ayant des teneurs en fer différentes, vis-à-vis de la réduction électrocatalytique de H_2O_2 en utilisant le MV^{2+} comme médiateur redox (Schémas II-1) [7]. Ils concluent que c'est le fer en site tétraédrique qui intervient dans le processus catalytique selon les réactions [6,7,8] :



De plus d'après eux, seul le MV^{2+} adsorbé en plus de la capacité d'échange est électroactif et intervient dans la catalyse [7].

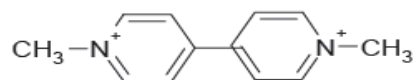


Schéma II-1 : Formule du méthyl viologène (MV^{2+})

Nous avons étudié le comportement électrochimique du MV^{2+} avec des électrodes modifiées par les argiles utilisées dans ce travail afin de comparer les résultats obtenus avec les études précédentes. Les voltammogrammes ont été enregistrés après 30 min de trempage des électrodes dans une solution tampon phosphate à pH 8 (20 ml) contenant 0,5 mM MV^{2+} et sous atmosphère d'argon.

La figure II-11a montre la courbe de voltammétrie cyclique ainsi obtenue avec une électrode de carbone vitreux. On observe un signal réversible à $E_{1/2} = 660$ mV caractéristique du MV^{2+} en solution. Lorsque l'électrode est modifiée par la MS, une augmentation notable de l'intensité de courant est observée (Figure II-11b). Avec les électrodes modifiées par les différentes argiles, l'intensité du courant augmente selon la séquence : MS < SapSF < NontG < MSF (Figure II-12). Le méthyl viologène étant chargé positivement, il peut s'accumuler à la surface de l'électrode modifiée par les argiles. Par contre, son potentiel d'oxydo-réduction varie peu avec la nature des argiles. Les argiles ferrifères montrent des intensités de courant plus importantes. Si l'on compare l'intensité du courant obtenue avec SapSF et MSF, on constate que l'intensité est plus importante dans le cas de la montmorillonite malgré qu'elle contienne moins de fer structural. Il semblerait que non seulement la présence de fer intervient dans l'accumulation de MV^{2+} mais que d'autres propriétés des argiles comme la CEC, la charge des feuillets et la perméabilité interviennent également dans la réaction d'échange. Comme nous l'avons observé en microscopie électronique, les particules de MSF se délaminent d'avantage que celles de SapSF, ce qui favorise l'accumulation du MV^{2+} .

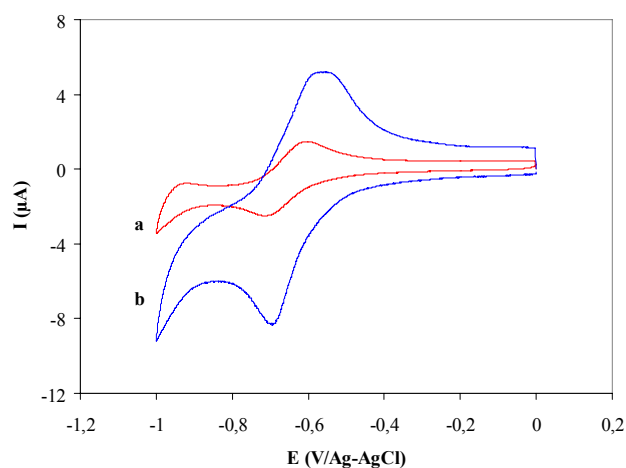


Figure II-11 : Courbes de voltammétrie cyclique ($v = 10 \text{ mV/s}$) d'une électrode CV nue (a) et modifiée par $40 \mu\text{g MS}$ (b) dans une solution de $0,5 \text{ mM MV}^{2+}$ (TP, pH 8).

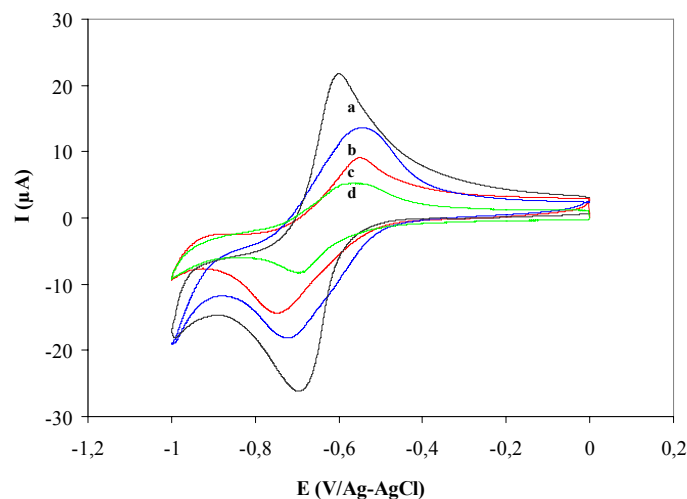


Figure II-12: Courbes de voltammétrie cyclique ($v = 10 \text{ mV/s}$) d'une électrode modifiée par $40 \mu\text{g}$ de MSF (a), NontG (b), SapSF (c) et MS (d) dans une solution de $0,5 \text{ MV}^{2+}$ (TP, pH 8).

Après accumulation de MV^{2+} pendant 60 min dans les différents films d'argiles, les électrodes sont rincées et remises dans une solution tampon ne contenant pas de MV^{2+} . A l'exception de l'électrode modifiée par SapSF, le signal du MV^{2+} est toujours observé en voltammétrie cyclique (Figure II-13) avec cependant des intensités de courant plus faibles et différentes selon les argiles (Tableau II-5). Les intensités évoluent dans le même ordre qu'en solution de MV^{2+} : $\text{MSF} > \text{NontG} > \text{MS}$.

Comme nous l'avons vu précédemment, les propriétés physico-chimiques de la SapSF (densité de charge, perméabilité du film) ne sont pas favorables à la délamination et à l'échange des cations dans l'espace inter-feuillet. L'accumulation du MV^{2+} est donc faible dans cette argile.

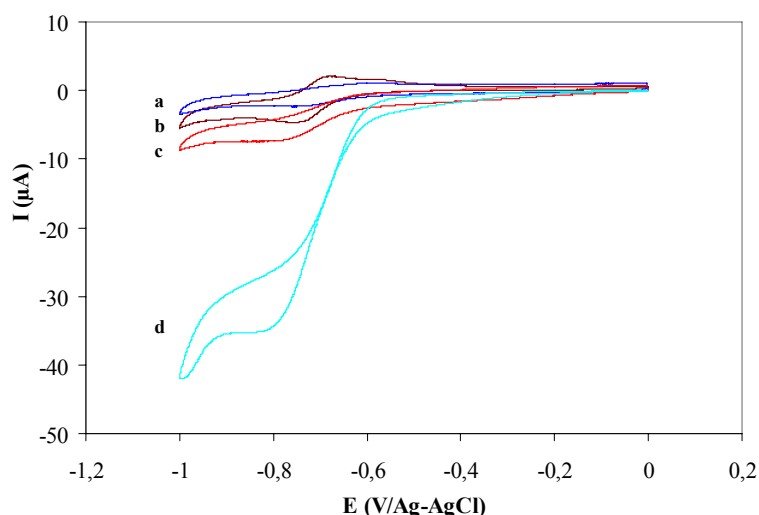


Figure II-13 : Voltammétrie cyclique ($v = 10 \text{ mV/s}$) d'une électrode modifiée par $40 \mu\text{g}$ MV^{2+}/MS (a, c) et $\text{MV}^{2+}/\text{MSF}$ (b,d) dans une solution de TP à pH 8 (0.1M) avant et après ajout de 5 mM de H_2O_2 .

La quantité électroactive de MV^{2+} (Γ^*) adsorbé dans les films d'argile est déterminée par intégration du pic de voltammétrie cyclique enregistrée à faible vitesse de balayage en utilisant l'équation de Laviron suivante [37]:

$$Q = n F \Gamma^* \quad (\text{éq : II-17})$$

où Q est la charge (C) obtenue par intégration du pic de réduction, F la constante de Faraday et n le nombre d'électron échangé. Les valeurs de Γ^* sont reprises dans le tableau II-5. La présence du fer dans la MSF augmente considérablement l'intensité du signal du MV^{2+} par rapport à celui observé avec la MS. Par contre, la quantité de MV^{2+} électroactif dans la NontG est plus faible par rapport à la MSF, alors qu'elle est plus riche en fer. Cependant la NontG a une densité de charge plus grande (voir Tableau II.1) favorisant l'agglomération des particules (voir Fig. II.2). En conséquence, sa perméabilité est plus faible que celles des montmorillonites Ces facteurs ne favorisent pas l'accumulation du MV^{2+} .

Tableau II-5 : Caractéristiques des voltammogrammes des électrodes CV modifiées par $\text{MV}^{2+}/\text{argiles}$.

Argile	E_{p_a} (V)	E_{p_c} (V)	I_{p_a} (μA)	I_{p_c} (μA)	Q_c (μC)	$\Gamma^*_{\text{MV}^{2+}}$ (10^{-10} mole)
NontG	-0,59	-0,74	1,80	1,30	14,20	1,47
MSF	-0,67	-0,75	2,59	2,59	31,27	3,24
MS	-0,60	-0,72	0,73	0,73	9,12	0,95

Lorsque l'on ajoute de l' H_2O_2 dans la solution tampon, on observe une augmentation du courant cathodique associée à une diminution du courant anodique, ce qui correspond à la réduction électrocatalytique de H_2O_2 . Le courant catalytique est 5 fois plus important avec la MSF qu'avec le MS (Figure II-13). Nous avons également pu doser le peroxyde d'hydrogène par ampérométrie en utilisant ces électrodes modifiées $\text{MV}^{2+}/\text{Argiles}$ (voir II.6.2).

En conclusion, nos résultats semblent confirmer le rôle joué par le fer situé dans les sites octaédriques des argiles comme relais d'électrons dans les processus électrochimiques. La présence d'un médiateur redox facilite la mise en évidence de ce phénomène, avec cependant une limitation due aux propriétés d'échange cationique et de perméabilités différentes suivant les argiles utilisées.

II.5- Immobilisation de l'hémoglobine dans les argiles.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'hémoglobine (Hb) est une hémoprotéine de poids moléculaire de 68 KDa avec un point isoélectrique de 7,1 [38], ce qui est favorable à son adsorption sur les particules d'argiles chargées négativement à pH neutre. De plus lorsque cette protéine est adsorbée sur les argiles, le transfert direct d'électron sur son site actif (hème) est facilité. Par contre, aucun article de la littérature ne parle de l'intervention possible du fer structural des argiles dans ce processus. Après avoir mis en évidence le rôle du fer dans l'électrochimie des argiles en présence d'un médiateur redox chimique, nous étudierons son intervention dans le comportement électrochimique de l'Hb.

II.5.1-Isothermes d'adsorption

La fixation d'une substance par un matériau argileux peut être obtenue par une simple adsorption, un échange ionique ou bien les deux phénomènes en même temps. L'adsorption des protéines à la surface des argiles se fait par des interactions hydrophobes et hydrophiles avec les acides aminés constituant la protéine. La méthode d'adsorption consiste à mélanger une masse d'argile m à un volume V de solution de protéine de concentration C_i , dans un récipient fermé, sous agitation, à température constante proche de la température ambiante. Après un temps d'équilibre, la solution est séparée du solide par centrifugation et la concentration du surnageant C_e (concentration à l'équilibre dans la solution) est déterminée par absorbance UV. La différence entre la concentration initiale C_i et la concentration

d'équilibre C_e permet de déterminer la concentration de protéine adsorbée par masse d'argile C_s en utilisant la relation suivante :

$$C_s = \frac{(C_i - C_e)V}{m} \quad (\text{éq.II-18})$$

L'isotherme d'adsorption est obtenu en traçant la quantité de produit adsorbé (C_s) en fonction de la concentration d'adsorbat à l'équilibre C_e . Généralement on observe l'un des quatre grands types d'isothermes C, L, H et S (Figure II-14) suivant la classification de Giles [39].

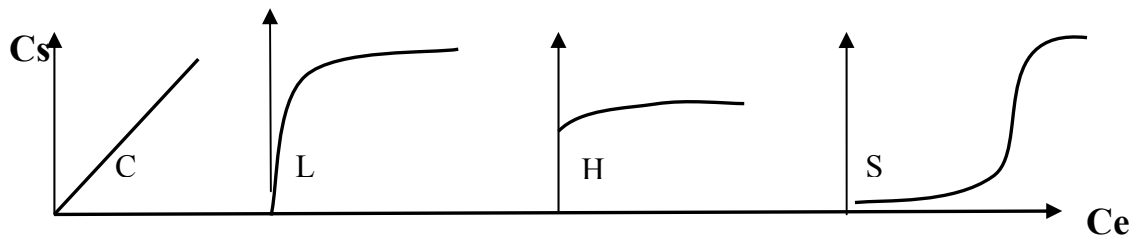


Figure II-14 : Classification des isothermes d'adsorption de Giles

Ces courbes d'adsorption des protéines par les argiles sont ensuite modélisées en utilisant les modèles de Langmuir et Freundlich :

➤ **Modèle de Langmuir :**

C'est un modèle simple basé sur les hypothèses suivantes :

- L'espèce adsorbée est située sur un site bien défini de l'adsorbant (adsorption localisée) ;
- Chaque site n'est susceptible de fixer qu'une seule espèce adsorbée ;
- L'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante de la présence des espèces adsorbées sur les sites voisins (surface homogène et pas d'interaction entre les espèces adsorbées). Il est applicable à une adsorption monomoléculaire à la surface de l'adsorbant à l'équilibre. L'équation de Langmuir peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{C_e}{C_s} = \frac{C_e}{C_m} + \frac{1}{(C_m * L)} \quad (\text{éq.II-19})$$

Où C_m (g/g) représente la quantité d'adsorbat nécessaire pour la formation d'une monocouche à la surface de l'adsorbant, et L (L/g) c'est l'affinité de l'adsorbat-adsorbant.

➤ **Modèle de Freundlich :**

Il s'agit d'une équation souvent employée dans la représentation pratique de l'équilibre d'adsorption entre l'adsorbat et la surface du solide. Elle se présente sous la forme suivante:

$$C_s = K_F * C_e^{1/n_f} \quad (\text{éq.II-20})$$

La linéarisation par changement d'échelle de la relation de Freundlich conduit à l'équation suivante :

$$\text{Log}C_s = \log K_F + \frac{1}{n_f} \log C_e \quad (\text{éq.II-21})$$

La représentation graphique est sous forme d'une droite de pente $1/n_f$ et d'ordonnée à l'origine $\log K_F$. L'extrapolation de cette équation pour $C = C_0$ à condition que C_0 soit constante (concentration initiale en protéine) donne la capacité d'adsorption (C_s) dans le domaine de concentration étudiée.

D'après la littérature, l'adsorption de l'Hb sur les argiles est maximale à pH neutre, proche de son point isoélectrique. L'interaction Hb-argile se fait par des liaisons hydrogènes entre les feuillets de l'argile et les groupements amines et carboxyliques des acides aminés (lysine, arginine, histidine) constituant la protéine [40]. Nous avons donc établi les isothermes d'adsorption à pH 7,0.

Le spectre d'absorption d'UV-Vis de l'Hb montre une bande d'absorption à 215 nm qui correspond à la présence des acides aminés et une autre bande à 410 nm correspondant à l'absorbance de l'hème appelée la bande de Soret (Figure II-15A) caractéristique des hémoprotéines. Pour établir les isothermes d'adsorption, nous devons déterminer la concentration en Hb dans la solution d'équilibre. Nous avons donc suivi la variation de l'absorbance à 410 nm en fonction de la concentration en Hb en solution (Figure II-15B).

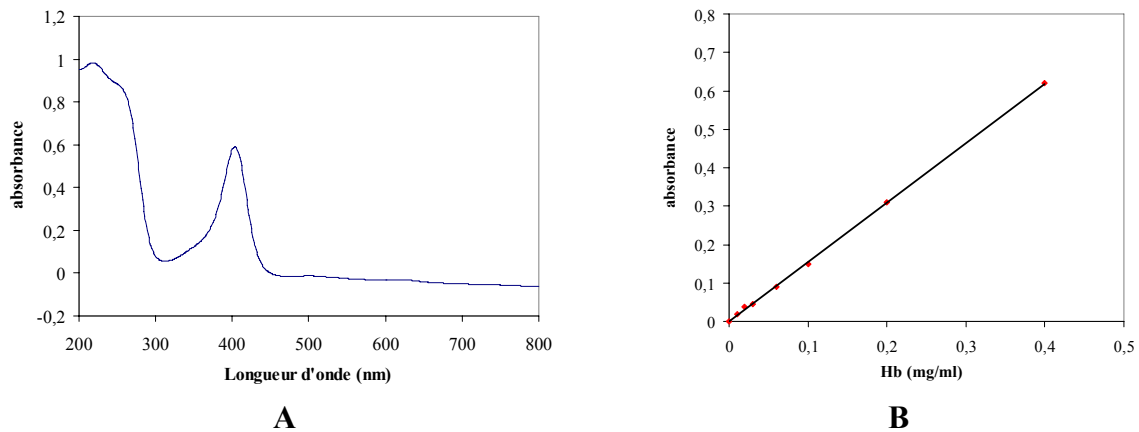


Figure II-15 : A) Spectre d'absorption UV-Vis de l'Hb en solution
B) Droite d'étalonnage de l'Hb à 410 nm.

II.5.1.1-Cinétique d'adsorption

Pour déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, une étude cinétique a été préalablement effectuée pour l'adsorption d'une solution d'Hb à 0,02 mg/ml par l'argile pendant des durées variables de 1 h à 24 h. L'équilibre d'adsorption de l'Hb sur la NontG est atteint au bout de deux heures de contact (Figure II-16). Après deux heures une légère quantité d'Hb est relarguée. Après 24 h d'adsorption, on observe une certaine augmentation pour atteindre une valeur de C_s de 1,3 mg/mg. Cette augmentation peut être liée à l'intercalation possible d'Hb par échange avec le sodium dans l'interfeuillet d'argile. Le processus d'adsorption est assez rapide et montre une grande affinité de la protéine pour l'argile.

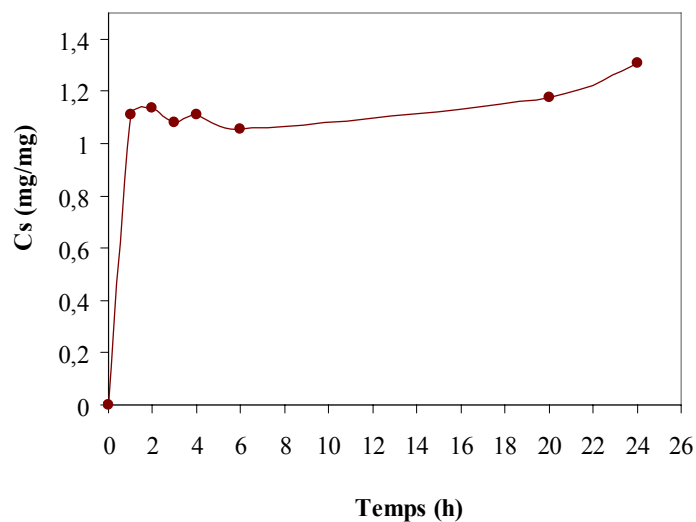


Figure II-16 : Cinétique de l'adsorption de l'Hb par la NontG.

II.5.1.2- Isothermes d'adsorption de l'Hb

L'état d'équilibre étant atteint après 2 h et afin d'éviter la dénaturation de la protéine, les isothermes d'adsorption ont été réalisés pendant 2 h. Les isothermes d'adsorption de l'Hb par les différentes argiles cationiques ont été obtenues en dispersant l'argile dans l'eau avec une concentration égale à 30 mg/L. Ensuite, on prépare différentes solutions d'Hb de 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 et 50 mg/L dans une solution tampon phosphate (TP) de concentration 0,1 M à pH égale à 7. On mélange à volume égal la solution Hb et d'argile sous agitation de 100 tr/mn pendant 2 h et à une température égale à 25 °C, ensuite le mélange est centrifugé à 10000 tr/min pendant 35 min. En mesurant la quantité d'Hb dans le surnageant (C_e) par l'absorption UV-Visible à une longueur d'onde égale à 410 nm, on peut déterminer la quantité non adsorbée (surnageant). La concentration d'Hb adsorbée C_s est déterminée par la différence entre la quantité d'Hb initialement introduite avec l'argile et C_e . Sur la figure II-16, nous avons porté les isothermes d'adsorption d'Hb par les différentes argiles.

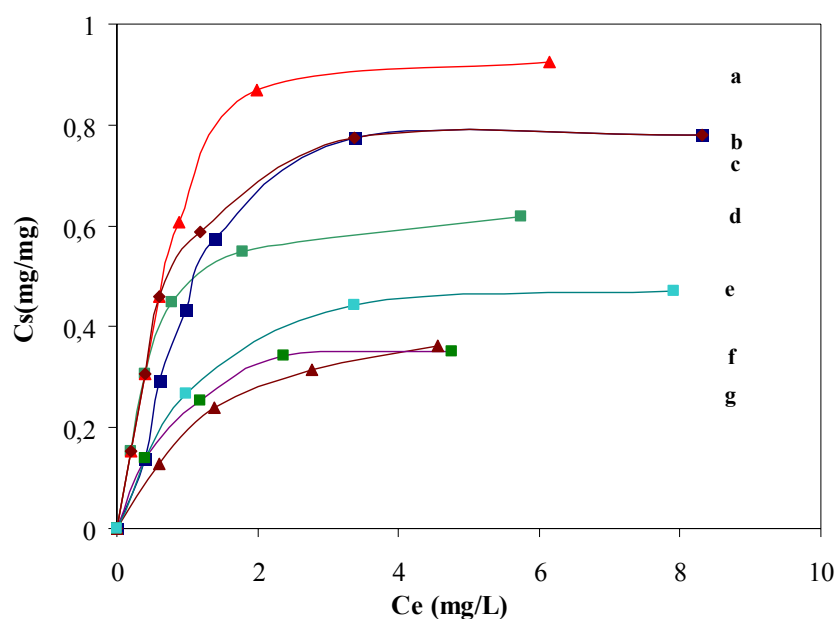


Figure II-17 : Isothermes d'adsorption de l'Hb par la NontG (a), MSF (b), Swy₂ (c), MS (d), Lap (e), SapSF (f) et NontS (g) à 25°C pendant 2 h et à pH 7.

Les courbes des isothermes d'adsorption d'Hb sont de forme L. Elles varient avec la nature de l'argile. L'adsorption la plus importante est obtenue dans le cas de NontG ($C_s = 0,9$ g/g d'argile), elle est de l'ordre de 0,7 g/g dans le cas de Swy₂ et MSF, et par contre la plus faible quantité adsorbée est obtenue dans le cas des argiles SapSF et NontS avec C_s égale à 0,3 g/g. Les C_s obtenues avec ces différentes argiles cationiques sont supérieures à celle

obtenue par Causserand et col avec 0,08 g/g pour la montmorillonite [41]. Elles sont aussi plus grandes de celles observées pour d'autres matériaux non argileux, tel que le phosphate de zirconium (ZrP), ($C_s = 5 \text{ mg/g}$) [42].

La modélisation suivant Langmuir montre des valeurs qui coïncident avec nos valeurs expérimentales contrairement au modèle de Freundlich (Tableau II-6). Le coefficient d'affinité de l'Hb (L) est important avec NontG, MSF, Swy₂ et SapSF, toutes des argiles riches en fer. Ces valeurs sont très importantes si on les compare avec l'affinité de Hb pour d'autres matrices comme ZrP ($L=2,01 \cdot 10^{-4} \text{ L/g}$) [42].

Selon le modèle de Langmuir, l'adsorption de Hb sur les argiles se ferait sous forme d'une monocouche d'Hb à la surface de l'argile [40], avec un nombre infini, identique et indépendant de sites d'adsorption [43]. Dans le cas du modèle de Freundlich, l'adsorption est hétérogène et l'énergie d'adsorption varie après l'interaction entre les sites d'adsorption. Cette dernière est caractéristique de l'adsorption des macromolécules avec des charges positives et négatives à la surface de la molécule comme les enzymes. Cela ne semble pas être le cas pour l'Hb.

Tableau II-6 : Modélisation des isothermes d'adsorption Hb/argiles

a) Caractéristiques avec le modèle de Langmuir

Hb/Argile	Cm (mg/mg)	L (L/g)	R ²
NontG	0,98	1635	0,9960
MSF	0,88	1130	0,9915
Swy ₂	0,91	1557	0,9993
MS	0,80	328	0,9987
NontS	0,46	764	0,9999
SapSF	0,40	1541	0,9940

b) Caractéristiques avec le modèle de Freundlich

Hb/Argile	Nf (mg/mg)	Kf	R ²
NontG	1,07	14	0,9942
MSF	1,26	8	0,9994
Swy ₂	1,31	8	0,9464
MS	1,65	3	0,9947
NontS	2,87	1,5	0,9933
SapSF	1,90	3	0,9962

II.5.2- Caractérisations physico-chimiques de Hb/argiles

II.5.2.1- Caractérisation par DRX

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe de caractérisation des argiles, le diffractogramme de rayons X (DRX) permet de déterminer les distances interlamellaires caractéristiques de la structure des argiles et de leurs cations intercalés entre les feuillets.

Les diffractogrammes de rayons X des phases Hb/argiles correspondants au maximum d'adsorption ont été enregistrés sur sous forme d'un film déposée des lames de verre. Dans la Figure II-18, nous avons porté les diffractogrammes RX des échantillons Hb/argiles comparés avec ceux des argiles seules, ainsi que la DRX de l'Hb. On remarque le déplacement de la raie 001, située à 12,83 Å dans le cas de NontG, vers 60 Å pour celui du complexe Hb/NontG (Figure II-18A). Une telle variation de l'espace inter-feuillet (d) peut être due à l'intercalation de la protéine (Figure II-19). Rappelons que la dimension moyenne de la protéine est de 70x55x55 Å, ce qui est compatible avec l'augmentation de l'espace interfeuillet qui est observée.

Dans le cas des argiles MSF et MS, la variation de d est inférieure à la dimension moyenne de la protéine (Figure II-18 B, C). Dans le cas de la montmorillonite Swy₂, la distance basale augmente de 12 à 45 Å en présence de Hb. Un résultat similaire a été obtenu également par Rusling et al qui a observé des distances $d_{001} = 47, 44, \text{ et } 35,5 \text{ \AA}$ pour des échantillons Hb/bentonite [15,18,44]. Enfin dans le cas de SapSF la variation est très faible et elle n'est que de 2 Å (Figure II-18-D). On n'observe ni écartement des feuillets, ni élargissement de la raie comme dans le cas des autres argiles. Ceci est du à la difficulté d'échanger les cations de la saponite et cela malgré l'importante valeur de sa CEC. En effet, la présence de fer tétraédrique dans la saponite augmente la cohésion des feuillets d'argile, l'Hb ne pouvant s'absorber qu'à la surface des particules.

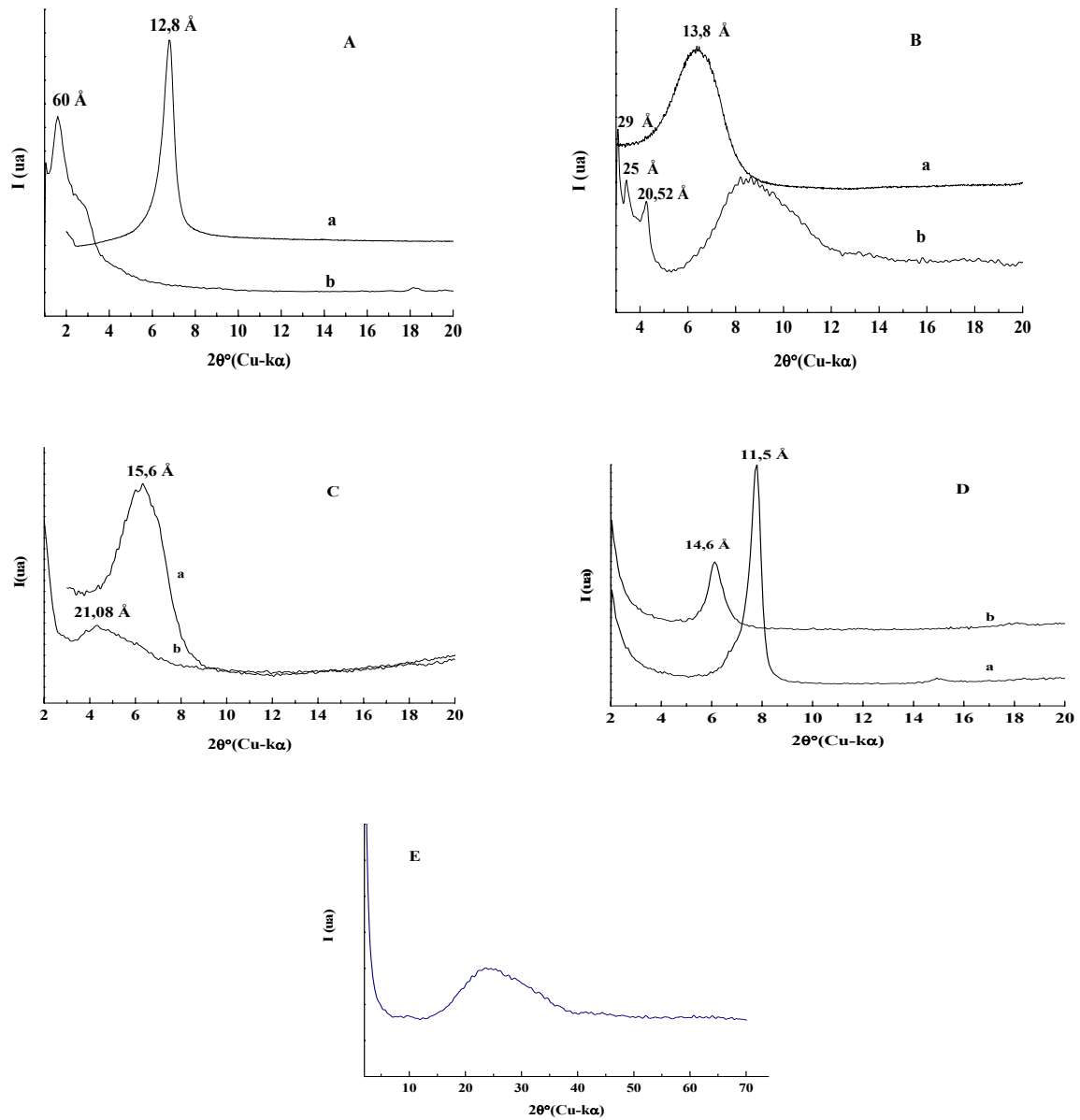


Figure II-18 : Diffractogrammes de RX de NontG (A), MSF (B), MS (C) SapSF (D) sans (a) et avec Hb (b) et de l'Hb (E).

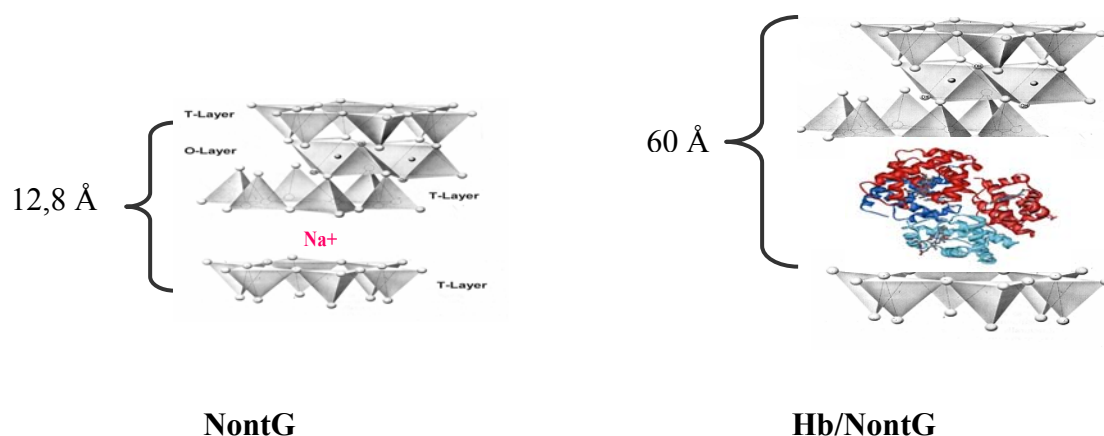


Figure II-19 : Schéma de l'intercalation de l'Hb dans la NontG.

II.5.2.2- Spectroscopie Infra-rouge.

Rappelons que l'Hb est une hémoprotéine caractérisée par une séquence d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides ainsi que par quatre sites hèmes. Elle est caractérisée par une structure secondaire et tertiaire et son immobilisation peut modifier sa structure. La spectroscopie IR des biomolécules est très sensible au changement conformationnel de la structure secondaire des protéines. Les vibrations des amides I et II, qui sont situées entre $1300-1800\text{ cm}^{-1}$, donnent une idée sur la structure secondaire de la chaîne polypeptidique [45,46]. La vibration de l'amide I correspond à la liaison (C=O) et se situe entre $1600-1700\text{ cm}^{-1}$. La vibration de l'amide II, entre 1500 et 1600 cm^{-1} , correspond à la liaison C-N et N-H dans le plan.

La figure II-20 montre les spectres FTIR-ATR des solides Hb, NontG et Hb/NontG. On observe bien les bandes de vibration de l'amide I (1640 cm^{-1}) et l'amine II (1545 cm^{-1}) lorsque l'Hb est adsorbée sur l'argile. Le tableau II-7 reprend les caractéristiques des spectres enregistrés pour les différentes argiles. Nous n'observons pas de modifications significatives des bandes de vibrations lorsque la protéine est immobilisée sur les argiles.

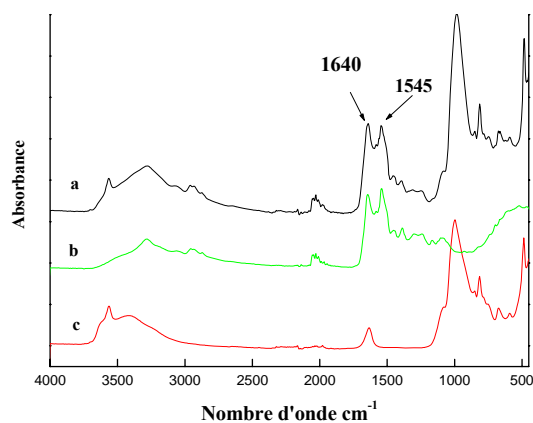


Figure II-20 : Spectres FTIR-ATR de Hb/NontG (a), Hb (b) et NontG (c).

Tableau II-7 : Caractéristiques des bandes de vibration des amines de l'Hb et Hb/argile :

	Amide I (cm ⁻¹)	Amide II (cm ⁻¹)
Hb/Nont	1640	1545
Hb/MSF	1643	1545
Hb/MS	1647	1531
Hb/SapSF	1650	1531
Hb	1644	1542

II.5.2.3- Spectroscopie UV

Le spectre UV-visible de l'Hb seule montre une bande de Soret à 410 nm. La présence d'argile pourrait modifier l'hème de l'Hb et par conséquent la structure de la protéine. L'analyse des argiles modifiées (Hb/argile) par UV-Visible (Figure II-21) montre une bande de Soret, située à 410 nm. L'allure générale des spectres est semblable à celui obtenu avec l'Hb en solution avec cependant une diminution des intensités dans en ordre décroissant NontG > MSF > MS > SapSF, qui suit la capacité d'adsorption des argiles (C_m).

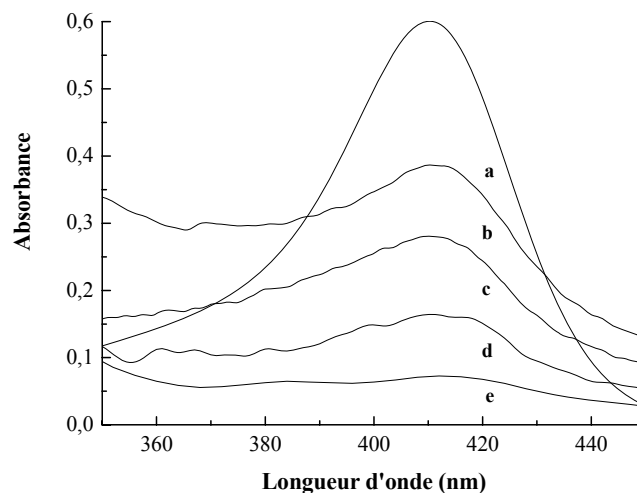


Figure II-21 : Spectres UV-Vis de Hb (a) Hb/NontG (b), Hb/MSF (c), Hb/MS (d) et Hb/SapSF (e).

En conclusion, les techniques spectroscopiques FTIR et UV-Visible confirment que la structure secondaire et tertiaire de l'Hb adsorbée et/ou intercalée dans l'argile n'est pas modifiée.

II.5.2.4- Imagerie par microscopie à balayage

Les clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) des solides NontG et Hb/NontG (Figure II-22) ne montrent aucune modification morphologique de la NontG après adsorption de la Hb.

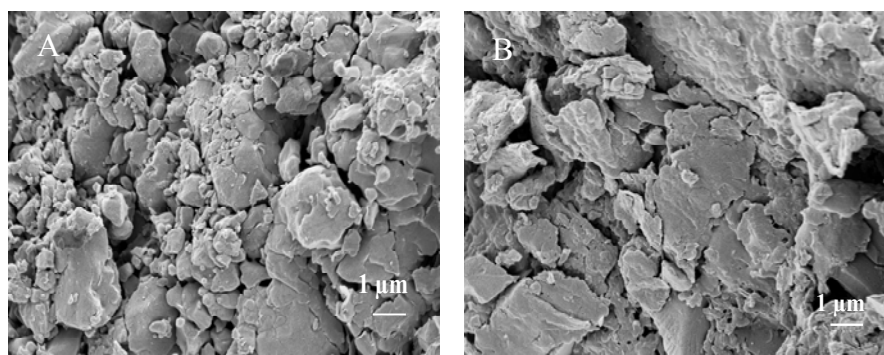


Figure II-22: Clichés MEB de NontG (A) et Hb/NontG (B).

II.5.3- Etude électrochimique de Hb/argiles

Après la caractérisation physico-chimique de l'interaction Hb/argiles, nous avons examiné le comportement électrochimique de l'Hb en interaction avec des électrodes modifiées par les argiles. Dans un premier temps la biomolécule est mise en solution dans le tampon. Par la suite, nous l'avons immobilisée à la surface de l'électrode modifiée par les argiles.

II.5.3.1-Adsorption d'Hb par l'électrode modifiée par les argiles

L'Hb est une protéine de structure tridimensionnelle très large. Chaque sous unité contient un hème qui se trouve dans une zone appelé crevasse, proche de la surface [47] ce qui permet un transfert direct d'électron entre l'électrode et l'hème de la biomolécule si celle-ci est bien orientée sur l'électrode.

Afin de vérifier la possibilité de transfert direct d'électrons entre la protéine et l'électrode de carbone vitreux, une électrode nue est trempée dans une solution tampon phosphate 0,01 M à pH 7 contenant de l'Hb à une concentration 0,1 mM. La courbe de voltammétrie cyclique enregistrée sous atmosphère inerte (argon) montre un très faible signal pour une vitesse de balayage de 200 mV/s (Figure II-23).

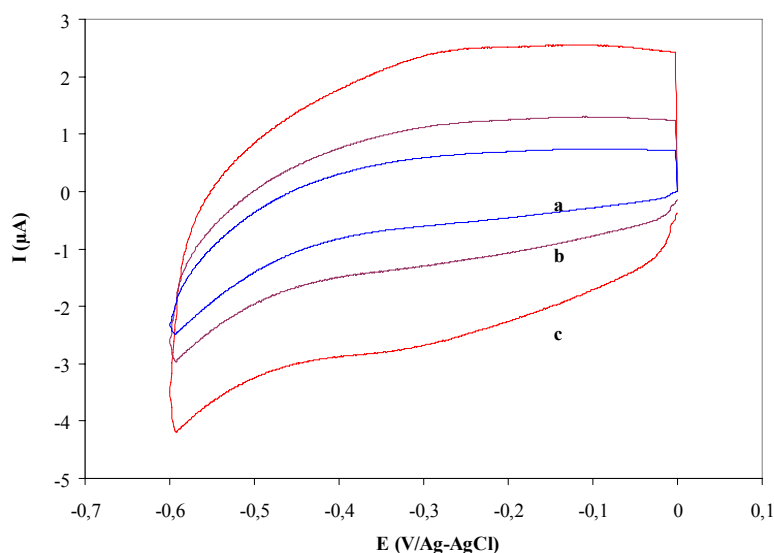


Figure II-23 : Courbes de voltammétrie cyclique d'une électrode de carbone vitreux nue dans une solution d'Hb à différentes vitesses de balayage 50 (a), 100 (b) et 200 mV/s (c) (TP 0,01 M pH 7).

Plusieurs travaux rapportés dans la littérature ont montré que des électrodes modifiées par des argiles facilitent le transfert direct d'électron vers le site actif de la protéine, grâce sans doute à une orientation privilégiée de la biomolécule adsorbée à la surface de l'électrode [48].

Nous avons enregistré les courbes de voltammétrie cycliques dans la solution d'Hb en utilisant des électrodes de carbone vitreux modifiées par 40 μg d'argiles : NontG, MSF (Figure II-24) et MS, SapSF et Lap (Figure II-25). Nous avons également enregistré la courbe de voltammétrie cyclique d'adsorption de l'Hb par une électrode modifiée avec la NontG (40 μg) en fonction du temps (Figure II-24A). On observe un signal réversible dont l'intensité augmente en fonction du temps de trempage de l'électrode dans la solution d'Hb, il atteint un maximum après deux heures. Après deux heures, ce signal réversible a une intensité de pic égale 1 μA pour la NontG et 0,5 μA avec la MSF (Figure II-24B). Le signal trouvé est caractérisé par des potentiels $E_{pa} = -0,28$ et $E_{pc} = -0,34$ V et $E_{1/2} = -0,30$ V, correspondant au potentiel d'oxydo-réduction du fer de l'hème de l'Hb [14,49]. Par contre, pour des électrodes modifiées avec MS, Lap et SapSF aucun signal n'est observé après deux heures d'accumulation (Figure II-25).

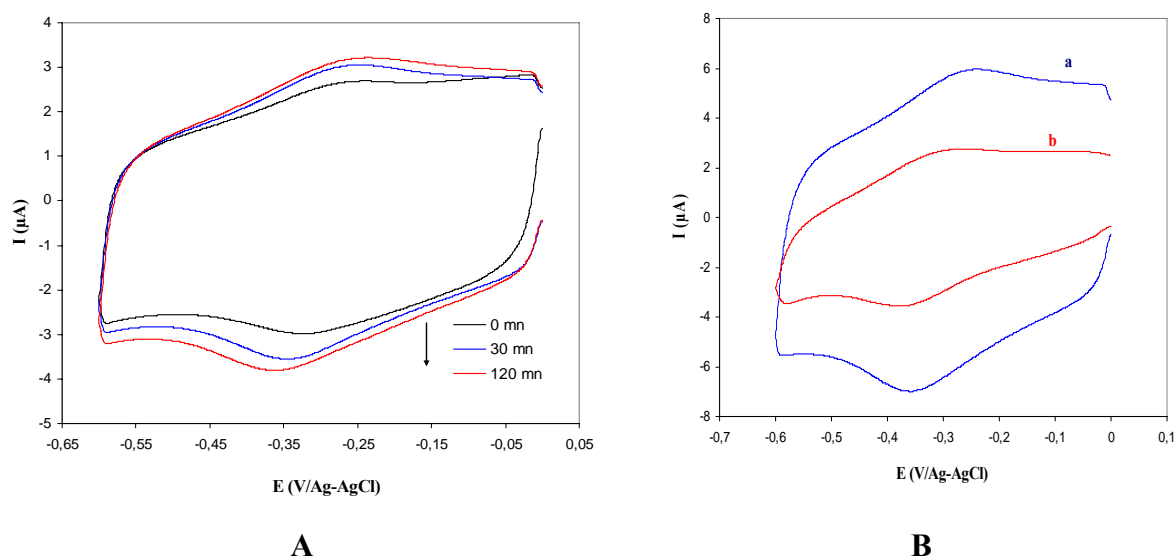


Figure II-24 : A : Courbes de voltammétrie cyclique enregistrées en fonction de temps avec une électrode modifiée par NontG dans une solution de 0,1 mM d'Hb,
B: Courbes de voltammétrie cyclique NontG (a) et MSF (b) après 2 h dans 0,1 mM d'Hb, (TP 0,01 M pH = 7,0; $\nu = 200$ mV/s).

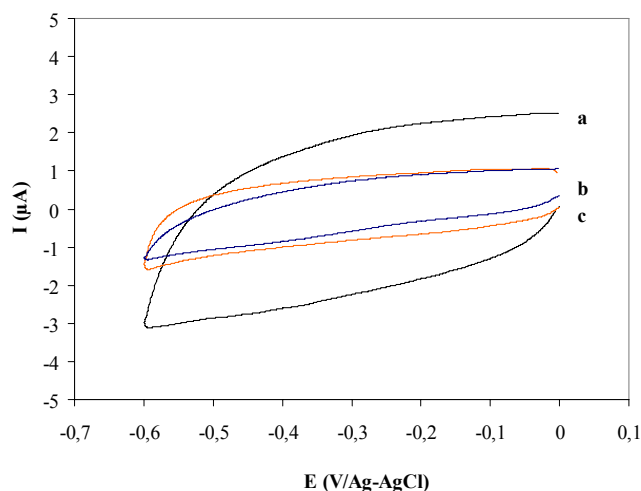


Figure II-25 : Courbes de voltammétrie cyclique ($v = 200$ mV/s) d'électrodes modifiées avec SapSF (a), MS (b), Lap (c) dans une solution de 0,1 mM d'Hb (TP 0,01M, pH 7,0) après 2 h d'accumulation.

La forte d'affinité de l'Hb pour la NontG est confirmée par la voltammétrie cyclique. Nous avons utilisé cette propriété pour quantifier la présence de la protéine en solution. En effet, le dosage de l'hémoglobine joue un rôle important dans l'hémoglinopathie et la méthode d'analyse d'anémie. La méthode standard de détermination d'hémoglinopathie, correspond à un test développé par Drabkin en 1930 [50] basé sur la détection spectrophotométrique du complexe Met-Hb avec du cyanure à 540 nm. Récemment d'autres biocapteurs ampérométriques pour la détermination dans le sang humain d'hémoglobine glucosée ont été publiés [51,52]. Leur principe consiste à mesurer la réponse électrochimique de l'acide ferrocène-boronique (FcBA) qui est lié à l'acide aminé terminal de l'hémoglobine glucosé. Ces capteurs sont préparés par l'immobilisation de l'Hb dans le dioxyde de zirconium (ZnO_2) et la deoxychololate (DOCA).

Dans notre cas, nous avons utilisé la voltammétrie à vague carrée ayant une amplitude ΔE de 50 mV, une fréquence de 100 Hz et un pas de 0,2 mV. Cette méthode électrochimique impulsionnelle permet l'augmentation de rapport signal/bruit par soustraction du courant capacitif lors du balayage en potentiel. Elle est plus sensible que la voltammétrie cyclique. Le dosage a été réalisé avec une électrode de CV (5 mm) modifiée avec 80 μg de NontG tournant à 500tr/min dans une solution de tampon phosphate (0,01 M) à pH 7 sous atmosphère d'argon. Les courbes intensité-potentiel sont enregistrées 15 min après l'injection de 100 μl d'une solution mère d'Hb à concentration $5 \cdot 10^{-6}$ M. Les injections sont répétées 8 fois jusqu'à la saturation du courant. Nous avons ainsi pu établir une droite d'étalonnage de l'Hb (Figure II-

26). Le domaine de linéarité est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage de l'Hb (Figure II-25), il correspond à l'intervalle (0,025- 0,17 μM) et la sensibilité (S) est de 500 A/M cm^2 . Cette méthode de détermination de l'Hb en solution est très simple à mettre en œuvre. Elle est cependant nettement moins sensible qu'un immunocapteur impédancemétrique ayant une limite de détection de 0,3 nM [53].

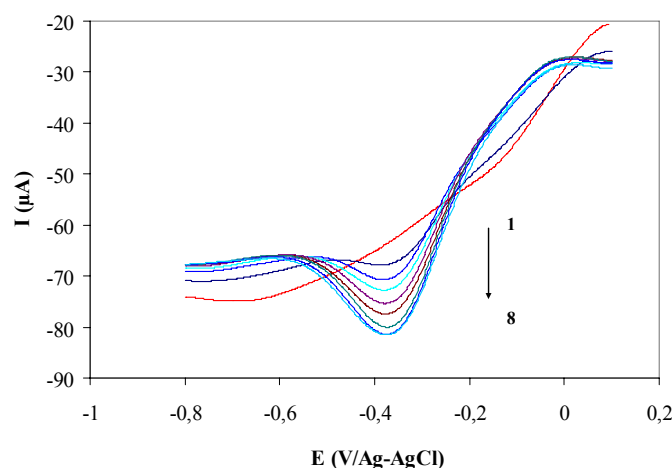


Figure II-26: Courbes de voltammétrie à vague carrée d'une électrode modifiée par NontG pour des injections successives de $5 \cdot 10^{-6}$ moles d'Hb dans une solution de TP.

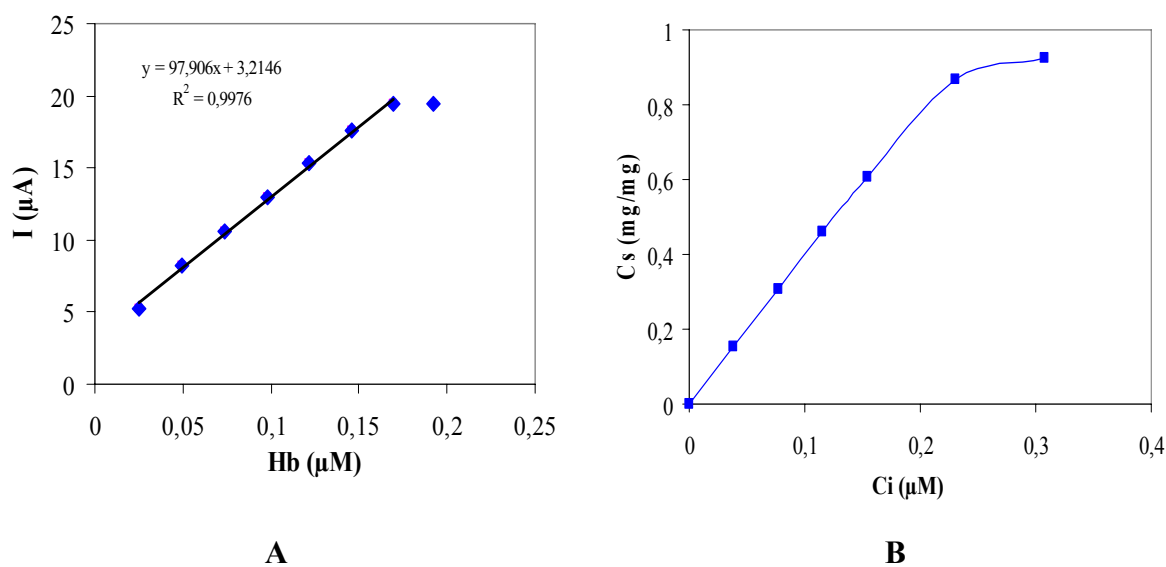


Figure II-27 : A) Courbe d'étalonnage de Hb par NontG, B) Isotherme d'adsorption de Hb sur NontG.

Si l'on compare la courbe d'étalonnage de l'Hb (Figure II-27-A) et l'isotherme d'adsorption de l'Hb par la NontG en fonction de la concentration initiale (Figure II-27-B), on trouve une certaine ressemblance. En effet dans les deux cas, on constate une saturation pour une concentration en Hb égale à 0,2 μM .

II.5.3.2-Etude électrochimique de Hb/argiles.

L'accumulation de l'Hb par des électrodes modifiées avec les argiles ne donne aucun signal appréciable sauf dans le cas des argiles riche en fer octaédriques: NontG et MSF. Nous avons étudié par la suite la co-déposition du mélange Hb/argile dans un rapport de masse 1/1 sur la surface des électrodes de carbone vitreux.

Une électrode modifiée uniquement par la NontG (20 μg) dans une solution de tampon phosphate (Figure II-28-a) ne montre aucun signal en voltammétrie cyclique. Pour le dépôt Hb/NontG, on trouve un signal réversible à $E_{pa} = -0,28$ et $E_{pc} = -0,35$ V. Ce signal est caractéristique du comportement électrochimique du couple redox du fer de l'hème ($\text{Fe}_{III}/\text{Fe}_{II}$) de la protéine suivant la réaction :

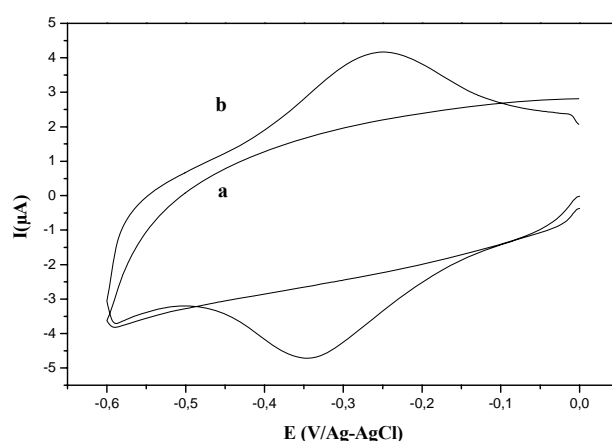


Figure II-28: Courbes de voltammétrie cyclique de NontG/CV (a) et l'Hb/NontG/CV (b) dans une solution de TP (0,01M, pH 7 et $\nu = 200$ mV/s).

Des électrodes modifiées avec les autres argiles ont également été préparées en immobilisant l'Hb dans un rapport massif de 1. Le relargage éventuel de l'Hb dans la solution d'électrolyte est déterminé par spectroscopie UV-Vis à 410 nm. On trouve 0%, 6%, 6% et 35% d'Hb relarguée par rapport à la quantité initialement introduite dans le dépôt de NontG MSF, MS et SapSF. La voltammétrie cyclique montre que le signal varie d'une argile à l'autre (Figure II-29). L'intensité du signal électrochimique augmente suivant la séquence : MS < SapSF < MSF < NontG. L'ensemble des caractéristiques électrochimiques de ces voltammogrammes sont reprises dans le tableau II-8.

Les intensités des courants anodique et cathodique sont faibles dans le cas des argiles sans fer, de l'ordre de $0,5 \mu\text{A}$ à 200 mV/s pour les hybrides Hb/Lap ou Hb/MS. La meilleure réponse est obtenue avec Hb/NontG ($2 \mu\text{A}$). La comparaison entre deux montmorillonites synthétiques, MS et MSF, montre qu'à 200 V/s , l'intensité du signal est respectivement $0,61$ et $1,46 \mu\text{A}$. Ce qui suggère de nouveau l'intervention possible du fer structural des argiles dans le processus de transfert électronique.

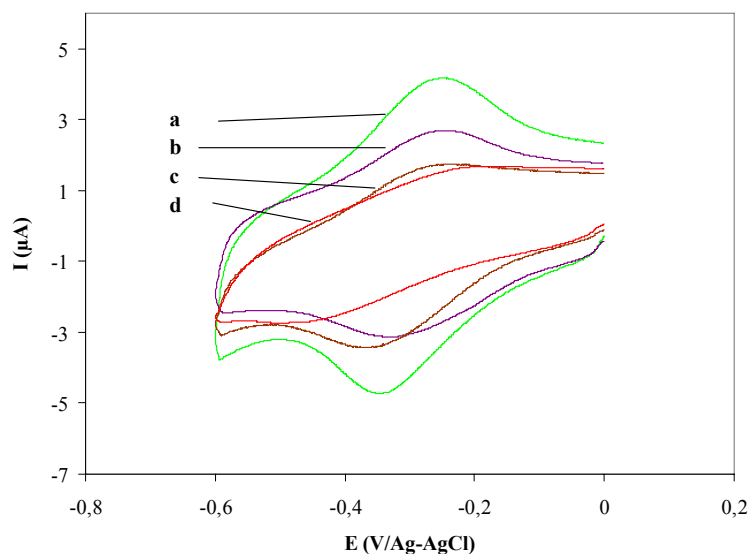


Figure II-29: Courbes de voltammétrie cyclique des hybrides Hb/NontG (a), Hb/MSF (b), Hb/MS (c) et Hb/SapSF (b) dans une solution de tampon phosphate ($0,01\text{M}$ pH 7, $\nu = 200 \text{ mV/s}$).

Une étude plus détaillée du transfert d'électron sur Hb immobilisée dans la NontG a été réalisée. On observe que l'intensité des pics de réduction et d'oxydation augmente en fonction de la vitesse de balayage ν (Figure II-30). Le processus de transfert d'électron se produisant à l'électrode est régi par un phénomène d'adsorption et non de diffusion. De plus après 70 cycles, le signal reste stable, confirmant la forte affinité l'Hb pour la NontG (Figure II-31).

Tableau II-8: Caractéristiques des voltammogrammes de Hb/argiles.

Argiles	ν (mV/s)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)
NontG	50	-0,26	-0,36	-0,31	0,50	-0,50
	100	-0,26	-0,34	-0,30	1,00	-1,00
	200	-0,25	-0,34	-0,29	2,05	-2,05
	400	-0,24	-0,34	-0,29	4,07	-4,07
	800	-0,22	-0,38	-0,29	8,00	-8,00
MSF	50	-0,27	-0,34	-0,30	0,34	-0,44
	100	-0,26	-0,35	-0,30	0,53	-0,65
	200	-0,26	-0,36	-0,31	1,33	-1,46
	400	-0,25	-0,38	-0,31	2,13	-2,26
	800	-0,25	-0,38	-0,31	4,04	-3,80
MS	50	-0,27	-0,39	-0,33	0,27	-0,27
	100	-0,25	-0,4	-0,32	0,38	-0,44
	200	-0,20	-0,45	-0,32	0,50	-0,61
SapSF	50	-0,24	-0,36	-0,30	0,16	-0,16
	100	-0,24	-0,33	-0,28	0,50	-0,50
	200	-0,24	-0,32	-0,28	1,21	-1,21
	400	-0,24	-0,32	-0,28	2,30	-2,30
	800	-0,24	-0,38	-0,31	4,25	-4,25
Lap	50	-0,25	-0,33	-0,29	0,19	-0,20
	100	-0,26	-0,33	-0,29	0,31	-0,22
	200	-0,26	-0,33	-0,29	0,50	-0,50
	400	-0,26	-0,34	-0,30	1,0	-1,20
	800	-0,25	-0,32	-0,28	1,75	-2,50

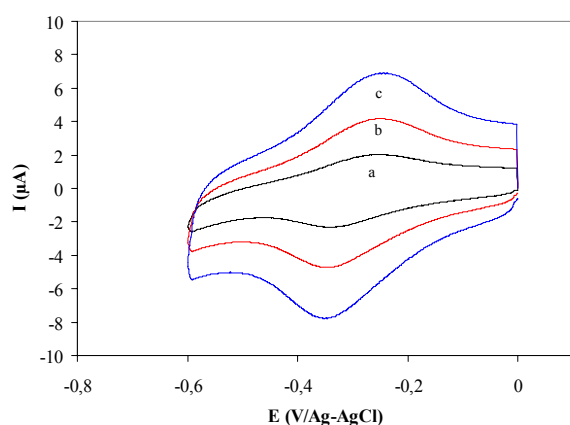
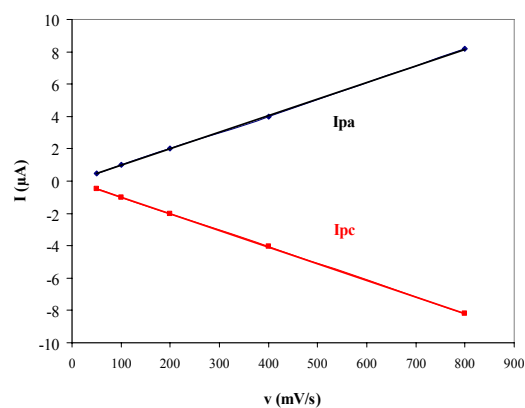
**A****B**

Figure II-30: **A)** Courbes de voltammétrie cyclique de Hb/NontG en fonction de la vitesse de balayage 100 (a), 200 (b) et 400 mV/s (c) dans une solution TP (0,01M, pH7), **B)** Variation de I en fonction ν .

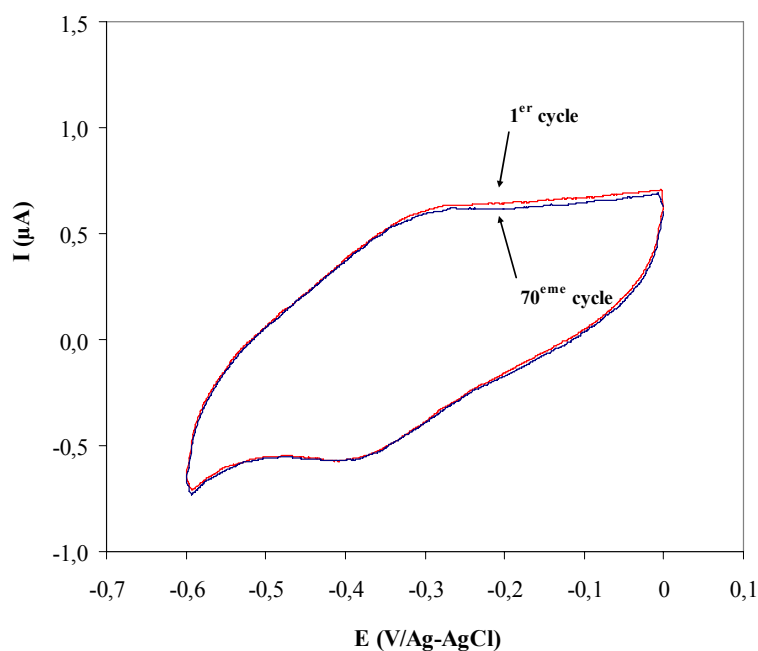


Figure II-31: Stabilité d'une électrode d'Hb/NontG dans une solution de TP (pH 7).

L'effet du pH de la solution tampon a été étudié. Les courbes de voltammétrie cyclique ont été enregistrées dans des solutions de tampon phosphate à pH 7, 6, 8, 9, 5 et 7. On observe un déplacement des potentiels E_{pa} et E_{pc} en fonction du pH de milieu (Figure II-32A). Ce phénomène est réversible. La valeur de la pente de la droite ainsi obtenue est de 43 mV/pH (Figure II-32B). Ce résultat a été aussi obtenu avec un autre hybride Hb/bentonite (48 mV/pH) [15]. La valeur théorique de la pente est $-57,6 \text{ mV pH}^{-1}$ à une température de 18°C , correspondant au transfert d'un proton et d'un électron comme écrit dans l'équation II-22.

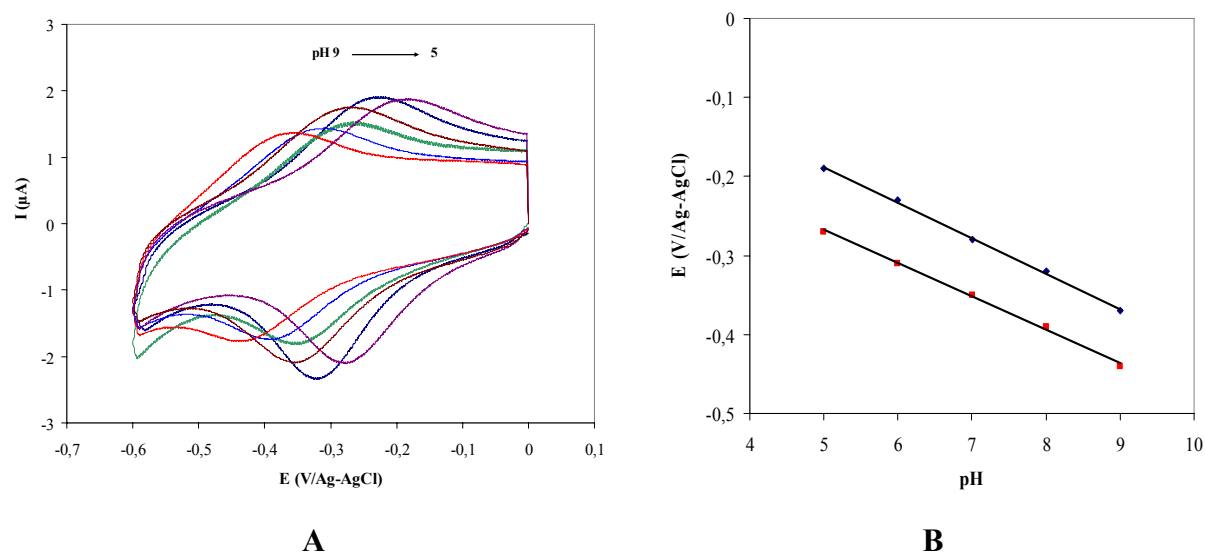


Figure II-32 : **A)** Courbes de voltammétrie cyclique de Hb/NontG en fonction du pH dans une solution TP (0,01M), **B)** Variation des potentiels E_{pa} et E_{pc} en fonction du pH.

La détermination de la quantité d'Hb électroactive est estimée par intégration du pic de réduction en utilisant l'équation de Laviron (eq II-17). La quantité d'Hb déposée sur l'électrode correspond à $2,8 \cdot 10^{-10}$ moles (20 μg), mais seulement $2 \cdot 10^{-11}$ moles sont électroactives, ce qui correspond à 7% d'Hb initialement déposée. Le même calcul a été fait pour les autres argiles compte-tenu de la quantité d'Hb effectivement retenue sur l'électrode (Tableau II-9). La valeur minimale est trouvée pour la MS 1,9 %. Cette valeur est proche de celle observée avec l'attapulgite (1,97 %) [49]. Dans le cas de la bentonite environ 10 % d'Hb adsorbée est électro-active [15]. Il faut noter que le pourcentage d'électroactivité ne suit pas l'ordre d'affinité de l'Hb pour les argiles observé avec les isothermes. La quantité plus grande d'Hb électroactive observée avec le NontG, SapSF et MSF, suggère l'intervention possible du fer dans le processus de transfert électrochimique. En effet, seulement une faible quantité d'Hb immobilisée dans les argiles est électroactive. Ces biomolécules sont adsorbées dans les couches internes du dépôt, proche de la surface de l'électrode [20]. Dans les argiles contenant du fer, cet atome peut servir de relais d'électrons suivant le schéma II-2 et augmenter ainsi la part d'Hb immobilisée pouvant intervenir dans le processus électrochimique.

Tableau II-9 : Quantité d'Hb électroactive adsorbée dans les argiles

Hb/argile	Γ_{Hb}^* (10^{-11} mole)	% électroactif
NontG	2,0	7
MSF	1,4	5
SapFS	1,4	7
MS	0,5	1,9

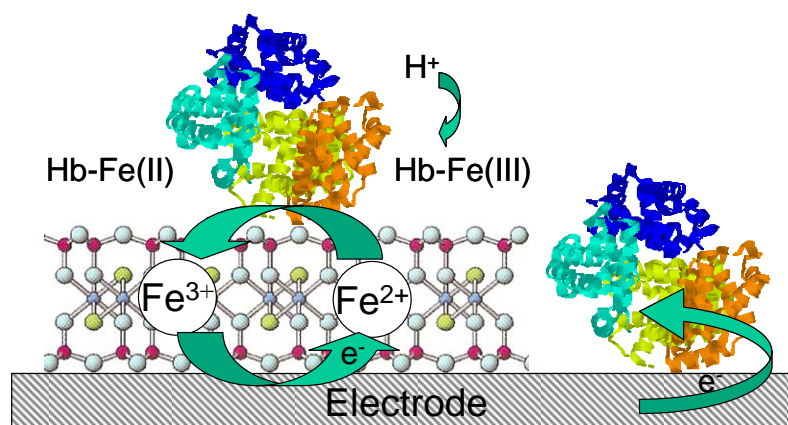


Schéma II-2 : Schéma du rôle du fer dans le transfert d'électrons sur l'Hb

Enfin, les propriétés électro-catalytiques de Hb/NontG vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène ont été étudiées. Après l'ajout d' H_2O_2 , on observe l'augmentation du

courant cathodique et une diminution du courant anodique (Figure II-33), ce qui suggère la décomposition du peroxyde d'hydrogène suivant le mécanisme :

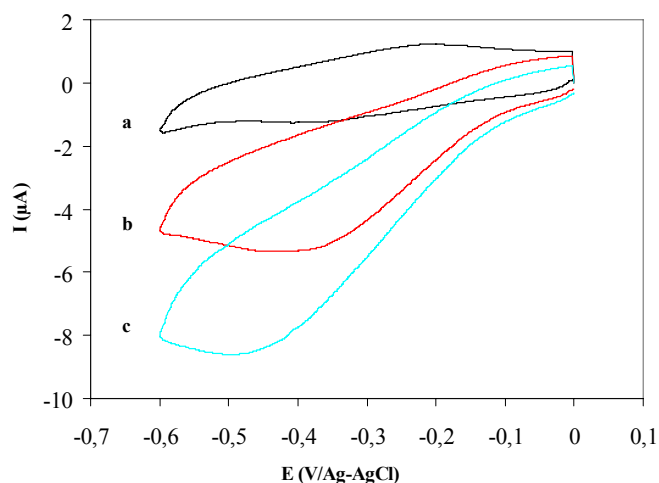


Figure II-33 : Courbes de voltammétrie cyclique de l'Hb/NontG dans une solution de TP 0,01 M pH 7 sans (a) et en présence de 0,2 (b) et 0,4 mM (c) de H₂O₂. ($\nu = 100 \text{ mV/s}$).

II.6- Dosages ampérométriques du peroxyde d'hydrogène

Nous avons utilisé les différentes électrodes modifiées avec les argiles, décrites précédemment pour doser le peroxyde d'hydrogène par chrono-ampérométrie sous atmosphère inerte d'argon. Nous avons spécialement utilisés la NontG et la MSF en milieu acide, avec le méthyl viologène et l'Hb. Dans tous les cas, nous avons utilisé des électrodes de carbone vitreux de surface de $0,196 \text{ cm}^2$ (5 mm) tournant à une vitesse de rotation de 500 tr/min. Le potentiel imposé a été choisi pour être sur le plateau de diffusion et la réponse en courant a été mesurée après chaque ajout d'H₂O₂, une fois que le courant s'est stabilisé. Les conditions de préparation des électrodes modifiées et de pH de l'électrolyte dépendent du type de dosage que nous avons réalisé.

II.6.1- Dosage d'H₂O₂ en milieu acide

Le dosage du H₂O₂ est effectué en milieu acide pour les argiles au fer : MSF et NontG à une température de 30°C en appliquant un potentiel ($E_{\text{app}} = -250 \text{ mV}$). 40 μg d'argile sont déposés sur l'électrode et séché à l'air ambiant. On obtient une réponse en courant cathodique

(I_{pc}) qui augmente en fonction de la concentration de H_2O_2 ajouté (Figure II-31). L'équation de la partie linéaire de la courbe est obtenue par régression linéaire, la gamme de concentration (G.L.) étant choisie afin d'obtenir le meilleur R^2 . La sensibilité est calculée à partir de la pente de cette droite. La limite de détection correspond à trois fois le signal sur bruit.

Les limites de détection et les sensibilités sont résumées dans le tableau II-10. On remarque que la sensibilité du capteur à H_2O_2 en utilisant la NontG est plus importante que celle obtenue avec la MSF. La quantité de fer est plus importante dans la NontG que dans la MSF. La réponse de capteur est tributaire de la quantité de fer structural et de sa localisation. Malgré que le film de MSF soit plus perméable, la réponse est plus importante avec la NontG.

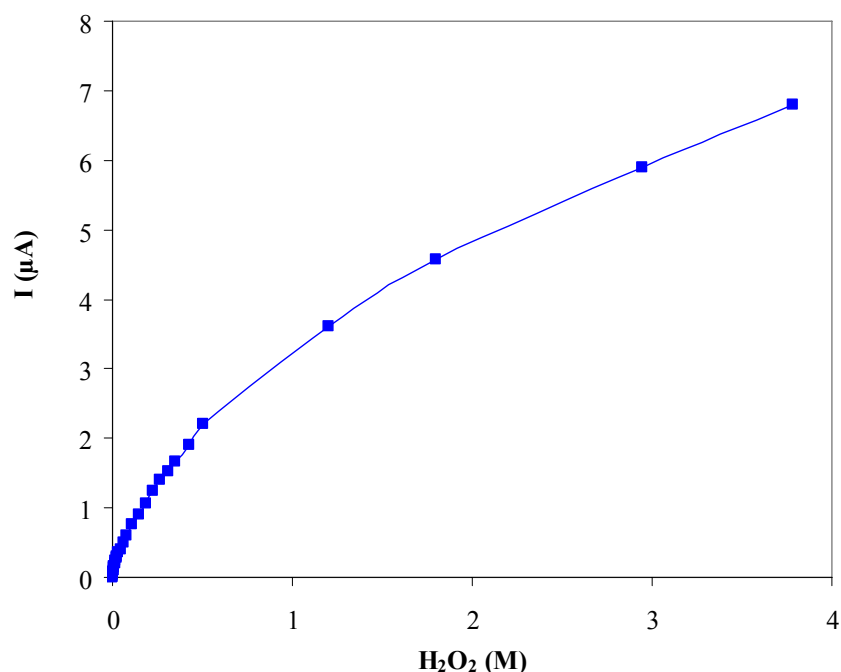


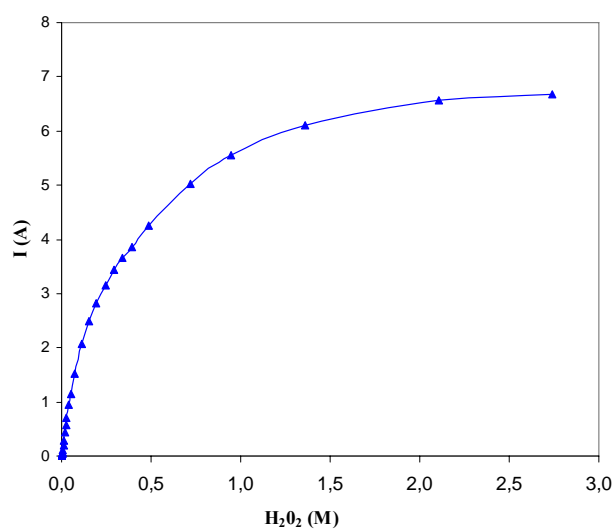
Figure II-34 : Dosage de H_2O_2 par 40 μg de NontG dans une solution à pH 3 ($E_{appl} = -250$ mV).

Tableau II-10 : Caractéristiques des capteurs à H_2O_2 en milieu acide

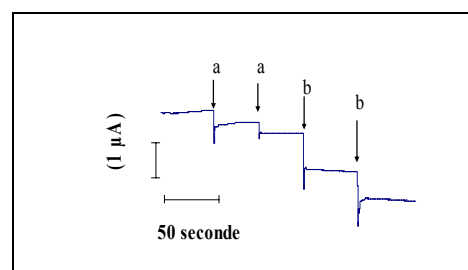
Argile	S (mA/Mcm ²)	L.D. (μM)	G.L. (mM)	R ²
NontG	0,23	109	0,63-2,45	0,9973
MSF	0,10	246	0,25-1,60	0,9965

II.6.2- Dosage de H₂O₂ avec un médiateur chimique (MV²⁺/Argiles)

Dans le but d'adsorber le maximum de MV²⁺, 80 µg d'argile ont été déposés et séchés à la surface d'une électrode. L'électrode modifiée est trempée dans une solution de 0,5 mM MV²⁺ pendant 1 h, 8 h et 24 h. Une étude cinétique a montré que 8 h est le meilleur temps d'adsorption du médiateur. En effet après 1 h la réponse est faible. Par contre après 24 h, on observe une perte d'adhésion du film sur l'électrode liée au changement d'hydrophobicité de l'argile échangée avec le MV²⁺. Le dosage d'H₂O₂ a été réalisé dans une solution tampon phosphate (pH 8) ne contenant pas de MV²⁺ à E_{appl} = -750 mV. Le capteur présente une réponse rapide aux ajouts d'H₂O₂; 90 % de la réponse (t₉₀) est obtenue après une seconde et une courbe d'étalonnage peut ainsi être établie (Figure II-35). Le tableau II-11 reprend les caractéristiques des capteurs construits avec le MV²⁺ immobilisé dans la NontG et la MSF. Deux domaines de linéarité sont observés dans les courbes, ce qui suggère deux sites d'adsorption du méthyl viologène différents ayant des accessibilités différentes pour entrer dans le cycle électro-catalytique. La sensibilité est plus grande qu'en milieu acide et la MSF est plus efficace que la NontG. En effet, le courant maximum (I_{max}) et la sensibilité sont plus importants avec la MSF. Rappelons que la MSF est plus favorable à l'accumulation du MV²⁺ que la NontG.



A



B

Figure II-35 : A) Courbe d'étalonnage de H₂O₂ dans une solution de T P (pH 8) à E_{appl} = -750 mV.

B) Réponse du capteur MV²⁺/MSF vis-à-vis de H₂O₂ ; a) 10 µM) et b) 20 µM.

Tableau II-11 : Caractéristiques des capteurs à H₂O₂ par MV²⁺/argile

MV ²⁺ /Argile	S (mA/Mcm ²)	G.L. (mM)	I _{max} (A/cm ²)	R ²
NontG	9,4	0,01 - 5	14	0,9755
	54	12 - 40		0,9988
MSF	53	0,01 - 4	34	0,9984
	132	5 - 40		0,9981

II.6.3- Dosage de H₂O₂ par des biocapteurs Hb/Argile

Pour effectuer le dosage de H₂O₂ par l'Hb adsorbée dans l'argile, un mélange Hb/argile avec un rapport massique de 1 est déposé sur l'électrode de carbone vitreux et séché une nuit dans le frigo. Avant l'utilisation, l'électrode est laissée 20 min dans une solution tampon phosphate pour être réhydratée. La chronoampérométrie est enregistrée à E_{app} = - 400 mV et à une température de 25°C. Le courant enregistré est exprimé en fonction de la concentration en H₂O₂ (Figure II-36). Les caractéristiques des biocapteurs Hb/argiles sont résumées dans le tableau II-12.

Le meilleur biocapteur est obtenu avec l'hybride Hb/NontG, avec une sensibilité de 132 mA/Mcm² et un courant maximum de I_{max} de 44 µA/cm². Le capteur Hb/MS a la plus faible sensibilité (0,043 mA/Mcm²) comparée à celle obtenue avec l'hybride Hb/MSF (74 mA/Mcm²). Ce qui conforte l'importance du fer dans le processus électro-catalytique observé en voltammétrie cyclique.

Nous avons préparé des biocapteurs avec différents rapports massiques Hb/NontG (1/1, 2/1, 1/2, 2/2), afin de déterminer la meilleure configuration pour le dosage de H₂O₂. Les caractéristiques de ces biocapteurs sont mentionnées dans le tableau II-13. La sensibilité est la plus grande pour le rapport 1. Cette valeur est similaire au maximum d'absorption (C_m) de l'Hb dans la NontG. Lorsque le rapport est augmenté au dessus de C_m, la sensibilité et le I_{max} diminue, probablement du au relargage de la protéine dans la solution. Si l'on double l'épaisseur du film (r = 2/2), les caractéristiques du biocapteur ne sont pas améliorées, à cause des contraintes diffusionnelles à travers le film d'Hb/argile plus épais. En effet, l'épaisseur du film, mesurée au profilomètre, augmente de 0,7 µm à 1,5 µm en doublant la quantité déposée.

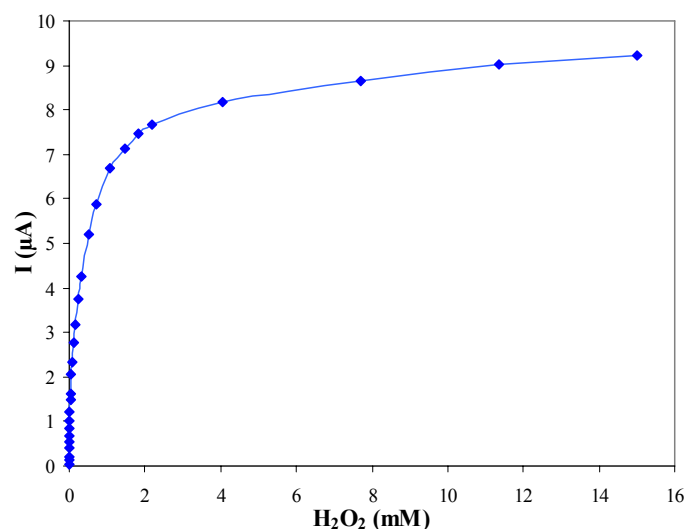


Figure II-36 : Dosage de H_2O_2 par Hb/NontG dans une solution de T P (pH = 7), T = 25°C et $E_{appl} = -400$ mV.

Tableau II-12 : Caractéristiques des biocapteurs Hb/argile à H_2O_2 .

Hb/argile	S (mA/M cm ²)	I _{max} (µA/cm ²)	G.L. (µM)	R ²
NontG	132	44	2-15	0,9997
MSF	74	21	2 - 12	0,9989
MS	0,043	1	4 - 18	0,9977

Tableau II-13: Caractéristiques des biocapteurs à H_2O_2 pour différents rapports de masse Hb/NontG.

Hb/NontG	S (A/Mcm ²)	I _{max} (µA/cm ²)	G.L. (µM)	R ²
1/1	0,41	47	2- 14	0,9988
2/2	0,29	69	2 - 17	0,9984
2/1	0,13	38	6 - 21	0,9990
1/2	0,19	56	2 - 21	0,9995

Pour évaluer l'activité catalytique de la protéine immobilisée, nous avons utilisé la cinétique classique définie par Michaelis-Menten. La représentation de Lineweaver-Burk ($1/I$ en fonction de $1/[H_2O_2]$) donne la valeur apparente de la constante de Michaelis (K_M). Elle est de 88 µM dans le cas Hb/NontG. On peut comparer cette valeur à celles obtenues avec Hb/attapulгите [49] ($K_M = 490$ µM) et Hb/laponite [13] (1090 µM). La valeur plus petite que nous avons obtenue confirme la grande affinité de l'Hb pour le peroxyde d'hydrogène

lorsqu'elle immobilisée dans le NontG. Si l'on se réfère au tableau I.5, on remarque que la sensibilité du biocapteur Hb/NontG est proche de celles rapportées pour d'autres biocapteurs à H₂O₂ à base d'hémoglobine avec cependant une limite de détection inférieure (2 μM).

Finalement, quatre électrodes modifiées Hb/NontG ont été préparées indépendamment. Leur réponse est reproductible avec une déviation standard de 10 %. Ce biocapteur a été stocké au frigo dans une solution tampon. Aucune diminution de signal n'est observée pendant 13 jours.

II.7-Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre tentent à prouver que les argiles cationiques ferrifères peuvent servir de relais d'électrons dans le transfert électronique se produisant à la surface des électrodes modifiées. Il semblerait que le fer situé en site octaédrique est le plus accessible au transfert d'électron. La présence de molécules (MV²⁺) ou de biomolécules (Hb) adsorbés dans l'argile facilite la mise en évidence du rôle du fer dans ce processus. L'Hb présente une forte affinité d'adsorption pour les argiles cationiques. De plus, nous avons montré pour la première fois que des argiles riches en fer peuvent exalter le transfert direct d'électrons entre l'Hb et l'électrode.

Les électrodes modifiées par les argiles ferrifères offrent la possibilité de développer des méthodes d'analyse très sensibles pour la détection de H₂O₂. L'adsorption d'un médiateur chimique ou de biomolécule (Hb) dans les couches d'argile améliorent considérablement les performances des capteurs. En particulier, la forte activité catalytique de l'Hb adsorbée dans la NontG a été appliquée pour le développement d'un biocapteur à H₂O₂ très sensible.

II.8-References :

- [1] Macha S., Baker S. and Fitch A. dans *Electrochemical properties of clays*; CMS Workshop lectures, Vol. 10 (Ed. A. Fitch), The Clay Minerals Society, Aurora, pp. 2 (2002).
- [2] Villemure G. dans *Electrochimical properties of clays*, Vol. 10 (Ed. A. Fitch), The Clay Minerals Society, Aurora, pp. 149 (2002).
- [3] Xiang Y. and Villemure G., *Electrodes modified with synthetic clay minerals: evidence of direct electron transfer from structural iron sites in the clay lattices*, J. Electroanal. Chem. 381 (1995), 21.
- [4] Shyu S.-C. and Wang M., *Characterisation of iron-rich clay modified electrodes and their application in optical recognition*, J. Electroanal. Chem. 440 (1997), 27.
- [5] Teng Y.-W., Chang I.-J. and Wang C. M., *Direct evidence of clay-mediated charge transfer*, J. Phys. Chem B 101 (1997), 10386.
- [6] Oyama N. and Anson F. C., *Catalysis of the electroreduction of hydrogen peroxide by montmorillonite clay coatings on graphite electrodes*, J. Electroanal. Chem. 199 (1986), 467.
- [7] Zen J.M., Jeng S. H., and Chen H.J., *Catalysis of the electroreduction of hydrogen peroxide by nontronite clay coatings on glassy carbon electrodes*, J. Electroanal. Chem. 408 (1996), 157.
- [8] Zen J.-M. and Lo C.-W., *Glucose sensor made of an enzymatic clay-modified electrode and methyl viologen mediateur*, Anal. Chem. 68 (1996), 2635.
- [9] Song W., Cheng M., Ma J., Ma W., Chen C. and Zhao J., *Decomposition of hydrogen peroxide driven by photochemical cycling of iron species in clay*, Environ. Sci. Technol. 40 (2006), 4782.
- [10] Song W., Ma J., Ma W., Chen C. and Zhao J., *Photochemical production or depletion of hydrogen peroxide controlled by different electron transfer pathways in methyl viologen intercalated clays*, J. Photochem. Photobiol. A 183 (2006), 31.
- [11] Ouyang C. S. and Wang C. M., *Clay-enhanced electrochemiluminescence and its application in the detection of glucose*, J. Electrochem. Soc. 145 (1998), 2654.
- [12] Chih T., Jao H.-J. and Wang C. M., *Glucose sensing based on an effective conversion of O_2 and H_2O_2 into superoxide anion radical with clay minerals*, J. Electroanal. Chem. 581 (2005), 159.
- [13] Shan D., Han E., Xue H. and Cosnier S., *Self-assembled films of hemoglobin/laponite/chitosan: application for the direct electrochemistry and catalysis to hydrogen peroxide*, Biomacromolecules 8 (2007), 3041.

- [14] Liu Y., Liu H. and Hu N., *Core-shell nanocluster films of hemoglobin and clay nanoparticle: Direct electrochemistry and electrocatalysis*, Biophys. Chem. 117 (2005), 27.
- [15] Zhou Y., Hu N., Zeng, and Rusling J. F., *Heme protein-clay films: direct electrochemistry and electrochemical catalysis*, Langmuir 18 (2002), 211.
- [16] Fan C., Zhuang Y., Li G., Zhu J. and Zhu D., *Direct electrochemistry and enhanced catalytic activity for hemoglobin in a sodium montmorillonite Film*, Electroanalysis 12 (2000) 14.
- [17] Lei C., Wollenberger U. , Bistolas N., Guiseppi-Elie A. and Scheller F. W., *Electron transfer of hemoglobin at electrodes modified with colloid clay nanoparticles*, Anal. Bioanal. Chem. 372 (2002), 235.
- [18] Zhou H., Li Z., Hu N., Zeng Y., and Rusling J. F., *Layer by layer Assembly of ultrathin films of haemoglobin and clay nanoparticles with electrochemical and catalytic activity* Langmuir 18 (2002), 8573.
- [19] Sun H., *Direct electrochemical and electrocatalytic properties of heme protein immobilized on ionic liquid- clay-nanoparticle-composite films*, J. Porous Mater. 13 (2006), 393.
- [20] Chen X., N. Hu, Y. Zeng, J. F. Rusling and J. Yang, *Ordered electrochemically active films of hemoglobin, didoceldimethylammonium ions, and clay*, Langmuir 15 (1999), 7022.
- [21] Drits V. A., and Manceau A., *A model for the mechanism of Fe^{3+} to Fe^{2+} reduction in dioctahedral smectites*, Clays and Clay Minerals 2 (2000), 185.
- [22] Letaief S., Aranda P., and Ruiz-Hizky E., *Influence of iron in the formation of conductive polypyrrole-clay nanocomposites*, Appl. Clay Sci. 28 (2005), 183.
- [23] Decarreau A., Petit S., Martin F., Farges F., Vieillard P. and Joussein E., *Hydrothermal synthesis between 75 and 150°C, of high-charge, ferric nontronites*, Clays and Clay Miner. 56 (2008), 322.
- [24] Duc M., Thomas F. and Gaboriaud F., *Coupled chemical processes at clay/electrolyte interface: A batch titration study of Na-montmorillonites*, J. Colloid Interface Sci. 300 (2006) 616.
- [25] Ouslati W., Ben Rhaïem H., Lanson B., Ben Haj Amara A., *Selectivity of Na-montmorillonite in relation with the concentration of bivalent cation (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+}) by quantitative analysis of XRD patterns*, Appl. Clay Sci. 43 (2009), 224.
- [26] Gough D.A. and Leypoldt J.K., *Membrane-covered rotated disk electrode*, Anal. Chem. 51 (1979), 439.

- [27] Savéant J.-M., *Permeation through polymer coating on electrodes: membrane versus pinhole permeation*, J. Electroanal. Chem. 302 (1991), 91.
- [28] Cosnier S., Mousty C., Gondran C. and Lepellec A., *Entrapment of enzyme with in organic and inorganic materials for biosensor applications: comparative study*, Mater. Sci. Eng. C 26 (2006), 442.
- [29] Kwan W. and Volker B. M., *Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems*, Environ. Sci. Technol. 37 (2003), 1150.
- [30] Liu S.S. and Gurol M. D., *Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on iron oxide: kinetics, mechanism and implications*, Environ. Sci. Technol. 32 (1998), 1417.
- [31] Stucki J., Bailey G. and Gan H., *Redox reactions in phyllosilicates and their effects on metal transport*. In: Allen H. Ed., Lewis Publishers, (1995).
- [32] De Leon M.A., Castiglione J., Bussi J. and Sergio M., *Catalytic activity of an iron-pillared montmorillonitic clay mineral in heterogeneous photo-Fenton process*, Catal. Today 133-135 (2008), 600.
- [33] Rozenson I. and Heller Kallai L., *Reduction and oxidation of Fe^{3+} in dioctahedral smectites. I: reduction with hydrazine and dithionite*, Clays and Clay Miner. 24 (1976), 271.
- [34] Song W., Cheng M., Ma J., Ma W., Chen C., Zhao J., *Decomposition of hydrogen peroxide driven by photochemical cycling of iron species in clay*, Environ. Sci. Technol. 40 (2006), 4782.
- [35] Chih T., Jao H. J. and Wang C.M., *Glucose sensing based on an effective conversion of O_2 and H_2O_2 into superoxide anion radical with clay minerals*, J. Electroanal. Chem. 581 (2005), 159.
- [36] Song W., Ma J., Ma W., Chen C. and Zhao J., *Photochemical production or depletion of hydrogen peroxide controlled by different electron transfer pathways in methyl viologen intercalated clays*, J. Photochem. Photobiol. A 183 (2006), 31.
- [37] Murry R.W., *Electroanalytical Chemistry*. Bard A. J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 13 (1986), 191.
- [38] Palecek S. P. and Zydney A.L., *Hydraulic permeabilities of protein deposits formed during microfiltration; effect of solution pH and ionic strength*, J. Memb. Sci. 95 (1994), 71.
- [39] Giles C. H., Smith D. and Hinton A., *A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical*, J. Colloid Interface Sci. 47 (1974), 755.
- [40] Bajpai A. K. and Sachdeva R., *Study on the adsorption of hemoglobin onto bentonite clay surfaces*, J. Appl. Polym. Sci. 85 (2002), 1607.

- [41] Causserand C., Kara Y. and Aimar P., *Protein fractionation using selective adsorption on clay surface before filtration*, J. Membr. Sci. 186 (2001), 165.
- [42] Geng L., Wang X., Li N., Xiang M. H. and Li K., *Characterisation of hemoglobin immobilized on γ -zirconium phosphate*, Colloid. Surf., B 34 (2004), 231.
- [43] Wang Y., Mu Y., Zhao Q.B. and Yu H. Q., *Isothermes, Kinetics and thermodynamics of dye biosorption by anaerobic sludge*, Sep. Purif. Technol. 50 (2006), 1.
- [44] Xie Y., Liu H., and Hu N., *Layer-by-layer films of hemoglobin or myoglobin assembled with zeolite particles: Electrochemistry and electrocatalysis*, Bioelectrochem. 70 (2007), 311.
- [45] Kumsinski T. F. and Unruh J. J., In *Molecular Modeling*, Kumsinski T. F., Leibman M. N. Eds. ACS Symp. Ser. 576 American Chemical Society: Washington, DC pp 71 (1994).
- [46] Schlereth D. D. and Mantele W., *Redox-induced conformational changes in myoglobin and hemoglobin electrochemistry and ultraviolet-visible and Fourier transform infrared difference spectroscopy at surface-modified gold electrodes in an ultra-thin-layer spectrelectrochemical cell*, Biochemistry 31 (1992), 7494.
- [47] Scheller F.W., Bistolas N., Liu S., Janchen M., Katterle M. and Wollenberger, *Thirty years of haemoglobin electrochemistry*, Adv. Colloid Interface Sci.116 (2005), 111.
- [48] Mousty C., *Sensors and Biosensors based on Clay-modified electrode-new trends*, Appl. Clay Sci. 27 (2004), 159.
- [49] Xu J., Li W., Yin Q., Zhong H., Zhu Y. and Jin L., *Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of haemoglobin on nano-structural attapulgite clay-modified glassy carbon electrode*, J. Colloid Interface Sci. 317 (2007), 170.
- [50] Drabkin D. L. and Austin J.H., *Spectrophotometric studies a technique for the analysis of undiluted blood and concentrated haemoglobin solutions*, J. Biol. Chem. 112 (1935), 105.
- [51] Lui S. Wollenberger U., Katterle M. and Scheller F.W., *Ferroceneboronic acid-based amperometric biosensor for glycated haemoglobin*, Sens. Actuators, B 113 (2006), 623.
- [52] Halamek J., Wollenberger U., Stocklein W. and Scheller F.W., *Development of biosensor for glycated haemoglobin*, Electrochim. Acta 53 (2007), 1127.
- [53] Hleli S., Martelet C., Abdelghani A A., Bessueille F., Errachid A., Saenatier J., Hays H. C. W., Millner P. A., Burais N., Jaffrezic-Renault N., *An immunosensor for haemoglobin based on impedimetric properties of a new mixed self-assembled monolayer*, Mater. Sci. Eng. C. 26 (2006), 322.

Chapitre III :

Les Hydroxydes Doubles

Lamellaires

III.1-Introduction

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont des matériaux lamellaires bidimensionnels qui présentent des propriétés très différentes de celles des argiles cationiques (densité de charge, capacité d'échange anionique, etc...). Ils permettent notamment d'intercaler une grande variété d'espèces anioniques inorganiques, organiques et même biologiques comme des fragments d'ADN ou ATP [1,2,3]. Comme nous l'avons montré dans le chapitre I, plusieurs enzymes ont été immobilisées dans les HDL pour des applications en biocatalyse [4] ou pour la construction de biocapteurs [5,6]. En particulier, l'uréase, l'alcaline phosphatase et la trypsine ont été immobilisées lors de la coprécipitation d'HDL de type MgAl et ZnAl [7,8,9,10].

Récemment, des HDL du type ZnAl-dodecylsulfonate et MgAl-lactate ont été utilisés pour adsorber l'hémoglobine(Hb) [11,12]. De même, l'adsorption de la myoglobine a été étudiée sur une suspension colloïdale de NiAl-Br [13]. Enfin, le transfert direct d'électron a été mis en évidence entre la peroxydase de Raifort (HRP) et une électrode modifiée par NiAl-NO₃ [14] et pour l'hémoglobine immobilisée dans le ZnAl-dodecylsulfonate [11].

Nous avons montré dans le chapitre précédent, que le fer situé en site octaédrique dans les argiles cationiques jouait un rôle important dans l'amélioration du transfert électronique entre l'hémoglobine et l'électrode. Les HDL peuvent également contenir du fer en coordination octaédrique dans leurs feuillets, ce dernier pourrait éventuellement aussi intervenir dans un processus électrochimique impliquant l'Hb. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de la composition chimique de la matrice inorganique HDL et en particulier au rôle du fer. Des matrices HDL de composition chimiques MgAl, MgFe, ZnAl ont été préparés et utilisés comme matrices d'immobilisation de l'Hb, soit par adsorption, soit au cours de la coprecipitation. Après les caractérisations physico-chimiques des matériaux HDL hybrides bio-inorganiques, le comportement électrochimique de l'Hb immobilisée dans ces matériaux biohybrides a été étudié, avant d'envisager la réalisation de biocapteurs ampérométriques à H₂O₂.

III.2-Préparation des HDL de référence

Les HDL sont formés d'un empilement de feuillets de type brucite constitué d'octaèdres $M(OH)_6$, la substitution d'une partie des cations divalents par des cations trivalents génère une charge positive à la surface des feuillets. La neutralité électrique globale des HDL est assurée par la présence d'espèces anioniques X^- , (Cl^- , NO_3^-). Ces anions ont une forte affinité pour la structure HDL et sont intercalés dans l'espace inter-lamellaire avec des molécules d'eau.

Pour la synthèse des HDL, nous avons utilisé la méthode de coprecipitation à pH constant [15], une méthode simple qui consiste à réaliser une réaction de précipitation contrôlée à partir d'une solution de sels de métaux divalents et trivalents par une solution de base de Brønsted (NaOH). La réaction qui se produit est la suivante :



$$\text{avec } R = (1+x)/x$$

Nous avons choisi un rapport molaire (R) $M^{II}/M^{III} = 2$, correspondant à une capacité d'échange anionique importante. Le pH de coprecipitation est fixé selon la nature des cations métalliques. Afin d'éviter la contamination des phases par des anions carbonates, présentant une très forte affinité avec les phases HDL, les synthèses sont réalisées sous atmosphère d'azote. Les conditions expérimentales utilisées sont résumées dans le Tableau III-1 en fonction des compositions des HDL synthétisés.

La solution de sels métalliques divalents et trivalents est ajoutée gouttes à gouttes dans un réacteur contenant une solution aqueuse de volume égal à 50 ml mise sous agitation et contenant éventuellement des anions à intercaler (par exemple le dodecylsulfate). La solution de base (NaOH) est ajoutée simultanément. Un dispositif entièrement automatisé équipé de pompes et d'un pHmètre permet de régler les débits des solutions de sels et de soude et de maintenir le pH constant tout au long de la synthèse qui se poursuit pendant 24 h (voir figure I.4). Le produit final est centrifugé, lavé plusieurs fois avec de l'eau décarbonatée puis une partie est séchée et une autre est maintenue en suspension dans un peu d'eau.

Des phases $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6\text{Cl}\cdot n\text{H}_2\text{O}$, noté Mg_2AlCl , et $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6\text{NO}_3\cdot n\text{H}_2\text{O}$, noté Mg_2AlNO_3 , ont ainsi été synthétisées. Un HDL hybride intercalé avec un tensio-actif anionique, le dodecylsulfate (DDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) a également été préparé. Le matériau $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6\text{DDS}$ est synthétisé par la méthode de préparation décrite précédemment cependant les concentrations en sels ($\text{Mg}(\text{NO})_2$, $\text{Al}(\text{NO})_3$) et en NaOH sont plus faibles (Tableau III-1) et le réacteur contient une solution aqueuse de dodecylsulfate à une concentration correspond à un rapport molaire $\text{DDS}/\text{Al} = 2$. Pour déterminer le rôle joué par le fer structural, nous avons également préparé de manière identique une phase Mg_2FeCl en remplaçant le chlorure d'aluminium par du chlorure de fer (FeCl_3).

La synthèse d'HDL Zn_2AlCl a également été réalisée avec le même protocole, en utilisant une solution molaire (1 M) de chlorure de zinc et d'aluminium dans des proportions telles que le rapport $\text{Zn}/\text{Al} = 2$. Les pH de coprecipitation diffèrent d'une matrice à l'autre, respectivement 9 pour les matrices MgAl et MgFe et 7,5 pour la phase ZnAl . Les valeurs optimales ont été définies lors travaux précédents réalisés au laboratoire [15].

Tableau III-1: Paramètres de coprecipitation des HDL de référence

HDL	Sels (M)			NaOH (M)	X	pH
	$\text{M}^{\text{II}}\text{X}_2$	AlX_3	FeCl_3			
				-	-	9
Mg_2AlCl	0,66	0,33	-	2	Cl^-	9
Mg_2AlNO_3	0,66	0,33	-	2	NO_3^-	9
Mg_2AlDDS	0,066	0,033	-	0,2	NO_3^- 0,0122 M DDS	9
Mg_2FeCl	0,66	-	0,33	2	Cl^-	9
$\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$	0,66	0,33	-	2	Cl^-	7,5

III.2.1-Caractérisation par DRX

Les diffractogrammes de RX des matériaux synthétisés, notamment ceux des phases Mg_2AlCl , Mg_2AlNO_3 et Zn_2AlCl (Figure III-1) sont caractéristiques d'un HDL [16,17]. La raie (003) correspond à la distance interlamellaire (d) (Tableau III-2) tandis que la raie (110) au voisinage de 60° en 2θ permet d'accéder directement à la distance interatomique métal-métal dans le feuillet. Des distances interlamellaires de 7,5 Å et 8,4 Å, respectivement pour les phases intercalées par les ions chlorures et nitrates sont observés.

La présence du tensio-actif DDS induit un déplacement des raies $00l$ vers les petits angles donnant une distance interlamellaire de 28,14 Å (Tableau III-2) indiquant l'intercalation du DDS dans l'espace interfeuillelet comme décrit dans la littérature [18]. Le diffractogramme de la phase Mg_2FeCl ne traduit aucun changement structural significatif par rapport à la phase Mg_2AlCl , si ce n'est une légère augmentation de la distance interatomique dans le feuillet (Tableau III-2) liée à une taille supérieure de l'atome de fer par rapport à celle de l'atome d'aluminium.

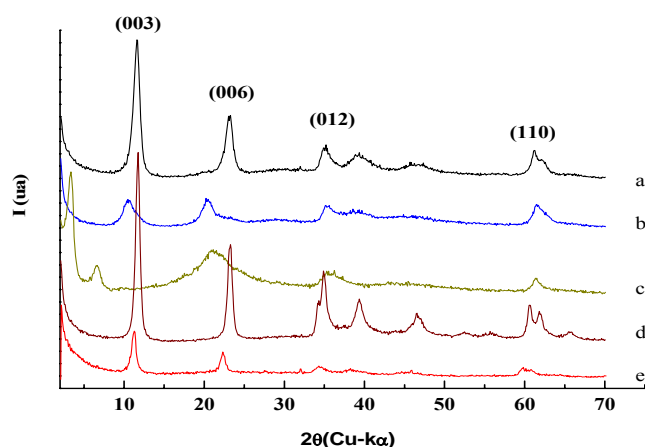


Figure III-1 : Diffractogrammes de RX de Mg_2AlCl (a), Mg_2AlNO_3 (b) Mg_2AlDDS (c) Zn_2AlCl (d) et Mg_2FeCl (e).

Tableau III-2 : Les différentes raies de DRX caractéristiques des HDL synthétisés

HDL	d_{003} (Å)	d_{006} (Å)	d_{012} (Å)	d_{110} (Å)
Mg_2AlCl	7,51	3,74	2,51	1,51
Mg_2AlNO_3	8,44	4,37	2,55	1,50
Mg_2AlDDS	28,14	13,69	4,24	1,50
Mg_2FeCl	7,86	3,96	2,60	1,54
Zn_2AlCl	7,56	3,82	2,56	1,55

III.2.2- Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouge des échantillons préparés sont également caractéristiques de phases d'HDL (Figure III-2) [19]. L'examen des spectres IR montre une bande d'absorption vers 3400 cm^{-1} qui correspond aux vibrations des groupements O-H et des molécules d'eau présente dans l'HDL. Aux basses fréquences, on trouve les modes de vibrations attribués au réseau caractéristique des feuillet des HDLs, soit M-O et O-M-O. Dans le cas de Mg_2AlCl les vibrations de réseau se trouve à 438 , 653 et 761 cm^{-1} .

La raie intense à 1346 cm^{-1} correspond à la vibration de valence de l'anion nitrate NO_3^- intercalé. Dans le spectre IR de Mg_2AlCl , on trouve des bandes vibrations moins intenses, mais toujours caractéristiques d'HDL et la bande de vibration à 1346 cm^{-1} , caractéristique de l'anion carbonate, est de faible intensité, ce qui confirme une faible carbonatation de la phase et la présence majoritaire d'ions chlorures.

Par rapport à celui de Mg_2AlNO_3 , on note sur le spectre infrarouge de $\text{Mg}_2\text{AlDDSO}_4$ la disparition de la bande de vibration des ions nitrate et l'apparition d'autres bandes de vibration à 2916 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} et 1197 cm^{-1} caractéristiques des liaisons C-H et sulfate OSO_3 (Figure III-2). Les vibrations à 1412 et 700 cm^{-1} correspondent au CH_2 . Toutes ces vibrations confirment l'intercalation du DDS dans l'espace interfeuille de l'HDL.

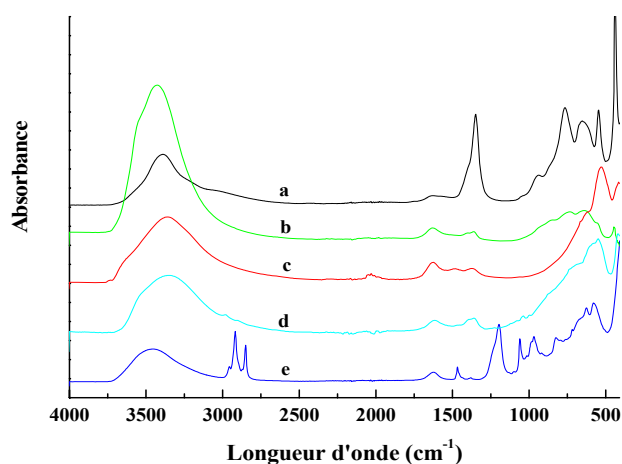


Figure III-2 : Spectres IR de Mg_2AlNO_3 (a) Mg_2AlCl (b), Mg_2FeCl (c), Zn_2AlCl (d) et $\text{Mg}_2\text{AlDDSO}_4$ (e).

III.3-Etude de l'interaction Hb/HDL

Rappelons que l'Hb a un point isoélectrique de 7,1 et une dimension ellipsoïdale de 70x55x55 Å. Les interactions entre cette protéine et les HDL seront certainement différentes que celles que nous avons mises en évidence avec les argiles cationiques dans le chapitre précédent. En effet, l'adsorption dépend des paramètres spécifiques de la biomolécule (charge, dimensions), de la solution dans laquelle elle se trouve (force ionique, pH, température), mais aussi la charge du support d'adsorption. Les HDL ont des feuillettes chargés positivement et possèdent des densités de charges plus importantes que les argiles cationiques.

III.3.1-Interaction Hb/HDL à base de Mg

III.3.1.1-Détermination du potentiel Zêta

Le potentiel zêta (ξ) des particules d'HDL permet une estimation de leur charge de surface et par conséquent une caractérisation des interactions entre la protéine et le matériau HDL. Le zétamètre mesure le potentiel zêta de particules colloïdales en déterminant le taux des particules se déplaçant dans un champ électrique connu. Ce potentiel dépend de la viscosité du milieu, la mobilité des particules et la permittivité selon le modèle de Smoluchowsky :

$$\xi = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad (\text{éq.III-1})$$

où : η est la viscosité du milieu, μ la mobilité et ε la permittivité.

Dans cette technique électro-acoustique, un champ électrique à haute fréquence (MHz) est appliqué à la suspension. Il induit une oscillation des particules chargées à la même fréquence que le champ appliqué. Si les particules ont une densité différente de celui du milieu environnant, cette oscillation induit une onde sonore de même fréquence. Ces mesures constituent le spectre ESA (*Electrokinetic Sonic Amplitude*).

Les HDL sont dispersés dans l'eau et agités pendant 24 h sans traitement ultrasonique, ils sont ensuite placés dans une cuvette à une concentration égale à 1 mg/ml. Le pH des solutions est mesuré avant chaque mesure du potentiel zêta. Ces mesures sont faites à

température ambiante. Les résultats obtenus pour les phases HDL et pour les mélanges Hb/HDL ($Q = 1$ et 5) sont repris dans le Tableau III-3.

Dans l'eau, les HDL de référence ont des surfaces chargées positivement et induisent un pH basique ($9 < \text{pH} < 10$). L'Hb dispersée dans l'eau à une surface faiblement positive (+16 mV) et le pH de la solution est neutre (7,2). Lorsque les HDL sont mis en contact avec l'Hb, le pH des solutions décroît à une valeur de 7,8 pour un rapport Hb/HDL $Q = 1$ et à pH 7,0 pour $Q = 5$. Ce changement de pH est associé une diminution nette de la charge des particules en suspension. Lorsque le rapport Q augmente à 5, on observe une légère croissance du potentiel. Ces résultats montrent que des interactions existent entre les particules d'HDL et l'Hb, provoquant une neutralisation des charges de surface des particules HDL.

Tableau III-3 : Potentiels zêta et pH de solutions d'HDL sans et en présence d'Hb.

Matériaux hybrides		Potentiel	
		Zêta (mV)	pH
Protéine	Hb	+16,2	7,2
HDL	Mg ₂ AlCl	+42,2	10,1
	Mg ₂ FeCl	+10,2	9,4
	Mg ₂ AlNO ₃	+35,4	9,9
Hb/HDL (1/1)	Hb/Mg ₂ AlCl	+1,89	7,7
	Hb/Mg ₂ AlNO ₃	+8,73	7,8
Hb/HDL (5/1)	Hb/Mg ₂ AlCl	+10,7	7,1
	Hb/Mg ₂ AlNO ₃	+9,11	7,0

III.3.1.2- Etablissement des isothermes d'adsorption

L'adsorption de l'Hb sur les HDL est réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées avec les argiles cationiques à pH 7 avec un temps d'équilibre de 2 h. Contrairement à ces dernières, les suspensions d'HDL sont moins homogènes du fait de la formation d'agrégats qui ne se dispersent pas en solution et ne permettent pas d'accéder à des solutions colloïdales. Aussi pour réaliser l'adsorption, nous avons utilisé deux protocoles.

- HDL séché : la phase Mg_2AlCl séchée est remise en suspension dans l'eau à une concentration (1mg/ml). Des solutions d'Hb à différentes concentrations (C_i) sont préparées dans une solution tampon phosphate (TP) de concentration 0,1 M à pH 7. Ensuite, la suspension d'HDL est mélangée avec celle de l'Hb à volume égal et laissée sous agitation (100 tr/min) pendant deux heures à 25°C. Le mélange Hb/HDL est centrifugé et la quantité d'Hb non adsorbée dans le surnageant (C_e) est déterminée par absorption UV à 410 nm. On trace C_s (quantité adsorbée) en fonction C_e .

- HDL en suspensions fraîches : les différentes phases HDL gardées en suspension après synthèse sont dispersées dans l'eau à une concentration égale à 0,5 mg/ml et l'on procède à l'adsorption de l'Hb comme décrit précédemment.

La figure III-3-A montre les deux isothermes d'adsorption obtenus en utilisant soit la phase séchée ou fraîche de Mg_2AlCl . On constate qu'en utilisant une fraction fraîche et moins concentrée de Mg_2AlCl , l'adsorption est meilleure que celle obtenue avec l'HDL séché. Elle est 7 fois plus importante. Le séchage du matériau doit probablement provoquer une agrégation des particules qui réduit la surface de contact entre le matériau et les protéines. Ainsi très récemment, il a été montré que l'adsorption de l'Hb est plus importante sur une phase délamillée de Mg_2Al -Lactate ($C_{S_{max}} = 3,94$ g/g) [12].

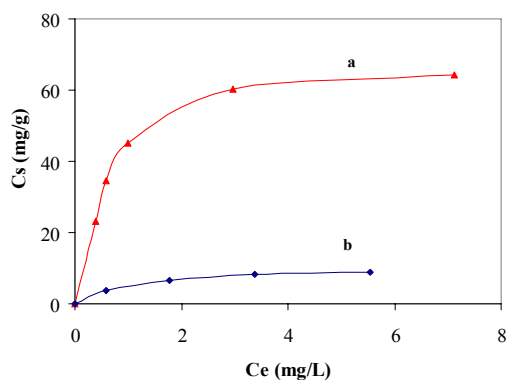


Figure III-3 : Isothermes d'adsorption de l'Hb par une fraction de Mg_2AlCl fraîche (a) et séchée (b).

Les isothermes d'adsorption de l'Hb par les différentes fractions fraîches des HDL montrent la même allure (Figure III-4). La quantité d'Hb adsorbée par les HDLs varie entre 40 et 70 mg/g, avec un maximum pour la phase Mg_2AlDDS .

Les isothermes ont une forme L selon la classification de Giles [20] et peuvent être modélisés suivants les deux modèles de Langmuir et Freundlich (Tableau III-4). Le modèle de Langmuir est le mieux adapté pour l'adsorption de l'Hb sur les HDL. Les valeurs obtenues sont plus proches des valeurs expérimentales avec $C_{s_{max}}$ qui varie entre 60,6 et 77,9 mg/g d'HDL. Le modèle de Langmuir montre une affinité importante dans le cas Hb/Mg₂AlCl.

La quantité adsorbée est très faible par rapport à la capacité d'adsorption des argiles cationiques de type smectite qui atteint 0,9 mg/mg pour la nontronite. Cette différence peut être expliquée par la charge positive des feuillets de l'HDL qui ne favorise pas l'interaction avec l'Hb qui possède une charge globale de même signe à pH neutre.

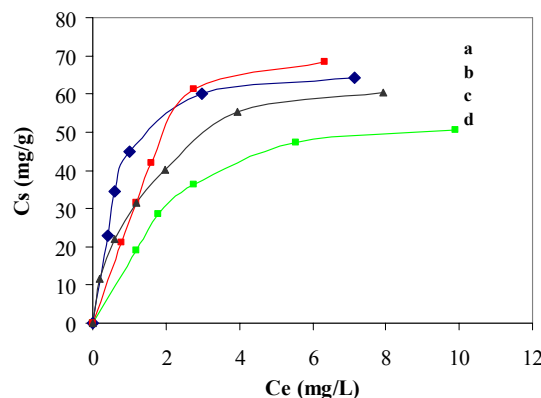


Figure III-4 : Isothermes d'adsorption de l'Hb par des HDL (fraction fraîche) Hb/Mg₂AlDDS (a), Hb/Mg₂AlCl (b) Hb/Mg₂FeCl (c) et Hb/Mg₂AlNO₃ (d) pendant 2 h et à 25°C.

Tableau III-4 : Modélisation des isothermes d'adsorption de Hb/HDLs

a) Caractérisation avec le modèle de Langmuir

Hb/HDL	C _m (mg/g)	L (L/g)	R ²
Mg ₂ AlCl	69,5	1843,5	0,9996
Mg ₂ AlNO ₃	60,6	549,3	0,9969
Mg ₂ AlDDS	77,9	986,9	0,9983
Mg ₂ FeCl	76,8	565,8	0,9895

b) Caractérisation avec le modèle de Freundlich

Hb/HDL	N _f (mg/mg)	K _f	R ²
Mg ₂ AlCl	4,0	1,2	0,9145
Mg ₂ AlNO ₃	2,9	1,4	0,9405
Mg ₂ AlDDS	2,2	1,5	0,8624
Mg ₂ FeCl	2,0	1,6	0,9991

Parallèlement des immobilisations par des procédés de calcination/reconstitution et délamination reconstruction ont également été envisagées mais n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants.

III.3.1.3-Caractérisation structurale des phases Hb/HDL adsorbées

Nous avons caractérisé les différentes phases Hb/HDL correspondant au maximum d'adsorption par diffraction des rayons X et par différentes techniques spectroscopiques. Il faut souligner que ces phases ne présentent aucun signal en spectroscopie infra-rouge ou UV-Vis attribuable à la protéine. Ceci est sans doute lié à une trop faible quantité de protéine immobilisée située en dessous de la limite de détection. Nous avons ensuite préparé des mélanges Hb/Mg₂AlCl_{sec} avec des rapports plus importants, pour permettre leur analyse en spectroscopie.

a-Caractérisation par DRX

Tous les échantillons ont été préparés par sédimentation et séchage des matériaux biohybrides sur plaques de verre. Sur la figure III-5 nous avons porté le diffractogramme de RX de l'hybride Hb/Mg₂AlCl (fraction sèche) correspondant au plateau de l'isotherme d'adsorption. Le diffractogramme montre des réflexions caractérisées par des distances interlamellaires $d_{003} = 36 \text{ \AA}$, $d_{006} = 18 \text{ \AA}$. L'augmentation de la distance basale de $7,5 \text{ \AA}$ pour la phase chlorure de référence à 36 \AA est insuffisante pour envisager l'intercalation de l'Hb dont la taille est $7,0 \times 5,5 \times 5,5 \text{ nm}$ [21]. En effet lorsque l'Hb est adsorbée sur les colloïdes Mg₂Al-lactate, Zhe An rapporte une distance basale de 85 \AA [12]. Il est à noter que cette structure empilée n'est pas observée pour les poudres obtenues par lyophilisation, mais qu'elle se forme lors de la sédimentation lente obtenue par séchage de la suspension du biohybride Hb/Mg₂Al-lactate. L'augmentation de la distance basale observée dans notre cas, ne correspond donc pas à l'intercalation de l'Hb, mais éventuellement à l'intercalation de monomères provenant de la décomposition de l'Hb.

Dans le cas de l'hybride Hb/Mg₂AlCl obtenu par adsorption sur la phase fraîche, on observe un déplacement des raies 00l vers les bas θ (Figure III-6A). En présence de l'Hb, la distance basale d_{003} subit une augmentation de l'ordre de $66,5 \text{ \AA}$, ce qui correspond à la taille de la protéine. Ceci permet alors d'envisager une intercalation de la biomolécule entre les feuillettes HDL suivant le schéma III-1. Ce déplacement des raies 00l est également observé dans le cas de la phase Hb/Mg₂AlNO₃, cependant il s'accompagne d'une forte augmentation

des largeurs de raie correspondant à un désordre turbostratique entre les feuillets (Figure III-6B). Dans le cas de l'hybride Hb/Mg₂FeCl, la distance basale observée est de l'ordre 57 Å (Figure III-6C). Il apparaît donc que pour cette composition, les propriétés d'expansion de la matrice lamellaire soient plus limitées que pour les phases à base de Mg et d'Al. Enfin, le diffractogramme de RX de Hb/Mg₂AlDDS montre une distance basale de 25,6 Å (Figure III-6D), légèrement inférieure à celle du matériau de référence, Cette modification est attribuable à la préparation de l'échantillon par sédimentation plutôt que par séchage. En effet selon les méthodes de préparation des distances variables ont été rapportés dans la littérature [22] pour des phases HDL intercalées par le DDS. L'absence de raie aux bas θ montre que cette composition favorise une adsorption de l'Hb en surface de l'HDL sans intercalation au sein de la structure. Aussi la présence de DDS limite l'échange anionique avec la protéine tout en améliorant l'adsorption de la protéine probablement via des interactions de Vander Walls, ou hydrophobe- hydrophobe.

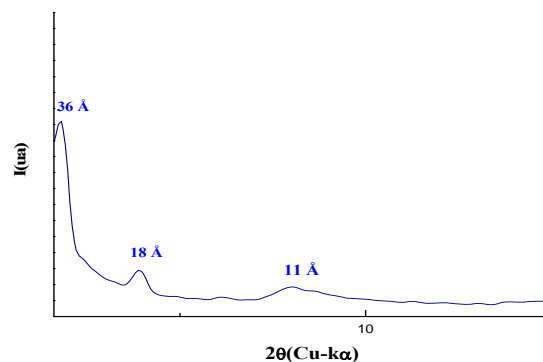


Figure III-5 : Diffractogramme de RX de la phase Hb/Mg₂AlCl fraction séchée.

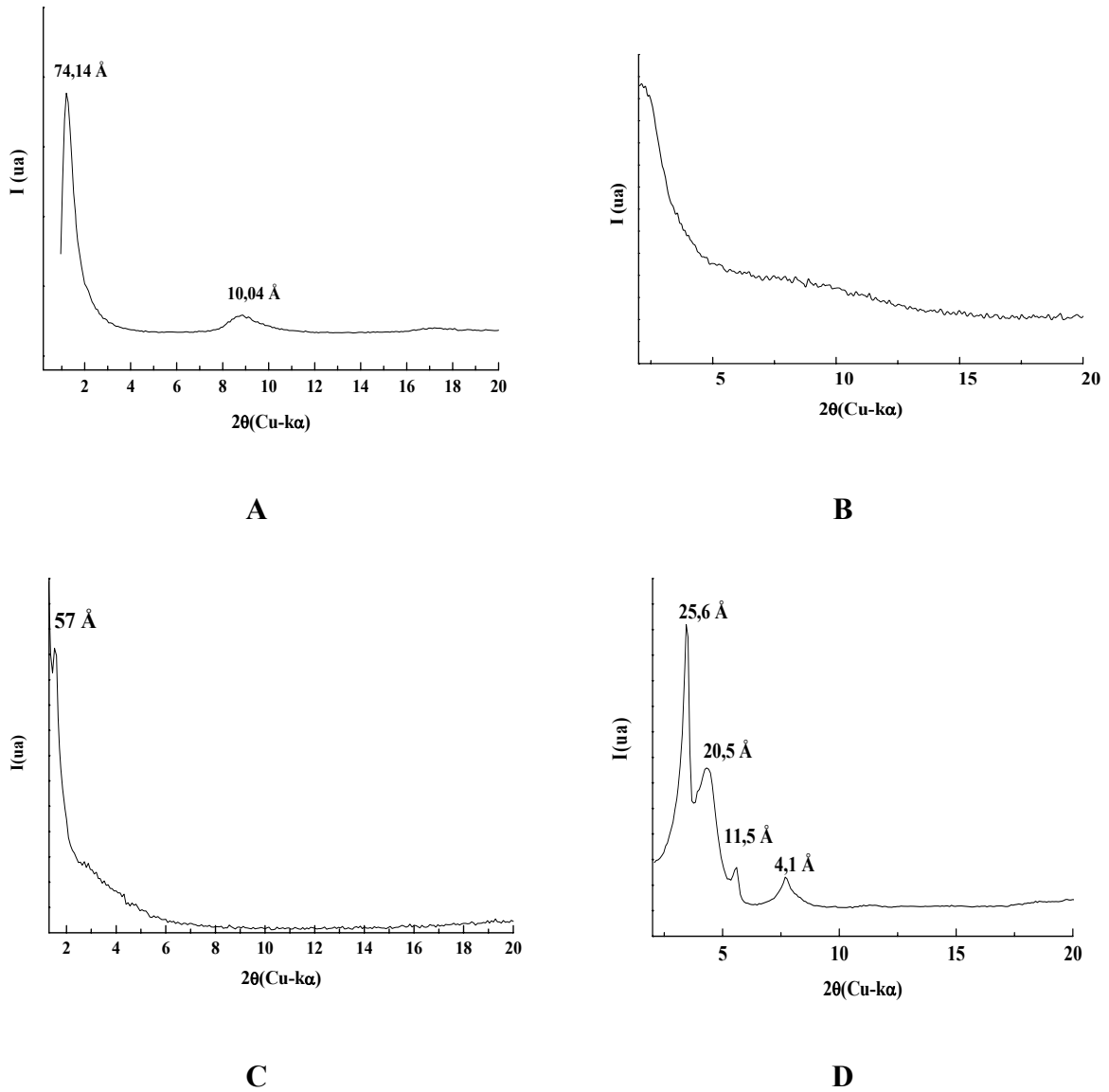


Figure III-6 : Diffractogrammes de RX des phases Hb/Mg₂AlCl (A), Hb/Mg₂AlNO₃ (B), Hb/Mg₂FeCl (C) et Hb/Mg₂AlDDS (D) obtenus sur des films orientés à partir des suspensions fraîches.

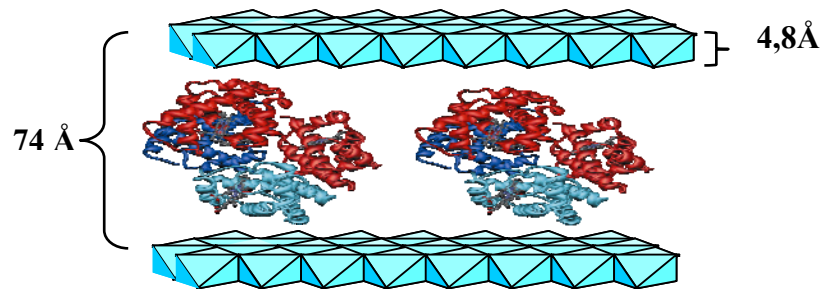


Schéma III-1: Intercalation de l'Hb dans Mg₂AlCl.

b- Spectroscopie Infrarouge

Rappelons que l'Hb est caractérisée par des vibrations des amides I et II qui sont liés aux propriétés structurales de la protéine [23]. Les spectres infrarouges des biohybrides Hb/Mg₂AlCl peuvent apporter des renseignements concernant la modification de la structure de protéine, après son adsorption et/ou intercalation dans les HDL. Cependant l'adsorption de l'Hb par les fractions fraîches des HDL a été réalisée à de faibles concentrations en protéine, ce qui ne permet pas de distinguer la présence de l'Hb en spectroscopie. Afin de caractériser malgré tout les interactions entre l'Hb et les phases HDL, des mélanges Hb/Mg₂AlCl avec des taux d'Hb plus élevés ont été réalisés.

Les spectres IR montrent les vibrations caractéristiques des amides I et II de l'Hb (1640 et 1540 cm⁻¹) uniquement pour des fortes concentrations en protéine (Hb/HDL ≥ 0,2) (Figure III-7). Aux plus faibles concentrations en Hb, on observe uniquement les bandes de vibration caractéristiques des phases HDL. Le pic situé vers 1000 cm⁻¹ correspond au bande de vibration de l'anion phosphate, provenant d'un échange des ions chlorures de l'HDL par les anions phosphates du tampon utilisé pour disperser l'Hb.

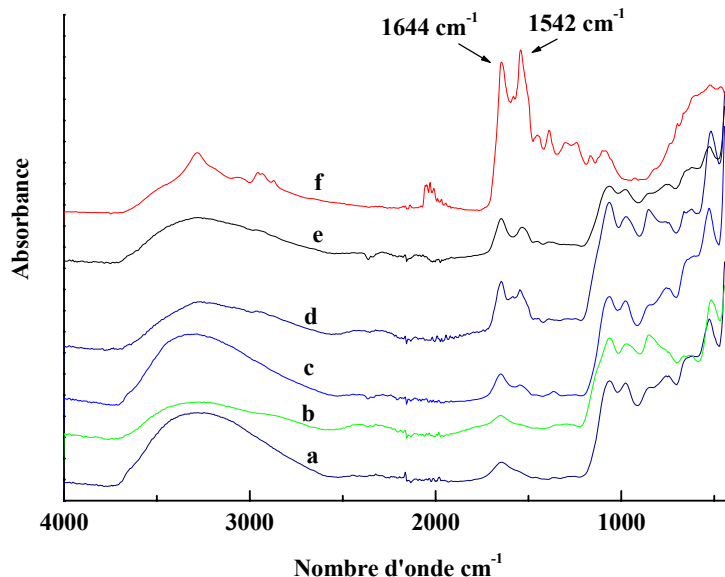


Figure III-7 : Spectres FTIR d'un mélange Hb/Mg₂AlCl avec des rapports Hb/HDL Q = 0,02 (a) ; 0,06 (b) ; 0,2 (c) ; 0,8 (d) ; 1,5 (mg/ml) (e) et l'Hb pure (f).

c- Spectroscopie UV-Vis

Rappelons que le spectre d'absorption d'UV-Vis de l'Hb est caractérisé par une bande à 410 nm correspondant à l'absorbance de l'hème, appelée la bande de Soret. Les spectres UV-visible des films biohybrides Hb/Mg₂AlCl séchés sur des lames de quartz montrent l'absence de la bande de Soret pour les faibles rapports Hb/HDL, elle apparaît à 406 nm pour des rapports supérieurs à 0,2 mg/ml (Figure III-8).

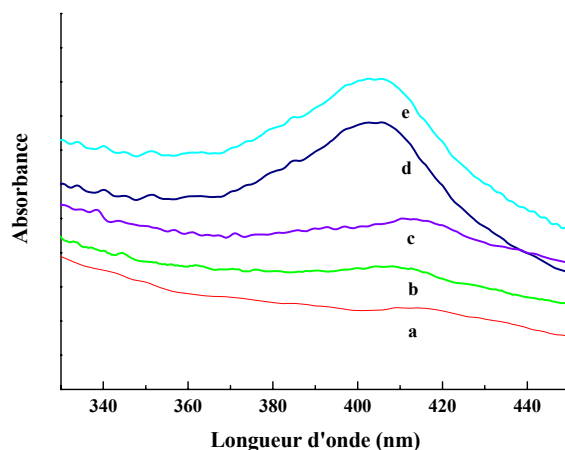


Figure III-8 : Spectres d'absorbance UV-visible d'un mélange Hb/Mg₂AlCl pour des rapports de Hb/HDL 0,08 (a) ; 0,1 (b) ; 0,2 (c) ; 0,4 (d) et 0,8 mg/ml (e).

III.3.1.4-Caractérisation morphologique

Une étude morphologique par microscopie électronique à balayage a été réalisée sur les échantillons HDL de références et sur les phases biohybrides correspondantes au maximum d'adsorption (Figure III-9). Les morphologies des HDL de référence dépendent fortement de la composition des matrices. La phase Mg₂AlCl est constituée d'agglomérats de petites plaquettes. L'image MEB de Mg₂AlNO₃ montre un empilement de plaquettes arrondies de différents diamètres. Pour la phase Mg₂AlDDS, les images MEB mettent en évidence une nette diminution de la taille des particules et une forte agglomération.

L'adsorption de l'Hb par ces HDL modifie la morphologie de ces matériaux. Dans le cas de Hb/Mg₂AlCl, on observe une modification du niveau d'agrégation avec l'apparition d'agrégats de l'ordre de 50 et 100 nm (Figure III-9-B). L'image MEB de la phase de Hb/Mg₂AlNO₃ (Figure III-9-D) ne permet plus de distinguer aussi nettement les plaquettes arrondies d'HDL. Le changement de la morphologie est moins marqué dans le cas de

l'hybride Hb/Mg₂AlDDS (Figure III-9-F). Si on la compare avec la phase pure (Figure III-9-E), la taille des particules et le niveau d'agrégation semblent peu modifiés. Ces dernières semblent être comme orientées les unes aux autres.

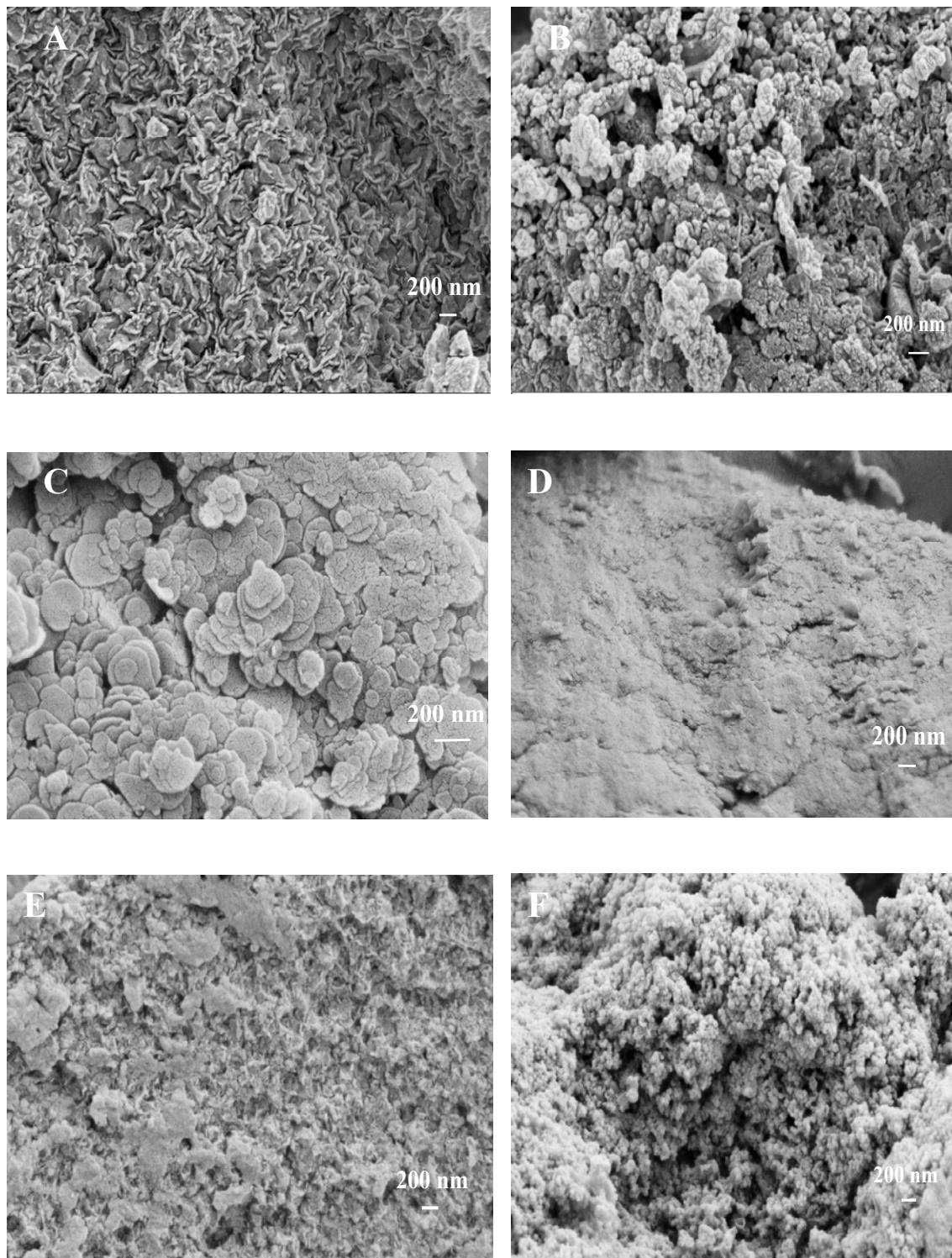


Figure III-9 : Cliché MEB de Mg₂AlCl (A), Hb/Mg₂AlCl (B), Mg₂AlNO₃(C), Hb/Mg₂AlNO₃ (D) Mg₂AlDDS (E) et Hb/Mg₂AlDDS (F).

III.3.2-Interaction Hb/ZnAl

Après l'immobilisation de l'Hb dans des HDL de type MgAl par l'adsorption, nous avons testé une autre matrice HDL (Zn_2AlCl). En effet, les HDL Zn_2AlCl et Mg_2AlCl ont des propriétés physico-chimiques différentes, ce qui peut modifier les interactions entre la protéine et la matrice. La comparaison de leurs propriétés est résumée dans le tableau III-5.

Tableau III-5 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des HDL.

HDL	CEA (meq/g)	Densité de charge (e/nm^2)	pH _{eq}	Potentiel zêta (mV)
Mg_2AlCl	4,07	2,47	10	+42,2
Zn_2AlCl	2,56	2,49	6,6	+43,7

Pour le mélange Hb/ Zn_2AlCl ($Q = 1$) le pH de la solution reste à 6,6 et le potentiel zêta ne change presque pas. Les tailles de particules augmentent de 267 nm sans protéine à 473 nm lorsque la protéine est en interaction avec l'HDL (Tableau III-5).

L'adsorption de l'Hb par Zn_2AlCl (fraîche) a été réalisée dans les mêmes conditions que décrites précédemment (paragraphe III.3.2). Comme pour les phases à base de Mg, on obtient un isotherme de forme L (Figure III-10A) que nous avons modélisé suivant Langmuir avec un R^2 de 0,9762. Les valeurs calculées de la capacité d'adsorption maximale et la constante d'affinité sont respectivement $C_{S_{max}} = 0,244$ mg/mg et $L = 469$. Il semblerait que l'Hb présente plus d'affinité pour une phase Zn_2AlCl que pour l'HDL Mg_2AlCl .

La diffraction RX de la phase adsorbée de Hb/ Zn_2AlCl_{ads} montre la disparition des raies caractéristique de HDL, le contact avec la protéine induit donc une exfoliation totale des feuillettes (Figure III-10B).

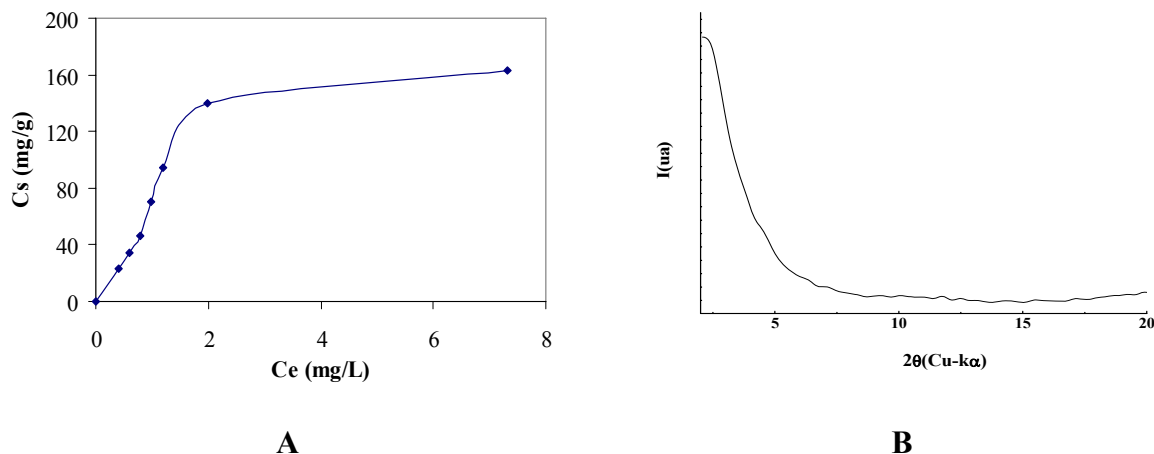


Figure III-10 : A) Isotherme d'adsorption de Hb/Zn₂AlCl; B) DRX de la phase Hb/Zn₂AlCl_{ads} ($C_{S_{max}}$).

III.4- Coprécipitation des matériaux biohybrides

Les capacités d'adsorption des HDL vis-à-vis de l'Hb étant assez limitées (100 mg de protéine par g HDL), nous avons choisi d'immobiliser cette protéine par la méthode de coprécipitation afin d'augmenter la quantité d'Hb immobilisée dans la matrice HDL. Cette méthode s'avère être une méthode non dénaturante pour des enzymes ayant un point isoélectrique inférieur à 7, comme l'uréase [7], l'alkaline phosphatase [8,9] et la trypsine [10].

III.4.1- Synthèse par coprécipitation Mg₂Al-Hb

Le protocole est similaire à celui utilisé pour la préparation des HDL de référence mais dans un volume plus réduit. Nous avons utilisé 10 ml de sels métalliques MgCl₂ et AlCl₃ de concentration totale 0,1 M avec un rapport $M^{II}/M^{III} = 2$ additionnés à une solution aqueuse d'Hb à température ambiante et sous atmosphère d'azote), le pH de synthèse étant égal à 9 (Tableau III-6). Le rapport théorique massique Q, défini comme le rapport d'Hb sur la masse d'HDL théorique calculée à partir du nombre de moles de chlorures de métaux ajouté, a été modulé entre 1/20 et 2, en faisant varier la quantité de protéine en solution. La réaction est stoppée après deux heures. Le précipité est récupéré par centrifugation et lavé avec l'eau décarbonatée. La quantité de protéine non immobilisée et présente dans les eaux de lavage est déterminée par l'absorbance UV à 410 nm. Pour un rapport Hb/HDL = 1, 98 % de la protéine est immobilisée. La méthode de coprécipitation permet donc d'obtenir un taux

d'immobilisation de Hb plus élevé que l'adsorption. Le biohybride obtenu par coprecipitation est noté Mg_2Al-Hb_{cop} , il a une couleur verte.

Plusieurs essais de coprecipitation d'HDL Mg_2Fe en présence d'Hb ont été menés sans succès. La présence de la protéine dans le milieu réactionnel provoque la précipitation d'un matériau amorphe non identifié. Ces synthèses ne seront donc pas présentées dans ce mémoire.

Tableau III-6 : Conditions de coprecipitation des matériaux biohybrides Mg_2Al-Hb_{cop}

	Sel		base
	$MgCl_2$	$AlCl_3$	NaOH pH = 9
C (M)	0,066	0,033	0,2
V (ml)	10		-
Hb/HDL (en masse)	1/20, 1/4, 1/2, 1/1, 2/1		-

III.4.2-Caractérisation par DRX

Les diffractogrammes des composés biohybrides Mg_2Al-Hb_{cop} sont reportés dans la figure III-11. La formation de phases HDL est confirmée par la présence des raies $00l$, 012 et 110 . On observe cependant une diminution d'intensité et un élargissement des raies en fonction de la quantité de Hb immobilisée. Il y a une perte de la cristallinité et un désordre important de la structure pour les phases Mg_2Al-Hb_{cop} comparé à la phase de départ. L'augmentation du rapport Hb/ Mg_2AlCl induit un désordre dans la structure HDL, avec une diminution progressive du domaine de cohérence et une exfoliation progressive des feuillettes (Schéma III-2).

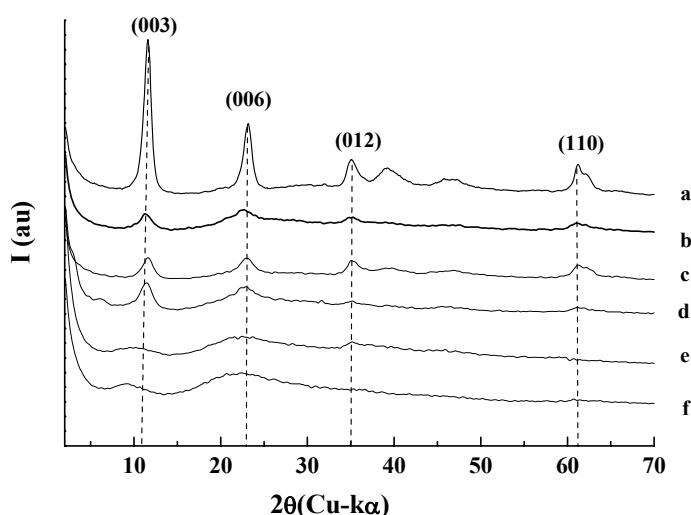


Figure III-11 : Diffractogrammes de RX Mg_2Al-Cl (a) et Mg_2Al-Hb_{cop} avec $Q = 0,05$ (b),
0,25 (c), 0,5 (d), 1,0 (e), 2,0 (f).

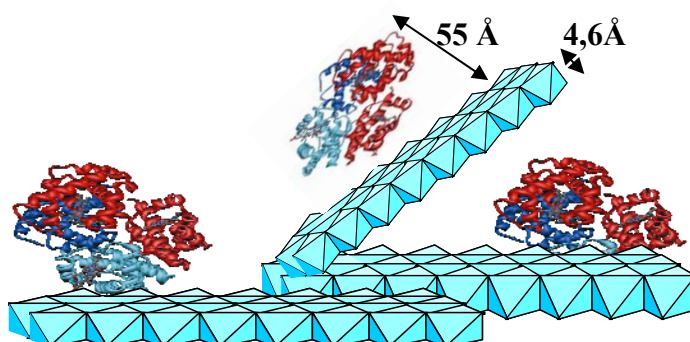


Schéma III-2 : Représentation schématique de la structure de Mg_2Al-Hb .

III.4.3- Spectroscopie Infrarouge

Les spectres FTIR des hybrides Mg_2Al-Hb_{cop} sont portés sur les figures III-12. On constate que pour le faible rapport Hb/HDL ($Q = 0,02$) les vibrations caractéristiques de la protéine ne sont pas observées. A partir d'un rapport Hb/HDL $\geq 0,5$ nous observons les bandes de vibrations C=O (amide I) à 1638 cm^{-1} et de déformation d'amide II (NH) à 1522 cm^{-1} de l'Hb. Lorsque Q augmente, on constate que les vibrations du réseau HDL ($\nu_{M-O} = 550\text{ cm}^{-1}$, $\delta_{O-M-O} = 440\text{ cm}^{-1}$) subissent un élargissement, confirmant la perte d'ordre dans la structure HDL observée en DRX. De plus pour les faibles valeurs de $Q < 1$, la vibration (ν_3)

caractéristique de l'anion CO_3^{2-} est présentée à 1359 cm^{-1} ; lorsque la quantité de protéine immobilisée dans le matériau augmente cette bande disparaît. L'absence d'anions carbonate alors peut s'expliquer par le recouvrement complet des particules d'HDL par la protéine, empêchant ainsi l'adsorption des ions carbonate.

Les modifications des bandes de vibration caractéristiques de la protéine peuvent être reliées à une dénaturation partielle de la biomolécule immobilisée. La figure III-12B présente les déconvolutions des spectres entre 1300 et 1800 cm^{-1} réalisées à partir des dérivées secondaires des spectres. Les positions et intensités des groupes amide I caractéristiques des vibrations d'élongation C=O et C-N et de déformation N-H ne sont pas affectées après l'immobilisation de la protéine. Les composantes de la structure secondaire ne sont donc pas modifiées. Par contre, les amines II observées à des valeurs $< 1600\text{ cm}^{-1}$ sont elles modifiées. En particulier, la bande à 1579 cm^{-1} décroît fortement et les bandes à 1541 et 1508 cm^{-1} sont fortement élargies. Ces modifications peuvent être reliées à la formation de liaisons hydrogène entre la protéine et les feuilletts hydroxylés des HDL.

III.4.4-Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV est complémentaire à l'infrarouge, ces deux techniques nous informent sur l'éventuelle modification de la structure de la protéine immobilisée. Les amides I et II ne sont pas distingués par IR pour les faibles taux d'Hb immobilisée. De même, la bande de Soret n'est pas observée pour des rapports Hb/HDL $Q < 1$. Le spectre de la phase biohybride $\text{Mg}_2\text{Al-Hb}_{\text{cop}}$ ($Q = 1$) présente un maximum à 404 nm et un épaulement à 350 nm , alors que la bande de Soret de l'Hb seule est située à 410 nm (Figure III-13). L'apparition de l'épaulement à 350 nm traduit un changement au moins partiel dans l'environnement de l'hème de la protéine. Cependant il est difficile de relier ce changement à un changement de conformation précis.

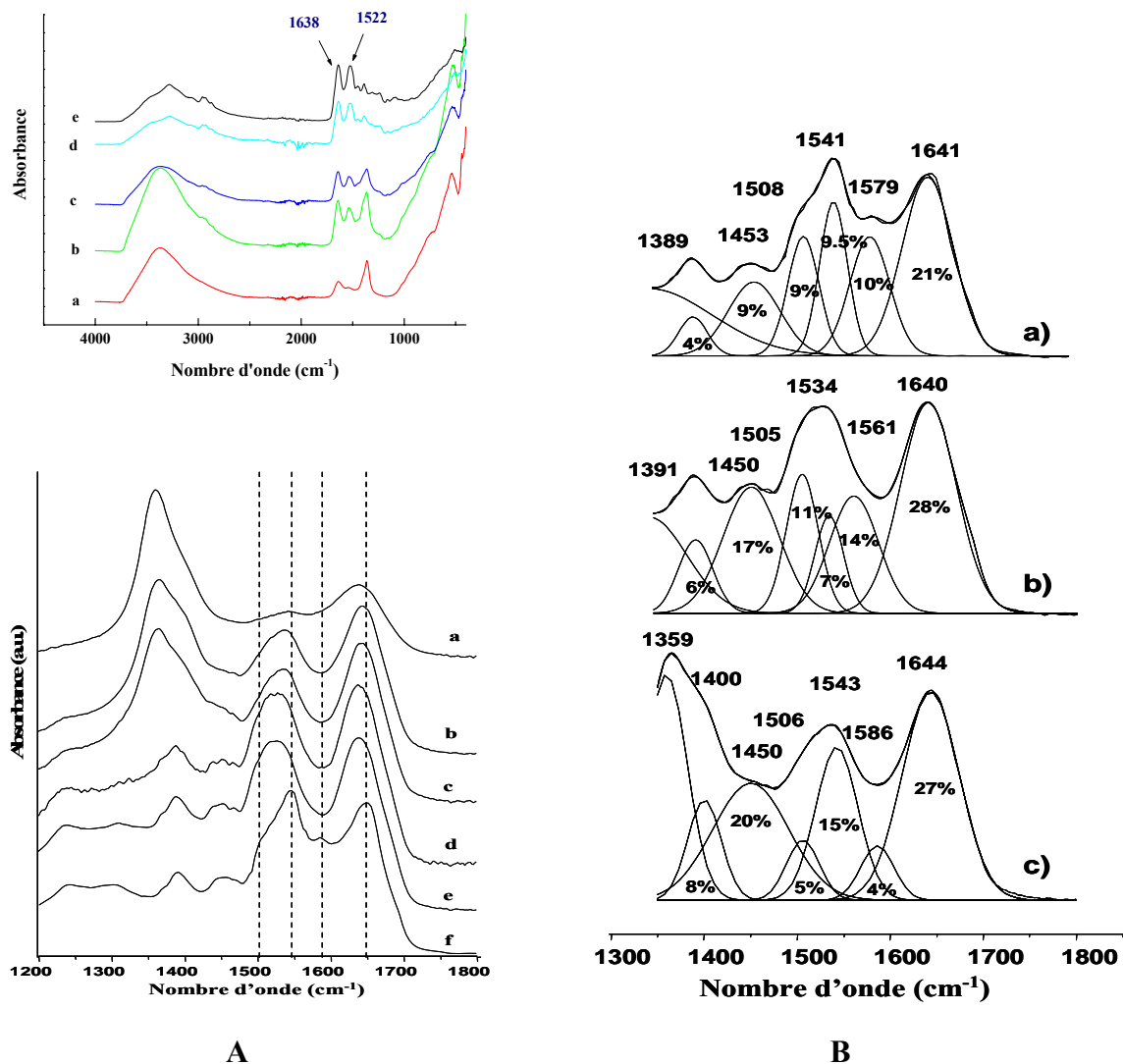


Figure III-12 : A) Spectres infrarouge de $Mg_2Al-Hbcop$ (A) à différentes rapport Hb/HDL 0,02 (a), 0,25 (b) 0,50 (c), 1 (d), 2 (e) et Hb (f).

B) Déconvolution des spectres ATR-FTIR of Hb (a), $Mg_2Al-Hbcop$ $Q = 2$ (b), $Q = 0,25$ (c).

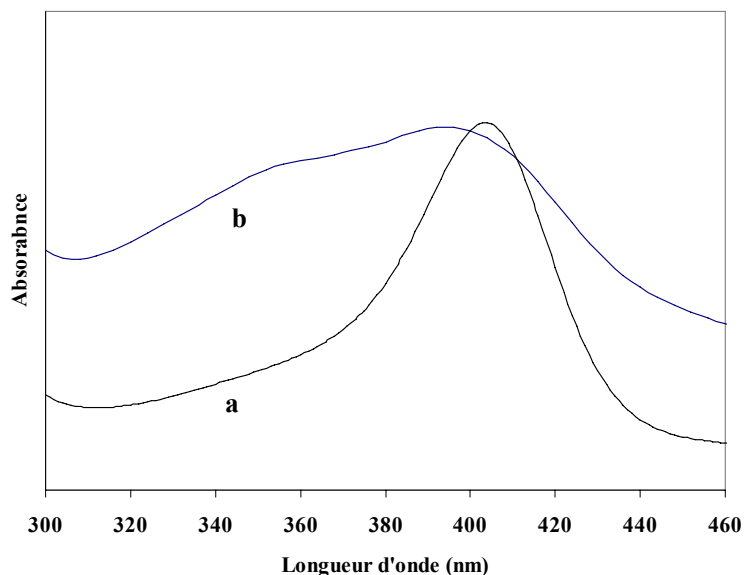


Figure III-13 : Spectre d'absorbance UV-Vis de Hb (a) et Mg₂Al-Hb_{cop} (b).

III.4.5-Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) est une technique spectroscopique d'analyse largement utilisée pour étudier la conformation des protéines. Elle permet d'évaluer les changements d'états conformationnels d'une protéine lors de son immobilisation. La mesure du DC dans l'UV lointain (180-260 nm), zone d'absorption de la liaison peptidique contient des informations sur leur structure secondaire (hélices α , feuilletts β et structures désordonnées). Les signaux dichroïques dans l'UV proche (250-330 nm) correspondent à la zone d'absorption des acides aminés aromatiques et fournissent des informations sur l'environnement de ces acides aminés. Le changement ou le déplacement de la bande de Soret résulte de l'interaction entre une portion de l'hème et la structure tertiaire. La présence d'une protéine dénaturée est facilement identifiable par déformation de la forme du spectre. Notons qu'il a été montré par DC que la structure de l'Hb est maintenue après immobilisation dans la matrice ZrP [24,25].

Sur la figure III-14, le spectre DC de l'hybride Mg₂Al-Hb_{cop} ($Q = 1$) est comparé à celui de l'Hb libre, les deux spectres étant normalisés par rapport au maximum d'amplitude négative. Les deux bandes d'absorbance à 210 et 225 nm de faibles intensités sont caractéristiques de l'hélice α par contre celle à 212 et la bande intense à 195 nm correspondent à la chaîne β [26]. On observe un changement dans l'allure générale du spectre lorsque l'Hb est immobilisée ce qui suggère à nouveau la possibilité d'une déformation de la

structure de la protéine immobilisée. Il est à noter que l'ajout d'HDL dans une solution d'Hb ne modifie pas le spectre de DC de l'Hb libre.

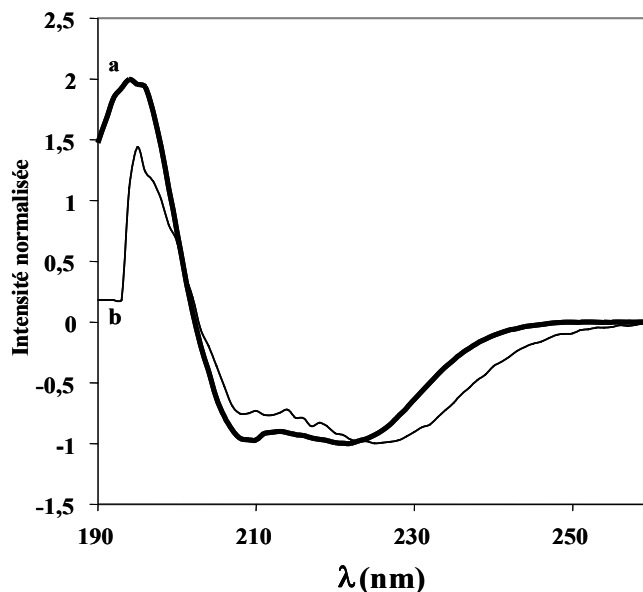


Figure III-14 : Spectre de dichroïsme circulaire de Hb (a) et Mg₂Al-Hb_{cop} (b).

III.4.6-Analyse morphologique

La morphologie du matériau biohybride Mg₂AlHb_{cop} a été comparée à celle du matériau de référence Mg₂AlCl à la fois en microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (TEM) (Figure III-15). Les clichés MEB montrent assez peu de différence par rapport au précurseur Mg₂AlCl. Toutefois les particules agrégées présentent des épaisseurs plus faibles et induisent la formation d'un matériau plus poreux. Lors de la coprécipitation, la croissance des cristaux se produit à l'interface protéine solution, provoquant leur agglomération autour de la protéine. Ceci est clairement observé sur les clichés TEM. Pour le matériau de référence Mg₂AlCl on observe des particules hexagonales poly-disperses avec des tailles allant de 20 nm à 100 nm et une valeur moyenne de 45 nm. Avec Mg₂Al-Hb_{cop}, on observe des agrégats de grande taille, généralement supérieure à 500 nm, conjointement avec de petites particules en périphérie.

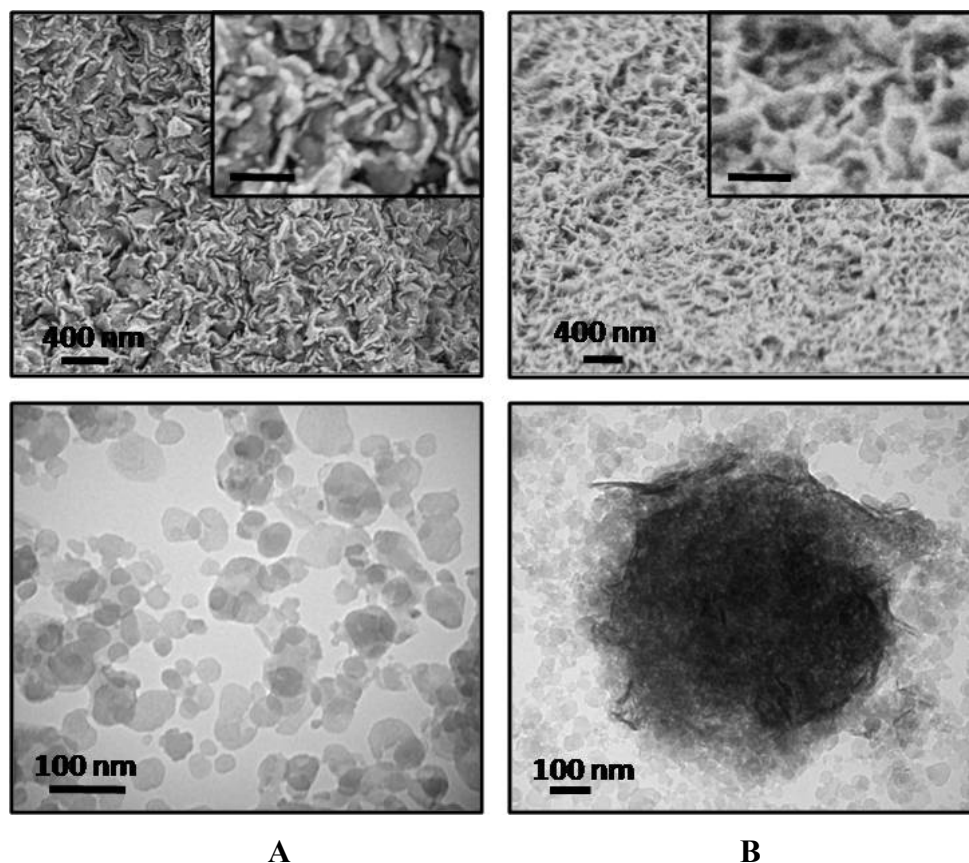


Figure III-15 : Clichés MEB et TEM de (A) Mg_2AlCl et (B) Mg_2Al-Hb_{cop} ($Q = 1$).

La formation de tels agrégats est probablement liée à une interaction forte entre la composante inorganique et la biomolécule. Contrairement à ce que l'on avait observé lors de l'adsorption de l'Hb sur les HDL, le pH de la solution contenant une suspension de Mg_2AlHb_{cop} reste voisin de celui du matériau de référence Mg_2AlCl (Tableau III-6). De même, le potentiel zêta des particules de Mg_2AlHb_{cop} est plus élevé que celui obtenu pour le mélange.

Tableau III-7 : Potentiel zêta et pH d'une suspension Mg_2Al-Hb_{cop}

HDL	pH	Potentiel zêta (mV)
Hb	7,2	+16,2
MgAlCl	10,1	+42,2
Hb/ Mg_2AlCl_{ads} Q = 1	7,7	+1,89
Mg_2AlHb_{cop} Q = 1	9,8	+25,6

III.4.7-Coprecipitation de Zn_2Al -Hb

Le biohybride Zn_2Al -Hb_{cop} est obtenu par coprecipitation de l'HDL Zn_2Al en présence de l'Hb dans les mêmes conditions expérimentales décrites pour la synthèse de Mg_2AlHb_{cop} . Le rapport HDL/Hb a été fixé à 1 et le pH =7,5.

La figure III-16 compare les diffractogrammes de RX du biohybride Zn_2Al -Hb_{cop} et de l'HDL de référence Zn_2AlCl . Comme pour la phase biohybride $MgAl$ -Hb_{cop}, la présence de l'Hb dans le matériau HDL provoque un élargissement des raies 00l résultant d'une diminution de domaine de cohérence suivant le plan normal aux feuillet. Contrairement à l'hybride Mg_2AlHb_{cop} , on observe clairement les différentes raies caractéristiques de l'HDL. La présence de la raie (110) montre que l'organisation des feuillet selon l'axe c est maintenue.

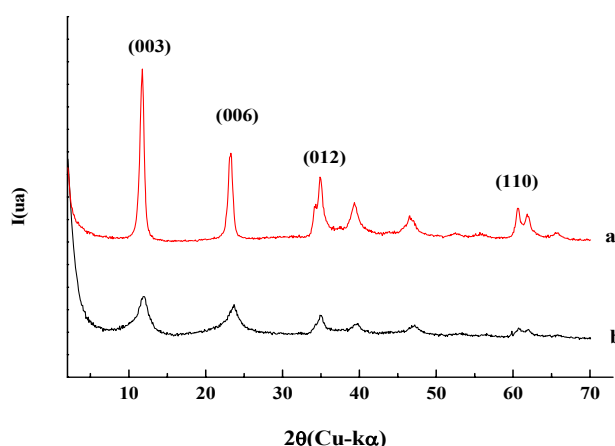


Figure III-16 : Diffractogrammes de RX du Zn_2AlCl (a) et Zn_2Al -Hb_{cop} (b) (Q = 1).

Les spectres d'infrarouge (Figure III-17) confirment la présence de l'Hb dans la phase coprecipitée avec la présence des bandes intenses amine I et II à 1640 et 1540 cm^{-1} .

Le spectre UV-Vis du biohybride Zn_2AlHb_{cop} fait apparaître une bande large située entre de 500 et 300 nm avec un maximum à 412 nm et un épaulement à 350 nm (Figure III-18). De nouveau, l'immobilisation par coprecipitation de l'Hb dans une phase HDL provoque une modification de l'environnement de l'hème de la protéine.

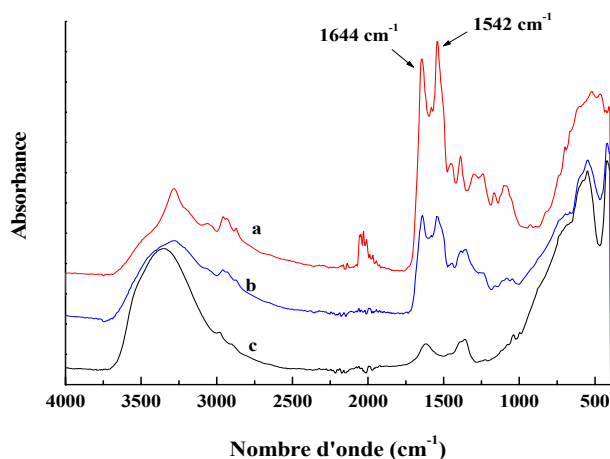


Figure III-17 : Spectres IR de Hb (a), $Zn_2AlClHb_{cop}$ (b) et Zn_2AlCl (c).

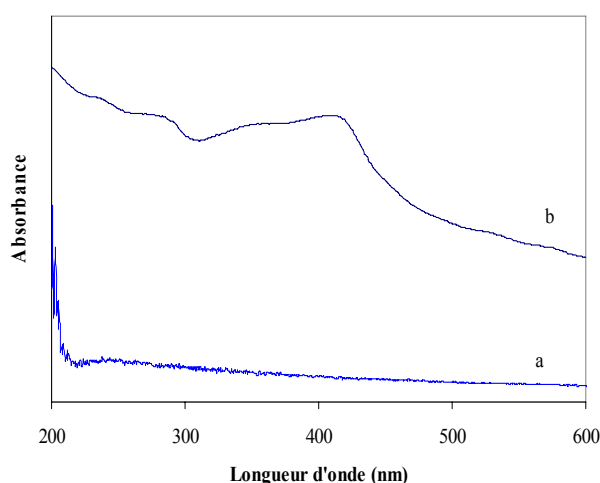


Figure III-18: Spectres d'absorbance de l'UV-visible de Zn_2AlCl (a) et Zn_2Al-Hb_{cop} (b).

III.5- Caractérisations électrochimiques des biohybrides

Dans cette partie, nous avons étudié le comportement électrochimique des HDL et de l'Hb immobilisée par adsorption et par coprecipitation dans ces matériaux. Des électrodes de carbone vitreux ont été recouvertes d'un film HDL (suspension fraîche) ou de mélanges Hb/HDL. Elles sont utilisées comme électrodes de travail dans un système à trois électrodes comportant également une contre électrode en Pt et une référence Ag-AgCl. Les expériences d'électrochimie sont réalisées dans une solution de tampon phosphate (0,1 M) à pH 7. Nous avons utilisé la voltammétrie cyclique pour étudier l'interaction Hb/HDL et la voltammétrie linéaire avec électrode tournante pour déterminer la perméabilité des films d'HDL. La réponse ampérométrique des bioélectrodes vis-à-vis de la détection du peroxyde d'hydrogène sera également décrite.

III.5.1-Perméabilité des films d'HDL

Après la caractérisation physico-chimique et morphologique des matériaux biohybrides Hb/HDL, nous avons étudié la perméabilité des films d'HDL déposés sur une électrode de carbone vitreux, afin d'évaluer la diffusion d'espèces dans ces matériaux. Comme pour les argiles cationiques, nous avons utilisé l'hydroquinone (HQ) comme sonde électroactive. La figure III-19 montre les courbes de voltammétrie linéaire enregistrées avec une électrode modifiées par 20 μg de Mg_2AlCl pour différentes vitesse de rotation de l'électrode de 250 à 2000 tr/min, la vitesse de balayage est fixée à 10 mVs^{-1} . L'analyse de ces courbes suivant l'équation de Koutechy-Levich (éq III-1) permet d'évaluer la perméabilité du film :

$$\frac{1}{i_{\text{lim}}} = \frac{1}{0,62nFAC_s D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2}} + \frac{\delta_m}{nFAKC_s D_m} \quad (\text{éq. III-2})$$

L'équation III-1 est composée de deux termes, le premier représente le courant en absence de membrane, caractéristique de la diffusion de l'HQ dans la solution. Le second terme est lié à la diffusion de substrat dans la membrane. Il dépend du produit de la constante d'équilibre, de la constante de diffusion du substrat dans la membrane et de l'épaisseur du film. En traçant $1/i_{\text{lim}} = f(1/\omega^{1/2})$ on peut déterminer la perméabilité du film :

$$P_m = \frac{KD_m}{\delta_m} \quad (\text{éq. III-3}).$$

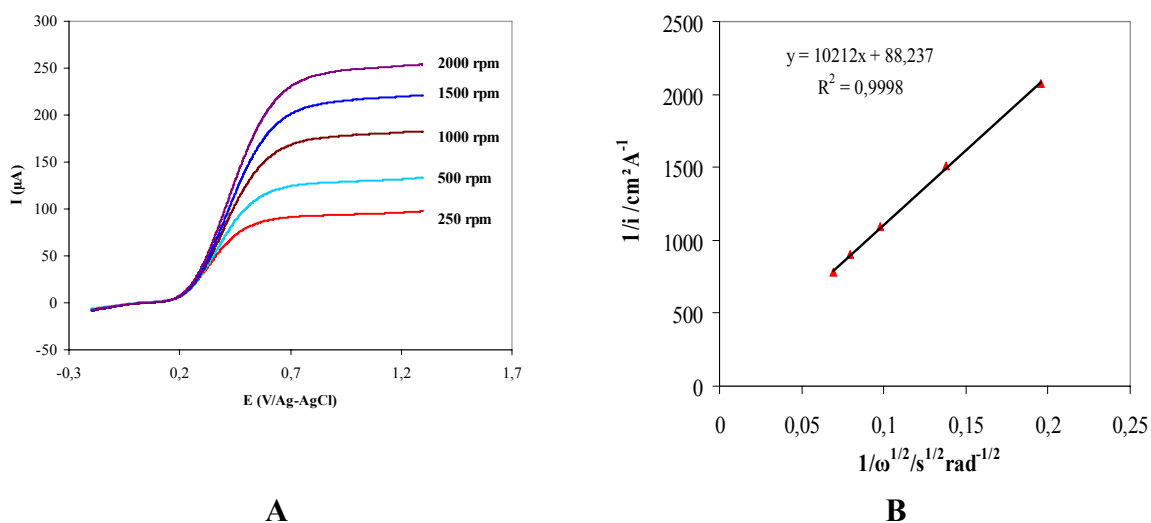


Figure III-19 : Voltammogrammes linéaires (A) et analyse de Koutechy-Levich (B) d'une électrode modifiée par Mg_2AlCl (20 μg , $\nu = 10 \text{ mVs}^{-1}$, 1 mM d'HQ dans 0,1 M de TP pH 7).

Ces mesures ont été faites pour toutes les membranes (HDL) et les biomembranes hybrides obtenues par adsorption et par coprecipitation et les résultats sont reportés dans le tableau III-8. Pour les phases adsorbées, le rapport Hb/HDL est fixé à 5 comme pour les études en voltammétrie cyclique. Dans ce cas, le biofilm est stabilisé par une réticulation chimique dans la vapeur de glutaralhéhyde (GA) pendant 10 min. L'épaisseur des films a été mesurée au profilomètre.

Tableau III-8 : Tailles des particules, perméabilités et épaisseurs des films HDL et des biohybrides Hb/HDL

	HDL et matériaux biohybrides	Taille (nm)	Epaisseur (nm)	Perméabilité 10^{-2} cm/s
HDL (20 μ g)	Mg ₂ AlCl	150	150	5,8
	Mg ₂ AlNO ₃	150	95	13,5
	Mg ₂ FeCl	410	360	8,6
	Mg ₂ AlDDS	145	400	5,5
	Zn ₂ AlCl	260	-	3,8
Adsorption 5/1 (100/20 μ g)	Hb/Mg ₂ AlCl	410	980	0,17
	Hb/Mg ₂ AlNO ₃	415	660	0,17
	Hb/Mg ₂ FeCl	1720	706	0,18
	Hb/Mg ₂ AlDDS	1040	1240	0,64
	Hb/Zn ₂ AlCl	473	-	0,57
Coprecipité 1/1 (200 μ g)	Mg ₂ AlClHb _{cop}	230 (49%) +1710 (22%)	8200	0,40
	Zn ₂ AlClHb _{cop}	-	-	0,20

Les HDL de références ont des tailles de particules assez semblables (150 nm), sauf Mg₂FeCl qui présente des particules de plus grosses tailles (450 nm). L'épaisseur des films varient entre 100 et 400 nm. Ces films sont plus fins que ceux obtenus avec les argiles cationiques. Leur perméabilité varie entre 5 et 13,5 10^{-2} cm/s. Ces valeurs sont légèrement supérieures à celle trouvées pour un film de Mg₂AlCO₃ (1,6 10^{-2} cm/s) [9]. La perméabilité de Zn₂AlCl est voisine de la valeur rapportée pour une phase Zn₃AlCl (2,7 10^{-2} cm/s) [27]. Ces valeurs de perméabilité sont dix fois plus grandes que celles trouvées avec les films d'argiles

cationiques. Cette différence de perméabilité entre les argiles cationiques et les HDL avait déjà été observée précédemment [27].

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ajout d'Hb dans une suspension d'HDL provoque l'agglomération des particules et les films qui en résultent ont une épaisseur importante ($700 < x < 1200$ nm). Les perméabilités des biomembranes Hb/HDL ainsi préparées par adsorption sont par conséquent plus faibles par rapport à celles des HDL seuls. La quantité importante d'Hb immobilisée forme une couche bloquante en surface des HDL limitant la diffusion de l'HQ dans la membrane. La perméabilité est améliorée en présence du DDS intercalé, cela malgré l'épaisseur importante du film Hb/Mg₂AlDDS qui dépasse 1 μ m. Ces résultats corroborent les analyses faites en MEB.

Le matériau hybride (Mg₂Al-Hb_{cop}) obtenu par coprecipitation est plus perméable que les phases adsorbées et que la phase coprécipitée Zn₂Al-Hb_{cop}. Bien que l'épaisseur du film atteigne 8 μ m, du fait de la taille importante des particules, la substance électroactive peut diffuser à travers la membrane, ce qui est relié à la structure poreuse observée pour ce matériau en MEB.

III.5.2-Comportement électrochimique de Mg₂FeCl en milieu neutre

Avant d'étudier le comportement électrochimique de l'Hb immobilisée dans les HDL, nous nous sommes intéressés au comportement électrochimique du fer présent dans les feuillettes HDL. Une électrode de carbone vitreux modifiée par 20 μ g de Mg₂FeCl ne montre aucun signal en voltammétrie cyclique dans une solution de TP (pH 7) (Figure III-20A). De plus l'ajout de H₂O₂ dans la solution d'électrolyte ne provoque aucune modification du signal.

Nous avons utilisé une sonde redox, le ferrocyanure de potassium K₄Fe(CN)₆, afin de mettre en évidence une éventuelle activité électrochimique du fer. En effet, Villemure a montré que le signal de K₄Fe(CN)₆ était plus important lorsque le nickel ou le cobalt situés dans les feuillettes d'HDL servent de relais d'électrons [28]. La figure III-20B montre la comparaison entre les courbes de voltammétrie cyclique des électrodes modifiées par Mg₂AlCl et Mg₂FeCl, dans une solution contenant du K₄Fe(CN)₆. Le signal est plus grand avec Mg₂AlCl. Contrairement à ce qui est observé dans les rouilles vertes (Fe^{II}Fe^{III}(OH)₆CO₃ où le Fe^{III} peut être réduit partiellement [29], le fer situé dans le feuillet MgFe n'est pas

électroréductible en milieu neutre Cette observation a également été faite par Ibtissem Ben Assaker [30].

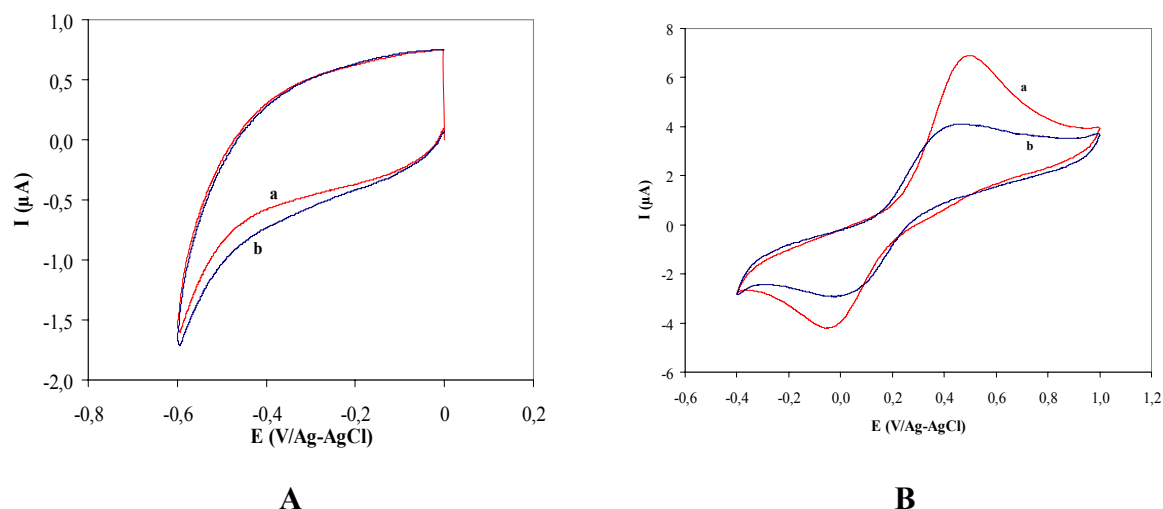


Figure III-20 : A) Courbes de voltammétrie cyclique d'une électrode modifiée par Mg_2FeCl sans (a) et en présence de $0,1 \text{ mM } H_2O_2$ (b) (TP pH 7 $v = 200 \text{ mV/s}$).

B) Courbes de voltammétrie cyclique d'une électrode modifiée par Mg_2AlCl (a) et Mg_2FeCl (b) dans une solution de TP contenant $0,1 \text{ mM}$ de $K_4Fe(CN)_6$ $v = 200 \text{ mV/s}$.

III.5.3-Etude électrochimique des biohybrides Hb/HDL

Dans le chapitre II, nous avons montré que l'Hb immobilisée dans des argiles cationiques pouvait subir un transfert direct d'électron entre son site actif (hème) et la surface de l'électrode. De plus, nous avons montré que le fer présent dans les feuillets des argiles pouvait servir de relais d'électron et augmenter ainsi le signal électrochimique caractéristique de l'Hb. Dans ce chapitre, nous étudierons le comportement électrochimique de l'Hb immobilisée dans les HDL, soit par adsorption ou par coprécipitation.

III.5.3.1-Etude des phases adsorbées Hb/HDL

Les électrodes modifiées ont été préparées en déposant un mélange de suspensions aqueuses Hb/HDL de rapports 20/20, 40/20 et 100/20 μg sur la surface d'une électrode de carbone vitreux. Les quantités d'Hb immobilisée étant plus importantes que la capacité d'adsorption du matériau, la biomembrane est stabilisée par une réticulation chimique. Ainsi, après séchage une nuit à $4^\circ C$, les électrodes sont placées 10 min dans de la vapeur de glutaraldehyde (GA), elles sont en suite remises dans une solution tampon pendant 20 min pour permettre la réhydratation du biofilm. Sans réticulation chimique, on observe un

relargage de 40% de l'Hb dans la solution d'électrolyte. Après réticulation, la perte n'excède pas 5%.

Les courbes de voltammétrie cyclique (VC), enregistrées avec des électrodes modifiées par les biofilms Hb/Mg₂Al ayant un rapport égal à 1/1 et 2/1 dans une solution tampon phosphate pH 7,0 sous atmosphère inerte d'argon, ne montrent aucun signal électrochimique. Nous avons dû augmenter ce rapport à 5 pour observer un signal (Figure III-21). Les voltammogrammes obtenus après immobilisation de l'Hb dans les différents HDL sont représentés dans la figure III-21A. Dans tous les cas on observe un signal réversible centré autour de -0,30 V. La biomembrane Hb/Mg₂AlNO₃ donne un signal un peu plus intense que les autres biohybrides. Contrairement à ce que l'on avait obtenu avec les argiles cationiques, la présence du fer structural dans l'HDL n'améliore pas le signal électrochimique. La détermination de E_{1/2} (Tableau III-9) ne montre pas de différences considérables entre les différents biohybrides. L'intensité du courant anodique varie en fonction de la vitesse de balayage (v) (Figure III-21B, C). Toutes ces caractéristiques électrochimiques confirment qu'il s'agit du signal d'oxydo-réduction de fer de l'hème de l'Hb [31].

Pour déterminer le taux d'Hb électroactive immobilisée, nous avons utilisé l'équation de Laviron [32] :

$$Q = nFA \Gamma \quad (\text{éq.III-4})$$

La charge Q est déterminée par intégration du pic de réduction. Cependant les signaux étant assez faibles, cela peut engendrer des erreurs importantes. Les pourcentages d'Hb électroactives sont résumés dans le tableau III-9. La masse initiale d'Hb déposée sur l'électrode est de 100 µg, soit 1,53 10⁻⁹ moles, le nombre de moles d'Hb actives dans le cas des hybrides Hb/Mg₂AlNO₃ et Hb/Mg₂AlCl correspond respectivement à 4,6 10⁻¹¹ et 1,1 10⁻¹¹ moles, soit environ 2,9 % et 0,7 %. Ces pourcentages sont faibles malgré la quantité importante de l'Hb déposée sur l'électrode.

La détermination de la durée de vie de l'activité de l'Hb immobilisée par adsorption dans Hb/Mg₂AlNO₃ est réalisée en mesurant le signal électrochimique en VC à différentes périodes. Entre les mesures, l'électrode modifiée est stockée dans une solution tampon phosphate à 4°C. On remarque une diminution importante de l'intensité du courant après dix jours, ensuite, le courant est stable au moins un mois (Figure III-22).

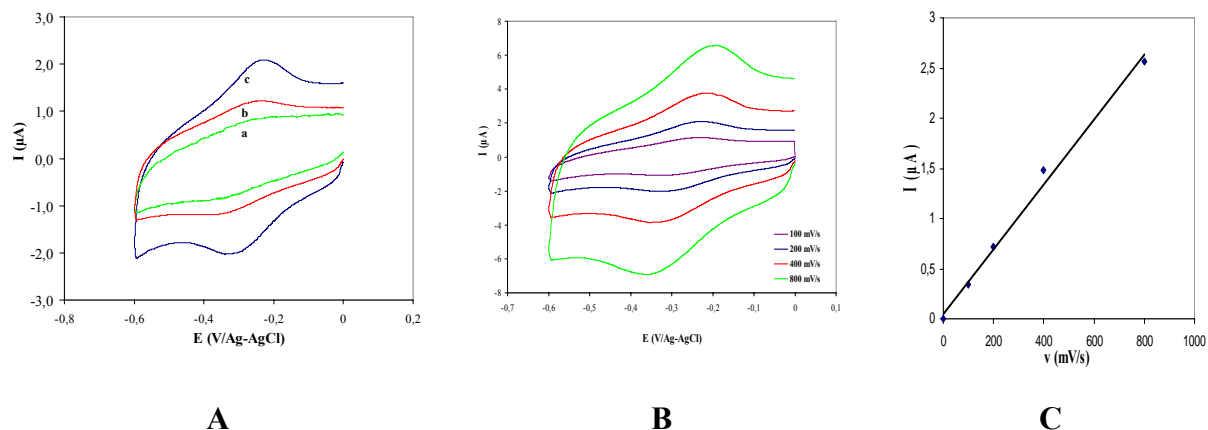


Figure III-21 : Courbes de voltammétrie cyclique des biohybrides (A), Hb/Mg₂FeCl (a), Hb/Mg₂AlCl (b), Hb/Mg₂AlNO₃ (c) (TP pH 7, $v = 200$ mV/s)

B) Courbes de voltammétrie cyclique de Hb/Mg₂AlNO₃ à différentes vitesses de balayage et C) Variation de I_{p_a} en fonction de v .

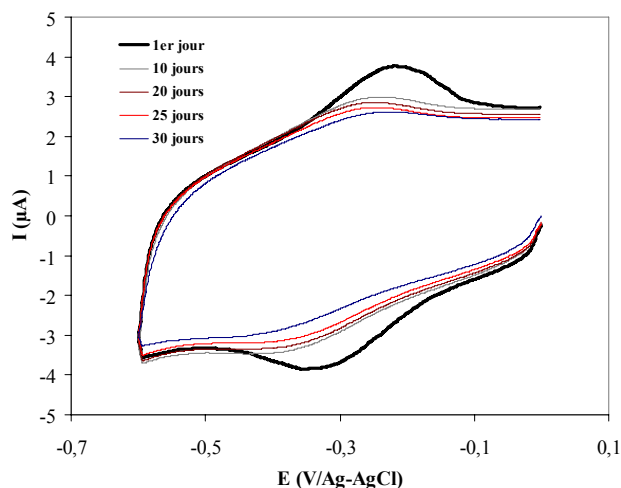


Figure III-22 : Stabilité dans le temps du signal électrochimique de Hb/Mg₂AlNO₃ (TP pH 7, $v = 200$ mV/s).

III.5.3.2- Etude électrochimique des phases coprécipitées

Avec les biohybrides préparés par coprécipitation, aucun signal électrochimique n'est observé pour des rapports inférieurs à 1. La figure III-23 reprend les courbes de VC obtenues avec Mg₂Al-Hb_{cop} et Zn₂AlHb_{cop} ($Q = 1$). Les intensités des courants obtenus sont semblables à celles obtenues dans le cas des biohybrides préparés par adsorption (Tableau III-8). La quantité de protéine présente sur l'électrode est la même (100 μ g). Le taux d'Hb électroactive dans le cas des biohybrides Mg₂Al-Hb_{cop} et Zn₂Al-Hb_{cop} est estimé à respectivement 1,8 et 1,4 %. L'intensité du signal varie linéairement avec la vitesse de balayage, confirmant le processus d'adsorption généralement observé lors du transfert d'électrons sur l'hème (Figure

III-23C). Après deux mois de stockage d'une solution de Mg_2Al-Hb_{cop} sous forme congelée, on retrouve toujours le même signal électrochimique caractéristique de l'Hb.

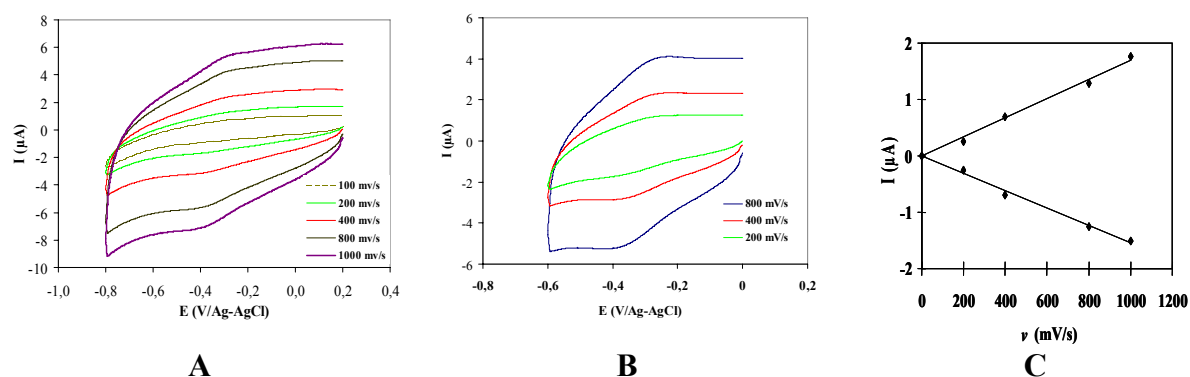


Figure III-23 : Courbes de voltammétrie cyclique des électrodes modifiées avec (A) Mg_2AlHb_{cop} , (B) Zn_2AlHb_{cop} , (C) variation de l'intensité des courants en fonction de vitesse de balayage pour Mg_2Al-Hb_{cop} (0,1 M TP pH 7,0 $\nu = 200$ mV/s)

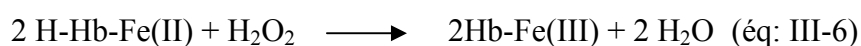
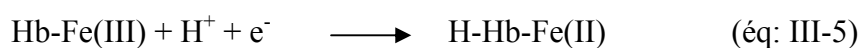
Tableau III-9 : Caractérisations électrochimiques des matériaux biohybrides Hb/HDL

Matériaux biohybrides		$-E_{1/2}$ (V)	ΔE_p (mV)	$-I_{p_c}$ (μA) (200 mV/s)	I_{p_c} (μA) en présence H_2O_2 (0,1 mM)	% d'Hb électro- active
Adsorption Hb/HDL (100/20 μg)	Mg_2AlCl	0,30	60	0,25	1,0	0,7
	Mg_2AlNO_3	0,26	53	0,80	1,8	2,9
	Mg_2FeCl	0,29	59	0,40	1,5	1,0
	Mg_2AlDDS	0,32	59	0,20	2,0	0,4
	Zn_2AlCl	0,35	62	0,20	2,0	0,7
Coprecipitation (200 μg)	Mg_2Al-Hb_{cop}	0,34	64	0,27	1,4	1,8
	Zn_2Al-Hb_{cop}	0,34	62	0,21	1,6	1,3

III.5.4-Dosages ampérométriques du peroxyde d'hydrogène

Les propriétés électro-catalytiques des différents matériaux biohybrides Hb/HDL vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène ont été étudiées en voltammetrie cyclique. Les courbes de VC correspondantes sont reprises dans la figure III-24 pour les phases à base de Mg obtenues par adsorption et dans la figure III-25 pour les phases Hb/Zn₂AlCl_{ads} et Zn₂Al-Hb_{cop}.

Après l'ajout de H₂O₂ dans la solution d'électrolyte, on observe une augmentation du courant cathodique et une diminution du courant anodique, ce qui correspond à la décomposition électrocatalytique du peroxyde d'hydrogène par l'hème de la protéine suivant le mécanisme :



Les intensités des courants cathodiques obtenus pour les différents biohybrides avant et après l'ajout de H₂O₂ sont reportées dans le tableau III-9. L'intensité des courants catalytiques est d'environ 2 μA pour une concentration en H₂O₂ de 0,1 mM.

Nous avons utilisé des électrodes de carbone vitreux modifiées avec les différents biohybrides Hb/HDL décrits précédemment pour doser le peroxyde d'hydrogène par chrono-ampérométrie. Les électrodes de carbone vitreux utilisées ont une surface de 0,196 cm² (5 mm) et tournent à une vitesse de rotation de 500 tr/min. Le dosage de H₂O₂ se fait dans une solution tampon phosphate (0,1 M) à pH 7,0 sous atmosphère inerte d'argon à 25°C au potentiel appliqué E_{app} = -400 mV. L'ajout de H₂O₂ dans la cellule se fait grâce à une seringue.

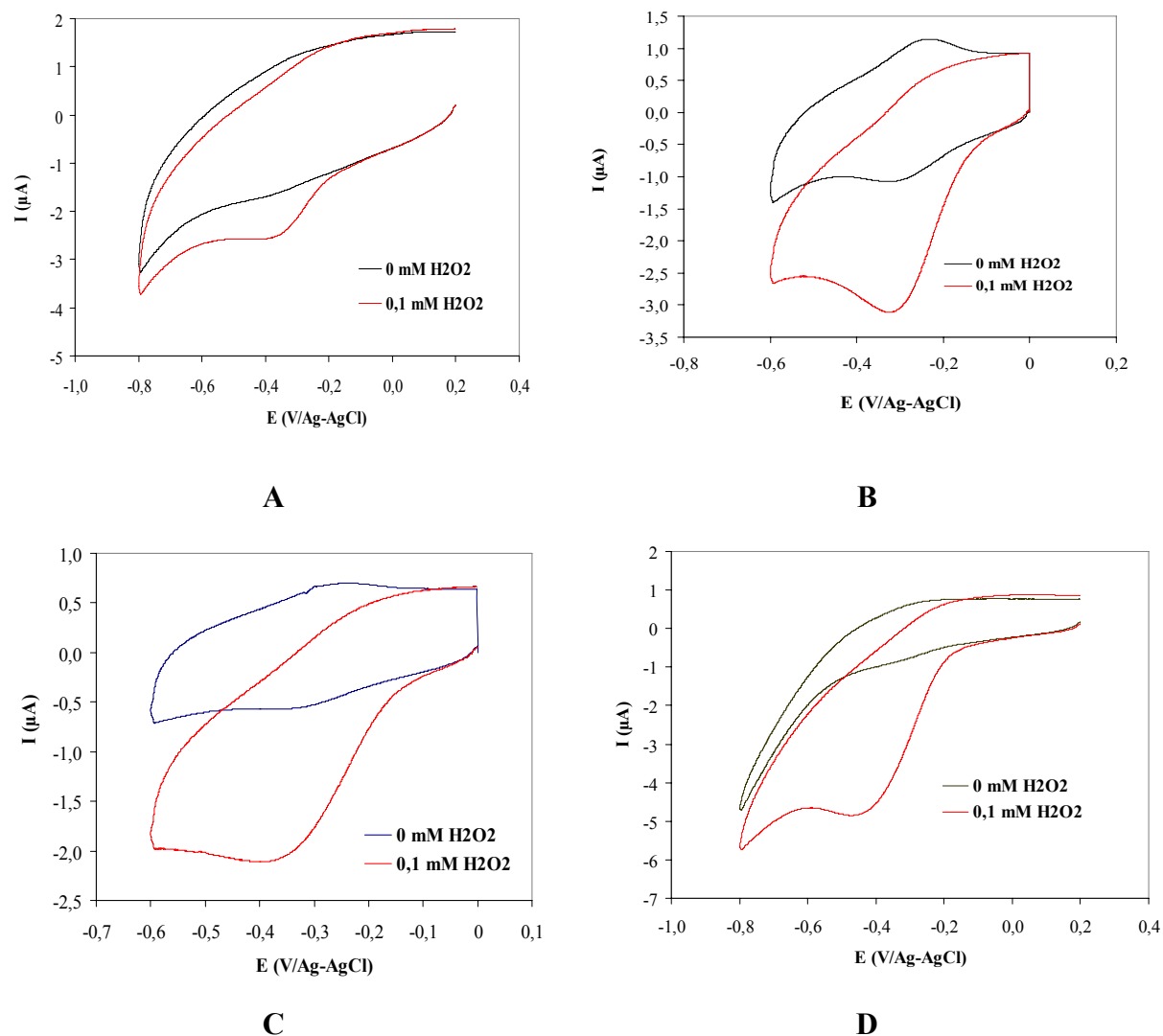


Figure III-24 : Courbes de voltammétrie cycliques de Hb/Mg₂AlCl (A), Hb/Mg₂AlNO₃ (B), Hb/Mg₂FeCl (C) et Hb/Mg₂AlDDS(D) avant et après ajout de 0,1 mM H₂O₂ dans 0,1 M TP pH = 7,0 ($\nu = 200$ mV/s).

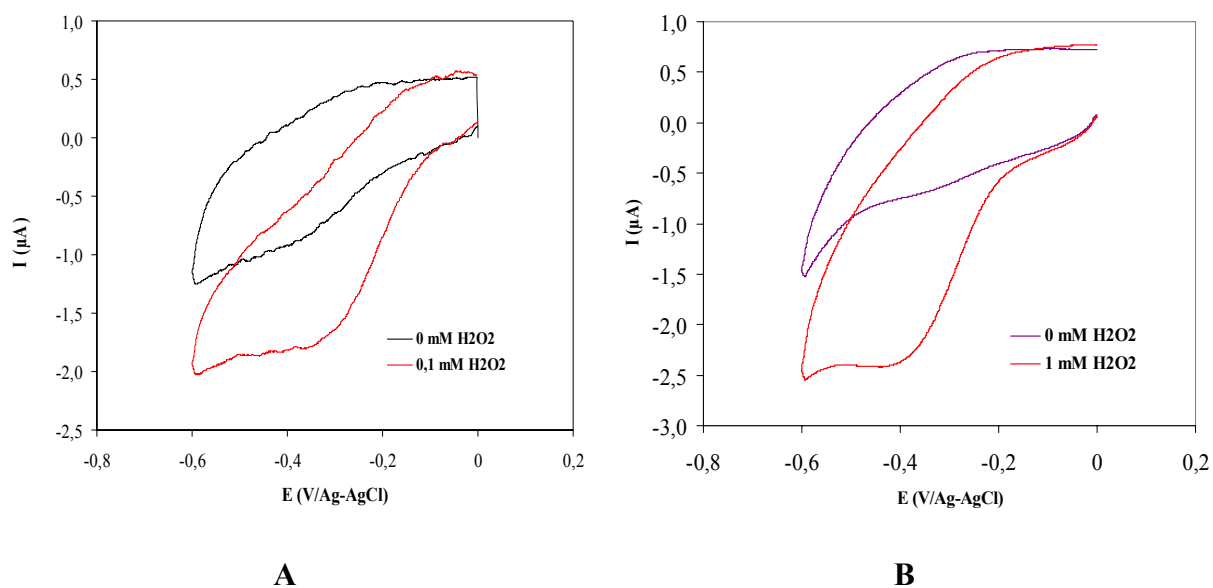


Figure III-25 : Courbes de voltammétrie cycliques de Hb/Zn₂Al_{ads} (A) et Zn₂Al-Hb_{cop} (B) avant et après ajout de 0,1 M H₂O₂ dans 0,1 M TP PH = 7,0 ($v = 200$ mV/s).

Les figures III-26 et III-27 montrent les courbes d'étalonnage obtenues avec les phases préparées par adsorption et par coprécipitation. Les caractéristiques des biocapteurs sont résumées dans le tableau III-10. Pour les phases adsorbées, les sensibilités varient entre 1 et 17 mA/M cm² suivant la séquence : Mg₂FeCl >> Mg₂AlNO₃ > Mg₂AlDDS > Mg₂AlCl > Zn₂AlCl. Notons que le biocapteur Hb/Zn₂AlCl a la sensibilité la plus faible dans un domaine de concentration étendu jusqu'à 0.16 mM.

Les phases coprécipitées donnent systématiquement une sensibilité plus importante que les phases équivalentes adsorbées. On remarque que la courbe d'étalonnage obtenue avec la phase Mg₂Al-Hb_{cop} est très différente des autres, avec une très grande sensibilité (37 A/M cm²) dans un domaine de concentration en H₂O₂ très faible (10⁻⁸ M). Trois biocapteurs différents ont été préparés avec ce matériau, ils donnent une sensibilité moyenne de 28 A/M cm² avec une déviation standard de 18 %.

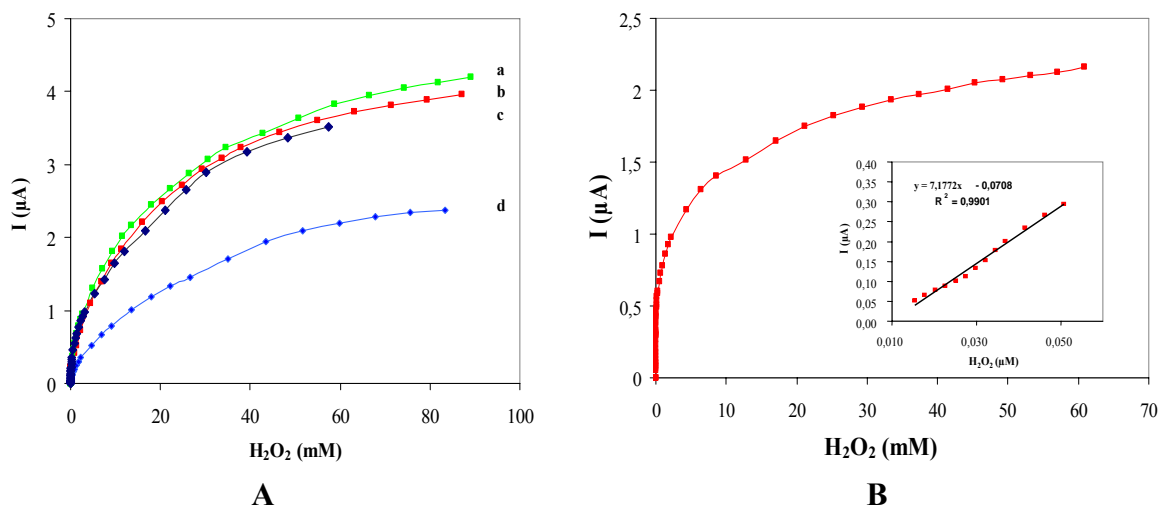


Figure III-26 : Dosages de H₂O₂ par (A) Hb/Mg₂AlNO₃ (a) Hb/Mg₂AlDDS (b) Hb/Mg₂FeCl (c) et Hb/Mg₂AlCl (d) et Mg₂Al-Hb (B).

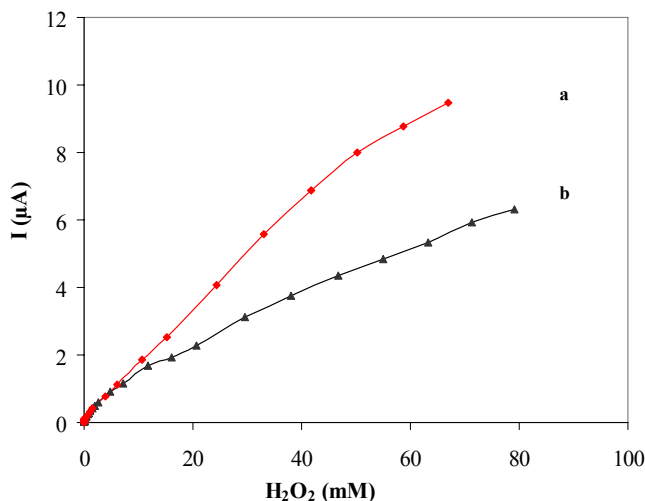


Figure III-27: Dosages de H₂O₂ par Zn₂Al-Hb_{cop} (a) et Hb/Zn₂AlCl_{ads} (b).

Tableau III-10: Caractéristiques des biocapteurs à H₂O₂.

Matériaux hybrides	S (A/Mcm ²)	I _{max} (µA/cm ²)	GL (M)	R ² (n)
Hb/Mg ₂ AlCl _{ads}	1,37 10 ⁻³	12	18 - 277 10 ⁻⁶	0,9887 (9)
Hb/Mg ₂ AlNO _{3ads}	6,63 10 ⁻³	21	4 - 69 10 ⁻⁶	0,9909 (8)
Hb/Mg ₂ AlDDS _{ads}	2,50 10 ⁻³	20	4 - 118 10 ⁻⁶	0,9981 (12)
Hb/Mg ₂ FeCl _{ads}	17,30 10 ⁻³	-	4 - 26 10 ⁻⁶	0,9866 (7)
Hb/Zn ₂ AlCl _{ads}	1,23 10 ⁻³	-	0,033 - 1,6 10 ⁻⁴	0,9960 (10)
Mg ₂ AlHb _{cop}	37	11	1,5 - 8 10 ⁻⁸	0,9901 (13)
Zn ₂ AlHb _{cop}	12 10 ⁻³	-	1 - 18 10 ⁻⁶	0,9905 (6)

III.6-Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'hémoglobine pouvait être immobilisée dans les HDL soit par adsorption ou par coprécipitation. Les capacités d'adsorption des HDL vis-à-vis de l'Hb sont beaucoup plus faibles que celles trouvées pour les argiles cationiques. Les phases obtenues par adsorption montrent sur les diffractogrammes RX un déplacement de la raie 003 vers les bas téta qui suggère l'intercalation de la protéine entre les feuillets HDL. Ce n'est pas le cas pour les phases obtenues par coprécipitation. Dans ce cas, les plaquettes d'HDL se forment à la surface de la protéine qui sert de facteur de forme (template). La morphologie des biohybrides et l'accessibilité de la protéine sont différentes selon le procédé d'immobilisation utilisé (Schéma III-3).

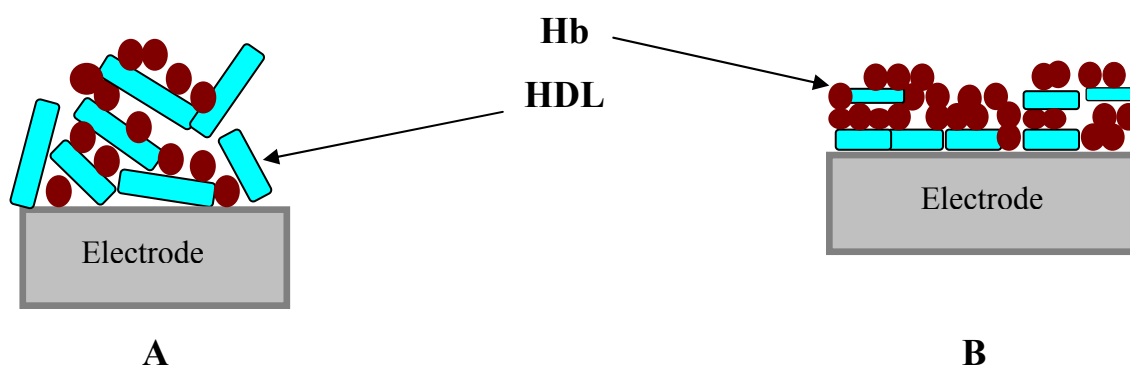


Schéma III-3 : Schémas représentatifs de l'Hb immobilisée à la surface d'une électrode au sein d'un HDL par coprécipitation (A) ou adsorption (B).

L'interaction Hb-HDL provoque une dénaturation, au moins partielle, de la structure tertiaire de la protéine par la formation de liaisons hydrogènes entre la protéine et les feuillets hydroxylés des HDL. Ces interactions provoquent un changement dans l'environnement de l'hème de la protéine, ce qui a pour conséquence de diminuer fortement l'activité électrochimique de la protéine immobilisée. Il est nécessaire d'immobiliser une très grande quantité de protéine pour observer un signal caractéristique de l'hème de la protéine. Seulement 2% de la quantité de la protéine immobilisée est électroactive. Cette dénaturation n'avait pas été observée avec les argiles cationiques. Cependant les électrodes modifiées préparées avec des HDL sont beaucoup plus perméables que celles obtenues avec les argiles cationiques, ce qui permet une diffusion plus aisée du substrat (H_2O_2) à travers le biocapteur pour atteindre les quelques sites hème impliqués dans l'électrocatalyse. Enfin, nous avons également mis en évidence que la présence de fer dans les feuillets d'HDL n'améliore pas le

transfert électronique, contrairement à ce que l'on avait observé avec les argiles cationiques riche en fer octaédrique.

Le biocapteur à H_2O_2 , préparé avec la phase $MgAl-Hb_{cop}$, a une sensibilité particulièrement importante mais dans un domaine de concentration très limité. Il semblerait que les biocapteurs préparés avec les phases $ZnAl$ soient moins performants que ceux préparés avec les phases $MgAl$.

III.7-Références :

-
- [1] Castantino U , Ambrogi V. , Nocchetti M. and Perioli L., *Hydrotalcite-like compounds: versatile layered hosts of molecular anions with biological activity*, Microporous Mesoporous Mater. 107 (2008), 149.
- [2] Del Hoyo C., *Layered double hydroxides and human health: An overview*, Appl. Clay Sci. 36 (2007) 103.
- [3] Choy J.-H., Choi S.-J, Oh J.-M. and Park T., *Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications*, Appl. Clay Sci. 36 (2007), 122.
- [4] Forano C., Vial S. and Mousty C., *Nanohybrid Enzymes-layered double hydroxides: potential applications*, Curr. Nanosci. 2 (2006), 283.
- [5] Mousty C., *Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes- new trends*, Appl. Clay Sci. 27 (2004), 159.
- [6] Mousty C., *Biosensing applications of clay-modified-electrodes: a review*, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010), 315.
- [7] Vial S., Prevot V. and Leroux F., *Immobilisation of urease in ZnAl layered double hydroxides by soft chemistry routes*, Microporous Mesoporous Mater. 107 (2008), 190.
- [8] Geraud E., Prevot V., Forano C. and Mousty C., *Spongy gel-like layered double hydroxide-alkaline phosphatase nanohybrid as a biosensing material*, Chem. Comm. (2008), 1554.
- [9] Mousty C., Kaftan O., Prevot V., and Forano C., *Alkaline phosphatase biosensors based on layered double hydroxides matrices: Role of LDH composition*, Sens. Actuators, B 133 (2008), 442.
- [10] Mansouri H., Forano C., Prevot V., Jaffrezic R.N. and Ben Haj Amara A., *Layered double hydroxides/trypsin based conductometric biosensors*, Sens. Lett. 7 (2009), 1.

- [11] Li M., Chen S., Ni F., Wang Y. and Wang L., *Layered double hydroxides functionalized with anionic surfactant: Direct electrochemistry and electrocatalysis of haemoglobin* *Electrochim. Acta* 53 (2008), 7255.
- [12] An Z., Lu S., He J. and Wang Y., *Colloidal assembly of proteins with delaminated lamellas of layered metal hydroxide*, *Langmuir* 25 (2009), 10704.
- [13] Bellezza F., Cipiciani A., Latterini L., Posati T. and Sassi P., *Structure and catalytic behavior of myoglobin adsorbed onto nanosized hydrotalcites*, *Langmuir* 25 (2009), 1098.
- [14] Chen X., Fu C., Wang Y., Yang W. and Evans D.G., *Direct electrochemistry and electrocatalysis base don a film of horseradish peroxidase intercalated into Ni-Al layered double hydroxide nanosheets*, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008), 356.
- [15] De Roy, Forano C., El Molki M. and Besse J.P., In: Ocelli Robson M.L., H. E. Eds: New York, H.E. (Eds) *Synthesis of microporous materials expanded clays and other microporous solids*. Van Nostrand Reinhold pp108 (1992).
- [16] Prevot V., Casal B., and Ruiz-Hitsky E., *Intracrystalline alkylation of benzoate ions into layered double hydroxides*, *J. Mater. Chem.* 11 (2001), 554.
- [17] Khan A. I. and O'Hare D., *Intercalation chemistry of layered hydroxides: recent developments and applications*, *J. Mater. Chem.* 12 (2002), 3191.
- [18] Zhao H. and Nagy K. L., *Dodecyl sulfate-hydrotalcite nanocomposites for trapping chlorinated organic pollutants in water*, *J. Colloid Interface Sci.* 274 (2004), 613.
- [19] V. Rives, *Layered double hydroxides: Present and Future*, Nova Science Publishers, Inc. 139, (2003).
- [20] Giles C. H., Smith D. and Hinton A., *A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical*, *J. Colloid Interface Sci.* 47 (1974), 755.
- [21] Palecek S. P. and Zydny A.L. *Hydraulic permeabilities of protein deposits formed during microfiltration; effect of solution pH and ionic strength*, *J. Membr. Sci.* 95 (1994), 71.
- [22] Zhao H. and Nagy K.L., *Dodecyl sulphate-hydrotalcite nanocomposites for trapping chlorinated organic pollutants in water*, *J. Colloid. Interface. Sci.* 274 (2004), 613.
- [23] Schlereth D. D. and Mantele W., *Redox-induced conformational changes in myoglobin and hemoglobin electrochemistry and ultraviolet-visible and fourrier transform infrared. difference dpectroscopy at durface-modified gold electrodes in an ultra-thin-layer spectrelectrochemical sell*, *Biochemistry* 31 (1992), 7494.
- [24] Kumar C.V. and Chaudhari A., *Proteins immobilized at the galleries of layered α -zirconium phosphate: Structure and scitivity studies*, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000), 830.

-
- [25] Geng L., Wang X., Li N., Xiang M. and Li k., *Characterisation of hemoglobin immobilized on γ -zirconium phosphate*, Colloids Surf. B 34 (2004), 231.
- [26] Woody R.W., in G.D. Fasmar (Ed) *Circular Dicroism and Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York pp 25, (1996).
- [27] Shan D., Cosnier S. and Mousty C., *Layered double hydroxides: an attractive material for electrochemical biosensor design*, Anal. Chem. 75 (2003), 3872.
- [28] Qiu J. and Villemure G., *Anionic clay modified electrodes: electron transfer mediated by electroactive nickel, cobalt or manganese sites in layered double hydroxide films*, J. Electroanal. Chem. 428 (1997), 165.
- [29] Antony H., Legrand L. and Chaussé A., *Carbonate and sulphate green rusts- Mechanisms of oxidation and reduction*, Electrochim. Acta 53 (2008), 7146.
- [30] Ben Assaker I., Thèse Université d'Evry 07/2009 : *Synthèse Electrochimique de films d'Hydroxydes Doubles Lamellaires – Application aux biocapteurs*.
- [31] Huang Q., Lu Z. and Rusling J. F., *Composites films of surfactants, nafions, and Proteins with electrochemical and enzyme activity*, Langmuir 12 (1996), 5472.
- [32] Murry R.W. In *Electroanalytical Chemistry*. Bard A.J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 13 (1986), 191.

Chapitre IV : Immobilisation d'une porphyrine au fer par les Hydroxydes Doubles Lamellaires

IV.1- Introduction

Les porphyrines sont des molécules à structures macrocycliques constituées de quatre sous-unités de pyrrole jointes par quatre ponts méthine. Les porphyrines peuvent complexer de nombreux métaux, comme le manganèse, le zinc et le fer. Elles jouent un rôle très important dans divers processus biologiques comme le métabolisme respiratoire et les processus de photosynthèse. Les porphyrines au fer entrent dans la composition de l'hémoglobine et de la myoglobine (groupement prosthétique hème) et jouent un rôle dans le transfert d'électron et le transport d'oxygène. Les métalloporphyrines ont également des propriétés catalytiques capables de mimer des réactions enzymatiques réalisées par la famille des cytochromes P450, par exemple. Outre cette capacité de complexation, les porphyrines possèdent des propriétés photochimiques et électrochimiques particulières permettant leur exploitation dans divers domaines, comme la photodégradation de polluants [1] ou le développement de capteurs et de biocapteurs [2].

Dans la majorité de ces applications, ces molécules macrocycliques sont immobilisées dans des polymères comme le polypyrrole-alkylammonium [3], des nanotubes de carbone [4], des tectosilicates (zéolite) [5,6,7] et des argiles comme la montmorillonite [1,8,9]. Des porphyrines portant des groupements anioniques ont été immobilisées dans des HDL [7,10]. Comme le montre le tableau IV-1, différentes porphyrines, bases libres ou métallées, différentes compositions d'HDL et différentes méthodes d'immobilisation ont été utilisées.

Le premier article paru en 1992 décrit l'immobilisation de la porphyrine Mn(III) tetraphenylsulfonate (MnTSPP) par réaction de calcination/reconstruction dans Mg_2Al-CO_3 [11]. Les propriétés catalytiques et électrochimiques de ces matériaux ont été évaluées [8]. Par la suite, Sylvie Bonnet et col ont intercalé les bases libres de trois porphyrines anioniques différemment substituées (*meso*-tetrakis (*p*-carboxyphenyl) porphyrine (*p*TCPP), *meso*-tetrakis (*o*-carboxyphenyl) porphyrine (*o*TCPP) et la *meso*-tetrakis (*p*-sulfonatophenyl) porphyrine (*p*TSPP) (Figure IV-1A) dans des phases HDL $ZnAl$ par delamination-reconstruction et coprécipitation à pH constant [12]. Une orientation différente du macrocycle dans l'espace inter-feuillet est observée suivant sa substitution en para ou ortho.

Par la suite, c'est essentiellement ces deux types de porphyrines (TCPP et TSPP) métallées (Mn, Fe et Co) qui ont été immobilisées, avec parfois des substituants sur le groupement benzénique. Les HDL les plus utilisés pour immobiliser les porphyrines sont

MgAl et ZnAl. Les feuillets ZnCr n'ont jamais été utilisés. Les méthodes d'immobilisation plus répandues sont soit l'échange, la coprécipitation et la calcination/reconstruction. Des phases MgAl-glycinate ou MgAl-dodécylsulfate exfoliées dans des solvants organiques ont également été utilisées pour permettre l'échange ou le greffage de porphyrines.

Plus récemment, la base libre $[H_2TSPP]^{4-}$ et complexée par du fer(III) ($[FeTSPP]^{3-}$) ainsi que d'autres dérivés secondaires $[Fe(TDFSPP)]^{3-}$, $[Fe(TDCSPP)]^{3-}$ (Figure IV-1B) ont été intercalés dans différents HDL Zn_nAl ($n = 2, 4$ et 5) par coprecipitation [13] ou immobilisés au sein de matrices MgAl macroporeuses par les procédés de calcination/reconstruction ou d'échange anionique avec un tensio-actif anionique (le dodécylsulfate) [14]. Malheureusement ces deux dernières méthodes ne permettent pas l'intercalation du macrocycle mais l'immobilisation des porphyrines se produit par adsorption de surface.

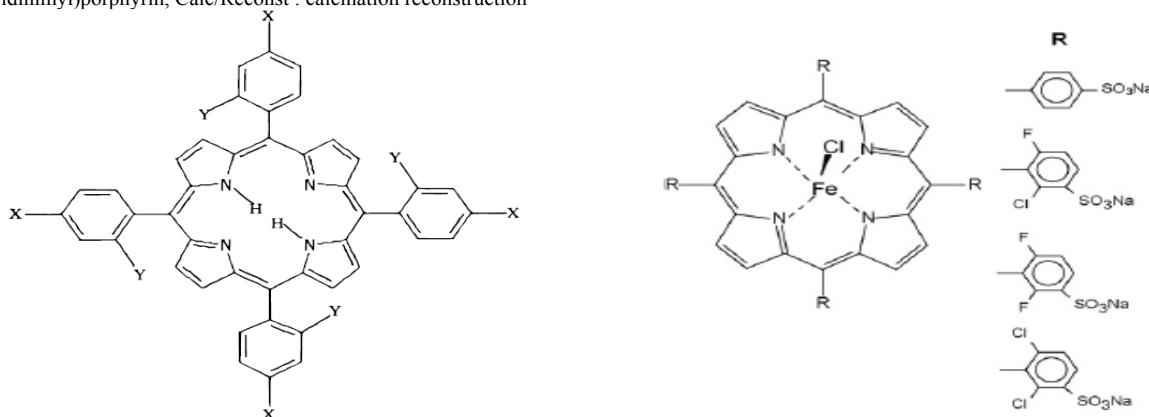
Ces différents matériaux hybrides ont été utilisés dans des réactions de catalyse hétérogène (par exemple : époxydation de styrène, oxydation du cyclohexane, trichlorophénol) et pour des applications en photochimie. Il est à noter qu'un seul article décrit le comportement électrochimique d'une phase HDL-porphyrine (MgAl-MnTSPP). De plus, la similitude de structure entre l'hème de l'hémoglobine et les porphyrines au fer, nous a conduit à nous intéresser à l'immobilisation de la porphyrine au fer ($FeTSPP^{4-}$) par la méthode de coprécipitation à différents pH en utilisant différents types d'HDL Mg₂Al, Zn₂Al et Zn₂Cr et d'en étudier le comportement électrochimique par voltammétrie cyclique, pour finalement les utiliser pour le dosage ampérométrique du peroxyde d'hydrogène.

Tableau IV-1 : Immobilisation des porphyrines dans les HDL.

HDL	Pophyrine	Immobilisation	Application	Référence
MgAl	MnTSPP	Adsorption Calc/Reconst	Catalyse	[11]
MgAl	MnTSPP	Adsorption Calc/Reconst	Electrochimie	[8]
MgAl	CoTMPyP	Calc/Reconst	Catalyse	[15]
ZnAl, MgAl	TCPP, TSPP	Calc/Reconst	-	[16]
ZnAl	<i>p</i> TCPP, <i>o</i> TCPP, <i>p</i> TSPP	Echange Coprécipitation	-	[12]
ZnAl	FeTPP, FeTSPP, FeTCPP, FeTDFSPP	Adsorption Coprécipitation Calc/Reconst	Catalyse	[17]
MgAl-Gly	FeTDFSPP	Adsorption	-	[18]
ZnAl	O=Ti(IV)TSPP	Coprecipitation	Photochimie	[19]
MgAl	MnTSPP	Echange	Catalyse	[20]
MgAl-3APTS	FeTPFP, FeTDCSPPCl	Greffage	Catalyse	[21]
MgAl	CoTSPP	Calc/Reconst	Catalyse	[22]
MgAl-Gly	FeTDFSPP, FeTCFSPP	Echange	Catalyse	[23]
MgAl	TSPP, PdTCPP	Echange	Photochimie	[24]
HDL	TCPP	Couche par couche (LBL)	Photochimie	[25]
ZnAl	H ₂ TSPP, FeTSPP FeTDFSPP, FeTDCSPP	Coprecipitation	Catalyse	[13]
MgAlDDS	TSPP	Adsorption	Fluorescence	[26]
MgAl(3DM)	FeTSPP, FeTDFSPP FeTCFSPP, FeTDCSPP	Calc/Reconst	Catalyse	[14]
MgAl	TSPP	Echange Calc/Reconst	-	[27]

Abréviations :

3APTS : 3-aminopropyl triethoxysilane, 3DM : trois dimensions macroporeux, TSPP : tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrine
Fe(TDCSPP)Cl : 5,10,15,20-tetrakis(dichlorophenyl)-21H **FeTCFSPP** [5,10,15,20-tetrakis (2-fluoro-6-chlorophenyl-3-sulfonatophenyl) porphyrinate] iron(III), **FeTDFSPP** : [5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluor-3-sulfonatophenyl)porphyrinato]iron(III), **FeTPP** : 5,10,15,20-tetraphenylporphyrinatoiron(III) cation **Gly** : glycinate **TCPP** : tetrakis (4-carboxyphenyl) porphyrine **CoTMPyP**:Co(II)-tetra(N-methyl-4-pyridinimyl)porphyrin, Calc/Reconst : calcination reconstruction



A : *p*TCPP X = COOH, Y = H; *o*TCPP X = H, Y = COOH, *p*TSPP X = SO₃H Y = H [12].

B : Fe(TSPP), Fe(TCFSPP), Fe(TDFSPP), Fe(TDCSPP) [13,14].

Figure IV-1 : Formules des différentes porphyrines immobilisées dans les HDL.

IV.2- La coprécipitation de HDL-FeTSPP

Pour les synthèses des HDL-FeTSPP par coprécipitation à pH contrôlé, nous avons utilisé différents sels métalliques à une concentration totale de 0,1 M. avec un rapport $M^{II}/M^{III} = 2$, la nature des sels et le pH (5,5 ; 7,5 ou 9) étant fixés selon la matrice choisie. La solution de sels métalliques est ajoutée à vitesse constante (0,02 mL/min). Pour la synthèse de Mg_2Al -FeTSPP, nous avons utilisé un rapport massique de FeTSPP/HDL = 2. Pour les deux autres matrices, le nombre de mole de FeTSPP mis en solution correspond à quatre fois la charge nécessaire à la réaction d'échange stœchiométrique, comme décrit dans le travail de M. Halma et col [13]. Une solution de soude (0,2 M) est simultanément ajoutée afin de maintenir un pH constant tout au long de la réaction. Toutes ces conditions sont reprises dans le Tableau IV-2. La synthèse est réalisée à température ambiante et sous atmosphère d'azote. La durée de synthèse est d'environ 4 h. Le précipité est récupéré par centrifugation et lavé à l'eau décarbonatée. La quantité de porphyrine, non immobilisée et présente dans les eaux de lavage, est déterminée par des mesures d'absorbance UV-Vis à une longueur d'onde de 404 nm (bande de Soret). La masse de FeTSPP immobilisée correspond à la différence entre la masse de FeTSPP initialement introduite dans le réacteur et celle récupérée dans le surnageant (Tableau IV-2).

Les HDL de références Mg_2Al -Cl et Zn_2Al -Cl sont ceux décrits dans le chapitre III. Un autre HDL Zn_2Cr -Cl a également été préparé par coprécipitation suivant les mêmes conditions de concentrations en sels avec un pH fixé à 5,5.

Tableau IV-2 : Conditions de coprécipitation des HDL-FeTSPP

Echantillons	Sel (M)				Sel (ml)	NaOH (M)	pH	FeTSPP (mg)	% immobilisé
	ZnCl ₂	CrCl ₂	MgCl ₂	AlCl ₃					
Mg ₂ Al-FeTSPP	-	-	0,066	0,033	6	0,2	9	120	75
Zn ₂ Al-FeTSPP	0,066	-	-	0,033	1	0,2	7,5	150	80
Zn ₂ Cr-FeTSPP	0,066	0,033	-	-	1	0,2	5,5	150	73

IV.3- Caractérisations physicochimiques des HDL-FeTSPP

IV.3.1- Caractérisation par DRX

La Figure IV-2 présente les diffractogrammes de rayons X des trois phases HDL-FeTSPP préparées. Ils sont caractéristiques des phases HDL avec cependant un élargissement des raies par rapport aux diffractogrammes des phases de références Zn_2AlCl , Mg_2AlCl présentées dans le chapitre III et Zn_2Cr-Cl (Figure IV-3). La raie (110) pointée 60° en 2θ , caractéristique de la densité électronique de plans réticulaires constitués des cations métalliques, est clairement observée. Par rapport aux phases chlorées de références, on note un déplacement de la raie 003 vers les petits angles. Le diffractogramme de la phase $Zn_2Al-FeTSPP$ (Figure IV-2A) est semblable à celui rapporté par Halma et al [13], avec dans notre cas une distance interlamellaire (d_{003}) de 23,9 Å, pour une valeur de 22,8 Å dans le travail précédent. Dans ce cas, une analyse détaillée des diffractogrammes de RX avait été réalisée après avoir amélioré la cristallinité des phases par un traitement hydrothermal. Ils concluent à une intercalation des porphyrines avec une orientation perpendiculaire du macrocycle par rapport au plan des feuillet HDL. Avec la phase $Zn_2Cr-FeTSPP$ (Figure IV-2B), nous obtenons une distance (d_{003}) un peu plus élevée (27,3 Å). Ces variations de distances peuvent être attribuées à des états de cristallinité différents selon les matériaux ou à des taux d'hydratation variables. Dans les deux cas, la distance est bien compatible avec l'intercalation de la porphyrine. L'examen du diffractogramme X de $Mg_2Al-FeTSPP$ (Figure IV-2C) montre la présence de la 2^{ème}, de la 3^{ème} et de la 5^{ème} harmonique respectivement à $d_{006} = 12,45$ Å, $d_{009} = 7,84$ Å et $d_{015} = 1,99$ Å. La 1^{ère} raie de diffraction dans la série (001) , (003) n'est pas visible car elle est noyée par le signal intense aux petits angles, provenant de la diffusion des rayons X par les particules d'HDL Mg_2Al de taille nanométrique. Notons que les conditions de synthèse utilisées dans ce cas n'étaient pas les mêmes que celles utilisées pour les phases Zn_2Al et Zn_2Cr . Par ailleurs on observe un élargissement très important de l'ensemble des raies de diffraction et en particulier de celles relatives aux feuillet, (012) et (110) , qui indique une perte de cohésion structurale du réseau HDL provoquée par une intercalation désordonnée de la macromolécule

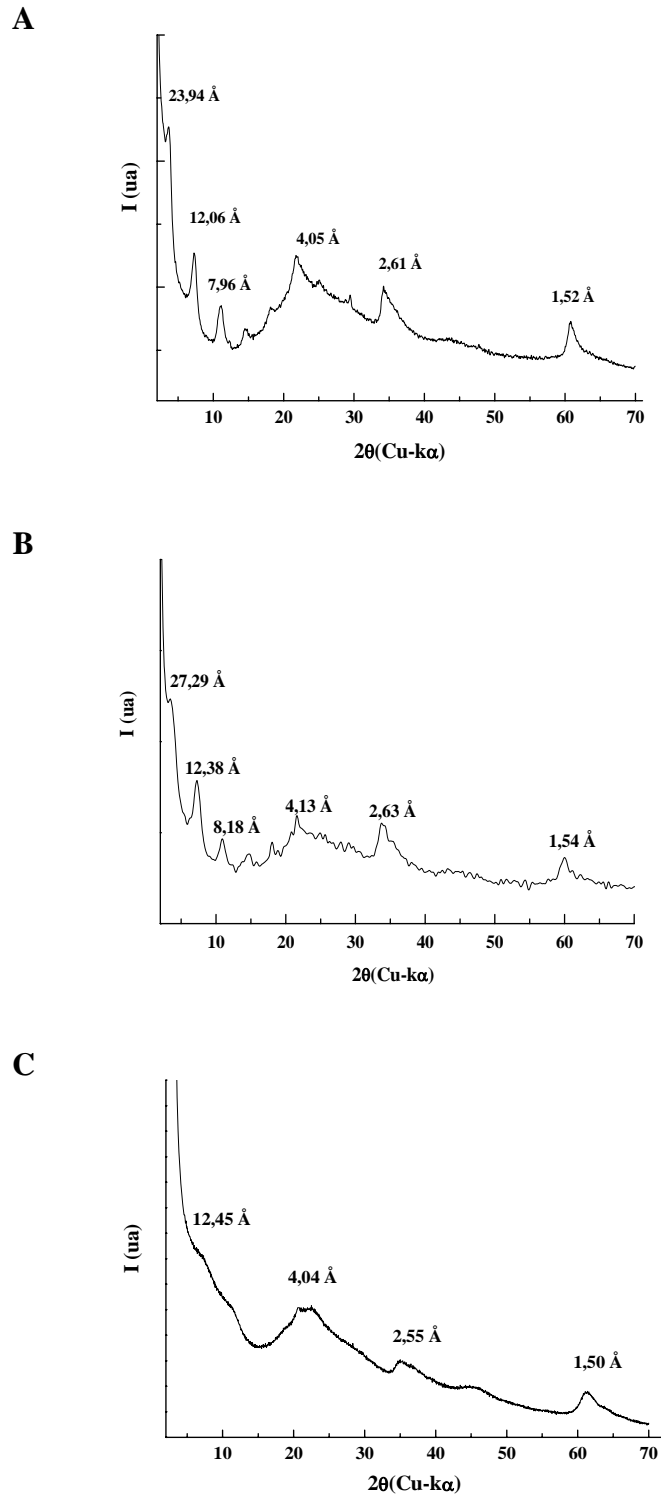


Figure IV-2 : Diffractogrammes de RX de Zn₂Al-FeTSPP (A), de Zn₂Cr-FeTSPP (B) et Mg₂Al-FeTSPP (C).

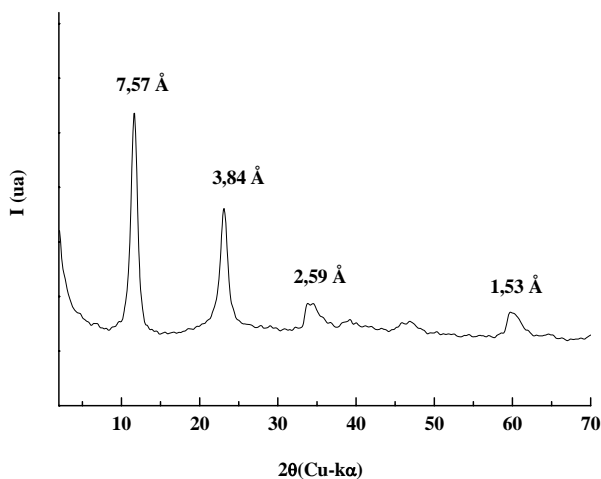


Figure IV-3 : Diffractogramme de RX de Zn₂Cr-Cl.

IV.3.2- Spectroscopie Infra-Rouge

Les spectres FTIR (ATR) des trois phases HDL-porphyrines sont comparés aux spectres de FeTSPP libre et aux matériaux de références (Figure IV-4). Les vibrations caractéristiques de la porphyrine sont situées entre 1600-1370 cm⁻¹, elles correspondent aux vibrations des liaisons C=C et C=N du cycle. Dans la région située entre 1200-1020 cm⁻¹, on observe les vibrations symétriques et asymétriques des groupements sulfonate. Les vibrations entre 720-640 cm⁻¹ sont attribuées à la vibration de la liaison C-H hors du plan [9]. Dans les trois matériaux hybrides, les bandes de vibrations de FeTSPP intercalée correspondent à celles de la FeTSPP seule. On note que les vibrations caractéristiques de matériaux HDL (autour 430 et 638 cm⁻¹) sont observées avec des intensités faibles.

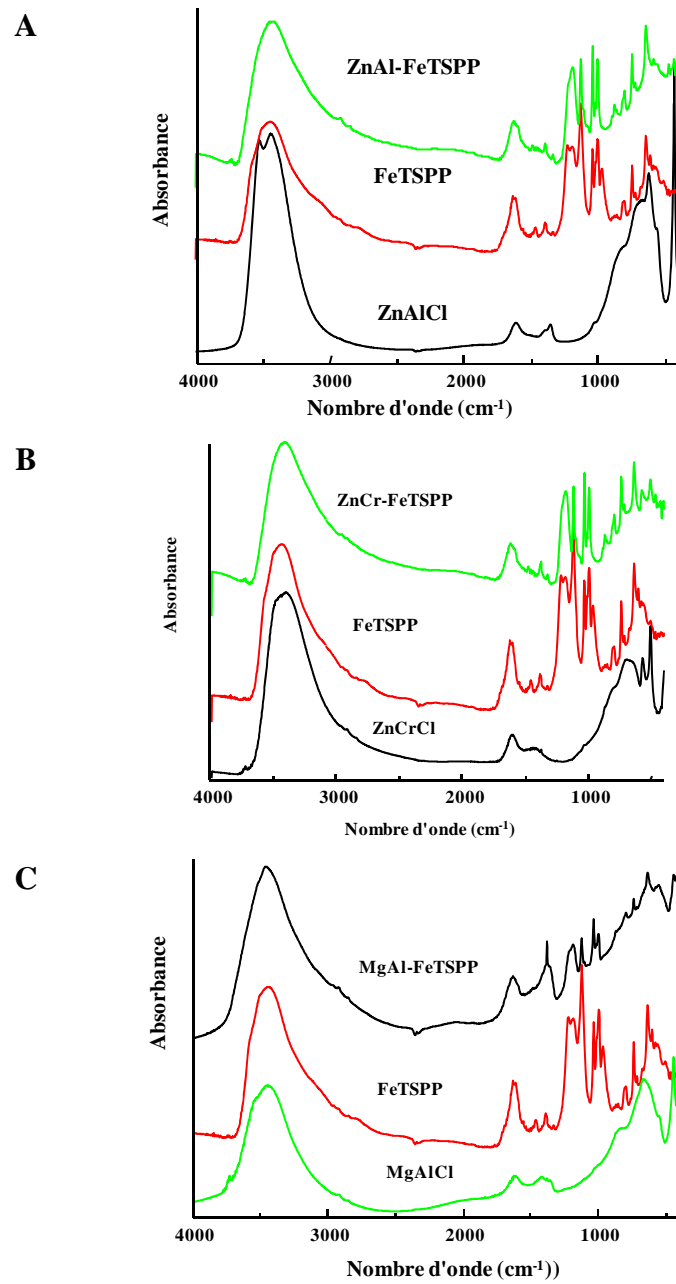


Figure IV-4 : Spectres infrarouges des composées HDL-FeTSPP, FeTSPP et HDL-Cl.

IV-3.3- Spectroscopie UV-Vis

Les spectres d'absorbance d'UV-Visible de la porphyrine pure et intercalée dans les matériaux HDL sont réalisés par réflexion à l'état solide. Les différents spectres obtenus sont donnés sur la figure IV-7. Par rapport à la base libre H₂TSPP de symétrie moléculaire D_{2h}, la porphyrine complexée FeTSPP présente une symétrie D_{4h}. Le spectre de FeTSPP libre dans l'eau (figure IV-5) montre deux types de bandes d'absorbance : la première bande située vers 404 nm est large et intense, elle correspond à la bande de Soret ($\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et provient de la transition électronique $e_g \leftarrow a_{1u}$ dans le groupe ponctuel de symétrie D_{4h} (figure IV-6). La série de petites bandes situées entre 500 et 700 nm est appelée les bandes Q [12]. La base libre (DMF) présente 4 bandes Q pointées à 510, 550, 591 et 647 nm alors que la base complexée FeTSPP (eau) présente 2 bandes Q à 530 et 682 nm correspondant aux deux transitions $e_g \leftarrow a_{2u}$ (figure IV-6). Pour les spectres UV-visible obtenus en réflexion diffuse sur les échantillons solides à l'aide d'une sphère d'intégration, la plus intense des bandes Q est située à 540 nm pour FeTSPP libre (figure IV-7). Cette bande a perdu de l'intensité et a subi un déplacement vers les grandes longueurs d'onde dans les différents matériaux hybrides. La bande de Soret ne subit pas de modification notable lorsque la porphyrine est intercalée. Il n'y a pas de démétallation lors de l'intercalation du complexe. Un léger déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde est observé pour Zn₂Cr-FeTSPP et Mg₂Al-FeTSPP. Dans ces cas, les bandes de Soret sont élargies et moins intenses que pour la phase Zn₂Al-FeTSPP. Les interactions intermoléculaires peuvent être modifiées lorsque le complexe macrocyclique est immobilisé dans l'HDL.

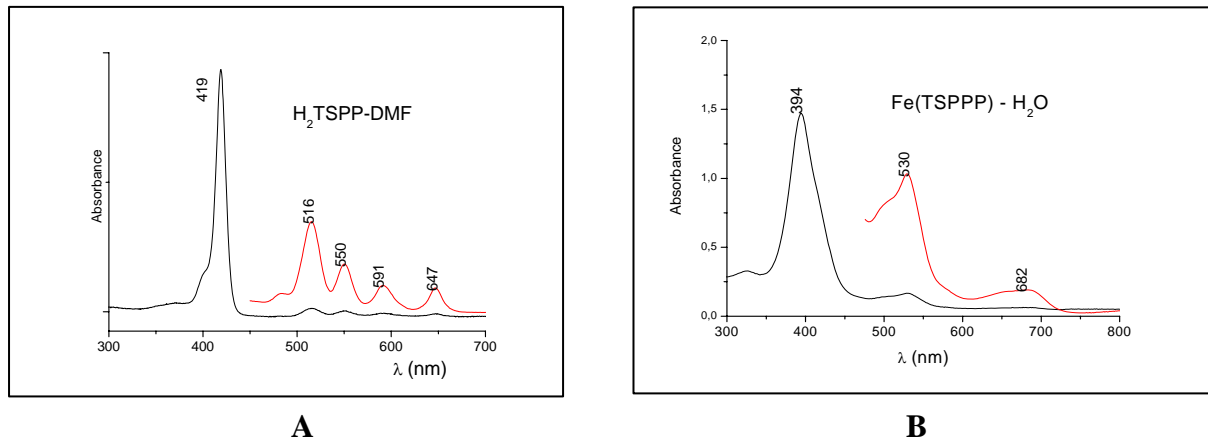


Figure IV-5: spectres UV-Visible de H₂TSPP (A) et FeTSPP respectivement dans le DMF et dans l'eau (B).

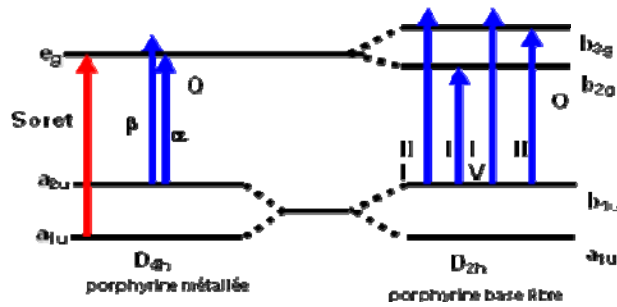


Figure IV-6: Transitions électroniques dans le domaine UV de H₂TSPP (D_{2h}) et FeTSPP (D_{4h}).

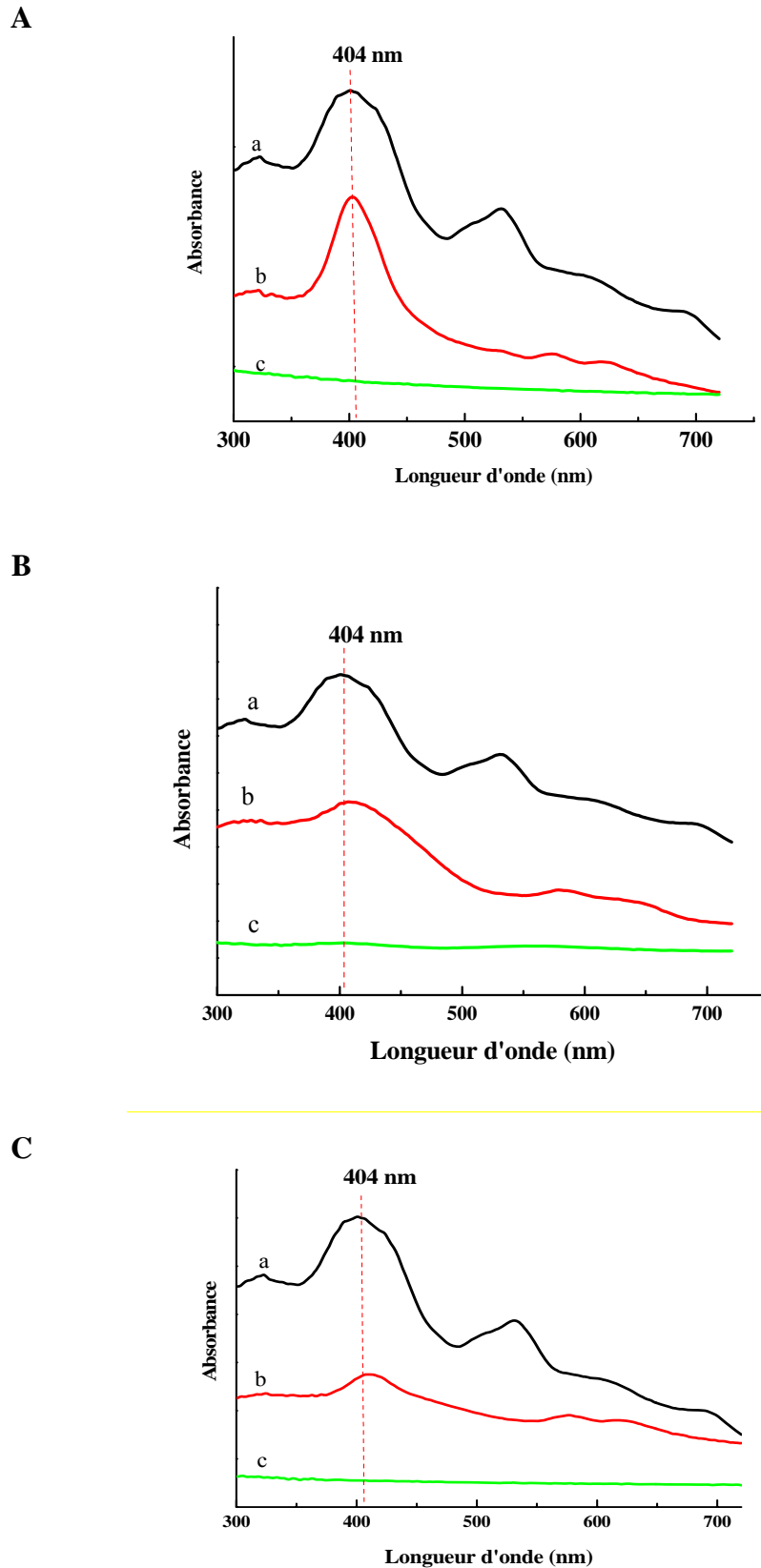


Figure IV-7: Absorbance UV-visible de A) FeTSPP (a) Zn_2Al -FeTSPP (b) et Zn_2AlCl (c).
B) FeTSPP (a) Zn_2Cr -FeTSPP (b) et Zn_2CrCl (c).
C) FeTSPP (a) Mg_2Al -FeTSPP (b) et Mg_2AlCl (c).

IV.4-Electrochimie des HDL-FeTSP

IV.4.1- Voltammétrie cyclique

Dans la littérature, l'étude du comportement électrochimique des métalloporphyrines comme modèle des hémoprotéine ou enzyme a été rapportée à la fois en solution ou immobilisées dans des polymères (polypyrrole) ou des zéolites, par exemple. En solution aqueuse, le comportement électrochimique de FeTSPP dépend fortement du pH [28,29]. A pH 2,0 il est caractérisé par deux couples rédox observés en voltammétrie cyclique à -0,22 V et 0,95 V/Ag-AgCl et correspondant respectivement aux couples rédox $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{TSPP}]^{3-} / \text{Fe}^{\text{II}}[\text{TSPP}]^{4-}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TSPP})^{3-} / \text{Fe}^{\text{III}}(\text{TSPP}^{*+})^{2-}$. Bedioui et coll. ont incorporé le FeTSPP dans un film de polypyrrole ammonium [3]. Un signal réversible centré à -0,15 V/ECS est observé à pH 2,8.

Les courbes de voltammétrie cyclique sur carbone vitreux d'une solution de 0,1 mM FeTSPP ont été enregistrées dans une solution 0,1 M du tampon phosphate dégazée (Ar) à pH 7,0 et 4,5. A pH 7, aucun signal électrochimique n'est observé dans la zone de potentiel allant de 0 à -0,6 V/Ag-AgCl. A pH 4,5; un signal réversible est clairement observé à $E_{1/2} = -0,28$ V avec un $\Delta E_p = 110$ mV pour $\nu = 50$ mV/s (Figure IV-8). L'intensité de courant est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage, comme attendu pour un système quasi-réversible régi par la diffusion. Ce signal correspond au couple redox Fe(II)/Fe(III) de la porphyrine.

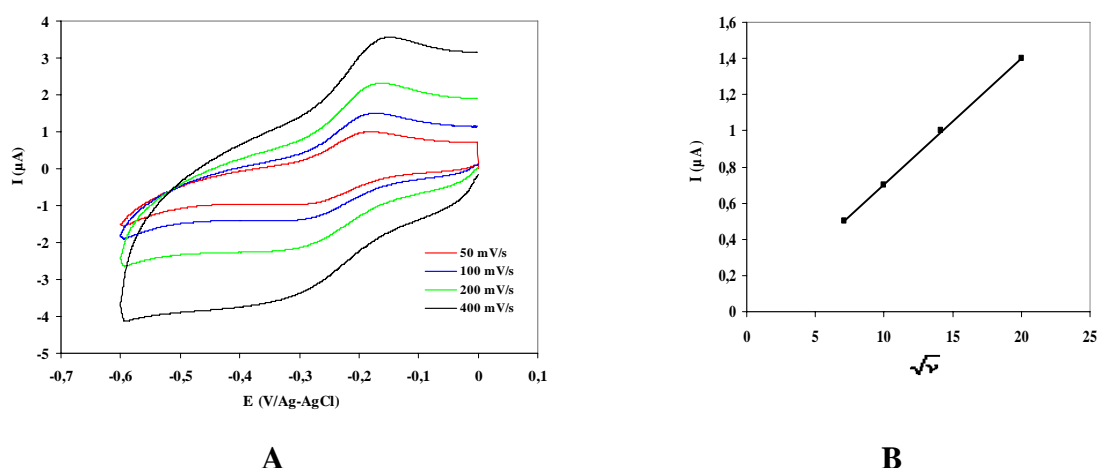


Figure IV-8 : Courbes de voltammétrie cyclique enregistrées avec une électrode de carbone vitreux nue dans une solution de FeTSPP (0,1 mM) (TP pH 4,5 sous Ar) (A); Variation de I en fonction de $\sqrt{\nu}$ (B).

Pour caractériser le comportement électrochimique de la FeTSPP intercalée dans les matrices HDL, une suspension d'HDL a été déposée sur la surface des électrodes de carbone vitreux (160 μg) et laissée sécher une nuit. Les courbes de voltammétrie ont été enregistrées dans une solution tampon phosphate à pH 4,5 sous argon. Les figures IV-9 et 10 montrent les résultats obtenus avec $\text{Mg}_2\text{Al-FeTSPP}$ et $\text{Zn}_2\text{Cr-FeTSPP}$. Dans les deux cas, un signal réversible est observé à $E_{1/2} = -0,27 \text{ V}$. L'intensité du courant varie avec la racine carrée de la vitesse v . L'intensité du signal est plus importante pour $\text{Zn}_2\text{Cr-FeTSPP}$. Etonnamment, avec la phase $\text{Zn}_2\text{Al-FeTSPP}$, nous n'avons pas observé de signal en voltammétrie cyclique.

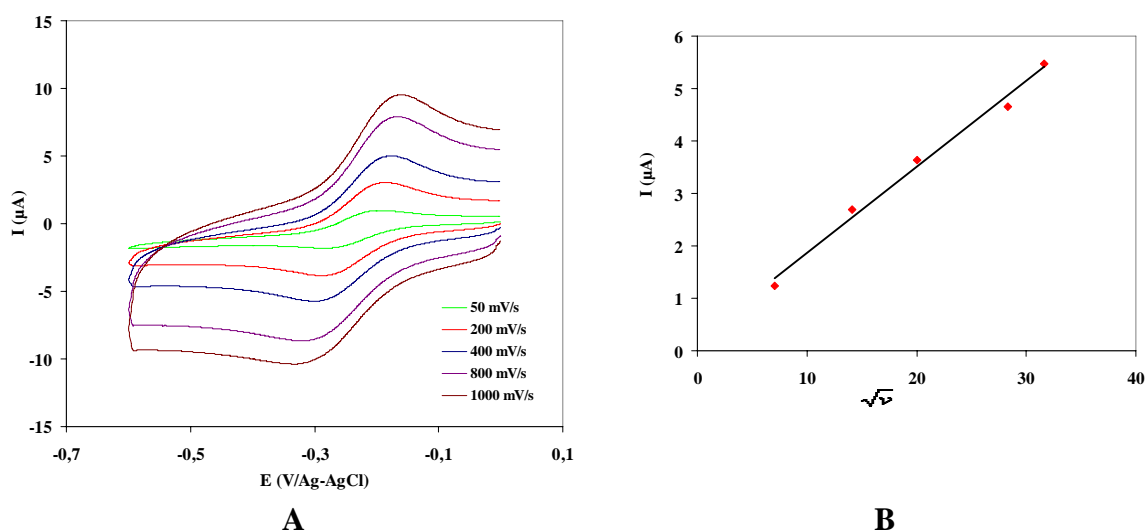


Figure IV-9 : Courbes de voltammétrie cyclique de $\text{Zn}_2\text{Cr-FeTSPP/CV}$ dans une solution de TP à pH 4,5 (A) et variation de I en fonction de \sqrt{v} (B).

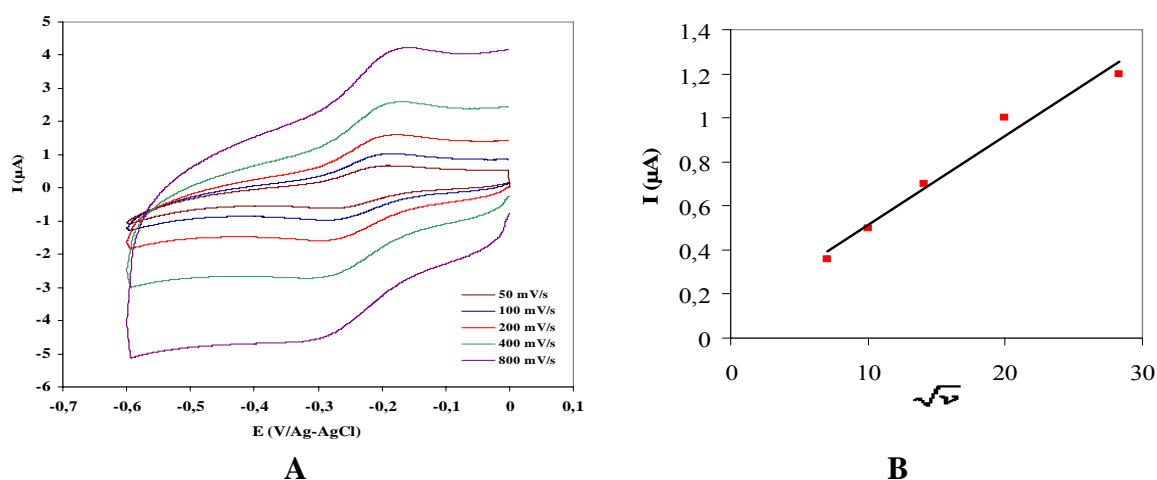


Figure IV-10 : Courbes de voltammétrie cyclique de $\text{Mg}_2\text{Al-FeTSPP/CV}$ dans une solution de TP à pH 4,5 (A) et variation de I en fonction de \sqrt{v} (B).

Dans les chapitres précédents nous avons montré que l'hème de l'hémoglobine permettait la réduction catalytique du peroxyde d'hydrogène. Le comportement catalytique de FeTSPP vis à vis de H_2O_2 a été étudié en détail par Zipplies et coll [28]. L'ajout de 0,1 mM H_2O_2 dans la solution tampon à pH 4,5 contenant les électrodes modifiées par les hybrides Mg_2AlCl -FeTSPP et Zn_2Cr -FeTSPP provoquent des modifications des courbes de voltammétrie cyclique (Figure IV-11). On observe une augmentation importante du pic cathodique en forme S, alors que le pic anodique disparaît. Ce phénomène, déjà observé avec l'hémoglobine, correspond à la réduction électrocatalytique de H_2O_2 , ce qui permet d'envisager le dosage de H_2O_2 par la porphyrine immobilisée dans les HDL.

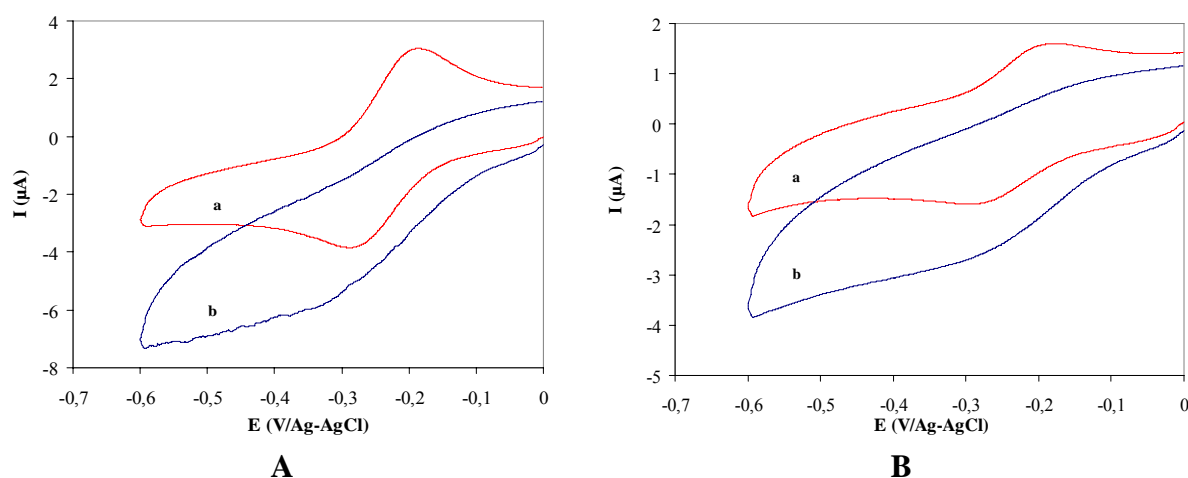


Figure IV-11 : Courbes de voltammétrie cyclique de Zn_2Cr -FeTSPP (A) et Mg_2Al -FeTSPP (B) dans une solution de TP à pH 4,5 sans (a) et en présence (b) de 1 mM H_2O_2 (200 mV/s).

IV.4.2- Biocapteurs à peroxyde d'hydrogène

Le dosage du H_2O_2 par les différentes porphyrines intercalées est réalisé en chrono-ampérométrie à $E_{app} = -0,30$ V. Nous avons utilisé des électrodes de carbone vitreux de 5 mm modifiées avec 160 μg HDL et tournant à 500 tr/min. Les mesures sont faites en solution de tampon phosphate à pH=4,5; à température ambiante (25°C) sous argon. Les ajouts de H_2O_2 sont réalisés grâce à une seringue. Les courbes d'étalonnage ainsi obtenues sont représentées sur la figure IV-12. Le capteur à H_2O_2 réalisé avec Mg_2Al -FeTSPP est caractérisé par une sensibilité $S = 137,7$ mA/Mcm² et un domaine de linéarité variant entre 0,2 et 0,8 μM . Le capteur à base de Zn_2Cr -FeTSPP a une meilleure sensibilité $S = 534,6$ mA/Mcm² dans un domaine de linéarité plus large (0,18 – 1,64 μM). Pour ces deux électrodes, le courant maximum est respectivement de 0,6 $\mu A/cm^2$ et 7,6 $\mu A/cm^2$. Ce qui peut s'expliquer par une quantité plus importante de porphyrine immobilisée dans la phase en chrome par rapport à Mg_2Al . De plus la phase Zn_2Cr -FeTSPP est mieux cristallisée.

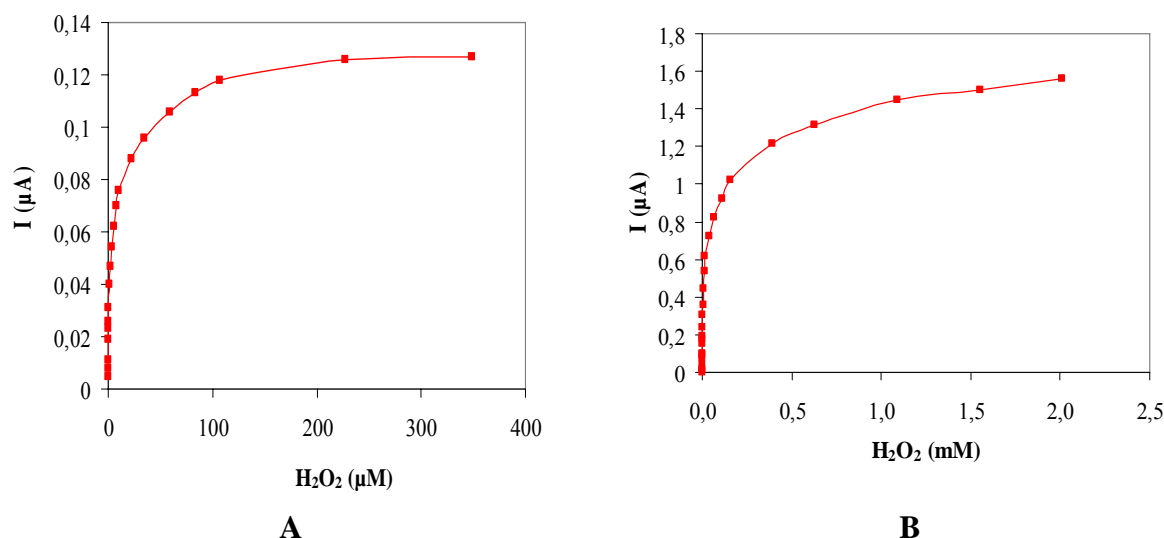


Figure IV-12 : Courbes d'étalonnage de H₂O₂ par Mg₂Al-FeTSPP (A) et Zn₂Cr-FeTSPP (B) dans une solution de TP à pH 4.5 et E_{app} = -0,30 V.

VI.5- Conclusion

La méthode de coprécipitation a permis l'intercalation d'une métalloporphyrine FeTSPP chargée négativement dans deux nouvelles matrices HDL : Mg₂Al et Zn₂Cr. Cependant la préparation de la phase Mg₂Al-FeTSPP devrait être améliorée, afin d'obtenir une intercalation plus ordonnée des macromolécules, en se basant sur le protocole utilisé pour le Zn₂Cr et Zn₂Al. Nous avons réalisé la première étude électrochimique avec ces matériaux, mettant en évidence le signal lié à la réduction réversible du fer complexé dans le macrocycle. Ce signal est particulièrement, important et bien réversible dans le cas de Zn₂Cr-FeTSPP. Étonnamment aucun signal n'a été obtenu avec la phase Zn₂Al-FeTSPP. Ce fait devrait être vérifié en utilisant d'autres solutions de tampons (Tris-HCl) et d'autres valeurs de pH. En ce qui concerne les capteurs à H₂O₂, des résultats assez prometteurs ont été obtenus avec la phase Zn₂Cr-FeTSPP. Ces capteurs pourront sans doute être adaptés pour d'autres analytes, comme les nitrites.

VI.6- Références

- [1] Takagi S., Eguchi M., Tryk D.A. and Inoue H., *Porphyrin photochemistry in inorganic/organic hybrid materials: clays layered semiconductors, nanotubes, and mesoporous materials*, J. Photochem. Photobiol., C 7 (2006), 104.
- [2] Biesaga M., Pyrzynska K. and Trojanowicz M., *Porphyrins in analytical chemistry. A review*, Talanta 51 (2000), 209.
- [3] Bedioui F., Bouhier Y., Sorel C., Devynck J., Coche-Guerente L., Deronzier A. and Moutet J. C., *Incorporation of anionic metalloporphyrins into Poly(Pyrrole-Alkylammonium)films- part2. Characterisation of the reactivity of the iron (III) porphyrinic-Based Polymer*, Electrochim. Acta 38 (1993), 2485.
- [4] Zagal J.H., Griveau S., Ozoemena K.I., Nyokong T. and Bedioui F., *Carbon nanotubes, phthalocyanines and porphyrins: attractive hybrid materials for electrocatalysis and electroanalysis*, J. Nanosci. Nanotechnol. 9 (2009), 2214.
- [5] Nakagaki S., Xavier C.R., Wosniak A.J., Mangrich A.S., Wypych F., Cantao M.P. Denicolo I. and Kubota L.T., *Synthesis and characterisation of zeolite-encapsulated metalloporphyrins*, Colloids Surf. A 168 (2000), 261.
- [6] Battioni P., Iwanejko R., Mansuy D., Mlodnicka T., Poltowicz J. and Sanchez F. *Reactivity of polyhalogenated and zeolite-encapsulated metalloporphyrins in oxidation with dioxygen*, J. Mol. Catal. A: Chem. 109 (1996), 91.
- [7] Bedioui F., *Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview*, Coord. Chem. Rev. 144 (1995), 39.
- [8] Gaillon L., Bedioui F., Devynck J. and Battioni P., *Electrochemical characterization of manganese porphyrins fixed onto silica and layered dihydroxide matrices*, J. Electroanal. Chem. 347 (1993) 435.
- [9] Machado A.M., Wypych F., Drechsel S.M. and Nakagaki S., *Study of the catalytic behaviour of montmorillonite/iron (III) and Mn (III) cationic porphyrins*, J. Colloid Interface Sci. 254 (2002), 158.
- [10] Changwen H., Danfeng L., Yihang G. and Enbo W., *Supramolecular layered double hydroxides*, Chin. Sci. Bull. 46 (2001), 1061.
- [11] Barloy L., Lallier J.P., Battioni P. and Mansuy D., *Manganese porphyrins adsorbed or intercalated in different mineral matrices: preparation and compared properties as catalysts for alkene and alkane oxidation*, New J. Chem. 16 (1992), 71.

- [12] Bonnet S., Forano C., De Roy A. and Besse J. P., *Synthesis of hybrid organo-mineral materials: anionic tetraphenylporphyrins in layered double hydroxides*, Chem. Mater. 8 (1996), 1962.
- [13] Halma M., Aparecida Dias de Freitas Castro K., Taviot-Gueho C., Prevot V., Forano C. Wypych F. and Nakagaki S., *Synthesis, characterization, and catalytic activity of anionic iron (III) porphyrins intercalated into layered double hydroxides*, J. Catal. 257 (2008), 233.
- [14] Halma M., Aparecida Dias de Freitas Castro K., Prévot V., Forano C., Wypych F. Nakagaki S., *Immobilization of anionic iron(III) porphyrins into ordered macroporous layered double hydroxides and investigation of catalytic activity in oxidation reactions*, J. Mol. Catal. A: Chem 310 (2009), 42.
- [15] Chibwe M., Ukrainczyk L., Stephen A. B. and Pinnavaia T. J., *Catalytic properties of biomimetic metallomacrocycles intercalated in layered double hydroxides and smectite clay: the importance of edge-site access*, J. Mol. Catal. A: Chem. 113 (1996), 249.
- [16] Hideyuki T., Ayako O., Tsuneo K., Sumikazu O., Masa K., Jun-ichi K. and Koji C. *Intercalation of colored organic anions into insulator host lattices of layered double hydroxides*, Microporous Mater. 7 (1996), 151.
- [17] Halma M., Wypych F., Drechsel S. M. and Nakagaki S., *Synthesis, characterization and catalytic behavior of iron porphyrins immobilized in layered double hydroxides*, J. Porphyrins Phthalocyanines 6 (2002), 502.
- [18] Wypych F., Bubniak G. A., Halma M. and Nakagaki S., *Exfoliation and immobilization of anionic iron porphyrin in layered double hydroxides*, J. Colloid Interface Sci. 264 (2003), 203.
- [19] Ryu S.Y., Yoon M., Choy J.H., Hwang S.H., Frube A., Asahi T. and Masuhara H. *Optical properties of oxotitanium (IV) meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin intercalated into the layered double hydroxides (LDH) studied by laser spectroscopy*, Bull. Korean Chem. Soc. 24 (2003), 446.
- [20] Tong Z., Tetsuya S. and Katsuhiko T., *Oxidation catalysis of a manganese (III) porphyrin intercalated in layered double hydroxide clays*, Mater. Lett. 57 (2003), 2258.

- [21] Wypych F., Bail A., Halma M. and Nakagaki S., *Immobilization of iron (III) porphyrins on exfoliated Mg-Al layered double hydroxide, grafted with (3-aminopropyl)triethoxysilane* J. Catal. 234 (2005), 431.
- [22] Barbosa C. A. S., Ferreira A. M. D. C., Constantino V. R. L., *Synthesis and caraterization of magnesium-aluminium layered double hydroxides conataining (tetrasulfonated porphyrin)cobalt*, Eur. J. Inorg. Chem. 8 (2005), 1577.
- [23] Nakagaki S., Halma M., Bail A., Guadalupe C., Gregoria A., Guadalupe C. and Wypych F., *First insight into catalytic activity of anionic iron porphyrins immobilized on exfoliated layered double hydroxides*, J. Colloid Interface Sci. 281 (2005), 417.
- [24] Lang K., Bezdicka P., Bourdelande J.L., Hernanado J., Jirka I., Kafunkova E., Kovanda F., Kubat P., Mosinger J. and Wagnerova A M., *Layered double hydroxides with intercalated porphyrins as photofunctional materials: subtle structural changes modify singlet oxygen production*, Chem. Mater. 19 (2007), 3822.
- [25] Tatsuto Y., Tatsuya K., Takayosi S., Tsukasa T. and Katsuhiko T., *Pyrene-to-porphyrin excited singlet energy transfer in LBL-deposited LDH nanosheets*, J. Porphyrins Phthalocyanines 11 (2007), 428.
- [26] Lang K., Kubat P., Mosinger J., Bujdak J., Hof M., Janda P., Sykora J. and Iyi N. *Photoactive oriented films of layered double hydroxides*, Phys. Chem. Chem. Phys. 10 (2008) 4429.
- [27] Kovar P., Pospisil M., Kafunkova E., Lang K. and Kovanda F., *Mg-Al layered double hydroxide intercalated with porphyrin anions: molecular simulations and experiments*, J. Mol. Model. 16 (2010), 223.
- [28] Zippies M.F., Lee W.A. and Bruice T.C., *Influence of hydrogen ion activity and general Acid-base catalysis on the rate of decomposition of hydrogen peroxide by a novel nonaggregating water-soluble iron(III) tetraphenylporphyrin derivative*, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986), 4433.
- [29] Barley, K. J. Takeuchi, T. J. Meyer, *Electrocatalytic reduction of nitrite to ammonia based on a water-soluble iron porphyrin*, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986), 5876.

Conclusion générale

Un des objectifs de ce travail était de mettre en évidence le rôle éventuel du fer dans le transfert électronique se produisant à la surface des électrodes modifiées par des argiles cationiques et des HDL. Nous avons montré que la substitution isomorphique du fer dans les argiles modifie leurs propriétés structurales et morphologiques. Ainsi, leurs propriétés physico-chimiques sont intimement liées à l'origine de la charge et sa localisation dans les feuillets. Selon que le fer se situe dans les feuillets en site octaédrique ou tétraédrique, les argiles auront également des propriétés électrochimiques différentes, comme par exemple la perméabilité des films d'argile et l'électro-activité du fer. Ainsi, l'électro-activité du fer situé dans les sites octaédriques a été clairement observée en milieu acide. En milieu neutre, la présence d'un médiateur redox facilite la mise en évidence du rôle du fer comme relais d'électrons. D'autre part, nous avons montré que le fer situé en site octaédrique dans les HDL n'est pas électroactif, mais que les films préparés avec les HDL ont des perméabilités dix fois plus importantes que ceux préparés avec les argiles cationiques.

Un deuxième objectif était l'immobilisation de l'hémoglobine dans ces matériaux lamellaires. Nous avons montré que les capacités d'adsorption à pH 7 des argiles cationiques notamment la nontronite ($C_m = 900$ mg/g), étaient beaucoup plus importantes que celles des HDL ($C_m = 69$ mg/g pour Mg_2Al-Cl et 244 mg/g pour Zn_2Al-Cl). Par contre, ces matériaux offrent la possibilité d'immobiliser l'Hb au cours de leur synthèse (méthode de coprécipitation). Dans ce cas, un rapport massique protéine/HDL de 1 g/g peut être atteint. Cependant, les caractérisations spectroscopiques montrent une dénaturation partielle de la structure tertiaire de la protéine par la formation de liaisons hydrogènes entre la biomolécule et les feuillets hydroxylés des HDL. Ce n'est pas le cas avec les argiles cationiques, où l'intégrité de la protéine est conservée malgré son intercalation entre les feuillets.

Le comportement électrochimique de l'Hb immobilisée dans ces matériaux est caractérisé par un signal réversible situé autour $-0,3$ V. Ce signal correspond au transfert direct d'électrons entre l'hème de la biomolécule et l'électrode. Le pourcentage d'Hb électroactive est plus important dans les argiles cationiques que dans les HDL. De plus, nous avons montré que les argiles riches en fer octaédrique améliorent le transfert direct d'électrons entre l'hémoglobine et l'électrode, avec 7 % d'électro-activité pour la nontronite et seulement 2 % pour l'HDL Mg_2Al-Hb . Dans tous les cas, nous avons observé un comportement électrocatalytique de la protéine immobilisée vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène. Son

efficacité dépend à la fois du pourcentage de protéine électro-active mais aussi de l'accessibilité de son site actif par les molécules de H_2O_2 , donc de la perméabilité du film.

Outre l'immobilisation de l'Hb dans les HDL, nous avons également intercalé une métalloporphyrine chargée négativement, la FeTSPP, dans trois HDL de compositions différentes : Zn_2Al , Mg_2Al et Zn_2Cr et nous avons réalisé la première étude électrochimique avec ces matériaux. Un signal électrochimique réversible particulièrement important, lié à la réduction réversible du fer complexé dans le macrocycle, a été mis en évidence pour la phase Zn_2Cr -FeTSPP.

Enfin, des capteurs et biocapteurs ampérométriques ont été développés avec les différentes électrodes modifiées par les argiles et les HDL pour permettre le dosage du peroxyde d'hydrogène. En particulier, des biocapteurs de troisièmes générations ont été préparés avec l'Hb immobilisée dans les argiles et les HDL. Les caractéristiques des meilleurs capteurs sont résumées dans le tableau V.1. Avec les argiles cationiques, la présence du fer permet le dosage direct de H_2O_2 en milieu acide. Cependant, la présence d'un médiateur redox (méthyl-viologène) ou de la biomolécule (Hb) améliore les performances des capteurs. Le biocapteur de troisième génération, préparé avec la phase $MgAl$ -Hb_{cop}, a une sensibilité particulièrement importante mais dans un domaine de concentration très limité. Les capteurs Hb/NontG et Zn_2Cr -FeTSPP ont des sensibilités et des domaines de linéarité très proches.

Tableau V.1 : Les différentes configurations des capteurs à H_2O_2

Matériau	pH	E_{appl} (V)	G.L. (mM)	S (mA/Mcm ²)
NontG	3	-0,25	0,63 - 2,45	0,23
MV ²⁺ /MSF	8	-0,75	0,01 - 4	53
			5 - 40	132
Hb/NontG	7	-0,40	$2 - 14 \cdot 10^{-3}$	410
Mg_2Al -Hb _{cop}	7	-0,40	$1,5 - 8 \cdot 10^{-5}$	$37 \cdot 10^3$
Zn_2Cr -FeTSPP	4,5	-0,30	$0,18 - 1,6 \cdot 10^{-3}$	534

Les perspectives de ce travail se déclinent sous différents volets qui devraient permettre de confirmer certains de nos résultats ou de compléter cette étude.

Il faudrait reprendre la synthèse de l'HDL MgFe-Hb, en étudiant l'influence des conditions de synthèse de telles que la concentration en sels, le rapport des métaux divalent et trivalent et le pH de synthèse.

De même, il faudrait poursuivre l'étude sur l'immobilisation de la métallo-porphyrine au fer dans les HDL et plus particulièrement étudier l'effet de la nature des cations dans le feuillet sur le comportement électrochimique de la porphyrine immobilisée. Nous pourrions tester également des argiles cationiques riches en fer afin de comparer l'intervention du fer de l'argile dans le comportement électrochimique de l'Hb avec celui d'une porphyrine au fer chargée positivement.

Finalement, ce travail devrait être poursuivi par l'immobilisation d'autres hémoprotéines comme la myoglobine et la peroxydase de Raifort. Nous étudierons l'adsorption de ces hémoprotéines par les HDL de compositions différentes. Ensuite, nous nous intéresserons plus particulièrement à la coprécipitation de ces hémoprotéines dans les HDL afin de comparer les résultats obtenus avec ceux relatifs à l'hémoglobine.

Annexes

A.1-Les argiles utilisées

- ✓ Nontronite naturelle (NontG) : Nontronite de Garfield Washington, Clay Minerals Repository (University of Missouri, Columbia USA).
- ✓ Montmorillonite naturelle (Swy2): Wyoming USA, Clay Minerals Repository.
- ✓ Les montmorillonites synthétiques (MS) et (MSF) ont été synthétisées par Madame Jocelyne Brendlé (LMPC-UMR 7016, Mulhouse).
- ✓ Saponite synthétique au fer (SapSF); synthétisée par Monsieur Jean-Louis Robert (ISTO UMR 6113, Orléans).
- ✓ Nontronite synthétique (NontS); synthétisée par Madame Sabine Petit (UMR 6532 CNRS/INSU, Poitiers).
- ✓ Laponite (Lap) : Laportes Industries Ltd

La nontronite (NontG) et la montmorillonite (Swy2) ont été purifiées et échangées avec du sodium par une réaction d'échange. L'argile a été dispersée dans une solution NaCl (1N) agité pendant 24 h puis centrifugée. Cette procédure a été répétée cinq fois, ensuite l'argile a été lavée avec de l'eau jusqu'à ce qu'un test au chlorure négatif ait été obtenu. La fraction finale a été récupérée par centrifugation et séchée. Toutes les argiles synthétiques ont été utilisées sans modification.

A.2-Techniques et appareils

1-La Diffraction des Rayons X

La diffraction des rayons X ont été enregistrées sur un diffractomètre Siemens D501 équipé d'un tube anticathode de cuivre en utilisant des rayonnements $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,5415 \text{ \AA}$ et d'un monochromateur arrière à lame de graphite. Les échantillons sont en poudre ou séchés sous forme de films minces sur une lame de verre.

Les diffractogrammes ont été réalisés dans les conditions opératoires suivantes :

- ✓ Domaine angulaires en 2θ : 2-70, incrément angulaire en 2θ est $0,08^\circ$ avec un temps d'intégration par comptage : 4 s.
- ✓ Domaine angulaires en 2θ : 1-20, incrément angulaire en 2θ : $0,08^\circ$ avec un temps d'intégration par comptage : 12 s.

2-Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier

Les mesures d'Infra-Rouge ont été réalisées sur un spectromètre à transformée de Fourier de type Nicolet 5700 électrons Thermo équipé un accessoire de réflectance totale atténuée (ATR).

3-Spectroscopie UV-Vis

Les spectres UV-Visible en phase liquide ou sous forme de films minces sur des plaques de quartz ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Evolution 500 UV-Visible (Nicolet).

4-Imagerie par microscopies

Le microscope électronique à balayage (MEB) utilisé est un supra Zeiss 55-VP avec une énergie d'électrons de 3 kV du Centre CASIMIR à Aubière. Les images de microscopie à transmission (MET) ont été prises en utilisant un microscope électronique à transmission (7650 Hitachi) avec une tension d'accélération de 80 kV.

5-Zétamètre

La taille des particules ont été déterminées après dispersion de l'argile dans l'eau (2 mg/ml) sous agitation pendant 24 h. L'appareil utilisé est nanoZS Zetasizer instrument Malvern utilisant la spectroscopie de photocorrelation.

6-Profilomètre

Les épaisseurs des dépôts d'argiles et HDL ($\phi = 5\text{mm}$) sur des lames de verre ont été déterminés par mesure de marche par un profilomètre de type Alpha-step IQ (KLA TENCOR). La marche est faite par arrachement d'une fine bande de papier scotch. Les valeurs des épaisseurs sont des moyennes de 3 mesures par dépôt répétées avec 2 dépôts différents.

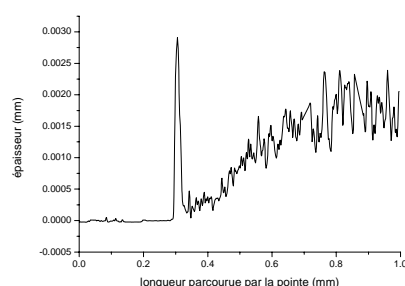


Figure A-1 : Exemple de profil obtenu avec un dépôt d'argile MS.

7- Dichroïsme circulaire

Dichroïsme circulaire (DC) a été réalisé sur un spectropolarimètre JOBIN YVON CD6. Les spectres ont été enregistrés entre 190 et 260 nm à 20° C à l'IBS (Grenoble) par Monsieur Dominique Madern.

8-Électrochimie

La voltammétrie cyclique, la voltammétrie à balayage linéaire (LSV) et la chronoampérométrie ont été réalisées avec un potentiostat EA161 (eDAQ) (Figure A-1) relié à une cellule thermostatée avec un système à trois électrodes; une électrode de référence (Ag/AgCl), une électrode auxiliaire en platine et une électrode de travail de carbone vitreux. Mesures d'impédance (IES) ont été réalisées avec un Potentiostat AutoLab PGSTAT 100 Eco-Chemie.

Avant leur utilisation, les électrodes de carbone vitreux ont été polies avec une suspension des particules d'alumine (0,05 μm) sur un feutre puis elles ont été nettoyées avec l'eau et l'éthanol dans un bain à ultrasons pendant 5 min et enfin elles sont rincées à l'eau et séchées.

A.3-Produits

- Le peroxyde d'hydrogène (Sigma-Aldrich)
- Hydroquinone (Sigma-Aldrich)
- Méthyle Viologène (MV^{2+} - 2PF_6) synthétisé dans notre laboratoire [Reynes O., PhD thèse, Joseph Fourier, Grenoble 2003].
- Hémoglobine (Hb) à partir de sang bovin (Sigma-Aldrich)
- 5, 10, 15, 20 Tetrakis 4 Sulfonatophenyl porphyrine : TSPP (Sigma-Aldrich)
- FeTSPP a été métallée par Matilde Halma.
- Dodecyle sulfonate de sodium (Acros)
- MgCl_2 (Acros)
- ZnCl_2 (Acros)
- FeCl_3 (Acros)
- CrCl_2 (Acros)
- AlCl_3 (Acros)
- NaOH (Acros)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Acros)
- NaH_2PO_4 (Acros)
- Na_2SO_4 (Acros)
- H_2SO_4 (Acros)



A



B



C

Figure A-2 : Photos du dispositif de mesure électrochimique (A) et de potentiostat EA161 (B) et d'une cellule électrochimique (C).

Résumé

Ce travail de thèse est consacré au développement de biocapteurs électrochimiques en utilisant des argiles ou des hydroxydes doubles lamellaires (HDL), riches en fer, comme matrices d'immobilisation de l'hémoglobine (Hb). Le but était de mettre en évidence la contribution des propriétés redox de ces matériaux dans l'amélioration des performances des biocapteurs par un phénomène de catalyse redox. L'hémoglobine est une métalloprotéine qui contient des porphyrines au fer (hème) comme sous-unité prosthétique. Une orientation privilégiée de cette biomolécule à la surface d'une électrode permet le transfert direct d'électrons entre le site actif de la protéine et l'électrode. Les propriétés électro-catalytiques de l'Hb immobilisée ont été étudiées pour la réduction du peroxyde d'hydrogène et ont permis la réalisation de différents biocapteurs ampérométriques.

Nous avons immobilisé l'Hb dans plusieurs argiles cationiques contenant du fer : la nontronite de Garfield, des montmorillonites ferriques synthétiques ou naturelles, ainsi qu'une montmorillonite synthétique servant de référence. Les propriétés électrochimiques de ces argiles ont été évaluées en voltammétrie cyclique et en impédancemétrie, en relation avec leurs propriétés structurales. Les isothermes d'adsorption de l'Hb dans ces argiles ont été établis montrant une forte affinité de l'Hb pour la nontronite. Nous avons montré que les argiles riches en fer octaédrique, notamment la nontronite, améliorent le transfert direct d'électrons entre l'Hb et l'électrode.

L'immobilisation de l'Hb dans des HDL, de compositions différentes (MgAl et ZnAl) a été réalisée par adsorption et coprécipitation. Il faut noter que le fer situé en site octaédrique dans les HDL (MgFe) n'est pas électroactif et ne peut donc pas intervenir dans le processus électro-enzymatique. Les caractérisations physico-chimiques et morphologiques des biohybrides Hb-HDL ont été faites par plusieurs techniques, comme la DRX, IR, UV, MEB et MET, montrant une dénaturation partielle de la structure tertiaire de la protéine par la formation de liaisons hydrogènes entre la biomolécule et les feuillets hydroxylés des HDL; ce qui limite l'accessibilité de l'hème au transfert électronique direct.

Outre l'immobilisation de l'Hb dans les HDL, nous avons également intercalé une métalloporphyrine chargée négativement, la FeTSPP, dans trois HDL de compositions différentes : Zn_2Al , Mg_2Al et Zn_2Cr et nous avons réalisé la première étude électrochimique avec ces matériaux.

Mots clés : Argiles, HDL, Hémoglobine, Biocapteurs ampérométriques, H_2O_2

Abstract

In this thesis work, we were interested in the development of electrochemical biosensors by using iron rich clays and Layered Doubles Hydroxides (LDH), as matrices for immobilizing hemoglobin (Hb). The aim of this work was to study the contribution of iron structural materials in improving the performance of biosensors by a phenomenon of redox catalysis. Hemoglobin is a metalloprotein containing iron porphyrin (heme) as prosthetic group. A preferred orientation of the biomolecule on an electrode surface may improve the direct electron transfer between the active site of the protein and the electrode. The electro-catalytic properties of immobilized Hb were studied for the reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) and, allowed the development of different amperometric biosensors.

We have immobilized Hb in iron rich cationic clays (nontronite from Garfield, montmorillonites) and in a montmorillonite containing non iron as a reference. The electrochemical properties of these clays were studied by cyclic voltammetry and impedancemetry. The adsorption isotherms of Hb on these clays showed a strong affinity of Hb for nontronite. We have also shown that octahedral structural iron clays, especially nontronite, improve the direct electron transfer between Hb and electrode.

Immobilization of Hb in LDH of different compositions (MgAl and ZnAl) was performed by adsorption and coprecipitation methods. We noted that iron situated in octahedral site in LDH (MgFe) is not electroactive and therefore can not improve the electro-enzymatic process. The chemical and morphological characterizations of the Hb-LDH biohybrids were carried out by several techniques, such as XRD, IR, UV, SEM and TEM. We noted a partial denaturation of the tertiary structure of the protein, due to the formation hydrogen bonds between the biomolecule and hydroxyl layers of LDH, which limits the accessibility of heme to direct electronic transfer.

Besides interactions between Hb and LDH, we were also interested in the immobilization of a negatively charged metalloporphyrin (FeTSPP) in three different LDH: Zn_2Al Mg_2Al and Zn_2Cr and we have starting the first electrochemical study of these materials.

Keywords: Clay, LDH, Hemoglobin, Amperometric biosensor, H_2O_2