

In memoriam prof. dr. Liviu Oniciu

CARACTÉRISATION OPÉRATIONNELLE D'UN BIOCAPTEUR AMPÉROMÉTRIQUE POUR LA DÉTECTION DE L'ANION NITRATE

ANA-MARIA TODEA, LIANA MARIA MUREȘAN,
IONEL CATALIN POPESCU*

RÉSUMÉE. L'étude a été centrée sur le développement d'un biocapteur ampérométrique pour la détection de l'anion nitrate et a envisagé l'amélioration de la stabilité du biocapteur par l'utilisation d'une matrice enzymatique composite. Ainsi, sur une première couche polymérique, obtenue par l'électropolymérisation "*in situ*" d'un dérivé pyrrolique amphiphilique du viologène, a été déposée l'enzyme (nitrate réductase) immobilisée par adsorption sur une argile hydrophilique (laponite). Finalement, une dernière couche polymérique a été déposée par l'électropolymerisation d'un dérivé pyrrolique-viologène soluble dans l'eau. La limite de détection du biocapteur est 0,5 μM , tandis que sa sensibilité, calculée de la pente de la région linéaire, est de 37,7 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^2$. La valeur assez petite de K_M^{app} (0.29 mM), déterminée par modélisation de la dépendance Michaelis-Menten, indique que l'argile utilisée offre un milieu biocompatible avec l'enzyme.

Mots clef: biocapteur ampérométrique, anion nitrate

INTRODUCTION

Au cours des dernières années, la détection électrochimique des espèces chimiques d'intérêt dans la protection de l'environnement a retenu l'attention de nombreux chercheurs, due à ses caractéristiques très attrayantes au niveau du rapport performances (sensibilité, limite de détection, sélectivité, temps de réponse, robustesse etc.) / efforts de réalisation (simplicité, coût réduit, versatilité etc.). De plus, le couplage des transducteurs électrochimiques (potentiométriques et surtout ampérométriques), réalisés à base d'électrodes modifiées, avec des éléments de reconnaissance biologique (de nature métabolique ou immunospecifique) a donné lieu à l'apparition d'un outil très performant, le biocapteur électrochimique (voir, par ex. [1]).

* Département de Chimie Physique, Université Babeș-Bolyai, 11 Rue Arany Janos, 400028 Cluj-Napoca, Roumanie; cpopescu@chem.ubbcluj.ro

Des biocapteurs pour l'anion nitrate ont été fabriqués par l'incorporation de la nitrate réductase (NR) dans des différentes matrices polymériques [2, 3]. Malgré les caractéristiques analytiques très intéressantes de ces dispositifs, leur utilisation est fortement diminuée en raison de leur instabilité fonctionnelle, essentiellement déterminée par la fragilité du récepteur biologique [4].

Notre étude, centrée sur le développement d'un biocapteur pour la détection de l'anion nitrate par l'immobilisation de la nitrate réductase dans une matrice composite, a envisagé l'amélioration de la stabilité du biocapteur par l'utilisation combinée de l'électropolymérisation "*in situ*" de deux dérivés pyrroliques (Schème 1) et d'une argile (laponite). Laponite est un matériel avec une grande stabilité thermique, mécanique et chimique, ayant des propriétés remarquables d'échangeurs d'ions et qui, suite à sa structure particulière, permet l'obtention de vitesses élevées de diffusion du substrat, lors qu'il est présent dans l'architecture d'une matrice enzymatique [5].

Le laponite a été employée avec succès dans la construction des biocapteurs ampérométriques pour la détection de glucose [6], de l'anion NO_3^- [7] et pour la construction des biocapteurs conductimétriques [8]. D'autre part, les dérivés polypyrroliques-viologène assurent simultanément l'immobilisation de l'enzyme, le contact électrique avec le matériel électrodique [7, 9 -11] et la création d'un microenvironnement favorable pour augmenter la durée de vie du récepteur biologique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le biocapteur a été caractérisé par voltammétrie hydrodynamique cyclique en tampon TRIS 0,1 M (pH 7,5), dans le domaine de potentiel -0,7 - -0,3 V vs. Ag/AgCl. Les voltammogrammes typiques obtenues pour le biocapteur **poly 1 / NR-laponite / poly 2**, en absence et en présence de l'anion nitrate pour différentes concentrations, sont présentées dans la figure 2.

Comme on peut voir dans la figure 2, en absence des nitrates on obtient une onde à caractère quasi-réversible, correspondant au couple $\text{MV}^{2+}/\text{MV}^+$ ($\varepsilon^0 = 0,55 \text{ V} / \text{Ag/AgCl/KCl}_{3\text{M}}$). Par contre, en présence de différentes concentrations de l'anion nitrate une augmentation prononcée du courant cathodique a été mise en évidence, en parallèle avec la diminution progressive du courant anodique. Ce comportement est la preuve directe de l'activité bioélectrocatalytique de l'électrode **poly 1 / NR-laponite / poly 2** pour la réduction de l'anion nitrate.

Le comportement électrocatalytique du biocapteur met en évidence un très bon contact électrique entre le centre redox de la NR et la surface de l'électrode de travail, par l'intermédiaire des groupes viologène de la matrice polymérique. À la fois, celui-ci prouve l'efficacité de la communication

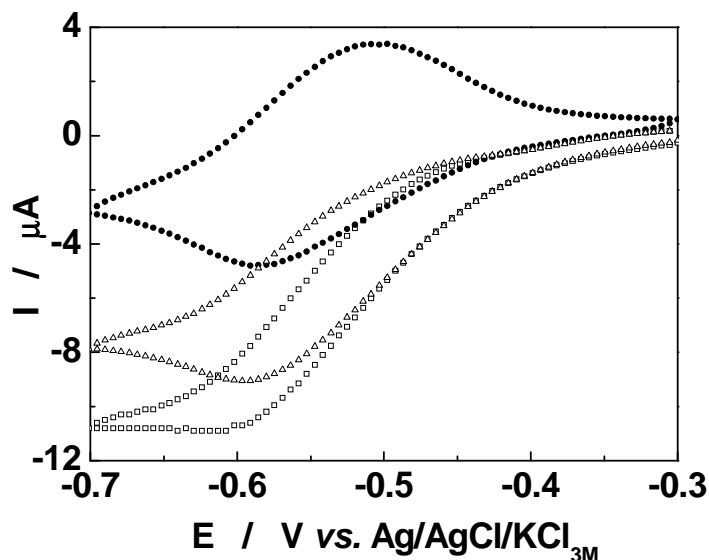
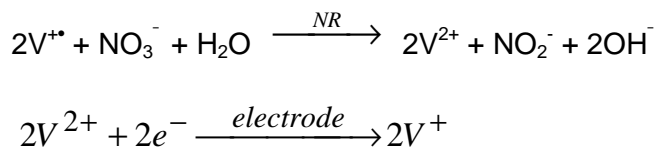


Figure 2. Réponse voltammétrique du biocapteur **poly 1 / NR-laponite / poly 2** en absence (●) et en présence de NO_3^- : (Δ) 0,25 mM; (□) 5 mM. Conditions expérimentales: tampon TRIS 0,1 M (pH 7,5); vitesse de balayage, 5 mV/s; 1000 rpm; 30 °C.

électrique entre le film de **poly 1**, en contact avec la surface de l'électrode et le polymère **poly 2**, qui est incorporé dans l'argile. Par conséquent, le schéma de la détection bioampérométrique de l'anion nitrate sur l'électrode **poly 1 / NR-laponite / poly 2** est la suivante:



L'augmentation du courant cathodique, due à la réduction du nitrates à nitrite, a permis le traçage d'une courbe de calibration, basée sur des mesures voltammétriques (figure 3). On peut constater facilement l'allure typique correspondant à une cinétique Michaelis-Menten. Les paramètres cinétiques caractéristiques (I_{max} et K_M) ont été estimés à l'aide du logiciel Origin (figure 3).

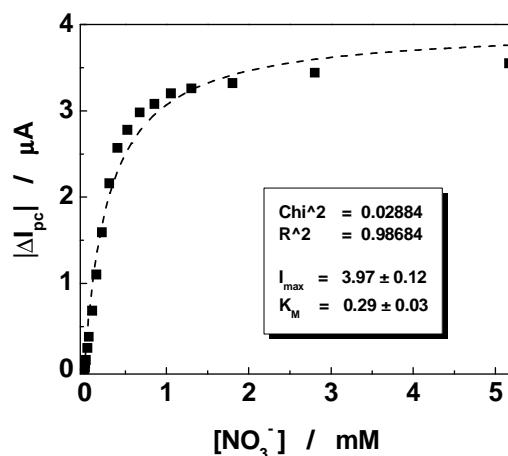


Figure 3. Courbe de calibration pour le dosage de NO_3^- par voltammétrie hydrodynamique cyclique en utilisant le biocapteur **poly 1 / NR-laponite / poly 2**. Conditions expérimentales: domaine de potentiel, -0,7 - -0,3 V vs. Ag/AgCl; tampon, TRIS 0,1 M (pH 7,5); 30 °C; vitesse de balayage, 5 mV/s; 1000 rpm.

Comme on peut observer dans la figure 4 la réponse du biocapteur est linéaire jusqu'à la concentration de 0.15 mM NO_3^- . Les paramètres correspondant à la dépendance linéaire entre ΔI_{pc} et $[\text{NO}_3^-]$ sont marqués dans la figure 4. La limite de détection est 0,5 μM , tandis que sa sensibilité, calculée de la pente de la région linéaire, est de 37,7 $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^2$.

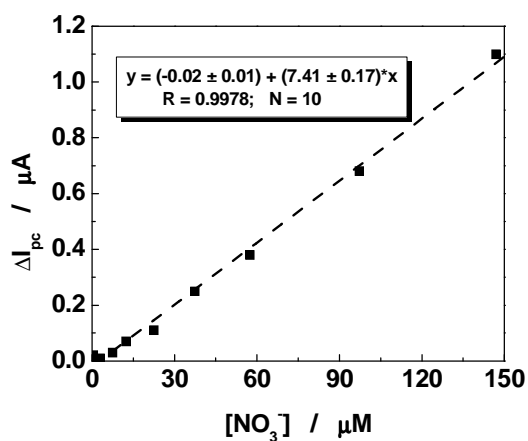


Figure 4. Domaine linéaire de la courbe de calibration pour le dosage de NO_3^- avec le biocapteur **poly 1 / NR-laponite / poly 2**. Conditions expérimentales: comme en figure 3.

La valeur assez petite de K_M^{app} , déterminée par modélisation de la dépendance Michaelis-Menten de la pente de la représentation linéaire $1/\Delta I_p = f(1/c)$ indique le fait que l'argile offre un milieu biocompatible avec NR. Le caractère hydrophile du laponite et l'absence des réactions chimiques pendant l'immobilisation de l'enzyme préviennent la dénaturation de la NR.

Une étude préliminaire de la stabilité du biocapteur indique une maintenance de 100% de la réponse pendant 48 heures. L'efficacité du biocapteur diminue jusqu'à 80,2 % après 72 heures et jusqu'à 68 % après 96 heures. La diminution du signal est due à la perte de viologène et à la dénaturation de l'enzyme.

CONCLUSIONS

Les recherches ont conduit à l'obtention d'un biocapteur, **poly 1/NR-laponite/poly 2**, pour l'anion NO_3^- , basé sur une matrice enzymatique composite.

Le comportement électrocatalytique du biocapteur **poly 1/NR-laponite/poly 2** met en évidence un bon contact électrique entre le centre redox de l'enzyme immobilisée et la surface de l'électrode en carbone vitreux. L'efficacité de la communication électrique entre le film du polymère 1, en contact avec la surface de l'électrode et le polymère 2, qui se trouve incorporé dans l'argile, se reflète dans les valeurs des paramètres bioélectroanalytiques qui se situent parmi les meilleurs dans le domaine.

SECTION EXPERIMENTALE

Le dispositif experimental

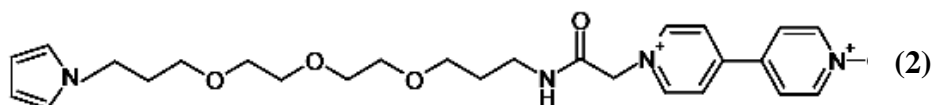
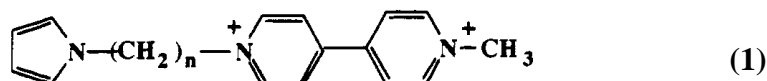
Les études électrochimiques ont utilisé un potentiostat (AUTOLAB 100, ECOchemie, Utrecht, Pays Bas) et une cellule électrochimique thermostatée, à trois électrodes: l'électrode de travail en carbone vitreux ($\Phi = 5\text{mm}$); l'électrode auxiliaire en fil d'Ag; l'électrode de référence, Ag/AgCl/KCl_{3M} .

Préparation de l'électrode modifiée

La méthode d'immobilisation comporte deux étapes: (i) l'immobilisation de l'enzyme (nitrate réductase, **NR**) dans une argile hydrophile (laponite), déposée sur une couche polymérique du médiateur redox, obtenue par l'électropolymerisation d'un dérivé pyrrolique-viologène amphiphilique (**monomère 1**; $n = 12$); (ii) la déposition sur la couche précédente d'une couche polymérique, préparée par l'électropolymerisation d'un dérivé pyrrolique- viologène soluble dans l'eau (**monomère 2**) (Schema 1).

L'électrode en carbone vitreux a été polie avec de la pâte de diamant et nettoyée par ultrasonnage pendant 20 minutes plongée dans l'eau distillée. Par suite, sur la surface de l'électrode on a déposé 20 μl de solution 5mM du **monomère 1**, dispersé dans l'eau distillée par ultrasonnage; puis, le solvant a été évaporé sous vide. L'électrode ainsi modifiée a été transférée dans une

cellule contenant une solution aqueuse 0,1 M de LiClO_4 et l'électropolymérisation du **monomère 1** a été réalisée par électrolyse potentiostatique (0,8 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{3\text{M}}$) pendant 15 minutes, sous argon.



Schema 1

Séparément, on a préparé une suspension colloïdale de laponite en eau bidistillée et 33 μl de ce mélange (contenant 22 μg laponite et 22 μg NR) ont été déposés sur la couche polymérique 1 (**poly 1**). Après l'évaporation sous vide de l'eau et la formation d'un film adhérent de NR-laponite sur la première couche polymérique, par l'électropolymérisation oxydative potentiostatique (0,8 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{3\text{M}}$) d'un dérivé pyrrolique-viologène soluble dans l'eau (**monomère 2**), à partir d'une solution 5 mM, contenant 0.1 M LiCl_4 , une dernière couche polymérique (**poly 2**) a été déposée sur l'électrode modifiée. La structure finale de l'électrode modifiée est représentée schématiquement dans la figure 1.

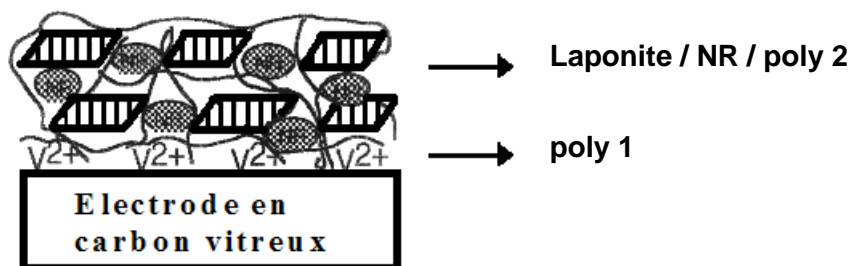


Figure 1. Représentation schématique de l'électrode modifiée (V^{2+} , viologène; \bullet , nitrate réductase; ▨ , polymère).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Dr. Serge Cosnier et Dr. Christine Mousty (Laboratoire d'Electrochimie Organique et de Photochimie Redox, UMR CNRS 5630, Institut de Chimie Moléculaire, FR CNRS 2607, Université Joseph Fourier, Grenoble) pour les produits chimiques utilisés pour la construction du biocapteurs et pour l'accueil de Mlle Todea dans leur laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (eds.), "Frontiers in Biosensorics I", Birkhauser Verlag, Basel, **1997**, chapitre 4, pp. 49.
2. L. M. Moretto, P. Ugo, M. Zanata, P. Guerriero, C. R. Martin, *Analytical Chemistry*, **1998**, *70*, 2163.
3. S. Cosnier, C. Innocent, Y. Jouanneau, *Analytical Chemistry*, **1994**, *66*, 3198.
4. G. L. Turdean, S. E. Stanca, I. C. Popescu, "Biosenzori amperometrici", Presa Universitara Clujeana, **2005**, chapitre 2, pp. 15.
5. S. Cosnier, K. Le Lous, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1996**, *406*, 243.
6. S. Poyard, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, S. Cosnier, P. Labbe, *Sensors and Actuators B*, **1999**, *58*, 380.
7. S. Da Silva, D. Shan, S. Cosnier, *Sensors and Actuators B*, **2004**, *103*, 397.
8. A. Senillou, N. Jaffrezic, C. Martelet, S. Cosnier, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, *401*, 117.
9. S. Cosnier, B. Galland, C. Innocent, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1997**, *433*, 113.
10. S. Cosnier, C. Gondran, A. Senillou, *Synthetic Metals*, **1999**, *102*, 1366.
11. G. Ramsay, S. M. Wolpert, *Analytical Chemistry*, **1999**, *71*, 504.