

Synthèses, caractérisations et mises en forme de matériaux nanohybrides Enzymes-Hydroxydes Doubles Lamellaires
Elaboration de biocapteurs électrochimiques appliqués à la détection de polluants aqueux.

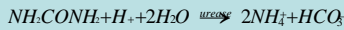
Objectifs

Le projet de recherche concerne l'élaboration de biocapteurs électrochimiques appliqués à la détection de polluants aqueux, basés sur l'encapsulation d'enzymes dans une matrice bidimensionnelle de type Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL), aux propriétés physico-chimiques ajustables à l'accumulation et à la protection de l'enzyme, à la préservation du site actif, à l'accessibilité du substrat et à l'électro-activité du support. La réalisation des biocapteurs passe par une mise en forme des nanohybrides Enzyme-HDL en dépôt ou multicouches de Langmuir-Blodgett sur électrodes. La caractérisation des matériaux met en relation les performances électrochimiques du capteur avec les propriétés structurales et morphologiques du nanocomposite (interactions structure hôte – enzyme, confinement de l'enzyme, interactions substrat-nanohybrides, et positité du matériaux).

Enzymes

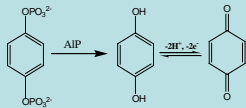
Choix des Matériaux

Deux enzymes modèles : l'uréease et l'Alcaline phosphatase
L'uréease catalyse la décomposition de l'urée selon la réaction :



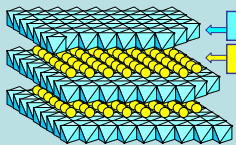
La détection de l'urée réalisée est basée sur la mesure de la variation de pH à l'interface biomembrane - transducteurs du type isolant-semiconducteur (ISFET) sensibles aux variations de pH (mesures conductimétriques).

L'alcaline phosphatase provoque la dégradation des monoesters orthophosphoriques en libérant des phosphates inorganiques et des alcools :



La détection des phosphates organiques est réalisée par la mesure du courant d'oxydation des dérivés phénoliques issus de la réaction enzymatique (mesures ampérométriques).

Hydroxydes Doubles Lamellaires



Feuilleil: $[M^{II}_x M^{III}_y(OH)_z]^{n+}$
Interfeuilleil: $[X_n nH_2O]^{n-}$
 $M^{II} = Zn^{2+}, Mg^{2+}$
 $M^{III} = Al^{3+}$
 $0.20 \leq x \leq 0.33$
 $X = NO_3^-$

Propriétés spécifiques des matériaux HDL

- Composition chimique ajustable feuilleil/interfeuilleil
- Propriété d'échange anionique 150 meq/100g < a.e.c. < 450 meq/100g
- Matériaux à porosité contrôlée micro-méso-macro
- Matériaux régénérables
- Contrôle des propriétés Hydrophile/Hydrophobe

Activités des enzymes confinées

Pourcentage d'activité des enzymes immobilisées par rapport aux enzymes libres ZnAl-uréease_{cop} et MgAl-AIP_{cop}

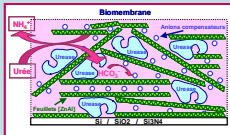
Perméabilité des membranes Pm (cm/s)

ZnAl-Uréease				
Q	Zn/Al	pH	%	Suspensions fraîches
1/3	3	8	16	
1/2	3	8	32	
1	3	8	28	
2	3	8	44	
3	3	8	62	
1	3	7	42	
1	3	9	16	
1	2	7.5	21	
1	4	9	32	

MgAl-AIP	
Matrices	%
MgAl-AIP (Q=1) séchée	0
MgAl-AIP (Q=3) séchée	10
MgAl-AIP (Q=1) fraîche	30

Matrices	Pm (cm/s)
Zn ₂ Al-Cl	2.5 10 ⁻¹¹
Zn ₂ Al-Cl-uréease _{cop} (Q=1)	1.4 10 ⁻¹²
Zn ₂ Al-uréease _{cop} (Q=3)	1.6 10 ⁻¹²
Mg ₂ AlCO ₃	1.6 10 ⁻¹²
Mg ₂ Al-Alp _{cop} (Q=3)	2.6 10 ⁻¹²
Laponite	3.1 10 ⁻¹²
Laponite-uréease (Q=1)	3.1 10 ⁻¹²

Biocapteur à Urée

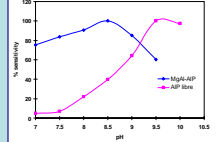
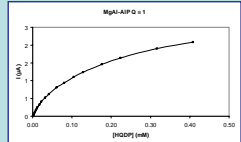
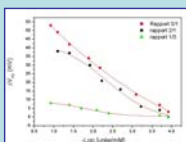


Les Perméabilités élevées des HDL et HDL/Enzyme assurent une bonne accessibilité du substrat à l'Enzyme

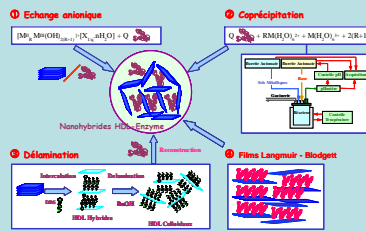
Performances des Biocapteurs

Réponse du biocapteur Zn₂Al-uréease en fonction de la concentration en urée et du taux de confinement.

Réponse du biocapteur Mg₂Al-AlcalinePhosphatase et effet du pH de travail



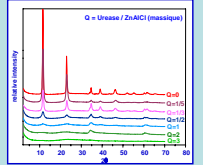
Stratégie d'Elaboration



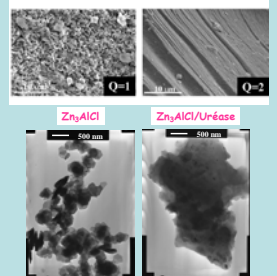
Caractérisations

Diffractogrammes RX et clichés de MEB et de MET des phases Zn₂Al-Uréease copécipitées à différents taux de confinement Q → la dispersion HDL/Enzyme augmente avec Q

DRX

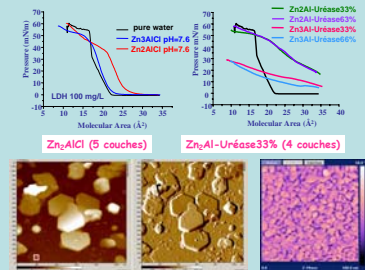


Clichés MEB et MET



Mise en forme : Films LB

Les courbes Pression-Surface et les images AFM démontrent la stabilité des films LB d'HDL et de matériaux Hybrides HDL-Uréease et la réalisation de couches minces.



Retombées du projet et perspectives

La réalisation complète des objectifs ambitieux annoncés dans le projet a été rendue difficile, du fait qu'une seule thèse financée (S. Vial – LMI) a pu être attribuée à ce sujet (allocation MENRT). La majorité des manipulations réalisées au LOPR l'ont été par des stagiaires de courte durée (entre 1 et 5 mois).

La collaboration LMI-LEOPR-IFOS sur ce sujet se poursuit. Une allocation de bourse de thèse (MENRT) a été accordée en 2006 au LMI pour poursuivre cette étude. Cette collaboration a été étendue au Laboratoire de Physico-Chimie de la Faculté des Sciences de Bizerte (Université de Tunis). Un Programme d'Action en Réseau (PAR) « Nanomatériaux hybrides Biomolécules/Argiles » vient d'être accepté par le Comité Mixte Franco-Tunisien pour la Coopération Universitaire pour 3 ans (2006-2008) avec l'initiation de 2 thèses en cotutelle (LMI/CEGELY/Bizerte et LEOPR/LMI/Bizerte).

Production scientifique

7 articles acceptés et 2 soumis - 1 thèse - 12 communications orales – 6 communications par affiche

- Immobilisation d'enzymes dans des Hydroxydes Doubles Lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques, S. VIAL, Thèse de Docteur d'Université, Spécialité Chimie-Sciences des Matériaux, Université Blaise Pascal, 12 décembre 2005.
- Urea biosensor based on Zn₂Al-Ureaase layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures, H. Barhoumi et al., Mat. Sci. Eng. (2006) C26 328-333.
- Nanohybrid layered double hydroxides / Ureaase materials: synthesis and application to urea biosensors, S. Vial et al., Mat. Sci. Eng. (2006) C26 387-393.
- Nanohybrid Enzyme –Layered Double Hydroxides: Potential applications, C. Forano et al., Curr. NanoSci. (2006) 2, 283-294.
- Biogenesis of Zn₂Al LDH by Ureaase Enzyme, S. Vial et al., Chem. Commun. (2006) 290-292.
- Novel route for Layered Double Hydroxides preparation by enzymatic decomposition of urea, S. Vial et al., J. Phys. and Chem. Solids, sous presse.
- Specific determination of As (V) by acid phosphatase-polyphenol oxidase biosensor, S. Cosnier et al., Anal. Chem. (2006) 78, 4985-4989.
- Laccase immobilization in Redox active Layered Double Hydroxides: a reagentless amperometric biosensor, C. Mousty et al., Biosens. Bioelect. (2006) sous presse.

Contacts :

- Forano Claude, Lab. Matériaux Inorganiques, UMR CNRS 6002, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, claudie.forano@univ-bpclermont.fr
- Mousty Christine, Lab. D'Electrochimie Organique et des Procédés Redox, UMR 5630, Université Joseph Fourier, 301, Rue de la Chimie, BP 53 - 38041 GRENOBLE CEDEX 9, christine.mousty@ujf-grenoble.fr
- Nicole Jaffrezic-Renault, Laboratoire des Sciences Analytiques UMR CNRS 5180, Université Claude Bernard-Lyon1, Bat. Raulin 5e étage, 69622 VILLEURBANNE Cedex, nicole.jaffrezic@univ-lyon1.fr

