POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE BIOCAPTEURS AMPEROMETRIQUES DE TROISIÈME GÉNÉRATION À PARTIR DE NANOTUBES DE CARBONE

JEAN-FRANÇOIS ROCHETTE
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
AOÛT 2004

© Jean-François Rochette, 2004.

Library and Archives Canada

Published Heritage Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et Archives Canada

Direction du Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 0-612-97979-2
Our file Notre référence
ISBN: 0-612-97979-2

NOTICE:
The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:
L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT DE BIOCAPTEURS AMPÉROMÉTRIQUES DE TROISIÈME GÉNÉRATION À PARTIR DE NANOTUBES DE CARBONE

présenté par: ROCHETTE Jean-François
en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de:

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., président
M. MEUNIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. SACHER Edward, Ph.D., membre et codirecteur de recherche
M. LUONG H.T John., Ph.D., membre et codirecteur de recherche
Mme HOEMANN Caroline, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, M. Michel Meunier du département de génie physique, pour avoir accepté de diriger mes travaux et pour avoir fait une place à un microbiologiste au sein de son équipe de recherche. Je tiens aussi à remercier M. Edward Sacher, codirecteur de ma maîtrise, pour les nombreux conseils et pour sa disponibilité exceptionnelle.

Je voudrais également souligner l'aide de mon second codirecteur, M. John H.T. Luong, qui a partagé avec moi ses nombreuses connaissances sur le fonctionnement de biocapteurs ampérométriques et qui m'a généreusement ouvert les portes de sont laboratoire. J'ai ainsi eu la chance de rencontrer Keith Male, Sabahudin Hrapovic, Pierre Bouvrette et Yali Liu qui, au cours de mes séjours à l'Institut de Recherche en Biotechnologie, ont multiplié les judicieuses recommandations dans la mise au point de mon biocapteur.

Les autres membres du jury, soient Caroline Hoemann et M. L'Hocine Yahia, méritent également ma reconnaissance, ce dernier ayant aussi aimablement accepté la présidence du jury.

Mes travaux de recherche n'auraient pu progresser sans le soutien de plusieurs personnes faisant partie du personnel de l'École Polytechnique. Premièrement, je ne peux passer sous silence l'assistance de certains associés de recherche du département tels que De Quan Yang, Suzie Poulin et Souleymane Bah, qui ont toujours étés disponibles pour tout ce qui a trait au laboratoire de surface. Je dois également des remerciements à Samir Elouatik pour son aide dans la prise de mesure Raman.

J’exprime aussi ma gratitude à mon collègue de travail et ami, sans qui ma maîtrise n’aurait pu être à ce point agréable, pour son coup de main avec les mathématiques; merci Jean-Philippe.

En outre, je remercie ma copine Émilie, qui a su endurer pendant près de deux ans mon humeur et mon horaire très chargé d'étudiant.

J'aimerais réserver des remerciements spéciaux à mes parents qui m'ont encouragé sans relâche dans mes études. Ils m'ont supporté autant moralement que financièrement et je n'aurais pu me rendre aussi loin sans eux.

RÉSUMÉ

Le présent mémoire de maîtrise porte sur la conception de biocapteurs ampérométriques de troisième génération. Comme tout biocapteur, ce dispositif est composé d'un biorécepteur et d'un transducteur. Dans ce cas ci, les biorécepteurs utilisés sont des enzymes de type flavine adénine dinucleotide (FAD), alors que le transducteur est un système électrochimique classique à trois électrodes (électrode de travail, contre électrode, référence). Une fois sa confection terminée, le biocapteur devra être sensible à l'analyte choisi, sélectif face aux molécules interférentes et stable dans le temps.

Les biocapteurs ampérométriques de première ou de deuxième génération font respectivement appel à l'oxygène et à une molécule médiatrice pour établir une connexion entre l'enzyme et l'électrode de travail. Contrairement à ces derniers, les biocapteurs ampérométriques de troisième génération sont basés sur un transfert direct des électrons entre l'électrode de travail et le centre réactionnel FAD de l'enzyme. Pour favoriser ce transfert d'électrons entre le biorécepteur et le transducteur, des nanotubes de carbone multi-parois (NTCMP) servent de pont électronique. Les NTCMPs est un matériau idéal pour cette application car leur taille nanométrique est du de même ordre de grandeur que les molécules bioréceptrices. Ceci facilite l'atteinte du site oxydo-réducteur des enzymes et permet une meilleure communication avec le transducteur. De plus, le NTCMP est un matériau particulièrement résistant munie d'excellentes propriétés conductrices, caractéristiques qui s'avèrent être essentielles pour son utilisation comme pont électronique.

Pour être en mesure d'utiliser les NTCMPs pour modifier l'électrode de travail d'un tel dispositif, une des premières étapes consiste à trouver un moyen efficace de les mettre en suspension. Pour ce faire, il s'est avéré qu'une solution contenant une faible concentration de chlorure de polydiallyldimethylammonium (PDDA) ayant subit une

courte période de sonification était très efficace. Ce traitement favorise une interaction non-covalente entre une forme non régulière de PDDA et les NTCMPs grâce à un empilement des orbitaux π. Cette interaction a démontré une bonne stabilité dans le temps. Les NTCMPs uniformément dispersés en solution de PDDA sont par la suite modifiés avec de l'aminopropyltriethoxysilane dont l'une des extrémités réagira avec les groupements OH des NTCMPs alors que l'autre extrémité de la molécule, contenant un groupement amine, demeurera disponible pour une réaction éventuelle avec une enzyme.

Les enzymes utilisées pour modifier l'électrode de travail sont le glucose oxydase et le putrescine oxydase. Ces deux enzymes contiennent un groupement FAD qui leur permet d'oxyder leur substrat respectif, soit le glucose et la putrescine, avec une certaine sélectivité. Le suivie du taux de glucose sanguin est extrêmement important pour les personnes diabétiques. Une carence en glucose peut engendrer de nombreuses complications de santé pour un individu et rapidement aboutir à la mort de celui-ci. Pour éviter une surévaluation de la part du biocapteur une attention particulière doit être portée à la présence d'acétaminophène, d'acide ascorbique et d'acide urique dans les fluides biologiques utilisés pour la détection de glucose. Ces molécules sont reconnues comme étant facilement oxydable lorsque soumise à un potentiel. À cette fin, une fine couche de Nafion, un polymère connu pour diminuer les effets des molécules interférents est déposée à la surface de l'électrode de travail.

Quant à la putrescine, sa quantification a suscité de l'intérêt dans deux domaines différents, soient pour évaluer la fraîcheur des poissons et aussi comme marqueur pour le cancer. Comme c'est le cas pour la plupart des biorécepteurs enzymatiques, la putrescine oxydase est également sujette aux faux positifs lorsque l'on retrouve dans le milieu à analyser des molécules telles que la cadaverine, la spermidine, la spermine ou l'histamine. L'utilisation d'un très faible potentiel, lors de la détection, peut cependant limiter les inconvénients causés par ces molécules interférentes. Dans le but de vérifier la fonctionnalité de ce biocapteur en présence de véritables fluides biologiques, une

tentative d'évaluer la concentration de putrescine chez des souris porteuses de cancer a été réalisée. Malgré une légère surévaluation de la part du biocapteur de putrescine, en comparaison avec les résultats fournis par une méthode standard de chromatographie en phase liquide à haute performance, la putrescine a été retrouvée chez les souris porteuses de tumeur et non chez la souris saine.

Il en résulte que les biocapteurs développés dans le cadre de ce projet démontrent une bonne sensibilité, de l'ordre du micromolaire, grâce au complexe formé entre les biorécepteurs enzymatiques et les NTCMPs. Une sélectivité accrue vu l'utilisation d'un faible potentiel lors de la détection d'analyte a été rendue possible également par l'emploi de NTCMPs et finalement une bonne stabilité de la modification au niveau de l'électrode de travail a été permise par l'usage de différents polymères.

ABSTRACT

The present thesis is about the preparation of a third generation amperometric biosensor. Like other biosensors, this device is constructed of two important parts, a bioreceptor and a transducer. In our biosensor, the bioreceptor is flavin adenine dinucleotide (FAD) enzyme and the transducer is a traditional electrochemical system with three electrodes (working, counter and reference electrodes). To be efficient, the device will need to have high sensitivity for the analyte, a good selectivity toward the appropriate interfering molecules and high stability.

The first and second generation amperometric biosensor used oxygen or other mediating molecules to establish a connection between the enzyme and the working electrode. The innovation of the third generation of amperometric biosensors is that they are based on a direct electrons transfer between the working electrode and the FAD active center of the enzyme. To facilitate electron transfer between the bioreceptor and the transducer, multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) are used as an electronic bridge. MWCNTs are ideal for this application. The nanometric size of the MWCNTs, which is the same order of magnitude as the bio-receiving molecules, facilitates the communication between the active group of the enzyme and the surface of the working electrode. The MWCNT are also good conducting materials, a characteristics is essential for its use as electronic bridge.

To be able to use the multiwalled carbon nanotubes to modify the working electrode, it is important to find an effective way to put them into suspension. In this sense, polydiallyldimethylammonium chloride (PDDA), have provided interesting results. Only a small concentration of PDDA, combined with a short period of sonication, gives stable MWCNT suspensions. This treatment facilitates the non-covalent interaction between an irregular form of PDDA (an unavoidable contaminant) and the MWCNTs, through the overlapping of π orbitals. The well-dispersed MWCNTs are then modified

with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). This polymer reacts with the MWCNT surface through its OH group and to the enzyme through its amine group.

The enzymes used to modify the working electrode were glucose oxidase and putrescine oxidase. These two enzymes contain the FAD segment, which permits them to oxidize, respectively, glucose and putrescine, with certain selectivity. The evaluation of blood glucose is extremely important for diabetics. A glucose deficiency can cause many health complications for an individual, and rapidly lead to death. To avoid an overvaluation of the blood concentration by the biosensor, attention must be paid to the presence of acetaminophen, and ascorbic and uric acids in the biological fluids used for glucose detection. These molecules are known to be potential glucose oxidase reactants. For this purpose, a fine layer of Nafion, a polymer known to decrease the effects of the interfering molecules specific to glucose oxidase, was deposited on the surface of the working electrode.

In the case of putrescine, its quantification is important in two different fields, the evaluation of fish freshness and as cancer marker. Like the majority of enzymatic bioreceptors, the putrescine oxidase biosensor is also subject to overvaluation when molecules such as cadaverine, spermidine, spermine or histamine are present. However the use of a low potential during detection, can limit the signal caused by these interfering molecules. To verify the functionality of this biosensor in the presence of true biological fluids, an attempt was made to detect putrescine in the blood of cancerous mice. Despite a slight overvaluation of the putrescine concentration by the putrescine biosensor in comparison with the putrescine concentration provided by the standard high performance liquid phase chromatography method, putrescine was found in mice carrying tumours and not in healthy mice.

The biosensors developed in this project show good sensitivity provided by the complex formed between the enzymatic bioreceptor and MWCNTs. The selectivity increased

when using low potentials during the analyte detection. Finally, a good stability of the modification done on the working electrode was allowed by the use of various polymers such as Nafion and APTES.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **IV**

RÉSUMÉ ..... **VI**

ABSTRACT ..... **IX**

TABLE DES MATIÈRES ..... **XII**

LISTE DES FIGURES ..... **XV**

LISTE DES ÉQUATIONS ..... **XVIII**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XIX**

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS ..... **XXI**

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE 1 : LE BIOCAPTEUR **5**

1.1 Le biocapteur et ses principales composantes 5

1.2 Les enzymes de type FAD comme biorécepteur (GOx et PuO) 10

1.3 Notions d'électrochimie 15

1.4 Rappel sur la théorie du transfert direct d'électron de R.A. Marcus 17

1.5 Revue de littérature au sujet des biocapteurs ampérométriques de glucose 18

1.5.1 Première génération de biocapteur de glucose 18

1.5.2 Deuxième génération de biocapteur de glucose 21

1.5.3 Troisième génération de biocapteur de glucose 25

1.6 Revue littérature des biocapteurs de putrescine 28

1.6.1 La putrescine comme marqueur de cancer et comme marqueur de fraicheur 28

1.6.2 Les biocapteurs de putrescine 29

CHAPITRE 2 : LE NANOTUBE DE CARBONE (NTC).....35

2.1 La découverte des nanotubes de carbone.....35

2.2 La structure de base des NTCs.....35

2.3 Les propriétés mécaniques des nanotubes de carbone.....38

2.4 Les propriétés électriques des nanotubes de carbone.....40

2.5 Les propriétés chimiques des nanotubes de carbone.....41

2.6 Leurs modes de fabrication.....42

2.7 L'implantation des nanotubes dans la technologie.....44

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE MODIFICATION DES ÉLECTRODES SERVANT À LA DÉTECTION DU GLUCOSE.....45

3.1 L'évaluation de la sensibilité, sélectivité et stabilité des électrodes de travail.....45

3.2 La dispersion des nanotubes de carbone multiparois.....46

3.3 La concentration de Nafion.....46

3.4 Le temps de sonification.....48

3.5 La concentration d'APTES (3-aminopropyltriethoxysilane).....49

3.6 La concentration de PDDA.....50

3.7 La concentration de NTCMP.....51

3.8 La concentration d'enzyme (GOx).....52

3.9 Conditions optimales du biocapteur de Glucose.....53

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS DE LA DÉTECTION DE GLUCOSE PAR LE BIOCAPTEUR.....54

4.1 Détection du glucose et des interférents.....54

4.2 DET de la glucose oxydase.....56

CHAPITRE 5 : A MEDIATORLESS BIOSENSOR FOR PUTRESCINE USING MULTIWALLED CARBON NANOTUBES.....58

5.1 Authors.....58

5.2 Abstract.....59

5.3 Introduction....60
5.4 Experimental....61
5.5 Results and Discussion....65
5.6 Conclusion....73
5.7 Acknowledgments....74

CHAPITRE 6 : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET RECOMMENDATIONS ...80

6.1 Discussion général....80
6.2 Conclusions et recommandations....81

REFERENCES....84

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.1 Trois générations de biocapteur ampérométrique A) première génération, B) deuxième génération, C) troisième génération.....9

Figure 1.2.1 Flavine adénine dinucleotide (FAD).....10

Figure 1.2.2 Oxydation du D-glucose en glucono-1,5-lactone par la glucose oxydase. 11

Figure 1.2.3 Les interférents, a) Acétaminophène, b) l'Acide Urique, c) l'Acide Ascorbique 12

Figure 1.2.4 Molécules interférentes de PuO : A) Histamine, B) Cadaverine, C) Spermine, D) Spermidine.....14

Figure 1.3 Système électrochimique à trois électrodes 15

Figure 1.5.1 Schéma du dispositif de l'électrode d'oxygène de J.S. Updike et G.P. Hicks permettant la détection du glucose grâce à une membrane d'acrylamide imbibé de GOx [7]. 20

Figure 1.5.2 Ferrocène.....22

Figure 1.5.3 Glutaraldéhyde 222

Figure 1.5.4 Carbodiimide.....23

Figure 1.5.5 Polypyrrole.....24

Figure 2.2.1 Orientations possibles des atomes de carbones dans un NTC [38].....36

Figure 2.2.2 Les vecteurs de matrices [40].....37

Figure 2.2.3 Les propriétés électriques des nanotubes en fonction de leur symétrie. ..38

Figure 4.1.1 Détections successives des concentrations de glucose de 200, 100, 50, 25, 10 et 5 μM.....54

Figure 4.1.2 Zoom de la figure 4.1.1 sur la détection de 5μM de glucose.....54

Figure 4.1.3 L'augmentation de courant détecté par le biocapteur de glucose lors de la présence en solution de 100μM de glucose, acide ascorbique, acide urique, acétaminophène.....55

Figure 4.2.1 Voltamétrie cyclique de l'électrode de travail modifiée avec les NTCMP, l'APTES, GOx, Nafion (courbe pointillé), de l'électrode de travail modifiée avec l'APTES, GOx, Nafion (courbe pleine).....56

Figure 5.5.1.1 A) normal PDDA polymerization, B) PDDA contaminant.....65

Figure 5.5.1.2 FTIR spectra of A) MWCNT water suspension, B) MWCNT+PDDA, C) Blank silicon, D) PDDA.....65

Figure 5.5.2.1 Direct electron transfer of PuO at -0.45 V (vs Ag/AgCl) with a 0.05 V/s scan rate in a 0.1mM phosphate buffer. The dotted line is the modified electrode and the solid line is the unmodified electrode.....66

Figure 5.5.3.1 Direct electron transfer of Put at -0.45 (vs Ag/AgCl) confirmed by multiple scan rate cyclic voltammograms (a; 50 mV s^{-1},b; 100 mV s^{-1}, c; 200 mV s^{-1}, d; 300 mV s^{-1}) for enzyme immobilized on PDDA/APTES/Nafion/MWCNT-modified GC electrodes in 0.05 M phosphate buffer. The apperance of the redox peaks and their relationship with the scan rate (inset) confirm the direct electron transfer.....68

Figure 5.5.3.2 Amperometric bio-detection of 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM and 5 μM of Put on PDDA-APTES-Nafion-MWCNT-PuO modified GC electrode in 0.05 M phosphate buffer pH: 7. The inset is an enlargement of the detection of 5 μM, which appears to be the lower detection limit with a S:N of 3:1.....69

Figure 5.5.3.3 Standard curve of putrescine biosensor detection showing a proportional increase of 2 nA per μM of PuT detected. All data were obtained with PDDA-APTES-Nafion-MWCNT-modified GC electrode in 0.05 M phosphate buffer, at a pH of 7.....69

Figure 5.5.3.4: Detection of putrescine in three serum samples (A,B,C) from mice predisposed to develop tumors and on a healthy mouse(D).....70

Figure 5.5.3.5: Amount of current increase caused by the injection of 1 mM of the most common interfering species and PuT into lyophilized human plasma, in our biosensor with the PDDA-APTES-Nafion-MWCNT-modified GC electrode.....70

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1.1 Oxydation du peroxyde d'hydrogène.....8

Équation 1.2.1 Transformation de la putrescine en 4-aminobutyraldehyde par la putrescine oxydase.....14

Équation 1.5.1 Oxydation du glucose en présence d'oxygène.....21

Équation 1.6.2 Transformation de la putrescine en 4-aminobutanal et en peroxyde.....30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.3.1 Effet des différentes concentrations de Nafion sur la détection du glucose et des molécules interférentes ainsi que sur la stabilité de la modification.....48

Tableau 3.4.1 Effet des différents temps de sonification des NTCMPs sur la détection du glucose et des molécules interférentes.....49

Tableau 3.5.1 Effet des différentes concentrations d'APTES sur la détection du glucose et des molécules interférentes ainsi que sur la stabilité de la modification.....50

Tableau 3.6.1 Effet des différentes concentrations de PDDA sur la détection du glucose et des molécules interférentes ainsi que sur la stabilité de la modification.....51

Tableau 3.7.1 Effet des différentes concentrations de NTCMP sur la détection du glucose et des molécules interférentes.....52

Tableau 3.8.1 Effet des différentes concentrations de GOx sur la détection du glucose et des molécules interférentes.....53

Tableau 3.9.1 Conditions optimales du biocapteur de Glucose.....53

Table 5.4.7.1 HPLC elution program for Putrescine.....64

Table 5.5.4.1 Putrescine concentration comparison of HPLC analysis and biosensor biodetection. A, B, C, are samples from mice predisposed to develop tumors and D is serum from a healthy mouse.....74

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AO :	Amide oxydase
NTC :	Nanotube de carbon
CVD :	«Chemical Vapor Deposition»
DET :	«Direct electron transfert»
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FMN:	Flavine mononucleotide
FTIR:	Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourrier
GOx:	Glucose oxydase
HRP:	Horseradish peroxydase
NAD:	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NTCMP:	Nanotube de carbone multiparois
PDDA:	Chlorure de polydiméthyldiallylammonium
PEGDGE :	Polyéthylèneglycol-diglycidyl éther
PuO:	Putrescine oxydase
Put :	Putrescine
SPR :	Surface plasmon resonance
NTCSP :	Nanotube de carbone simple paroi
U :	Unité

INTRODUCTION

Ces dernières années, plusieurs événements sont venus amplifier la demande, déjà très présente dans le domaine médical, d'obtenir des dispositifs capables de mener à bien la détection de quelques molécules dans un court laps de temps. Outre leur utilisation dans les diagnostiques médicaux et le suivie de certaines maladies, ces dispositifs que l'on nomme capteurs, sont désormais très convoités pour la prévention d'attaques terroristes bactériologiques ou encore dans des études environnementales. En réalité, chaque activité qui nécessite le dosage ou la détection d'un analyte trouve son compte dans la mise au point d'un capteur approprié.

Comparativement aux techniques de chimie analytique conventionnelles, qui sont la plupart du temps complexes, coûteuses et réalisées en laboratoire, l'utilisation d'un capteur permet une détection réalisable par un technicien à coût moindre, et ce, directement sur le terrain. Depuis maintenant plusieurs années, la conception de capteurs fait appel à l'utilisation de molécules biologiques afin d'optimiser les performances de ces dispositifs de détection, que l'on nomme biocapteur. Ces molécules biologiques, qui jouent le rôle de biorécepteur, permettent d'accroître considérablement la sensibilité et la sélectivité des dispositifs. Pour être en mesure de saisir le signal émis par le biorécepteur, celui-ci est jumelé à un transducteur qui module le signal sous une forme plus accessible.

Les avancées des dix dernières en biotechnologie ont permis l'utilisation de nouvelles molécules biologiques comme biorécepteur. Combinées aux dernières avancées dans le monde des nanotechnologies, dont en autres la découverte des nanotubes de carbone, ces biorécepteurs peuvent être plus facilement exploités, permettant par le fait même un pouvoir de détection accru des biocapteurs. Le jumelage de ces deux technologies de pointe, la biotechnologie et la nanotechnologie, est responsable de l'apparition d'un nouveau domaine, la nanobiotechnologie qui vise avant tout l'étude des interactions

entre des nanomatériaux et des molécules biologiques en vue de créer des biocapteurs ou des biovecteurs servant à la libération contrôlée des médicaments dans l'organisme. La combinaison de ces deux technologies de pointe était prévisible. En effet, lorsque les biologistes travaillent à un niveau atomique, les personnes les mieux placées pour expliquer les interactions qui prennent lieu sont les physiciens. L'inverse est aussi vrai, lorsqu'un physicien cherche des domaines d'utilisation pour des matériaux de taille virale ou bactérienne, les biologistes sont des personnes de choix pour les aider.

Dans le cadre du présent projet de cette maîtrise, la conception d'un biocapteur ampérométrique de troisième génération pour la détection de glucose ou de putrescine est proposée. L'utilisation d'un système de transduction ampérométrique permet d'avoir un système facilement modifiable tout en offrant une bonne sensibilité pouvant aller jusqu'à 5 μM. Les nanotubes de carbone utilisés seront de type multiparois en raison de leurs propriétés électriques plus uniformes [1]. L'enzyme utilisée comme biorécepteur est dans un premier temps le glucose oxidase et analyte recherché est le glucose. Les premiers tests, dans le cas de la confection d'un biocapteur ampérométrique de troisième génération de glucose, permettent l'optimisation de différents paramètres nécessaires au bon fonctionnement du biocapteur. Lors de cette période d'optimisation, la concentration des différents polymères nécessaires à la fabrication du dispositif est évaluée. Cette période sert également à la recherche du potentiel idéal qui doit être utilisé pour avoir un maximum de réponse envers l'analyte recherché et un minimum de signal de la part des molécules interférentes. Le choix du glucose oxydase (GOx), comme enzyme, pour effectuer ces tests repose sur un bon nombre de facteurs. D'abord, comme cette enzyme est utilisée depuis plusieurs dizaines d'années dans la confection de biocapteurs, la communauté scientifique possède une bonne connaissance de sa structure tridimensionnelle et de la localisation des groupements actifs. De plus, le GOx est peu coûteux pour une enzyme et relativement stable par rapport aux différents pH et aux différentes températures. Toutefois, comme il existe déjà plusieurs biocapteurs de glucose, cette démarche sert de préparation à la conception d'un biocapteur de

putrescine. L'enzyme utilisée comme biorécepteur sera ensuite la putrescine oxydase (PuO). Cette enzyme est moins bien connue que le GOx. Il est toutefois admis que les centres réactionnels qu'il possède se trouvent imbriqués bien plus profondément dans la structure de l'enzyme. Le mode de détection des biocapteurs ampérométriques de troisième génération repose sur un transfert direct des électrons entre l'enzyme et l'électrode de travail du système. Comme le transfert des électrons diminue de 10^4 lorsque la distance augmente de 8 à 17 Å, il est à prévoir que la communication entre le biorécepteur et le transducteur du biocapteur de putrescine sera difficile sans l'aide d'une molécule pouvant faciliter le transfert des électrons. C'est dans ces circonstances que les nanotubes de carbone multiparois, préalablement suspendus dans une solution diluée de chlorure de polydiméthyldiallylammonium, entrent en jeux. La taille nanométrique et la bonne conductibilité de ce matériau permettent de faciliter l'interaction entre les centres réactionnels des enzymes et le transducteur. Si cette interaction est fonctionnelle on peut s'attendre à avoir un biocapteur plus sensible, plus sélectif et même plus stable.

Ce mémoire présente les travaux réalisés dans le but de produire un biocapteur ampérométrique de troisième génération plus sensible et sélectif que ses prédécesseurs. Son mode de détection repose sur un transfert facilité des électrons par le biais de nanotubes de carbone multiparois. En étant plus sensible et sélectif des détections de putrescine réalisées par ce biocapteur peuvent être faites directement dans les fluides biologiques sans que ceux-ci subissent de traitements préalables. Les deux premiers chapitres de ce document introduisent les concepts importants à la bonne compréhension du projet de recherche. Une description des principales composantes des différents biocapteurs ainsi qu'une revue de la littérature portant sur les biocapteurs ampérométriques de glucose et de putrescine sont présents dans le premier chapitre. Le second chapitre présente une courte étude de la littérature concernant les propriétés des nanotubes et de leurs modes de fabrication. Le chapitre trois et quatre présente les étapes d'optimisations et les résultats obtenus par le biocapteur de glucose. Le

cinquième chapitre reprend l'article soumis dans (Analytical Biochemistry), portant sur la détection de putrescine chez des souris potentiellement porteuses de tumeurs à partir du biocapteur de putrescine élaboré. Enfin, le sixième chapitre fait état d'une discussion générale permettant de tirer des conclusions sur l'utilisation de nanotube de carbone pour faciliter le transfert des électrons dans les biocapteurs ampérométriques de troisième génération.

CHAPITRE 1 : LE BIOCAPTEUR

1.1 Le biocapteur et ses principales composantes

La nature de l'homme fait de lui un être qui cherche constamment à repousser ses limites dans le but d'obtenir une meilleure compréhension du monde qui l'entoure. Pour être en mesure d'en apprendre toujours davantage sur lui et sur son univers, l'homme a mis au point des dispositifs capables de recueillir de l'information qui n'est pas accessible par les cinq sens de l'homme, ces dispositifs se nomment capteurs. Ces capteurs sont en mesure de recueillir divers types d'information et de les présenter sous une forme permettant leur analyse. Les capteurs possèdent deux composantes principales, soient le récepteur et le transducteur qui permettent la détection et la quantification de molécules cibles (l'analyte). L'interaction entre l'analyte et le récepteur engendre un signal qui est mesuré par le transducteur. Les types de transducteurs les plus fréquemment rencontrés sont généralement de type optique, électrochimique ou massique.

Comme le récepteur est responsable du premier contact avec l'analyte, il joue un rôle crucial au niveau de la sensibilité et de la sélectivité du biocapteur. C'est pour cette raison que les capteurs mis au point de nos jours, utilisent de plus en plus, comme récepteur, des molécules biologiques dont la sensibilité et la sélectivité ont été optimisées durant des millénaires par la sélection naturelle. Ce type de capteur, que l'on nomme biocapteur, offre ainsi un pouvoir de détection inégalée envers une gamme étendue d'analytes. Il existe de nombreux types de molécules utilisées comme biorécepteur. Les plus couramment utilisés sont des molécules de la classe des antigènes/anticorps, des acides nucléiques, des enzymes ou bien tout simplement des cellules.

L'interaction des biorécepteurs de type antigènes/anticorps avec l'analyte est déterminée par une région de l'anticorps que l'on nomme épitope. L'épitope de chaque anticorps subit une maturation très sévère et très complexe par l'organisme, ce qui lui donne un pouvoir de sélectivité qui dépend à la fois de la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire de l'antigène qu'il doit détecter. Ce type de biorécepteur antigènes/anticorps présente également l'avantage d'offrir une excellente sensibilité pouvant parfois attendre les 10^{-21} moles. Les principaux inconvénients des biocapteurs utilisant ce type de biorécepteur sont un coût de fabrication élevé, une conception nécessitant une bonne connaissance de l'immunologie et pour la majorité des dispositifs, une utilisation unique. Un biocapteur utilisant ce type de biorécepteur est généralement muni d'un transducteur à la fluorescence ou d'un système «surface plasma resonance» (SPR) pour effectuer la transformation du signal de détection.

Les progrès réalisés au courant ces dernières années dans le monde de la génétique ont permis l'utilisation de courtes séquences d'acides nucléiques comme biorécepteur. Le principe de sélectivité de ce biorécepteur repose sur la complémentarité des acides nucléiques adénine:thymine (A:T) et cytosine:guanine (C:G). L'utilisation des acides nucléiques comme biorécepteur permet la fabrication d'une gamme très large de biorécepteurs possédant une excellente spécificité et une sensibilité de l'ordre du picomolaire [2]. Les types de transducteurs qui peuvent être combinés avec ce type de biorécepteur sont nombreux. Les systèmes optiques (fluorométrie), les SPR et les systèmes électrochimiques sont les plus utilisés pour détecter les appariements d'ADN complémentaires. D'autres transducteurs, comme des systèmes acoustiques et des systèmes microfabriqués de structure en en porte-à-faux, semblent être prometteurs pour être combinés à des biorécepteurs fait d'ADN.

Les biorécepteurs de type cellulaire ne sont souvent pas aussi précis que les biorécepteurs décrit précédemment. Néanmoins, ce manque sur le plan de la sélectivité peut être un atout lorsque l'on recherche un groupe de substances plutôt qu'un seul type

d'analyte en particulier. La détection de substances polluantes pour l'environnement, comme par exemple dans la détection de métaux lourd, peut être réalisée par ce type de biorécepteur. Souvent, les biorécepteurs de type cellulaire sont subdivisés en trois sous-groupes :1) système cellulaire, 2) les protéines non-enzymatiques et 3) les enzymes [3]. Toutefois, comme les éléments de ce dernier sous-groupe sont très nombreux, il est souvent traité comme étant une classe de biorécepteurs comme telle. Les biocapteurs possédant des biorécepteurs enzymatiques sont dans la majorité des cas jumelés à des transducteurs de type optique (spectrométrique) ou électrochimique (ampérométrique). Les biorécepteurs de type enzymatique détectent une substance grâce à leur capacité de liaison spécifique avec un analyte et à leur pouvoir catalytique. Les enzymes utilisés comme biorécepteurs produisent divers types de réaction qui leurs sont propres et qui génèrent des produits dont les quantités sont proportionnelles aux analytes. Ces produits sont par la suite détectés et quantifiés par le transducteur. Il est dont possible, à partir du signal émis par le transducteur et d'une courbe étalon appropriée de déterminer la concentration d'analyte recherchée. Même si ce type de biocapteur utilisant des enzymes comme biorécepteur est moins sensible que le biocapteur utilisant les anticorps comme biorécepteur, celui-ci possède les avantages, lorsque combinés à un transducteur ampérométrique, d'être facile d'utilisation, de conception simple, réutilisable et peu coûteux. Il demeure donc une option judicieuse pour la détection de plusieurs analytes.

Le biocapteur ampérométrique détecte une augmentation de courant entre deux électrodes (l'électrode de travail et la contre électrode) sur lesquelles est posée une différence de potentiel. Ces dispositif combiné à un biorécepteur enzymatique offre d'excellents temps de réponse, sensibilité et sélectivité. Au fil des années, les biocapteurs ampérométriques ont grandement évolués. Récemment, la troisième génération de biocapteurs ampérométriques a vu le jour.

La première génération de biocapteurs ampérométriques reposait sur le principe de détection du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par une réaction enzymatique (Figure

1 A). La détection de ce peroxyde d'hydrogène a lieu à la surface de l'électrode de travail selon l'équation 1.1, pendant la réaction d'oxydation du peroxyde d'hydrogène. L'inconvénient de l'utilisation de ce type de réaction pour la détection d'un analyte est que l'oxydation du peroxyde d'hydrogène est dépendante de l'accessibilité de l'oxygène dans le milieu.

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

Équation 1.1: Oxydation du peroxyde d'hydrogène

Si l'oxygène est en trop faible concentration ou difficilement accessible, la concentration de H_2O_2 produite et détectée sera moindre, ce qui engendre une sous estimation de la concentration d'analyte.

Pour résoudre ce problème, une deuxième génération de biocapteurs ampérométriques avec médiateur a été mise au point (Figure 1 B). Le médiateur permet une oxydation de l'enzyme indépendante de la concentration d'oxygène dans le milieu. Pour être efficace, le médiateur doit être capable de réagir rapidement avec la forme réduite de l'enzyme. Il doit être soluble, autant sous sa forme réduite qu'oxydée, afin d'être en mesure de voyager facilement dans une solution entre l'enzyme et la surface de l'électrode. Finalement, la forme réduite du médiateur ne doit pas réagir facilement avec l'oxygène, pour éviter une oxydation prématurée du médiateur avant que celui-ci atteigne la surface de l'électrode.

La troisième génération de biocapteurs ampérométriques (Figure 1 C) propose un transfère direct des électrons entre l'enzyme et la surface de l'électrode, sans passer par une molécule médiatrice. Cette dernière génération de biocapteurs ampérométriques permet une évaluation plus exacte de l'analyte limitant les sous évaluations qui peuvent être causées par l'utilisation d'un médiateur. La confection de ce type de biocapteurs ampérométriques nécessite l'utilisation d'enzymes qui peuvent être facilement oxydées

et réduites par une électrode sur laquelle on exerce une faible tension. Les oxydoréductases sont reconnues pour avoir la propriété d'être facilement oxydables et réduites. Même si on connaît certaines enzymes qui sont adéquates pour la fabrication de ce type de biocapteurs, une question demeure : comment fixer ces enzymes à la surface de l'électrode de travail sans dénaturer les enzymes et en permettant un transfert efficace des électrons entre l'enzyme et la surface de l'électrode? C'est pour répondre à cette problématique que les NTCs ont été utilisés dans le présent projet.

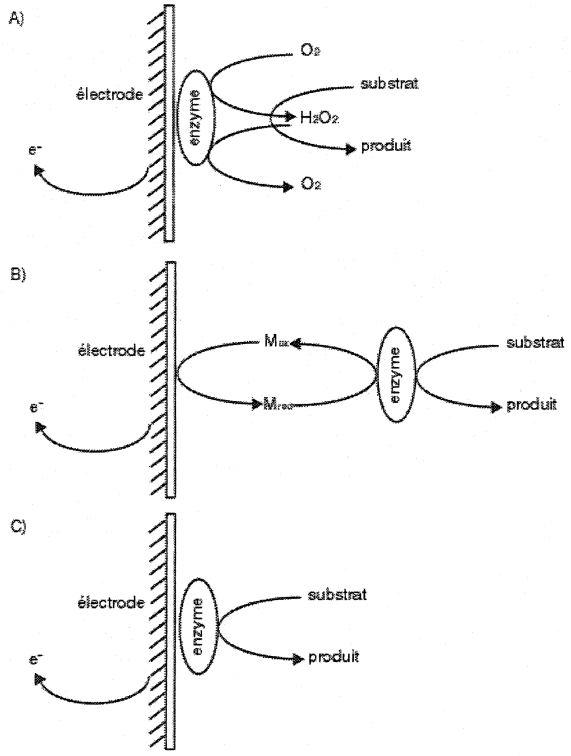


Figure 1.1.1 : Trois générations de biocapteurs ampérométriques A) première génération, B) deuxième génération, C) troisième génération.

1.2 Les enzymes de type FAD comme biorécepteur (GOx et PuO)

Les oxydoréductases sont des enzymes qui catalysent des réactions d'oxydoréduction. Cette famille d'enzymes est constituée de nombreuse déshydrogénases qui nécessitent une coenzyme, tels que NAD, NADP, FAD ou FMN, pour être fonctionnelles. Ces coenzymes sont impliquées dans les réactions d'oxydoréduction de l'organisme, c'est-à-dire dans les transferts d'électrons. Leurs activités enzymatiques peuvent donc être suivie par un transducteur ampérométrique. Les groupement FAD et FMN sont reconnus pour être de meilleurs oxydants que les groupements NAD et NADP, car ils ont une plus forte tendance à accepter les électrons. Ils sont donc plus appropriés pour confectionner des biocapteurs ampérométriques.

Ce type de coenzyme est une sous-unité de l'enzyme qui permet la réduction et l'oxydation rapide de l'enzyme. La structure des coenzymes est telle quelle permet à l'enzyme de recevoir et de donner des électrons pour mener à bien la réaction pour laquelle l'enzyme possède une certaine spécificité. Cette spécificité ne dépend aucunement de la coenzyme, elle est plutôt régie par la structure même de l'enzyme.

Dans la présente recherche, les enzymes qui ont été utilisées possédaient toutes des groupements FAD (1.2.1) comme coenzyme.

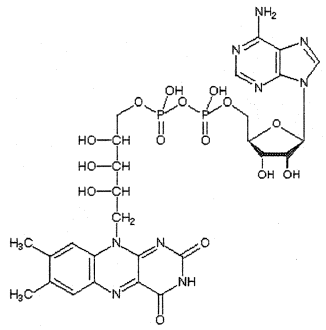


Figure 1.2.1: Flavine adénine dinucleotide (FAD)

La première enzyme qui a été utilisée pour la confection du biocapteur est le glucose oxydase. Cette enzyme, de 60 x 52 x 37 Å et de 80 daltons, a pour fonction de transformer le glucose en glucolactone (Figure 1.2.2). Le GOx est généralement retrouvé sous forme de dimère de 160 daltons. Les deux monomères du GOx sont liés de façon non covalente par des ponts hydrogènes. Le dimère du GOx a une forme ellipsoïdale et possède une quantité élevée de structures secondaires, soit 28% d'hélices et 18% de feuillets. La structure tertiaire du GOx est caractérisée par deux structures en feuillet-β bien distinctes. Ces structures forment une cavité dans l'enzyme dans laquelle on retrouve le site actif du GOx ainsi que le groupement FAD qui est lié de façon non-covalente à l'enzyme.

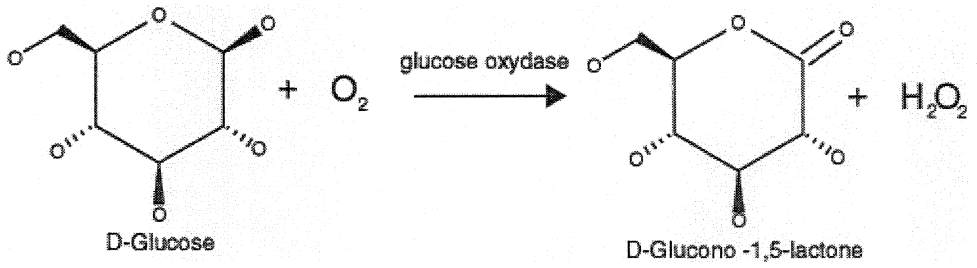


Figure 1.2 : Oxydation du D-glucose en glucono-1,5-lactone par le glucose oxydase.

Le glucose oxydase utilisé pour la fabrication de biocapteurs peut être extrait de nombreuse bactéries ou mycètes. Souvent, le GOx utilisé en laboratoire provient d'un champignon nommé *Aspergillus niger*. Cette enzyme isolée pour la première fois en 1928 par le Dr. Muller, est bien documentée et peut facilement être obtenue auprès des compagnies distribuant des produits chimiques et biologiques [4]. Une particularité importante de cette enzyme est son groupement FAD qui est situé à 13Å de sa surface. Cette distance entre le FAD et la surface du GOx, quoi que très petite, demeure trop importante pour que les électrons puissent passer direct du FAD à une électrode. Pour palier à ce problème, la distance entre la coenzyme FAD et la surface de l'électrode doit

être diminuée. Les paragraphes suivant vont présenter une hypothèse pour résoudre cette problématique.

La majorité des biocapteurs de glucose utilisant le glucose oxydase sont des biocapteurs ampérométriques de type 1. Ces biocapteurs évaluent la concentration de glucose à partir de la quantité de peroxyde d'hydrogène produite en solution par la réaction enzymatique (Figure 1 A). Les biocapteurs de première, deuxième et troisième génération font face à un problème commun, celui des molécules interférentes présentes dans la solution où l'on cherche à doser l'analyte. Ces molécules interférentes sont des substances autres que le peroxyde d'hydrogène qui peuvent être oxydées à la surface de l'électrode de travail. Ce type de réaction a pour effet de surestimer la concentration de glucose présente dans la solution que l'on analyse. Les molécules interférentes les plus communes lors de la détection du glucose sont l'acétaminophène, l'acide urique et l'acide ascorbique (Figure1.2.3) [5]. Pour réduire au minimum la réponse qui peut être causée par les molécules interférentes, deux voies peuvent être utilisées. La première voie est d'utiliser des techniques qui reposent sur la création de matrices, généralement faite de polymère. Ces matrices agissant comme un tamis qui limite le passage des molécules de poids moléculaire trop élevé vers la surface de l'électrode de travail où l'on trouve l'enzyme [6]. Pour optimiser au maximum cette technique, des charges de même signe que les molécules interférentes peuvent être associées à la matrice. Ainsi, lorsqu'une molécule interférente s'approche de la surface de l'électrode, elle se voit repoussée du biocapteur par les charges matricielles de polarité similaire.

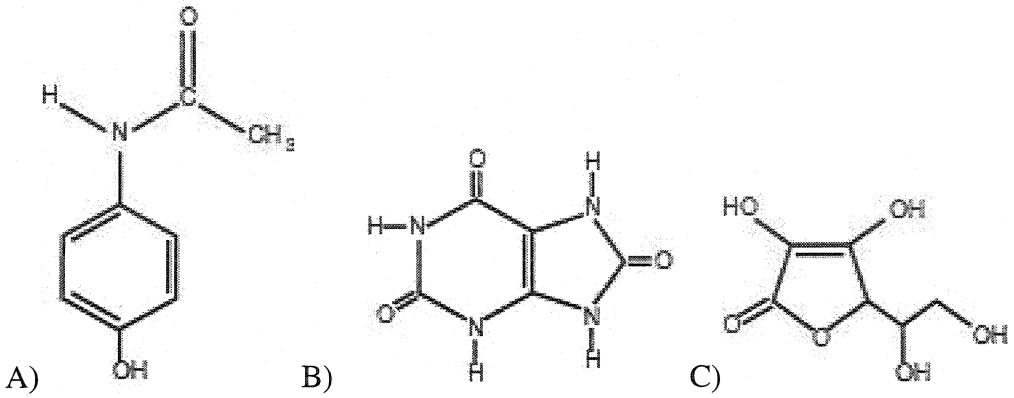


Figure 1.2.3 : Les interférents, a) Acétaminophène, b) l'Acide Urique, c) l'Acide Ascorbique

La deuxième voie pouvant être utilisée pour limiter le signal causé par les molécules interférentes consiste à diminuer le voltage utilisé pour la détection des analytes. Comme le potentiel d'oxydoréduction du FAD varie entre -0.49 et 0.19 V, il est possible de mener une biodétection à très faible voltage, ce qui minimise le nombre de molécules qui peuvent être oxydées à la surface de l'électrode de travail. Toutefois pour que la biodétection ait lieu à de faibles voltages, il doit y avoir une bonne connexion entre l'enzyme et l'électrode, afin de faciliter au maximum le transfert des électrons.

La seconde enzyme utilisée pour fabriquer un biocapteur ampérométrique dans ce projet est la putrescine oxydase. Tout comme le glucose oxydase, cette enzyme est une flavo-enzyme. Toutefois, contrairement au glucose oxydase, il y a moins d'information structurelle disponible à son sujet. Cependant, il est établi que sa coenzyme FAD est imbriquée à l'intérieur de sa structure tridimensionnel plus profondément que pour le glucose oxydase. Il est donc primordial de faciliter le transfert des électrons entre l'enzyme et la surface de l'électrode, dans le but de développer un biocapteur possédant une bonne sensibilité.

La putrescine oxydase est une enzyme retrouvée chez bon nombre d'organismes impliqués dans la dégradation de la matière organique. Sa fonction première est de transformer la putrescine en 4-aminobutyraldehyde selon l'éÉquation 1.2.1.

PuO

$$\text{Putrescine} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{4-Aminobutyraldehyde} + NH_3 + H_2O_2$$

Équation 1.2.1 : Transformation de la putrescine en 4-aminobutyraldehyde par la putrescine oxydase.

Comme pour bien d'autres enzymes, la spécificité de la putrescine oxydase n'est pas exclusive à un analyte. En plus d'interagir fortement avec la putrescine, PuO présente une certaine affinité pour d'autres analytes telles que la cadaverine, la spermidine, la spermine et la histamine (Figure 1.2.4).

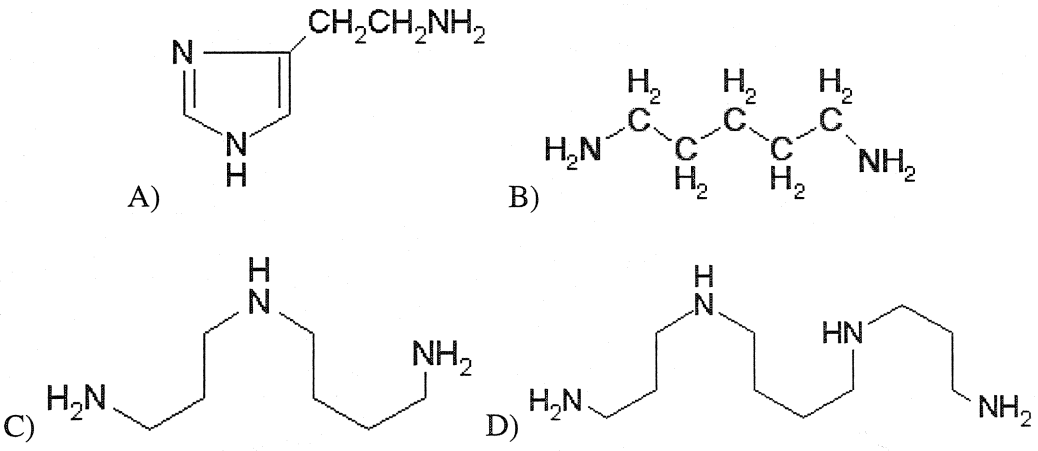


Figure 1.2.4 : Molécules interférentes de PuO : A) Histamine, B) Cadaverine, C) Spermine, D) Spermidine.

Les deux techniques mentionnées précédemment pour réduire la détection des molécules interférentes propres au GOx peuvent également être appliquées pour réduire les effets engendrés par les molécules interférentes propres à la PuO. Pour limiter au maximum tout type d'interférence, il suffit d'optimiser le contact réactionnel de l'enzyme et la surface de l'électrode. En permettant un transfert direct des électrons, tel que proposé

pour la première fois par R.A. Marcus, FAD est réduit plus rapidement, il est donc logique de s'attendre à obtenir une meilleur sensibilité et sélectivité de l'enzyme.

Dans cette réaction, la coenzyme FAD de la putrescine oxydase est d'abord réduite par la putrescine, pour être ensuite oxydée par l'oxygène. Toutefois, comme c'est le cas pour le glucose oxydase, ce type de réaction en présence d'O_2 est plus susceptible à la détection de molécules interférentes. Pour contourner ce problème, il est possible d'effectuer un transfert direct des électrons (DET) entre la sous-unité FAD selon la théorie de R.A. Marcus qui fera l'objet d'une prochain section. Comme le DET permet une réduction plus rapide de FAD, une meilleur sensibilité et sélectivité de l'enzyme est attendues [7].

1.3 Notions d'électrochimie

L'électrochimie est un sous domaine de la chimie qui fait référence aux réactions impliquant un transfert d'électrons. Les réactions électrochimiques sont divisées en deux types, ceux qui produisent de l'électricité (spontanées) et ceux qui exigent de l'électricité pour avoir lieu (non spontanées). Comme les réactions enzymatiques impliquent souvent un transfert d'électrons, il est possible de faciliter certaines de ces réactions (non spontanées) en utilisant un potentiel électrique pour ensuite suivre leurs cinétiques par le biais d'un système électrochimique de base.

Pour ce faire, une cellule électrochimique contenant trois électrodes est toute indiquée. Ce type de cellule électrochimique est constitué d'une électrode de travail, d'une contre électrode et d'une électrode de référence qui est plongée dans un tampon en présence de l'enzyme à l'étude (Figure1.3.1).

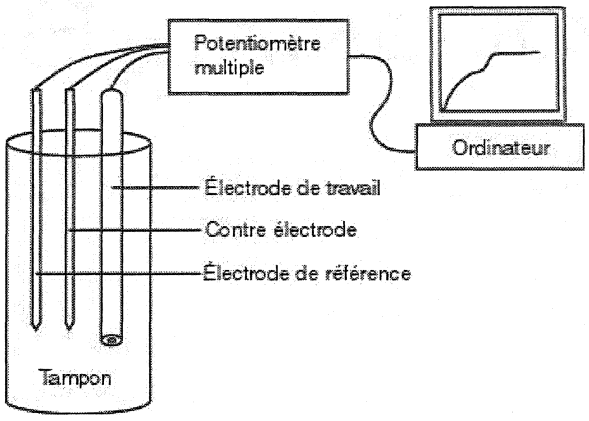


Figure 1.3.1 : Système électrochimique à trois électrodes

Ce système à trois électrodes permet de contrôler le potentiel externe qui est appliqué entre l'électrode de travail et la contre électrode en milieu liquide. Pour assurer un potentiel stable et exact entre l'électrode de travail et la contre électrode, ce potentiel est comparé au potentiel mesuré à l'aide d'une électrode de référence de type Ag/AgCl (3M NaCl). Grâce à cette électrode de référence et à un système, constitué d'un microordinateur et d'un potentiomètre multiple, il est possible de détecter et de corriger les baisses de potentiel due à la résistance du tampon ou à une polarisation de la contre électrode. Un dispositif comme celui-ci offre la possibilité de réaliser différentes techniques électrochimiques telle la chronoampérométrie. Cette technique consiste à suivre la variation du courant dans le temps et ainsi témoigner d'un transfert d'électrons entre les enzymes et l'électrode, ce qui cause une augmentation du courant. Il est également possible d'effectuer des voltamétries cycliques, au cours desquelles le potentiel varie et l'effet sur le courant entre la contre électrode et l'électrode de travail est observable, toujours par rapport à l'électrode de référence.

L'électrode de travail utiliser dans ce cas ci est une électrode de carbone vitreux. Le carbone qui compose ce type électrode a une structure amorphe qui lui confère d'excellentes propriétés conductrice très différentes des autres formes de carbone telle le graphite ou le diamant. La densité atomique élevée et la faible porosité de ce type d'électrodes permettent d'avoir un fini miroir noir très uniforme lorsqu'elles sont polies.

De plus, le carbone vitreux est inerte aux acides et bases ainsi qu'aux températures élevés. Ce type d'électrode de travail a été choisi préférentiellement aux électrodes d'or ou de platine en raison de sa large fenêtre d'utilisation allant de -1100 mV à 1000mV. Il est donc possible avec l'électrode de carbone vitreux de mener à bien des détections d'analytes en utilisant une tension plus faible que les autres types d'électrodes.

Le système électrochimique permet de suivre efficacement une activité enzymatique, il en donc un outil de prédilection pour être utilisé comme transducteur dans la confection d'un biocapteur dont le biorécepteur est une enzyme.

1.4 Rappel sur la théorie du transfert direct d'électron de R.A. Marcus

C'est en 1946, à l'âge de vingt-trois ans, que Rudolph Arthur Marcus reçu son doctorat à l'Université McGill de Montréal. Au cours des années suivantes, R.A. Marcus poursuivi ses travaux dans le domaine de la chimie théorique pour diverses instituts américaines dont Polytechnic Institute of Brooklyn, l'University of Illinois et The California Institute of Technology. Ces travaux le menèrent à l'élaboration de la théorie sur le transfert d'électrons en solution. L'importance de ces phénomènes chimiques et l'impact des conséquences pratiques de sa théorie ont bouleversées l'ensemble des domaines reliés à la chimie. Ses travaux sur le transfert des électrons, paru en octobre 1984, furent particulièrement bien accueillis par la communauté scientifique, ce qu'il lui valut, en octobre 1992, le prix Nobel de la chimie. Cette théorie permit une meilleure compréhension de phénomènes tels que la photosynthèse, la chimioluminescence, la conductivité des polymères électriques, la corrosion et les méthodes d'analyses électrochimiques.

La théorie de R.A. Marcus propose ce qui semble être, encore jusqu'à aujourd'hui, une réaction chimique sous sa plus simple forme, soit le transfert direct d'électrons entre deux molécules. Une telle réaction n'implique aucun bris de liaison chimique,

seulement des changements dans la structure moléculaire des molécules impliquées dans la réaction ainsi que pour les molécules voisines à celles-ci. Ces changements moléculaires permettent aux électrons de passer d'une molécule à l'autre.

Dans sa théorie sur le transfert des électrons, R.A. Marcus présente trois facteurs déterminants le transfert des électrons entre les molécules [8]. Le premier facteur, ayant un impact sur le transfert des électrons, est la force d'entraînement qui est exercée sur les électrons. La force d'entraînement agissant sur les électrons est déterminée par la différence de potentiel appliquée dans le milieu. Le second facteur jouant un rôle dans le transfert des électrons est la réorganisation énergétique des molécules impliquées dans la réaction. Qualitativement, cette énergie reflète la stabilité structurale des molécules impliquée dans le transfert des électrons. Pour obtenir un transfert d'électrons le plus efficace possible, une faible stabilité structurale des réactifs ainsi q'une forte stabilité structurale des produits sont recherchés. Finalement, le troisième facteur qui influence ce type de réaction est tout simplement la distance entre les deux centres réactionnels participants au transfert des électrons; plus la distance est courte, plus élevé sera le taux de transferts.

En se basant sur les conclusions de la théorie de R.A. Marcus pour concevoir un biocapteur ampérométrique, le transfert des électrons devrait être amélioré, de même que la performance du dispositif. Cependant, parmi les trois facteurs déterminants le transfert des électrons proposés par R.A. Marcus, seulement deux peuvent être ajustés par la main de l'homme, soient la force d'entraînement régie par le potentiel appliqué et la distance entre les deux centres réactionnels. Comme le potentiel que l'on peut appliquer en pratique dans un biocapteur ampérométrique est limité par des raisons de sélectivité, il ne reste que la distance entre les centres réactionnel qui peut être modifiée en vue d'améliorer la performance du dispositif.

1.5 Revue de littérature au sujet des biocapteurs ampérométriques de glucose

1.5.1 Première génération de biocapteur de glucose

C'est en 1962 que Leland C. Clark, scientifique américain, conçu le premier biocapteur ampérométrique de glucose [9]. Il menait alors des études sur la réduction électrochimique de l'oxygène à la surface d'électrodes de platine. À partir de ses électrodes, recouvertes d'une membrane contenant une enzyme capable de réagir avec l'oxygène, Clark cherchait à suivre l'activité enzymatique. Il était ainsi en mesure d'évaluer la variation de la concentration d'oxygène aux abords de son dispositif. L'enzyme utilisée pour effectuer ces expériences était le glucose oxydase. Ses travaux menèrent, treize ans plus tard, à l'apparition du premier biocapteur ampérométrique de glucose dans les laboratoires de la compagnie «Yellow Springs Instrument Company».

Depuis, la part de marché du biocapteur de glucose n'a pas cessé de croître. Cette part est estimée à $10^9$$ américains annuellement dont $10^8$$ américains exclusivement pour les biocapteurs ampérométriques de glucose [10]. Il n'est toutefois pas surprenant de voir un tel l'intérêt porté par le commerce envers le biocapteur de glucose. En effet, avec plus de 2% de la population américaine qui souffre de diabète et qui nécessite un suivie quotidien de leur taux de glucose sanguin, ce marché promet d'être très lucratif. De plus, le suivie du taux de glucose sanguin est une mesure facile à réaliser et à analyser et donc suffisamment simple pour être réalisé à domicile. Naturellement, cette opportunité commerciale a été saisie par l'industrie privée qui offre aujourd'hui une multitude de dispositifs pour le dosage du glucose sanguin à domicile.

Évidemment, le dosage du glucose n'est pas seulement une question de gros sous, c'est avant tout une question de santé pour des millions d'individus. La majorité des hydrates de carbone qu'un humain consomme se retrouve dans son sang sous forme de glucose.

Le glucose qui n'est pas consommé immédiatement pas l'organisme est alors emmagasiné dans le foie et les muscles squelettiques, sous forme de glycogène, pour être utilisés entre les repas. Ce sucre est en fait la principale source d'énergie pour la majorité des cellules du corps et la seule pour certaines d'entre elles, comme les cellules du cerveau et les globules rouges. Si la concentration de glucose sanguin est inférieure à 3mg/ml, cela engendre de la confusion chez l'individu ou la perte de conscience. Dans le cas contraire, une concentration de glucose sanguin dépassant les 30mg/ml risque de causer des symptômes similaires s'ils sont associés à la déshydratation, à certaines infections ou à l'acidose.

Depuis le biocapteur de Clark, un nombre important de publications sur la confection de biocapteurs de glucose a vu le jour. Quelques unes des avancées majeures ayant étés faites dans ce domaine sont présentées dans les prochaines lignes.

En 1967, J.S. Updike et G.P. Hicks [11] on utilisé un dispositif permettant de calculer le flot d'oxygène pour mesurer différentes concentrations de glucose. Ce dispositif était constitué d'une membrane d'acrylamide imbibée de GOx recouvrant une électrode (Figure). Ils ont établi que la diffusion de l'oxygène à travers la membrane imbibée de GOx est réduite lorsqu'il y a présence de glucose. Cette réduction du temps de diffusion de l'oxygène à travers la membrane s'explique par le fait qu'en présence de glucose, une partie de l'oxygène traversant la membrane contenant la glucose oxydase, se voit transformée en peroxyde d'hydrogène. Les performances de ce dispositif étaient plutôt médiocres avec un seuil de détection de 0,56 mmol de glucose et un temps de réponse variant de 30 secondes à 3 minutes.

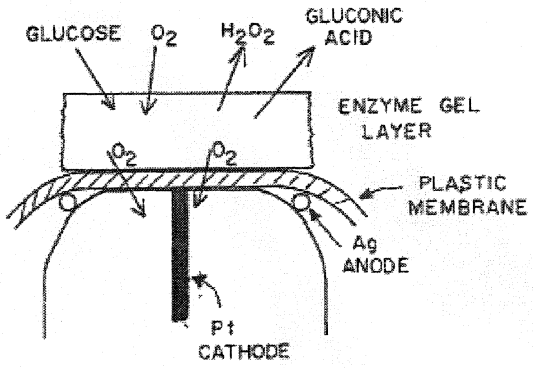


Figure 1.5.1: Schéma du dispositif de l'électrode d'oxygène de J.S. Updike et G.P. Hicks permettant la détection de glucose grâce à une membrane d'acrylamide imbibé de GOx [11].

1.5.2 Deuxième génération de biocapteur de glucose

Les biocapteurs ampérométriques de glucose qui ont par la suite été mis au point par la communauté scientifique visaient la détection du peroxyde d'hydrogène pour évaluer la concentration de glucose. Le principe de détection du peroxyde d'hydrogène est très simple; lorsque le H_2O_2 est produit par le GOx, selon la réaction présenté à la Figure 1.2.2, il diffuse jusqu'à la surface de l'électrode de travail de la cellule électrochimique. Le voltage appliqué à l'électrode de travail va générer une réaction électrochimique à sa surface qui elle va hydrolyser le peroxyde d'hydrogène (1.1). Le courant d'électrons, produit par la réaction électrochimique, est directement proportionnel à la concentration de glucose initial se trouvant dans le milieu, si la concentration d'oxygène est suffisante pour soutenir la réaction (équation 1.5.1) et que le milieu ne contient pas de molécules interférentes. Ce mode de détection, quoique ancien, est encore couramment utilisé dans certains dispositifs modernes en raison de sa simplicité [12,22]. Il est désigné comme étant la première génération de biocapteurs ampérométriques.

$$\text{Glucose} + \text{GOx (FAD)} \rightarrow \text{Gluconolactone} + \text{GOx (FADH}_2\text{)}$$
$$\text{GOx (FADH}_2\text{)} + O_2 \rightarrow \text{GOx (FAD)} + H_2O_2$$

Équation 1.5.1: Oxydation du glucose en présence d'oxygène

Les biocapteurs ampérométriques de première génération dépendent beaucoup de la diffusion des molécules (oxygène ou GOx) dans le milieu pour mener à bien la détection du glucose. Un moyen pour ne pas avoir à se soucier des problèmes engendrés par la diffusion des molécules est d'avoir un contact plus direct entre l'enzyme et l'électrode. Toutefois, un tel contact est très difficilement réalisable car le groupement $FAD/FADH_2$, responsable des réactions d'oxydoréductions menées par l'enzyme, est situé profondément à l'intérieur de la structure de l'enzyme. En réalité, même si l'enzyme diffuse jusqu'à l'électrode et entre en contact avec celle-ci, les chances d'obtenir un transfert direct des électrons est extrêmement faible. Cela s'explique par le fait que la distance entre le $FADH_2$ et l'électrode est supérieure à la distance à laquelle les électrons peuvent être transférés à un taux mesurable. Dans le but de palier à ce problème, A.E.G. Cassa et ses acolytes [13] ont proposé d'utiliser une molécule médiatrice qui peut être facilement oxydée et réduite pour diminuer la distance séparant le groupement $FAD/FADH_2$ du GOx et la surface de l'enzyme. Cette méthode, qui a par la suite été utilisée par plusieurs groupes de recherche, fait référence au biocapteur ampérométrique de deuxième génération [13,14,15]. La molécule médiatrice peut être simplement mise en solution avec l'enzyme ou encore fixée à la surface de l'électrode. Une des molécules médiatrices grandement utilisée est le ferrocène (Figure 1.5.2). Cette molécule contient une particule de fer capable de passer de la forme Fe^{3+} (ferricinium) à Fe^{2+} (ferrocène) lors du passage des électrons.

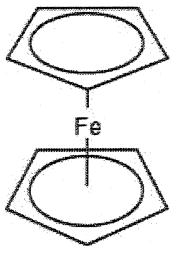


Figure 1.5.2 : Ferrocène

Ce type de molécule est capable de pénétrer partiellement dans l'enzyme pour interagir à la fois avec le centre réducteur $FAD/FADH_2$ et la surface de l'électrode, facilitant ainsi le passage pour les électrons lors de l'oxydation de l'enzyme

Dans les années suivantes, plusieurs groupes de recherche inspirés par les travaux de Liu [16] et Stoner [17], se mirent à utiliser la glutaraldéhyde (Figure) pour fixer le GOx directement sur l'électrode.



Figure 1.5.3 : Glutaraldéhyde

Liu [16] et Stoner [17] ont démontré que la fixation du biorécepteur enzymatique par la glutaraldéhyde sur l'électrode bonifie les performances de détection en réduisant les délais causés par la diffusion du GOx se trouvant en solution. Par la suite, d'autres groupes de recherche ont essayé de fixer l'enzyme avec différentes molécules comme par exemple, le carbodiimide [18] (Figure1.5.4).

HN=C=NH

Figure 1.5.4 : Carbodiimide

En 1987, Heller et ses collègues [19] publient un article démontrant qu'il est possible de modifier chimiquement une enzyme pour former un pont électrochimique entre cette dernière et une électrode. Ils utilisent pour ce faire un mélange de carbodiimide et de ferrocène pour fixer la molécule et obtenir une bonne communication entre le groupement $FAD/FADH_2$ du GOx et l'électrode. Grâce à cette modification, Heller éliminent les problèmes liés à la diffusion des molécules en solution. Cependant, toute modification chimique du GOx est accompagnée d'une baisse de son activité enzymatique. Dans le cas des expériences de Heller cette baisse est estimée à 50% de l'activité du GOx [19]. Toutefois, les voltamétries cycliques réalisées en présence de

ferrocène et de carbodiimide présentées, démontre que l'utilisation de molécules créant un pont pour les électrons entre le cœur oxydo-réducteur de l'enzyme et l'électrode facilite le suivie des réactions enzymatiques du GOx. Ce pont électrochimique, diminue le bruit de fond des voltamétries cycliques et amplifie le signal enzymatique.

Deux ans plus tard, c'est au tour de Yabuki et ses collègues [20] d'optimiser la connexion entre le GOx et l'électrode. Pour ce faire, ils utilisent un polymère conducteur, le polypyrrole (Figure 1.5.5), pour déposer et fixer l'enzyme à la surface de l'électrode. Ce polymère favorise le maintient de la bioactivité de l'enzyme. De plus, grâce à ses nombreuses dendrites, le polypyrrole, est capable d'atteindre le groupement $FAD/FADH_2$ pour faciliter le transfert direct des électrons jusqu'à l'électrode. Pour maximiser l'interaction entre le $FAD/FADH_2$ et la surface de l'électrode, Fiorito et Córdoba de Torresi [21] ont incorporé des molécules de ferrocène dans le polypyrrole avec une technique simple d'électropolymérisation. Les avantages de ce système sont nombreux. En effet, comme le ferrocène est peu soluble, son intégration dans une matrice de polypyrrole facilite grandement son utilisation. En plus de présenter une sensibilité de l'ordre du μM, une stabilité d'une semaine et un temps de réponse de deux secondes, ce biocapteur réagit très bien en présence de molécules interférentes. Puisque l'interaction entre le centre oxydo-réducteur de l'enzyme et la surface de l'électrode est facilitée, à la fois par le polypyrrole et par les molécules de ferrocène, la détection du glucose peut être faite à faible voltage, soit 0.4 V. Cette détection à faible voltage limite la réduction des molécules interférentes pour réduire principalement le glucose [21].

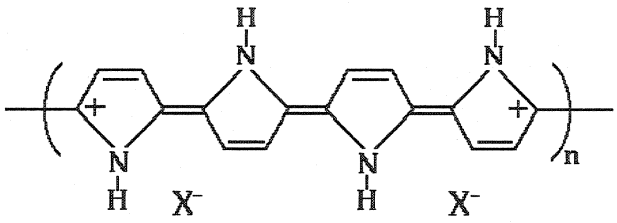


Figure 1.5.5 : Polypyrrole

L'utilisation de polymères conducteurs est maintenant chose courante dans la fabrication de biocapteurs ampérométriques de glucose. Il est toutefois plus rare de voir l'utilisation d'un polymère non-conducteur dans la mise au point de tels dispositifs, néanmoins, c'est ce que Badea et al. [22] ont réalisée. Même si leur biocapteur ne repose pas sur un transfert direct des électrons mais sur la réduction de H_2O_2, les résultats fournis par celui-ci attirent l'attention. Grâce à une matrice de copolymère fait de 2,6-dihydroxynapthalene (2,6-DHN) et de 2-(4aminophenyl)-éthylamine (AP-EA), le biocapteur de Badea et al. est en mesure de bloquer le bruit causé par l'acide ascorbique et l'acétaminophène. Cela est possible grâce aux propriétés du copolymère qui exerce l'exclusion des molécules interférentes en se basant sur leur charge et leur taille.

La présence de nombreux groupements amine dans le copolymère permet une adhésion covalente du GOx et une stabilité accrue de celui-ci. Contre tout attente, puisque qu'il est basé sur la détection de H_2O_2 et non sur un transfert des électrons, ce biocapteur présente un seuil de détection de 10μM de glucose avec une excellente reproductibilité. Les autres propriétés intéressantes de ce biocapteur sont sa stabilité de deux semaines et son temps de réponse de 25 secondes.

1.5.3 Troisième génération de biocapteur de glucose

La troisième génération de biocapteurs ampérométriques de glucose est basée sur un transfert direct des électrons de l'enzyme à l'électrode sans passer par des réactions d'oxydoréduction autres que celle se produisant sur le groupement FAD du glucose oxydase. Pour ce faire, il doit y avoir une connexion directe entre le centre d'oxydoréduction du GOx et la surface de l'enzyme. En raison de l'emplacement du groupement FAD, à 13Å à l'intérieur du GOx, le choix de la molécule capable de lier FAD à l'électrode en très restreint. Certains nanomatériaux peuvent répondre efficacement à ce besoin, s'ils sont conducteurs électriques et compatibles avec

l'enzyme. Les nanomatériaux présentement à l'étude pour la confection de biocapteurs de glucose sont les nanoparticules d'or [23] et les nanotubes de carbone [24].

Le groupe de Tang Fangqiong [23] a utilisé différents types de nanoparticules pour permettre un transfert direct des électrons entre le GOx et l'électrode. Des nanoparticules de silicium, d'or hydrophile et d'or hydrophobe ont été produites à cette fin. Pour modifier l'électrode de travail, celle-ci était tout simplement plongée dans une solution contenant 12 U de GOx et $8.5x10^{-6}$ mol×kg d'un des trois types de nanoparticules. Ceci permet un auto-assemblage de l'enzyme et des nanoparticules à la surface de l'électrode. Pour mesurer le transfert direct des électrons possible vu les différentes électrodes modifiées, ils utilisèrent une cellule électrochimique leur permettant de suivre l'augmentation de la densité de courant (nA/cm^2), pour une concentration donnée de glucose. Ils trouvèrent que l'électrode qui ne possédait pas de nanoparticule avait un taux de 200 nA/cm^2 alors que pour les électrodes modifiées avec des nanoparticules de silicium, d'or hydrophile ou d'or hydrophobe les taux de transfert étaient respectivement de 2500, 2800 et 7050 nA/cm^2. L'électrode modifiée de nanoparticules d'or hydrophobes a non seulement de bonnes capacités pour le transport d'électrons, mais a également la propriété de fournir une bonne adsorption de l'enzyme. Cette adsorption facilitée de l'enzyme sur les nanoparticules est rendue possible grâce à la formation de micelles renversées. Les micelles renversées, facilitées par la présence de certaine nanoparticules dans la solution, fournissent de bons réacteurs pour l'adsorption d'enzymes sur les nanoparticules.

Le courant perçu, lors de la biodétection, par l'électrode modifiée avec les nanoparticules d'or hydrophobes est beaucoup plus grand que le courant perçu par l'électrode modifiée avec une quantité égale de nanoparticules hydrophiles d'or qui ne favorisent pas la formation de ce type de micelles. Toutefois, c'est le mélange 1:1 de nanoparticules d'or hydrophiles et de nanoparticules de SiO_2 qui a donné les meilleurs résultats avec un taux de transfert de 8800 nA/cm^2. Tang Fangqiong et ses collègues expliquent cela par le fait

que l'introduction de nanoparticules de SiO_2 abaisse la concentration de nanoparticules d'or, diminuant ainsi le transfert superflu des électrons. Cela favorise un lien plus direct entre le groupement hydrophile FAD de GOx et l'électrode grâce aux nanoparticules hydrophiles alors que les nanoparticules de SiO_2 hydrophobe permettent la formation de micelle renversée. Ainsi, la combinaison de nanoparticules de SiO_2 hydrophobes et de nanoparticules hydrophiles d'or augmente plus efficacement la réponse ampérométrique des électrodes que la combinaison de nanoparticules de SiO_2 et de nanoparticules hydrophobes d'or qui offre un rendement de 4350 nA/cm^2.

Un second matériau qui a démontré des particularités intéressantes pour le transfert direct d'électrons dans la fabrication de biocapteurs ampérométriques est le nanotube de carbone. Ses excellentes propriétés conductrices et sa taille font de lui un substrat propice pour ce type d'application. Guiseppi-Elie [24] et al. ont utilisé des nanotubes de carbone simple brin (SWNT) pour établir un transfert facilité des électrons entre le groupement FAD de GOx et l'électrode. La formation de complexes SWNT-GOx est possible vu une fonctionnalisation préalable des SWNTs. Cette fonctionnalisation des SWNTs est réalisée lors des étapes de purification par un traitement à l'acide nitrique qui favorise la formation de groupements carboxyliques, carbonyles et phénoliques à la surface des nanotubes de carbone. Ces groupements présentent une forte affinité pour les groupements amines des enzymes.

Les voltamétries cycliques obtenues par le groupe de Guiseppi-Elie [24] ont permis d'évaluer l'augmentation de la surface de l'électrode modifiée par les SWNTs à environ 22 fois la surface d'une électrode standard de carbone vitreux. La modification de la surface de électrodes de travail, préalablement polie, est réalisée par un dépôt de SWNT suspendu dans l'eau. Une fois le dépôt de SWNT sec, l'électrode de travail est plongée dans un tampon contenant 0.1mM d'enzyme pour y être incubée durant toute une nuit afin de permettre l'adsorption de GOx par les SWNT.

Le rapport linéaire du courant de pointe des voltamétries cycliques avec le taux de balayage démontre que le transfert d'électrons de FAD est typique d'une réaction ayant lieu à la surface même d'une électrode [24].

Le biocapteur développé par Guiseppi-Elie offre une sensibilité maximum de 25mM lors de tests chronoampérométriques avec un temps de réponse de quelques secondes. Ce temps est relativement court, lorsqu'on sait que le taux de glucose sanguin n'a besoin que quelques minutes pour varier. La sensibilité du dispositif est quant à elle légèrement insuffisante avec un seuil de détection de 25mM alors que le glucose sanguin peut atteindre 1 mM. Le dispositif en question présente une stabilité convenable. Des tests effectués avec une électrode vieille de deux mois ont fourni une réponse équivalente à 70% de la réponse originalement détectée.

De façon surprenante, même si le voltage utilisé pour les voltamétries cycliques allait de -0.2 à -6.5V, l'influence de l'oxygène présente en solution à été observée lors de la mesure de voltamétrie cyclique. Cela témoigne que la réduction de $FADH_2$ par l'oxygène peut avoir lieu malgré l'utilisation d'un faible voltage et de la présence de SWNT à la surface de l'électrode.

1.6 Revue littérature des biocapteurs de putrescine

1.6.1 La putrescine comme marqueur de cancer et comme marqueur de fraicheur

Il est connu que les polyamines jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la transformation des cellules. Ces polyamines, plus précisément, la putrescine, la spermine, la spermidine et la cadaverine, participent au métabolisme de synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il en découle que toute prolifération des cellules engendre une production accrue de ces polyamines, ceux-ci peuvent donc être utilisés comme marqueurs pour le cancer [25,26]. Il a été rapporté, par certains groupes

de recherche, que les tumeurs pulmonaires sont responsables d'une concentration élevée de putrescine dans le sang, le sérum et le mucus de patients cancéreux [25]. Les recherches de Fujita et ses acolytes ont mis en évidence, grâce à des études menées chez des rats, que des tumeurs gastriques pouvaient engendrer une augmentation de la concentration de putrescine urinaire. Ces résultats concordent avec les résultats de Russell qui fut le premier, en 1971, à proposer une relation entre le taux élevé de polyamines retrouvé chez un individu et la présence de cellules cancéreuses chez celui-ci [27]. Outre son utilité de marqueur pour le cancer, la putrescine présente aussi des aptitudes pour évaluer la fraîcheur des aliments, en particulier le poisson. La putrescine présente chez les poissons provient de la décarboxylation de l'ornithine [28]. L'ornithine est un acide aminé, non codé par l'ADN, qui participe au cycle de l'urée et qui n'entre pas dans la constitution des protéines. Lorsque la putrescine est présente en trop grande quantité chez le poisson, elle peut causer des empoisonnements alimentaires qui se manifestent par des maux de tête, des nausées, des palpitation, de l'hypo ou de l'hypertension [29]. L'intérêt de doser la putrescine, que se soit pour être utilisée comme marqueur pour le cancer ou pour évaluer la fraîcheur des aliments, est bien évident et a déjà été démontré par plusieurs groupes de recherche [25,26,27,28,29].

1.6.2 Les biocapteurs de putrescine

Les premières techniques mises au point pour mesurer la concentration de putrescine dans divers substrats, soient celles du HPLC et de l'électrophorèse par capillaire qui étaient malheureusement fastidieuses, coûteuses et nécessitaient beaucoup de temps [30,31]. Quoique aucun biocapteur de putrescine ne soit vendu commercialement, il existe quelques biocapteurs ampérométriques qui ont été développés pour la détection des polyamines. Les biocapteurs ampérométrique de Sayed A. M. Marzouk [32], de Livia Nagy [25] et de Mihaela Niculescu [36] sont de ceux qui offrent les meilleures performances [25,32, 33, 36].

Le biocapteur ampérométrique de putrescine conçu par Sayed A. M. Marzouk [32] et ses collègues n'était pas destiné au diagnostic du cancer, mais plutôt à la détection d'infections vaginales. Le dispositif qu'ils ont mis au point est un biocapteur ampérométrique de première génération, particulièrement efficace, fonctionnant à un potentiel de 0.6 V. Leur dispositif est muni d'un système d'injection des fluides qui envoie des quantités préétablies d'analyte à l'intérieur d'une chambre à réaction. Cette chambre à réaction, de 40 mm par 2.5 mm, contient des billes de verre sur lesquelles l'enzyme, la putrescine oxydase, a préalablement été fixée grâce à la glutaraldéhyde. Lorsque l'analyte, contenant une certaine concentration de putrescine, traverse la chambre de réaction en suivant l'écoulement du fluide, il y a transformation de la putrescine en peroxyde d'hydrogène selon Équation 1.6.2.

$$H_2N(CH_2)_4NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow H_2N(CH_2)_3CHO + NH_3 + H_2O_2$$

Équation 1.6.2 : Transformation de la putrescine en 4-aminobutanal et en peroxyde.

La concentration de peroxyde d'hydrogène détectée, selon le principe des biocapteurs de première génération, permet d'évaluer la concentration de putrescine présente dans l'analyte grâce à une cellule électrochimique à trois électrodes (travail, contre électrode et référence) située à l'extrémité du dispositif. Les trois électrodes du dispositif sont reliées à un système de EG & G PARC M273A et à un microordinateur sur lequel un logiciel approprié permet la collecte des données. L'utilisation d'un taux d'écoulement de 2 ml/min a permis la détection de la putrescine de façon linéaire sur une gamme de concentrations allant de 10 μM et 1mM. Pour mettre à l'épreuve le dispositif, 70 échantillons par heure on été dosés et aucune diminution de la sensitivité à été détectée après le dosage de plus de 1000 échantillons. Pour s'assurer de l'exactitude des concentrations détectées par le biocapteur, des concentrations équivalentes de peroxyde d'hydrogène et de putrescine ont été successivement injectées dans le dispositif. Les résultats ont montré une concordance de 97 et 94% pour la détection de 100 et 500 μM de putrescine. Pour évaluer la sélectivité offerte par le biocapteur, Sayed A. M.

Marzouk et ses acolytes ont vérifié le signal émis par le système lors d'injections successives de 500 μM d'acide urique, d'acide ascorbique, d'acétaminophène et de cystine. Seule l'acide ascorbique a été légèrement perçue par le système de détection. Toutefois, la concentration injectée de ces espèces susceptibles de causer des interférences est de loin supérieure à la concentration que l'on risque de retrouver chez les différents fluides biologiques [34].

Le biocapteur mit au point par Livia Nagy et son équipe de recherche est aussi un biocapteur de première génération où la détection de la putrescine repose sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (Équation 1.6.2) à un potentiel de 0.6 V [25]. Néanmoins, grâce à une nouvelle technique qu'ils ont mis au point pour fixer l'enzyme sur l'électrode de travail, leur biocapteur a pu atteindre des niveaux de détection de l'ordre des 50 nM, soit un ordre de grandeur plus faible que les concentrations de putrescine que l'on détecte habituellement dans le sang (1 à 45 μM) [35]. Le dispositif qui a permis d'obtenir ces résultats est un système classique à trois électrodes qui a été microfabriqué par photolithographie sur un substrat flexible de Kapton. L'électrode de travail et la contre électrode du dispositif sont des électrodes d'or plaquées de platine alors que l'électrode de référence est de type Ag/AgCl. Pour procéder à la bio-modification de l'électrode de travail, deux techniques ont été essayées. La première méthode utilisée est de mettre dans une même solution l'agent liant, soit la glutaraldéhyde 9% (figure 1.5.3), et la putrescine oxydase pour ensuite étendre le tout à la surface de l'électrode de travail à l'aide d'une micropipette pour enfin laisser sécher le tout à la température de la pièce. La seconde méthode qui a été utilisée pour modifier l'électrode de travail a été une immobilisation en phase gazeuse. Pour ce faire 1 μl de putrescine est étendu à la surface de l'électrode de travail et partiellement séché pour une période de 20 minutes. L'électrode de travail est alors introduite dans une chambre contenant 10 ml de glutaraldéhyde 12,5%, de façon à ce que la surface plate de l'électrode fasse face à la solution contenant l'agent de liaison. Pour créer une

atmosphère humide de glutaraldéhyde, un jet d'azote est utilisé pour bouillonner la solution. Des temps d'exposition de 5, 10, 15, 25 et 30 minutes ont été réalisés pour étudier cette méthode de fixation de l'enzyme. Il s'est avéré qu'une période de 25 minutes de traitement offre les meilleurs résultats en terme de sensibilité. Afin de maintenir une bonne activité enzymatique du dispositif, celui-ci est entreposé à 4°C dans l'eau.

Dans le but de limiter la détection de molécules interférentes, une couche protectrice de polyuréthane 1%, préalablement dissoute dans un solvant 1:1 de tétrahydrofuran et de cyclohexanone, a été déposée à la surface de l'électrode de travail. Fonctionnant selon un principe d'exclusion de taille, cette membrane protectrice prévient la détection de l'acide ascorbique tout en permettant celle du peroxyde d'hydrogène. Un seuil de détection impressionnant de 50 nM a pu être observé avec ce dispositif. Toutefois, la majorité des résultats présentés convergent plutôt vers une limite de détection avoisinant le 2 μM.

La courbe étalon, conçue à partir du biocapteur ayant reçu une immobilisation en phase gazeuse de glutaraldéhyde de 25 minutes et un seul dépôt de polyuréthane, présente une pente de 0.57 ± 0.035 nA/μM.

Pour démontrer la possibilité de détecter de la putrescine en présence de l'ensemble des constituants du sang, Livia Nagy et ses acolytes ont procédé à la détection de différentes concentrations de putrescine (2, 5, 10, 37.48 μM) dans le sang et le plasma. Ils ont ainsi pu vérifier que les constituants du sang ou du plasma ne causaient pas de problèmes à la détection de la putrescine, car les quantités de putrescine qu'il a été possible de détecter dans les fluides biologiques correspondaient à au moins 99.3% des quantités de putrescine qui avaient été injectées dans ces fluides.

Le biocapteur développé par Mihaela Niculescu et ses acolytes est un biocapteur de deuxième génération qui n'est pas spécifique à la putrescine mais dont l'ingéniosité de sa confection mérite d'être mentionnée [36]. Leur biocapteur utilise une cellule électrochimique conventionnelle à trois électrodes, fonctionnant à une tension de -50 mV (Ag/AgCl), en combinaison avec un système d'injection des fluides. L'électrode de travail du système, faite de carbone vitreux, est modifiée à l'aide de deux enzymes, soient l'amine oxydase et la «horseradish» peroxydase. Des polymères sont également utilisés pour faciliter l'interaction inter-enzymes, le transfert des électrons entre la HRP et l'électrode et finalement pour augmenter la stabilité du dépôt qui est fait sur l'électrode. Le design particulier du biocapteur facilite l'interaction entre les diverses composantes du système, ce qui permet d'utiliser un très faible potentiel (-50 mV) pour la détection d'analytes. En utilisant ce potentiel, il est possible de réduire le bruit de fond du courant et de limiter la détection de molécules interférentes non désirées.

Après avoir testé différentes variantes de modifications pour l'électrode de travail, l'une d'elle s'est démarquée en offrant une meilleure sensibilité, stabilité et simplicité de confection. Cette modification se fait comme suit : Sur l'électrode de carbone vitreux de 3.05 mm, préalablement polie et rincée à l'eau distillée, 6 µl d'une solution contenant de l'AO (20 mg/ml), du HRP (10 mg/ml), du PVI_{13}-dmeOs (10 mg/ml) et de la polyéthylèneglycol-diglycidyl éther (5mg/ml) est déposée. L'électrode est ensuite séchée à la température de la pièce. Le PVI_{13}-dmeOs, déposé sur l'électrode de travail, est un hydrogel réducteur fait de poly-vinylimidazole et de osmium (4,4'-dimethylbipyridine)$_2$Cl, qui facilite le transfert des électrons alors que le PEGDGE sert d'agent liant entre les diverses molécules utilisées pour la modification. Lorsque non utilisées, les électrodes sont entreposées à 4°C.

Dans ce système bi-enzymatique, dans lequel l'AO est couplée à l'HRP via l'hydrogel réducteur, la détection de l'analyte (amine) est possible grâce à une suite de réactions qui débute par la conversion de l'amine en aldéhyde, laissant l'AO sous sa forme réduite,

qui se trouve à être sa forme inactive. L'AO réduite est alors naturellement oxydée par l'oxygène présent en solution pour former de l'ammoniaque et du peroxyde d'hydrogène. Ce peroxyde d'hydrogène est alors réduit par l'HRP en eau laissant l'HRP et son cofacteur hème sous sa forme oxydé. Finalement, l'HRP retrouve rapidement sa forme fonctionnelle grâce à la réduction facilitée par l'hydrogel réducteur du cofacteur hème de la HRP.

Lorsque les paramètres idéaux sont réunis, le biocapteur bi-enzymatique de Mihaela Niculescu montre une limite de détection de 0.17 μM pour la putrescine. Après un entreposage de l'électrode de 10 jours à 4 °C, le système présente une diminution du signal de 15%, et si la même électrode est utilisée de façon continue pour une période de 10 heures, à raison de 30 injection par heure, une diminution du signal de 50% peut être observée.

CHAPITRE 2 : LE NANOTUBE DE CARBONE (NTC)

2.1 La découverte des nanotubes de carbone

En 1991, six ans après la découverte de la première sphère de carbone 60, communément appelé fullerène [37], Iijima et sont équipe de recherche firent la découverte d'une nouvelle forme de carbone, le nanotube de carbone multiparois [38]. Deux ans plus tard, cette même équipe parvient à mettre en évidence l'existence de nanotubes simple-paroi [39]. L'apparition successive de ces nouvelles structures à base de carbone motiva l'ensemble de la communauté scientifique à pousser les recherches pour caractériser ces nouveaux matériaux. Lors de la dernière décennie un nombre important d'articles fut publié au sujet des les propriétés chimiques, mécaniques et électriques des nanotubes de carbone (NTCs). Il va de soi que les modes de fabrication des nanotubes ont également suscité un grand intérêt lors de ces recherches.

2.2 La structure de base des NTCs

La structure d'un tube de carbone simple-paroi (NTCSP) est similaire à celle d'une feuille de graphite que l'on aurait roulé sur elle-même. La structure du graphite se définie comme un arrangement planaire d'atomes de carbone organisés en couches avec une configuration spatiale hexagonale. L'orientation dans laquelle une feuille de graphite peut être roulée représente bien les différentes positions que peuvent prendre ces hexagones de carbone les uns par rapport aux autres dans la formation d'un nanotube de carbone (Figure 2.2.1).

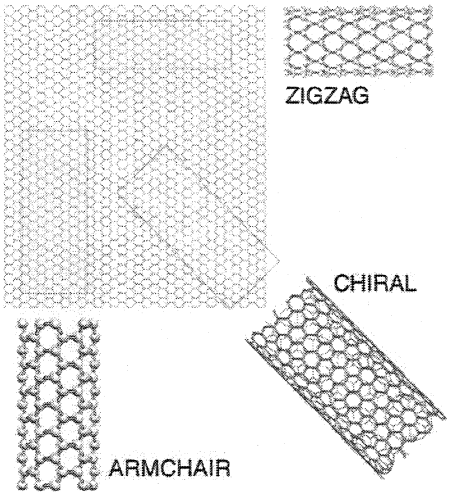


Figure 2.2.1 : Orientations possibles des atomes de carbone dans un NTC [42].

La dimension d'un NTCSP est d'en moyenne 1,4 nanomètre de diamètre et peut atteindre quelques µm en terme de longueur. Le plus petit NTCSP observé jusqu'à ce jour possède un diamètre de 0,4 nm [40]. Cette dimension minimum est en accord avec les calculs de Sawada S. et Hamada N. qui prédisent qu'un nanotube de carbone ayant un diamètre plus étroit ne serait pas stable [41]. Le tube de carbone multiparois est un ensemble de deux à cinquante tubes de carbone concentriques espacés de 3,4 Å et ayant un diamètre de 10 à 200 nm. Lorsque les NTCs ne contiennent pas de défaut, l'ensemble des atomes de carbone de la paroi possède une hybridation sp^2, tout comme celle du graphite.

La structure fine d'un tube de carbone est régie par deux paramètres clés, (m,n). Ces paramètres dictent le vecteur de la matrice (ā (m,n)) qui dirige la façon dont une feuille de graphite doit être roulée sur elle même pour permettre un arrangement précis des atomes dans le CNT (Figure2.3.1). Le roulement de la feuille de graphite n'est pas un mode de fabrication des NTCs, mais seulement un moyen d'illustrer la disposition des atomes qui peut être adoptée dans un nanotube de carbone.

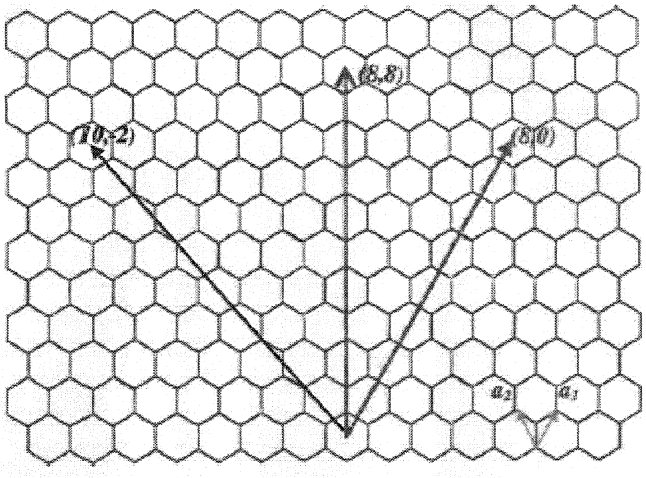


Figure 2.2.2 : Les vecteurs de matrice [43].

En additionnant le vecteur mā et nā ainsi qu'en rejoignant la queue et la tête du vecteur résultant, on obtient la direction dans laquelle on doit rouler la feuille de graphite pour obtient la structure finale du NTC.

Les indices (m,n) nous informent sur les propriétés électriques, sur le diamètre et sur la chiralité (propriété qu'a une molécule d'être différente de son image miroir) des NTCs. Il existe deux types de nanotubes achiraux (molécule possédant un ou plusieurs axes de symétrie); les tubes de type «arm-chair» possédant les indices (m,n) où m=n et les tubes de type «zig-zag» possédant (m,0) comme indices [42]. La configuration «arm-chair» donne des tubes aux propriétés métalliques, c'est-à-dire qu'ils possèdent une densité d'états non nulle au niveau de Fermi. Les autres tubes dont 2n+m est un multiple de 3, présentent des propriétés métalliques. Les tubes qui ne répondent pas à cette condition portent l'étiquette de semi-conducteur [1] (Figure2.3.2).

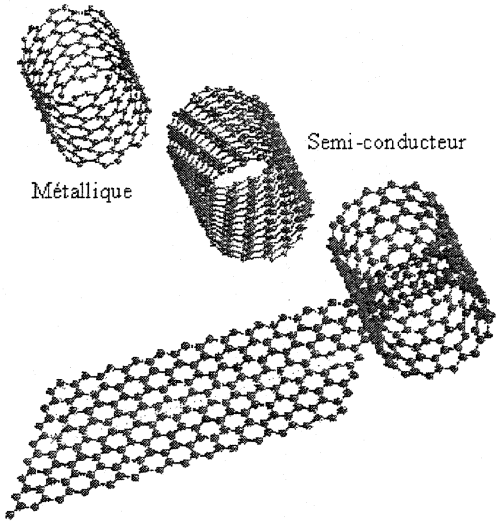


Figure 2.2.3 : Les propriétés électriques des nanotubes en fonction de leur symétrie.

Ainsi, la différence entre des NTCs de type métallique et des NTCs semi-conducteurs est purement reliée à la symétrie du tube. La chiralité des NTCMPs a beaucoup moins d'importance dans les propriétés électriques du tube car l'effet d'addition des différentes couches de chiralité a pour effet d'uniformiser les propriétés de ce type de NTC [43]. Néanmoins, c'est la structure de la paroi extérieure du NTCMP qui est principalement responsable des propriétés électriques du tube [44].

2.3 Les propriétés mécaniques des nanotubes de carbone

Comme les NTCs sont un matériau relativement nouveau, plusieurs des caractéristiques physiques varient d'un article à l'autre et dépendent grandement des détails du procédé de fabrication. La manipulation difficile qui découle de la petite dimension des NTCs n'aide en rien les expériences pour identifier les propriétés de ce matériau. Comme le graphite possède un module de Young de 350 GPa et que les nanotubes ont la structure d'une feuille de graphite roulée sur elle-même, il serait logique de penser que les NTCs possèdent un module de Young's élevé.

Plusieurs groupes de recherche ont dans un premier temps essayé de calculer théoriquement le module de Young des nanotubes de carbone. L'ensemble des calculs indique qu'un NTCSP a un module de Young d'environ 1 TPa, et ce, peu importe sa chiralité en autant que le diamètre soit similaire. Par exemple, Hermandez et ses confrères de travail prédisent par leurs calculs un module Young's de 1.2 TPa, indépendamment de la chiralité et du diamètre du NTC. Lu J.P., quant à lui, propose un module de 0.97 TPa selon les mêmes conditions [45, 46]. Le groupe de recherche de Zhang suggère des valeurs de 1.0 à 1.7 TPa [47]. Zhang avance également que les propriétés élastiques seraient indépendantes de la structure du NTC, alors que les propriétés de déformation plastique seraient influencées par cette structure. Toujours selon Zhang et ses collègues [47] les NTCSPs possédant une structure en «zig-zag» auraient une limite d'élasticité plus grande que ceux possédant une structure en «arm-chair». Le module de Young des nanotubes de carbone serait en fait encore plus élevé que celui du diamant (1.035Tpa), matériau également fait entièrement d'atomes de carbone [48].

Dans les calculs des modules de Young précédents, les auteurs ont supposé que les NTC ont une épaisseur de 3.4 Å, ce qui correspond au rayon de van der Waals des atomes de carbone composant le tube. Le groupe de recherche de Zhou Xin a mené des calculs théoriques de la résistance au pliage des NTCSPs, basés sur les théories d'élasticité modernes en utilisant une épaisseur de paroi des nanotubes de 3.4 Å. Les résultats de leurs calculs donnent un résultat 25 fois inférieur aux résultats prédits par la mécanique classique [49]. Pour avoir une rigidité de pliage qui concorde avec la mécanique classique, l'épaisseur d'un SWNT qui doit être utilisé est celle d'un atome de carbone soit de 0.66 Å. Toutefois, en utilisant cette valeur, les calculs de module de Young n'arrivent plus à 1 TPa mais à 5 TPa! Cette ambiguïté illustre bien les problèmes qui peuvent survenir lorsque la physique des matériaux en volume est appliquée à des matériaux nanostructurés possédant des dimensions ne contenant que quelques atomes.

Une des méthodes qui a été développée pour étudier expérimentalement le module de Young est d'exercer une pression radiale sur le NTC à l'aide d'une pointe AFM [42]. Cette méthode a permis de déterminer que les NTCMPs possèdent un module deYoung plus élevé que le graphite, mettant ainsi en évidence leur rigidité plus élevée. Ces mêmes tests ont également permis de démontrer qu'il était possible de déformer grandement les nanotubes sans induire de déformation plastique. J. Tang et ses collègues [50] ont démontré qu'un NTCSPs pouvait supporter une pression de 4 GPa avant que celui-ci subisse une déformation de sa structure. Une autre méthode mise au point par Treacy M. et ses acolytes pour étudier le module de Young des NTCs, est de suivre leur vibration indépendante lors d'une étude au TEM. Par cette méthode, on obtient un module de Young de 1.25 TPa ± 0.45 pour les SWNTs ayant un diamètre de 1.0 à 1.5 nm. Les NTCMPs, quant à eux, vont présenter un module 1.8 de TPa indépendamment du diamètre et du nombre de parois internes que possèdent les tubes [51].

2.4 Les propriétés électriques des nanotubes de carbone

Les propriétés électriques des nanotubes de carbone sont déterminées par leur structure atomique, leur diamètre et les indices de matrice (m,n) (Figure 2.3.1). La technique généralement utilisée pour mener à bien l'étude électrique des NTCs, est de positionner un seul NTC entre un drain et une source faite de platine et d'utiliser le NTC comme nano-fil conducteur. On évalue ainsi comment cette structure particulière d'atome de carbone se comporte sous tension. Une des particularités intéressantes des NTCs est que leurs propriétés électriques sont très peu affectées par l'environnement chimique ainsi que par leurs interactions avec d'autres molécules [42].

Dans le cas des NTCSP métalliques la résistance varie avec la température de ~12 kΩ à 2K jusqu'à ~20 kΩ à 300 K lorsque la tension appliquée est de -10 V. En modifiant la tension de -100 V à 100 V, les NTCSPs présentent une bonne conductivité sans

oscillation du courant. Généralement, il est dit qu'un NTCSP est métallique à la température de la pièce lorsque la conductivité du nanotube est indépendante de la tension gril lorsque celui-ci est déposé sur des électrodes à une distance de cent nanomètres.

Les propriétés électriques des NTCMPs sont plus controversées et moins bien définies du fait qu'un seul NTCMP est composé d'un ensemble de tubes de carbone aux propriétés diverses. Cette complexité structurale peut toutefois devenir un avantage si on développe la capacité d'utiliser préférentiellement une coquille du NTCMP possédant les propriétés que l'on désire [52]. Bon nombre des NTCMPs sont conducteurs, du fait que statistiquement 1 NTC sur 3 possèdent une structure métallique [53]. Les études de Sinnott et Andrews ont montré qu'il était possible de briser un à un les NTCs se trouvant à l'extérieur d'un NTCMP en mettant celui-ci sous une tension appropriée. Chaque perte de couche extérieure du NTCMP affecte le courant traversant le NTC. On peut ainsi déterminer la structure du tube se trouvant à l'extérieur de NTCMP ainsi que son diamètre [43].

2.5 Les propriétés chimiques des nanotubes de carbone

La plupart des atomes de carbone qui composent le nanotube ont une hybridation sp^2 ce qui rend ces atomes peu susceptibles de réagir chimiquement. Les endroits qui ont le plus de chance de réagir sur les NTCs sont ceux où l'on retrouve des atomes hybridés sp^3. Ce type d'hybridation sur la paroi d'un NTC témoigne de la présence de défauts qui sont généralement associés soit à des groupement alcool, carbonyle ou carboxyle. Ces groupements, qui sont capables de réaction avec d'autres molécules, représentent une porte d'entrée pour la fonctionnalisation de NTCs. Pour augmenter les défauts sur les NTCs et ainsi faciliter la fonctionnalisation des NTCs, il existe différentes méthodes. Une des méthodes est de plonger les tubes dans un bain de sonification. Il est également possible de mettre les NTCs en présence d'acide nitrique

ou sulfurique [54]. Lorsque les défauts sont créés sur le NTC, des molécules telles que le carbodiimide (Figure 1.5.4), peut agir comme coupleur entre les groupements COOH et une seconde molécule que l'on cherche a faire réagir. La fonctionnalisation chimique des côtés de NTCs est également possible. Ce type de fonctionnalisation permet une meilleure adhésion des autres molécules à la surface des NTCs et une meilleur solubilisation des NTCs. Les molécules de type «diradical», «nitrene» ou «dichlorocarbene» sont couramment utilisées pour fonctionnaliser les parois latérales des NTCs [55].

2.6 Leurs modes de fabrication.

Il existe plusieurs méthodes différentes de fabrication des NTCs. Les plus connues sont la méthode par laser, la méthode utilisant un arc électrique et la méthode CVD («chemical vapor deposition»). Chacune de ces méthodes présente ses propres avantages et inconvénients.

La méthode des arcs électriques est la première méthode qui a permis la création de NTCs [38]. Cette méthode était déjà utilisée depuis longtemps pour la fabrication de fibre de carbone. Il est très probable que des NTCs avaient été produits avant 1991 par cette méthode, toutefois ceux-ci n'ont jamais été observés avant cette date. Ebbesen et Ajayan décrivent une méthode toute simple en 1992 pour fabriquer des NTCs à partir d'un arc électrique [56]. Dans une atmosphère d'hélium, ils positionnent deux électrodes de graphite face à face, à quelques millimètres de distance. Ils posent ensuite une tension d'environ 18 V entre le deux électrodes. Lors des décharges électriques entre les électrodes, il y a vaporisation d'atomes de carbone à l'intérieur d'un plasma, qui fournit l'énergie nécessaire à la formation de NTCs. Les NTCs vont par la suite se déposer sur les électrodes de graphite de façon parallèle à celle-ci. Iijima et ses acolytes rapportent en 1993 que l'utilisation d'électrodes de graphite dopé au nickel ou au cobalt vont permettre la formation de NTCSP alors que des électrodes de graphite standard

vont donner de NTCMP [39]. Le taux de rendement de cette méthode varie de 30 à 90% et nécessite généralement une étape subséquente de purification. Les NTCSPs ou NTCMPs produits par cette méthode présentent peu de défauts dans leur structure. Cependant les NTCs produits sont généralement courts et de diamètres variés.

La méthode CVD est très populaire pour la production des NTCs. Cette technique présente les avantages de produire des NTCs relativement purs avec un nombre limité de défaut et d'offrir la possibilité d'orienter les NTCs sur le substrat de production [57,58]. Les nanotubes sont formés par la réaction à haute température de vapeurs hydrocarbonées avec des particules catalytiques déposées sur un substrat de quartz ou de silicium. Des gaz, tels que le méthane (CH_4), l'acétylène (C_2H_2), l'éthylène (C_2H_4), le xylène ou le benzène sont couramment utilisés dans le procédé de fabrication. Le gaz hydrocarboné suit le courant du gaz $Ar/H_2(10\%)$ et est apporté vers la pré-fournaise pour être chauffé jusqu'à 200°C. Par la suite, le gaz hydrocarboné est dirigé dans la fournaise principale où la température varie entre 600°C et 1000°C. C'est à cet endroit que ce trouve le substrat sur lequel ont été préalablement déposées les particules catalytiques de cobalt ou de nickel qui permettent la croissance des nanotubes de carbone. Cette méthode de production présente l'avantage de pouvoir être réalisée industriellement avec un taux de rendement variant de 20 à 100%, tout en offrant la possibilité de contrôler la taille des NTCs produits.

Une autre méthode qui a été mise au point pour la fabrication de nanotubes de carbone est celle utilisant l'ablation laser. Cette méthode, mise au point pas le groupe de recherche de Smalley, vise à diriger le faisceau d'un laser excimer ArF (λ=193nm; fluence=3 J/cm^2; repetition rate=10 ou 50 Hz) sur une cible de graphite dopé, au cobalt ou au nickel, située à l'intérieur d'un four dont la température avoisine les 1200 °C [59,60]. Lors de l'impulsion laser, il y a vaporisation des atomes de carbone qui vont se condenser de façon ordonnée à la surface des particules catalytiques pour former les nanotubes de carbone. Le tout se déroule dans un réacteur où un flux d'argon pousse les

NTCs sur un collecteur situé à l'extérieur de la fournaise. Cette méthode permet la synthèse de NTCs relativement longs, soit de 5 à 20 μm avec peu de défauts. Le taux de rendement approche les 70%. Le principal inconvénient de cette technique est le coût de production élevé engendré par l'utilisation d'un laser.

2.7 L'implantation des nanotubes dans la technologie.

Même si le nanotube de carbone est un matériau qui a été découvert il y a déjà plus que dix ans, son utilisation dans la technologie de tous les jours tarde à se faire. La principale raison qui retarde une mise en marché plus étendue des CNTs est son coût de production encore trop élevé. Pour faire baisser les coûts de production, des procédés de fabrication de masse doivent être mis au point. Ces procédés doivent pouvoir être réalisés par un technicien et ne doivent pas nécessiter un équipement trop onéreux. Le mot d'ordre est donc «High tech for low tech» [61]. La biopuce, qui pourrait éventuellement se retrouver dans chaque cabinet de médecin, où le nanotube de carbone sert de nanoélectrode est le dispositif idéal pour favoriser l'utilisation des NTCs sur une base quotidienne et permettre ainsi une chute des prix des NTCs. Il n'est donc pas surprenant qu'une forte proportion des brevets reliés aux NTCs proposent d'exploiter leurs propriétés électriques et leur dimension nanométrique dans la fabrication de biocapteurs afin de former des biopuces possédant un pouvoir de diagnostic sans précédant [62,63].

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE MODIFICATION DES ÉLECTRODES SERVANT À LA DÉTECTION DU GLUCOSE

3.1 L'évaluation de la sensibilité, sélectivité et stabilité des électrodes de travail

Pour évaluer la concentration idéale ou le temps de réaction optimal de chacun des paramètres de modification des électrodes de travail, une multitude de tests d'optimisation ont été réalisés. Pour ce faire, tous les paramètres sont maintenus fixés à l'exception de celui qui doit être optimisé. Les paramètres de départ utilisés pour faire les tests sont : une concentration de nanotubes de carbone de 1 mg/ml, une concentration de 2% de PDDA (Chlorure de polydiallyldimethylammonium), une concentration APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) de 2%, 1,5 unité de glucose oxydase par électrode et un temps de sonification de 2 min pour la mise en suspension des nanotubes de carbone.

Pour tester ces différents paramètres, 5 à 6 électrodes de travail sont préparées de façon identique à l'exception du paramètre à optimiser. Les différentes électrodes sont alors soumises à la détection successive de 10, 50, 100 μM de glucose, 50 μM d'acide urique, 100 μM d'acétaminophène et d'acide ascorbique. Ces différentes détections permettent d'évaluer l'effet de la modification apportée à l'électrode de travail sur la sensibilité et la sélectivité du biocapteur. La modification idéale doit permettre à l'électrode de travail de détecter un minimum de molécules interférentes et percevoir le plus fort signal possible lors des additions de glucose. La proportionnalité entre la concentration de glucose injectée et l'augmentation de courant induite est également surveillée lors de ces tests.

Pour vérifier la stabilité du dépôt fait sur les électrodes lors de la variation des différents paramètres, celles-ci sont plongées dans un bécher contenant une solution tampon de phosphate agitée par une barre magnétique durant de 45 minutes. Par la suite, les électrodes sont soumises une seconde fois à la détection des mêmes concentrations d'analyte et de molécules interférentes. Idéalement, si la modification faite sur l'électrode est stable, les résultats obtenus lors de cette seconde vague de tests devraient être identiques à ceux de la première vague de tests.

3.2 La dispersion des nanotubes de carbone multiparois

L'une des premières étapes dans le développement de ce biocapteur ampérométrique de troisième génération est de trouver un moyen simple et efficace de créer des solutions contenant une dispersion homogène de NTCMP. Plusieurs équipes de recherche ont utilisé les acides nitrique ou sulfurique [54] pour créer de telles solutions. L'inconvénient dans l'utilisation d'acides est qu'ils engendrent des étapes supplémentaires de dialyse ou de neutralisation pour se débarrasser de l'excès d'acide en solution qui risque de dénaturer l'enzyme utilisée comme biorécepteur. L'utilisation de PDDA pour disperser les tubes en solution c'est avérée être une méthode simple, rapide, efficace et offrant une bonne stabilité. De plus, la dispersion dans une solution de PDDA ne cause pas le bris de la structure des nanotubes de carbone comme c'est le cas avec l'utilisation d'acide. Cette conservation de la structure des nanotubes nous assure le maintient de leurs propriétés physiques.

3.3 La concentration de Nafion.

L'utilisation d'une membrane de Nafion pour diminuer les signaux causés par les molécules interférentes propres aux biocapteurs ampérométriques de glucose est une technique qui a déjà fait ses preuves [64]. La charge négative du Nafion permet de repousser efficacement l'acide urique et l'acide ascorbique en raison de leur charge

négative qu'ils possèdent. La membrane de Nafion peut également bloquer certaines molécules en créant un tamis à la surface de l'électrode de travail.

Les concentrations étudiées de la membrane de Nafion sont les suivantes : 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4%. En évaluant l'effet des différentes concentrations du film de Nafion sur la sensibilité, sélectivité et stabilité du biocapteur, la concentration de 0.5% a donné les meilleurs résultats (Tableau 3.3.1). Dans le but de simplifier la compréhension des résultats, seul une évaluation qualitative des données est présentée sous forme de tableau. La force du signal produite par l'injection des diverses analytes est proportionnel au nombre de «+» retrouvé vis-a-vis celle-ci dans le tableau. La concentration du paramètre à l'étude qui est définie comme la meilleure, est celle qui va permettre d'obtenir une forte réponse pour la détection du glucose (+++) et une faible réponse pour les molécules interférentes (+ ou 0).

Le nombre de film de Nafion à la surface de l'électrode de travail a également été étudié. Des électrodes possédant 1, 2 et 3 films de Nafion, tous de 0,5%, ont été testés selon les critères de sensibilité, sélectivité et stabilités habituels. L'électrode possédant un seul film de Nafion a offert le meilleur rendement. Pour l'évaluation des paramètres subséquents un seul film de Nafion de 0.5% est déposé sur la surface de l'électrode de travail.

Tableau 3.3.1 Effet des différentes concentrations de Nafion sur la détection du glucose et des molécules interférentes ainsi que sur la stabilité de la modification

sensibilité et sélectivité

% de Nafion / Analytes	0	0.25	0.5	1	2	4
100 µM de Glucose	+++	+++	+++	+++	++	++
50 µM de Glucose	+++	+++	+++	+++	+	+
10 µM de Glucose	++	++	+++	+	+	0
100 µM Acide Ascorbique	++	++	++	++	++	++
100 µM Acétaminophène	+	+	0	0	0	0
50 µM Acide Urique	+++	+++	++	++	++	+++

Stabilité (lavage de 45 min)

% de Nafion / Analytes	0	0.25	0.5	1	2	4
100 µM de Glucose	++	++	+++	++	++	+
50 µM de Glucose	++	+	+++	++	+	+
10 µM de Glucose	0	0	++	++	0	0
100 µM Acide Ascorbique	+	+	0	0	0	++
100 µM Acétaminophène	0	0	0	0	+	+
50 µM Acide Urique	+	+	++	++	++	+++

3.4 Le temps de sonification.

Pour favoriser la dispersion des NTCMPs dans la solution de PDDA une période de sonification s'est montrée très efficace. Des temps de sonification de 0, 5, 15, 30, 120 et 720 minutes ont été réalisés sur différentes solutions de NTCMPs (1 mg/ml) et de PDDA (2%). Celles-ci ont par la suite servies à la modification des différentes électrodes de travail. Selon des critères de sensibilité et sélectivité c'est l'électrode de travail modifié avec la solution de NTCMPs et de PDDA ayant subie une sonification de 120 minutes qui a offert les meilleures résultats (Tableau 3.4.1). Le temps de sonification n'a démontré aucun effet sur la stabilité de la modification de l'électrode. Lors de l'optimisation des paramètres qui ont suivies toutes les solutions de NTCMPs et de PDDA ont donc subit une période de sonification de 120 minutes.

Tableau 3.4.1 Effet des différents temps de sonification des NTCMPs sur la détection du glucose et des molécules interférentes

sensibilité et sélectivité min de sonification Analytes	0	5	15	30	120	720
100 µM de Glucose	0	++	+++	+++	+++	+++
50 µM de Glucose	0	++	+++	+++	+++	+++
10 µM de Glucose	0	0	+	++	+++	+++
100 µM Acide Ascorbique	0	0	0	0	0	0
100 µM Acétaminophène	++	++	+	0	0	0
50 µM Acide Urique	+++	++	+	++	++	++

3.5 La concentration d'APTES (3-aminopropyltriethoxysilane)

La molécule d'APTES est ajoutée à la solution contenant les NTCMPs et le PDDA pour permettre une fixation de l'enzyme à la surface des NTC, selon le modèle proposé par X. Yang [65,66]. Par les étapes habituelles de modification, six électrodes de travail ont été préparées avec des concentrations d'APTES de 0, 0.25, 0.5, 2, 10 et 20%. Parmi ces diverses électrodes, l'électrode modifiée avec de l'APTES 20% s'est démarquée par sa sensibilité et sa stabilité (Tableau 3.5.1). Il est à noter que les concentrations qui sont mentionnées précédemment sont les concentrations initiales, soit avant que l'APTES soit dilué d'un facteur de 10 dans une solution de PDDA et de MWCNT. La concentration finale d'APTES qui est donc retenue pour la mise au point d'électrodes de travail est de 2%.

Tableau 3.5.1 Effet des différentes concentrations d'APTES sur la détection du glucose et des molécules interférentes ainsi que sur la stabilité de la modification

sensibilité et sélectivité

% d'APTES / Analytes	0	0.25	0.5	2	10	20
100 µM de Glucose	++	++	++	+++	+++	+++
50 µM de Glucose	++	++	++	+++	+++	+++
10 µM de Glucose	0	0	0	+	+++	+++
100 µM Acide Ascorbique	0	0	0	0	0	0
100 µM Acétaminophène	0	0	0	0	0	0
50 µM Acide Urique	+++	+++	+++	++	+	+

Stabilité (lavage de 45 min)

% d'APTES / Analytes	0	0.25	0.5	2	10	20
100 µM de Glucose	++	++	++	+++	+++	+++
50 µM de Glucose	+	+	+	++	++	+++
10 µM de Glucose	0	0	0	+	++	++
100 µM Acide Ascorbique	0	0	0	0	0	0
100 µM Acétaminophène	0	0	0	0	0	0
50 µM Acide Urique	+++	+++	+++	++	+	++

3.6 La concentration de PDDA (Chlorure de polydiallyldimethylammonium)

Le rôle du PDDA, dans la solution servant à modifier l'électrode de travail, est de permettre la dispersion en solution de NTCMPs. Cette dispersion facilitée des NTCMPs à lieu grâce la présence d'une interaction entre les orbitaux π des NTCMPs et l'orbitale π du groupement vinyle d'un contaminant présent dans le PDDA [67]. L'étude de la sensibilité, sélectivité et stabilité de la concentration de PDDA a été effectuée pour les concentrations de 0, 0.5, 2, 10 et 50%. Les résultats du test ont mis en évidence de bons résultats pour les concentrations de 0.5 et 2%. Toutefois, les résultats fournis par l'électrode de travail modifiée avec la solution contenant 0.5% de PDDA ont été légèrement supérieurs. La concentration de PDDA qui est donc utilisée pour mettre au point les prochaines solutions destinées à modifier les électrodes est de 1%, soit une valeur se situant entre les concentrations 0.5 et 2%.

Tableau 3.6.1 Effet des différentes concentrations de PDDA sur la détection du glucose et des molécules interférentes ainsi que sur la stabilité de la modification

sensibilité et sélectivité

% PDDA / Analytes	0	0.5	2	10	50
100 µM de Glucose	++	+++	+++	++	++
50 µM de Glucose	+	+++	+++	++	++
10 µM de Glucose	0	+	0	0	0
100 µM Acide Ascorbique	0	0	0	0	0
100 µM Acétaminophène	0	0	0	+	+
50 µM Acide Urique	+	+	+	+	+

Stabilité (lavage de 45 min)

% PDDA / Analytes	0	0.5	2	10	50
100 µM de Glucose	++	+++	+++	+	+
50 µM de Glucose	+	+++	+++	0	0
10 µM de Glucose	0	+	0	0	0
100 µM Acide Ascorbique	0	0	0	0	0
100 µM Acétaminophène	0	0	0	0	0
50 µM Acide Urique	+	+	+	+	+

3.7 La concentration de NTCMP

Pour favoriser le transfert direct d'électron entre la sous-unitée FAD de l'enzyme et la surface de l'électrode de travail les NTCMP sont utilisées pour servir de pont aux électrons. Une concentration trop faible de NTCMP risque de ne pas être efficace pour assurer un bon transfert des électrons alors qu'une concentration trop élevée est susceptible d'augmenter le bruit de fond lors de la lecture du signal. Pour sélectionner la concentration idéale de NTCMP des électrodes de travail ont été modifiées avec des suspensions ayant des concentrations de 0, 0.1, 1, et 5 mg/ml de NTCMP. L'étude de la sensibilité, sélectivité et stabilité de ces électrodes a mis en évidence l'électrode modifiées avec 0.1 mg/ml de NTCMP comme celle qui offre les meilleurs résultats (Tableau 3.7.1). Cette concentration, de 0.1 mg/ml, est donc retenue pour la modification des prochaines électrodes.

Tableau 3.7.1 Effet des différentes concentrations de NTCMP sur la détection du glucose et des molécules interférentes.

sensibilité et sélectivité mg/ml de NTCMP / Analytes	0	0.1	1	5
100 µM de Glucose	++	+++	++	++
50 µM de Glucose	+	+++	++	+
10 µM de Glucose	0	++	0	0
100 µM Acide Ascorbique	0	0	0	0
100 µM Acétaminophène	+	+	0	0
50 µM Acide Urique	+	+	+	+

3.8 La concentration d'enzyme (GOx)

Finalement, le dernier paramètre qui a été optimisé pour la mise au point du biocapteur de glucose est la concentration d'enzyme utilisée pour procéder à la modification de l'électrode de travail. En principe si le transfert direct d'électron est efficace le nombre d'unité (U) d'enzyme par électrode ne devrait pas être élevé. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour permettre l'hydrolyse d'une micromole de substrat par minute. De plus, en limitant la quantité d'enzyme par électrode au contribue à réduire le coût de fabrication du biocapteur. Les concentrations d'enzyme qui ont été testées étaient de 0, 0.1, 0.3, 1 mg/ml. C'est l'électrode modifiée avec la solution contenant 0.1 mg/ml du GOx qui a le mieux performé en terme de sélectivité et sensibilité (Tableau 3.8.1). La stabilité de la modification n'est nullement influencée par la concentration d'enzyme. Les électrodes modifiées avec la solution contenant 0.1 mg/ml du GOx possédait environs 1.5 U à leur surface.

Tableau 3.8.1 Effet des différentes concentrations de GOx sur la détection du glucose et des molécules interférentes.

sensibilité et sélectivité mg/ml de Gox / Analytes	0	0.1	0.3	1
100 µM de Glucose	0	+++	++	++
50 µM de Glucose	0	++	++	++
10 µM de Glucose	0	++	++	++
100 µM Acide Ascorbique	+	0	0	0
100 µM Acétaminophène	0	0	0	+
50 µM Acide Urique	+	0	+	+

3.9 Conditions optimales du biocapteur de Glucose

Le tableau 3.9.1 résume les conditions optimales utilisées pour fabriquer le biocapteur de glucose. Les concentrations présentées dans le tableau tiennent compte des dilutions engendrées par les différentes manipulations. Ces différents paramètres sont ceux qui ont servie à confectionner le biocapteur qui a permit de recueillir les résultats du chapitre 4. Ce sont également ces résultats qui ont servis de point de départ pour fabriquer le biocapteur de putrescine.

Tableau 3.9.1 Conditions optimales du biocapteur de Glucose

La concentration de Nafion	0.5%
Le temps de sonification de NTCMP	120 min.
La concentration d'APTES	2%
La concentration de PDDA	1%
La concentration de NTCMP	0.1 mg/ml
La concentration de GOx	0.1 mg/ml

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS DE LA DÉTECTION DE GLUCOSE PAR LE BIOCAPTEUR

4.1 Détection du glucose et des interférents

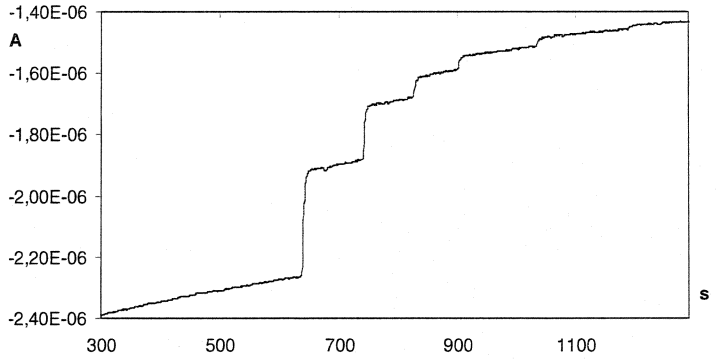


Figure 4.1.1 Détections successives des concentrations de glucose de 200, 100, 50, 25, 10 et 5 µM.

La figure 4.1.1 illustre la proportionnalité existant entre les diverses concentrations de glucose injectées dans le biocapteur et la réponse ampérométrique détecté par celui-ci. Cette proportionnalité est essentielle pour construire une courbe étalon permettant de determiner la concentration exacte de glucose au dosage d'un fluide biologique (urine ou sang) dont la concentration en glucose est inconnue.

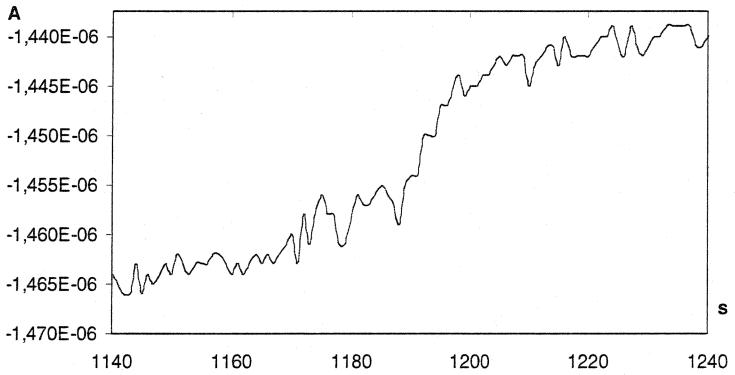


Figure 4.1.2: Zoom de la figure 4.1.1 sur la détection de 5µM de glucose.

La figure 4.1.2 présente la limite de détection du biocapteur qui est de 5 µM de glucose. Celle limite de détection est établie selon un ratio signal/bruit d'au moins 3. Pour faciliter la détection de faible quantité de glucose dans les fluides biologiques, et ainsi augmenter la sensibilité du dispositif, il est toujours possible de réduire le volume de la cellule électrochimique qui est utilisée lors de la détection d'analyte. C'est ce qui a été fait pour la détection de la putrescine dans l'article présenté au chapitre 5. La réduction du volume de la cellule électrochimique permet de minimiser la dilution de l'analyte lorsque celui-ci est injecté dans le tampon de la cellule électrochimique. Une concentration plus élevée d'analyte est donc disponible pour la détection.

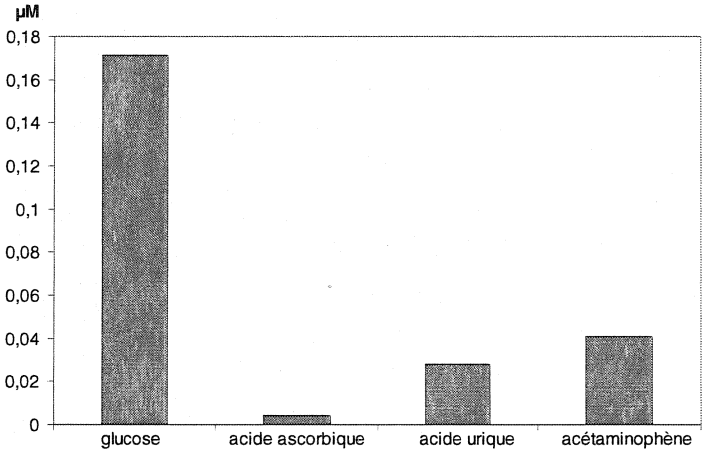


Figure 4.1.3: L'augmentation de courant détecté par le biocapteur de glucose lors de la présence en solution de 100 µM de glucose, acide ascorbique, acide urique, acétaminophène.

Une fois l'ensemble des différents paramètres optimisés, le biocapteur de glucose est toujours sensible à la présence de certaines molécules interférentes (figure 4.1.3). En effet, le film de Nafion, déposé à la surface de l'électrode de travail, ne bloque pas entièrement les molécules interférentes. Il permet toutefois, de diminuer leurs effets en plus de favoriser la stabilité de la modification réalisée sur l'électrode. Il est à noté, que les concentrations de molécules interférentes utilisées pour le test de sélectivité sont supérieures aux concentrations qu'il est possible de retrouver chez l'homme. En effet, des concentrations sanguines supérieures à 68.1 µM d'acide ascorbique, 132 µM d'acétaminophène ou 416.7 µM d'acide urique sont toxiques pour un individu.

Cependant, comme la méthode de dosage dans la cellule électrochimique implique une dilution d'un facteur 100, les valeurs de toxicité précédentes se retrouvent grandement sous la valeur de 100 μM utilisée pour faire le test de sélectivité. La sélectivité absolue d'un biocapteur envers un seul analyte est très difficile à obtenir. Généralement, la sélectivité absolue se fait au détriment de la sensibilité. Une connaissance grossière des concentrations de l'analyte et des molécules interférentes dans la solution dosée, permet de modifier les paramètres du biocapteur afin d'obtenir la sensibilité et sélectivité idéales. Lorsque la sensibilité maximum n'est pas requise, il est possible de soit diminuer la quantité d'enzyme se trouvant à la surface de l'électrode de travail ou d'augmenter la quantité de Nafion pour obtenir une meilleure sélectivité.

4.2 DET de la glucose oxydase

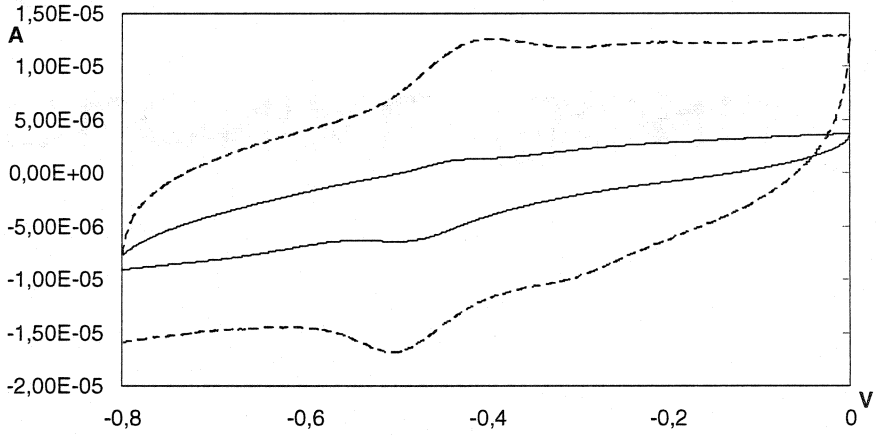


Figure 4.2.1 : Voltamétrie cyclique de l'électrode de travail modifiée avec les NTCNP, l'APTES, GOx, Nafion (courbe pointillé), de l'électrode de travail modifiée avec l'APTES, GOx, Nafion (courbe pleine).

La figure 4.2.1 met en évidence deux effets importants reliés à la présence des NTCMPs sur l'électrode de travail. L'un d'eux est l'augmentation de la surface de l'électrode qui peut être visualisée en comparant la courbe pointillée et la courbe pleine. Comme la surface à l'intérieur de la courbe de voltamétrie cyclique est proportionnelle à

celle de l'électrode de travail, la comparaison de ces deux courbes démontre bien que la présence des NTCMPs augmente la surface de l'électrode et par le fait même favorise le passage du courant. Le second avantage à utiliser les NTCMPs est qu'ils favorisent le transfert des électrons entre le groupement FAD du glucose oxydase et l'électrode de travail. Ce transfert des électrons, dans les voltamétries cycliques de la figure 4.2.1, correspond à l'oxydation et la réduction du groupement FAD qui sont illustrées par deux bosses dans la courbe. En comparant, encore une fois, la courbe pointillé et pleine, il en ressort que les bosses d'oxydoréduction de la voltamétrie cyclique réalisée avec l'électrode possédant les NTCMPs sont plus importantes. Il est donc possible d'affirmer que les NTCMPs favorisent le transfert direct d'électrons entre la sous unité FAD de l'enzyme et l'électrode de travail.

CHAPITRE 5 : A MEDIATORLESS BIOSENSOR FOR PUTRESCINE USING MULTIWALLED CARBON NANOTUBES

Ce chapitre présente un article soumis à (Analytical Biochemistry) s'intitulant : «A Mediatorless Biosensor for Putrescine using Multiwalled Carbon Nanotubes». Cet article fait état de la mise au point d'un biocapteur de troisième génération conçu pour la détection de putrescine. On y met en évidence deux innovations de tailles; i) l'utilisation de nanotubes de carbone pour effectuer le transfert direct des électrons entre le biorécepteur et le transducteur et ii) l'utilisation du PDDA pour permettre la dispersion efficace des NTCMPs en solution aqueuse. La réalisation de ce biocapteur de putrescine a été rendue possible grâce aux tests d'optimisation des paramètres réalisés pour la fabrication du biocapteur de glucose. Les paramètres optimisés du glucose ont servies de point départ à la confection du biocapteur de putrescine. Avant de reproduire le manuscrit soumis, nous présentons les auteurs ayant participé à son écriture ainsi que le Résumé (Abstract) qui l'accompagne.

5.1 Authors

J-F Rochette*, E. Sacher*, M. Meunier*, J. H. T. Luong**

* École Polytechnique de Montréal, Dept. of Engineering Physics , Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

** Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada (NRCC), Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2

Key Words: direct electron transfer, mouse blood cancer, multi-walled carbon nanotubes, putrescine biosensor.

5.2 Abstract

Poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA) is capable of dispersing multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) in solution. The PDDA-induced solubilization of MWCNTs permits the modification of electrode surfaces for use in the fabrication of a mediatorless putrescine biosensor. Nanoscale "dendrites" of MWCNTS, modified by PDDA, were reasoned to form a network projecting outward from the electrode surface and acting like bundled ultra-microelectrodes. This would permit access to the active site and facilitate direct electron transfer to the immobilized enzyme. Our biosensor was able to efficiently monitor the direct electroactivity of putrescine oxidase at the electrode surface. Direct electron transfer permits the detection of putrescine at negative potentials, circumventing the interference of endogenous ascorbic and uric acids, which often complicate the analysis of important compounds in blood. Compared to the most common interfering species, such as spermine, spermidine, cadaverine and histamine, a detection limit of 5 μM and a response 20 times greater were found for putrescine. Tests made on mouse cancer serum demonstrated that the detection of putrescine could be carried out very quickly on mammalian plasma.

5.3 Introduction

Since the discovery of carbon nanotubes (CNTs), significant efforts have been made to develop applications and establish the novel properties of this new class of materials [38]. The electrical conductivity and flexibility of the CNTs have suggested the very interesting possibility of using such materials to promote electron transfer reactions with enzymes [8]. In general, enzymes are large molecules with redox centers deeply embedded within their structures. Therefore, it is very difficult for the enzymes to exchange electrons directly with the smooth surface of the electrode [7]. CNTs can form a network and project outward from the electrode, and act like bundled ultra-microelectrodes that permit access to the active sites of the enzymes and facilitate direct electron transfer [24]. CNTs exist as single-walled (SWCNTs) and multi-walled (MWCNTs) [39]. SWCNTs usually exist as ropes or bundles, forming a dense, complex structure; therefore, they are resistant to wetting, compared to MWCNTs. SWCNTs can be metallic or semiconducting whereas MWCNTs are essentially metallic [68]. If contacted on the outside, the electric current is conducted uniquely through the outermost shell of MWCNTs [44].

The advantages of CNTs have not been fully realized because of the difficulty of obtaining fully dispersed nanotubes. Although CNTs have been solubilized by functionalizing their sidewalls, this approach often causes detrimental damage to their tubular structure. With the aid of surfactants, CNTs have been dispersed in water [54]. However, surfactants might denature the enzyme or, at least, impair its activity; such drawbacks make CNTs less desirable for biosensing applications. To date, the best liquids reported for generating CNT dispersions are amides such as N,N-dimethylformamide and N-methylpyrrolidone [69]. Unfortunately, the dispersions aggregate on a time-scale of days and such liquids are not compatible with biomolecules. A few polymers [70, 71] are known to effectively disperse CNTs and they have a strong tendency to randomly wrap around CNT bundles unless they have a

specific binding interaction [72]. Recently, CNTs have been suspended and dispersed in Nafion, a perfluorosulfonated polymer to facilitate the modification of electrode surfaces toward the development of an amperometric biosensor for glucose [73]. MWCNTs may be dispersed in 3-aminopropyltriethoxysilane to promote efficient electron transfer for glucose oxidase on CNTs [7].

In this paper, we describe a simple approach to disperse MWCNTs, using poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA, 5.5.5.1) without affecting their electrical properties. Together with putrescine oxidase, the fabrication of a PPDA-modified CNT biosensor for putrescine is presented, and its performance, with respect to efficient and direct electron transfer for putrescine oxidase on CNTs, is evaluated and discussed. Biogenic amines such as putrescine, cadaverine, and histamine have been used for various analytical and clinical purposes: plant stress markers, bacterial vaginosis [74,32] and food spoilage [75,76]. This important biogenic amine is frequently used as a freshness marker [30]. Putrescine can also be used as a cancer marker, since an abnormal increase of its concentration in the biological fluids of a patient indicates abnormal cell proliferation [77].

5.4 Experimental

5.4.1 Materials

Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs, 95% purity, diameter 10-20 nm, length 1-5 μm) were obtained from Nano-Lab (Brighton, MA). Nafion perflorinated ion-exchange resin (0.5% in water and ethanol), 3-aminopropyltriethoxy-silane (APTES, diluted to 20% in water) and poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA: MW 200,000-350,000, diluted to 0.1% in water), cadaverine, histamine, spermine, spermidine and dansyl chloride (98%) were obtained from Aldrich-Sigma (St. Louis, MO). Putrescine oxidase (PuO) from *Micrococcus roseus* (PuO, 37 U/mg) was obtained from Toyobo,

Osaka, Japan. Milli Q (Millipore) A-10 gradient (18MΩ cm) deionized water was use for the preparation. Cyclic voltammetry (CV) and amperometric measurements were carried out in a CH Instruments Electrochemical Analyzer Multi-Potentiostat. Pt wire (Aldrich, 99.9% purity, 1 mm diam.) was used as a counter electrode. The (Ag/AgCl, 3M NaCl) reference electrode and 3 mm glassy carbon electrode (GCE) working electrode were obtained from BAS, West Lafayette, IN. The cation exchange resin, Bio-Rex 70 (100-200) mesh, sodium form), was purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

5.4.2 Working Electrode Preparation

The GCEs were polished with wet fine Emery paper, followed by polishing for 5 min on soft paper with a 0.05 μm alumina slurry. The electrodes were sonicated for 5 min to remove the alumina particles. The electrodes were then rinsed with distilled water and dried under nitrogen. A mixture of MWCNTs, PDDA, APTES and PuO (1.5 μl) was deposited on the polished surface of the electrode. This mixture was prepared in a 1.5 ml vial by adding 27 μl of MWCNTs (1 mg/ml) suspended in a 0.1% solution of PDDA and sonicated for 15 min. APTES (3 μl, 20%) and PuO (0.1 mg) were then admixed for a few seconds to facilitate the interaction of the different compounds. APTES has been reported to permit the adsorption of the glucose oxidase on CNTs [65,66]. The modified electrode was dried in air overnight before applying on its surface 1.5 μl of 0.5% Nafion solution, then dried for 2-3 h. The surface of each modified working electrode contained about 3 enzymes units. When not used, the modified electrodes were stored at 4°C to prevent denaturation of the enzyme.

5.4.3 Bio-Rex 70 Column Preparation

A Bio-Rex cation exchange resin was used to extract the biogenic amines from the mouse serum. The resin (0.2513 g) was hydrated with 1.25 ml Tris-HCl buffer (pH 9) for at least 30 min. The resin (0.2 ml) was then transferred into a 1 ml syringe to form the column. The 0.2 ml column was then regenerated with 0.6 ml of 0.5 N NaOH. The

flow rate was kept below 1 ml/min.cm^2. The column was then washed with Tris-HCl, pH 9, until the liquid eluted from the column attained a stable pH.

5.4.4 Mouse Serum Putrescine Purification

To facilitate the reaction between putrescine (PuT) and putrescine oxidase (PuO), 500 µl of the serum were treated with HCl. Serum aliquots (0.5 ml) were placed in a 1.5 ml vial with 0.5 ml concentred HCl acid and heated at 100 °C in a water bath for 5 h. To minimize evaporation, tiny holes were made through the vial cap with a syringe needle. From the 800 µl of acid-treated (pH=2) serum remaining after the 5 h heating treatment, 300 µl were kept to run a bio-detection with the amperometric biosensor. The remaining sample (500 µl) was loaded onto the column and allowed to flow throught the Bio-Rex 70 by gravity. The resin was then washed with 350 µl of sodium carbonate (2 g/l, pH 9.3) to remove the non-polyamine cation bound to the resin. The collected resin was centrifuged at 800-g for 1 min to remove the supernatant.

5.4.5 Derivatization

Dansylation of the polyamines was performed as described by Gilbert and Gonzalez [78], with minor modification. The polyamine-containing resin was first suspended in 250 µl of deionized water by a few seconds of vortexing. To the suspension, 100 µl of sodium carbonate (285 g/L, pH 10.3) were added and the solution was mixed before adding 300 µl of dansyl chloride (25 g/l in acetone) to react with the amine groups [79]. The dansyl chloride permits UV detection of the polyamines at 220 nm. The vials were then capped and heated at 70 °C in a water bath for 20 min. During reaction, the vials were vortexed two or three times, keeping the temperature near 70 °C. After 20 min, a vial was cooled down before the addition of 850 µl of absolute methanol, followed by 20-30 s of vortexing. The methanol caused the precipitation of the majority of the carbonate. To complete the precipitation reaction, the vials were maintained at –20 °C for at least 1 h. The samples were then centrifuged at high speed to collect the resin and

the carbonate at the bottoms of the vials. The supernatant was transferred to another vial, and a 50 µl sample was taken for HPLC analysis.

5.4.6 Amperometric Biodetection

All detection tests were run in a three-electrode system, consisting of a working, a counter, and a reference electrode. Reactions took place in 10 ml of 0.05 mM phosphate buffer, except for the detection of putrescine mouse serum, which was run in 1 ml of phosphate buffer, to minimize the dilution effect.

5.4.7 HPLC Detection

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation of the dansylated polyamines was run on a 50 µl sample of the treated serum. The sample was injected onto a 25 x 0.46 cm CSC Inertsil (150Å/ODS2) column and chromatographed at room temperature, using (A) water, (B) acetonitrile, and (C) methanol gradients. The elution program is show in Table 5.4.7.1, at a flow-rate of 1.2 ml/min.

Table 5.4.7.1: HPLC elution program for Putrescine

Time min.	Flow ml/min.	A	B	C
		% of total		
0	1.2	50	30	20
4	1.2	50	30	20
6	1.2	44	34	22
26	1.2	0	60	40
30	1.2	0	100	0
32	1.2	50	30	20
45	1.2	50	30	20

5.4.8 FTIR spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was carried out using a Bio-Rad Excalibur series FTIR spectrometer. FTIR samples were prepared by dropping one or two drop of the different solutions onto a piece of undoped silicon. The samples were

dried in rough vacuum (~ few ten torr). The analysis was performing, at a modulation frequency of a 5 kHz and a spectra resolution of 8 cm^{-1} between 400 to 4000 cm^{-1}.

5.5 Results and Discussion

5.5.1 MWCNT Dispersion in PDDA

Even at very high dilution, PDDA permits high concentrations and good dispersions of MWCNTs. About 0.1-1% PDDA are sufficient to properly disperse 1 g/l of MWCNTs. Such dispersions were stable for five to six days without any precipitation. The interaction between the PDDA and the MWCNTs, which permits the MWCNTs dispersion, is due to the π-orbital overlap of these two molecules: this π-π stacking interaction takes place between the π-orbitals of the MWCNTs and those of the vinyl groups present as contaminants in the PDDA (5.5.1.1 B). This interaction is responsible for the peak diminution at 1600 cm^{-1} in the FTIR spectrum of PDDA/MWCNT (5.5.1.2). This is how the use of PDDA facilitates the preparation of stable dispersions of MWCNTs.

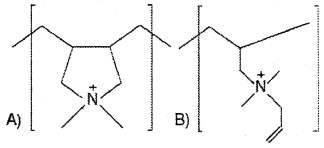


Figure 5.5.1.1: A) normal PDDA polymerization, B) PDDA contaminant

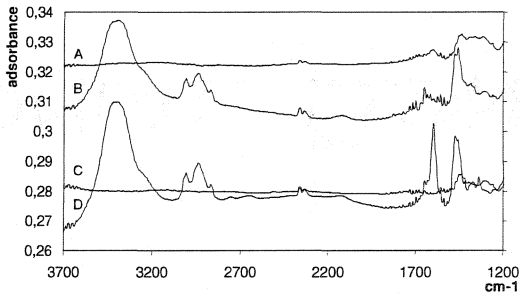


Figure 5.5.1.2: FTIR spectra of A) MWCNT water suspension, B) MWCNT+PDDA, C) Blank silicon, D) PDDA

5.5.2 Direct Electron Transfer (DET)

The use of CNTs creates an electron bridge between the glassy carbon electrode surface and the FAD (flavin adenine dinucleotide) group that is deeply embedded in the center of the PuO enzyme.

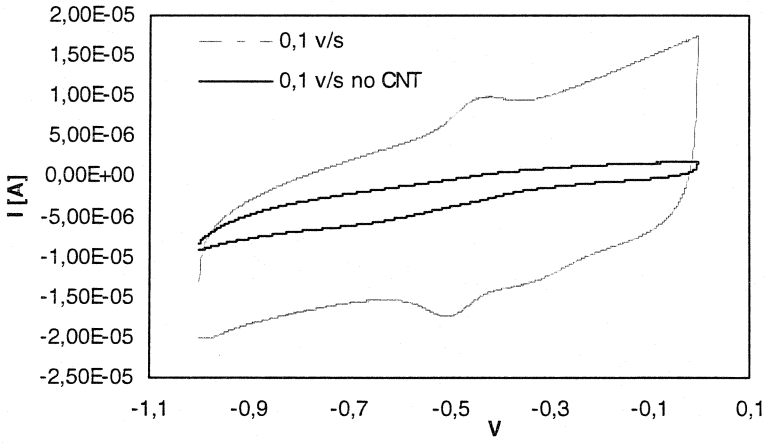


Figure 5.5.2.1: Direct electron transfer of PuO at -0.45 V (vs Ag/AgCl) with a 0.05 V/s scan rate in a 0.1mM phosphate buffer. The dotted line is the modified electrode and the solid line is the unmodified electrode.

Due to their large surface/volume ratio, only a small amount of carbon nanotubes is sufficient for a considerable increase of electrode surface area. As shown in Figure 5.5.2.1, the presence of MWCNTs on the electrode facilitates the direct electron transfer (DET) of the FAD subunit, which is know to have a redox peak around -0.448 mV. The direct electron transfer between the enzyme and the CNT is confirmed in Figure 5.5.3.1, showing a linear relationship between the current and the scan rate. Each peak present on the cyclic voltammetry curve corresponds to the oxidation or reduction of a FAD subunit. By recycling the reduced to the oxidized form ($FADH_2 \leftrightarrow FAD + 2\ H^+ + 2e^-$), the enzyme provides an increase of electrons circulating thought the modified working electrode, responsible for the increased current. Good contact between the enzyme and electrode assures an increased biosensor sensitivity [80].

5.5.3 Putrescine Detection

Putrescine detection is generally based on the detection of hydrogen peroxide ($FADH_2 + O_2 \leftrightarrow FAD + H_2O_2$). The direct electrochemical communication of the heme proteins and flavo enzymes is extremely difficult since the FAD moiety is deeply embedded within a protective protein shell [75]. This phenomenon is not generally observed with a smooth electrode. However, MWCNTs have shown good electrochemical communication with proteins having a redox center close to their surfaces [81,82,83] as well as embedded within the glycoprotein such as glucose oxidase [24,83,84]. With direct electron transfer, the $FADH_2$ is reoxidized to FAD more rapidly than when the $FADH_2$ reacts with oxygen to form hydrogen peroxide [7]. The DET provides faster re-oxidation of the enzyme, which can then react more quickly with subsequent putrescine molecules, resulting in better sensitivity and selectivity. A voltage of -0.45 V was used to reduce any possible interference caused by the presence of small quantities of H_2O_2 in the electrochemical cell. It should be noted that hydrogen peroxide below 2 mM is not detected at this applied potential. This last point was confirmed by running putrescine detection with bubbling nitrogen, which prevents the production of H_2O_2 by removing the O_2 present in the solution ($H_2N\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$). No noticeable difference in the amount of putrescine detected was observed between the two cases. Therefore, direct electron transfer between PuO and the electrode surface enabled the detection of putrescine at –0.45 V, and this is an important finding since the conventional scheme for detection of this biogenic amine must be done at +700-800 mV, which also detects electroactive interferences such as ascorbic, uric acid, acetaminophen, etc. A lower potential (+50 mV) can only be employed by coupling PuO with horseradish peroxidase and in the presence of artificial mediators, such as ferrocene and its derivatives [85].

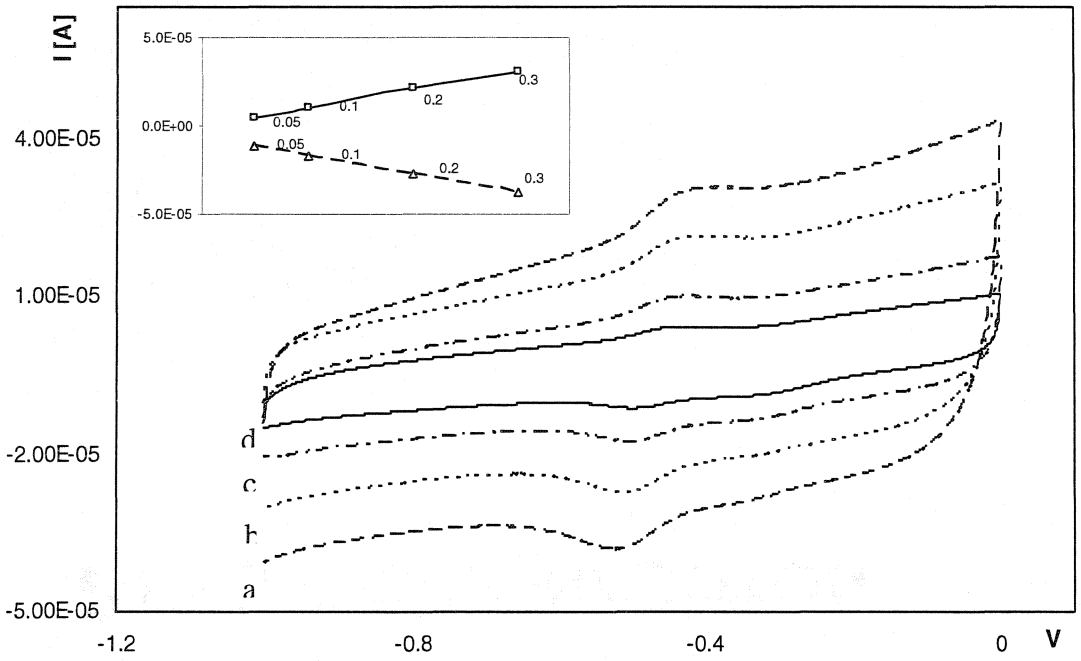


Figure 5.5.3.1: Direct electron transfer of Put at -0.45 (vs Ag/AgCl) confirmed by multiple scan rate cyclic voltammograms (a; 50 mV s^{-1},b; 100 mV s^{-1}, c; 200 mV s^{-1}, d; 300 mV s^{-1}) for enzyme immobilized on PDDA/APTES/Nafion/MWCNT-modified GC electrodes in 0.05 M phosphate buffer. The apperance of the redox peaks and their relationship with the scan rate (inset) confirm the direct electron transfer.

Based on Figures 5.5.3.2 and 5.5.3.3, a linear relationship between the current increase and the putrescine concentration (up to 200 μM) was established, with a slope of 2 nA/μM with R^2= 0.996. This value is about four times greater than the 0.57 nA/μM found by Nagy et al.[25] A greater current increase for the same amount of analyte facilitates data collection. The linear range of the biosensor, 5-200 μM, is then ideal for the detection of putrescine in human blood, 2 -50 μM for a cancer patient and 0.7 -2 μM for a healthy subject.

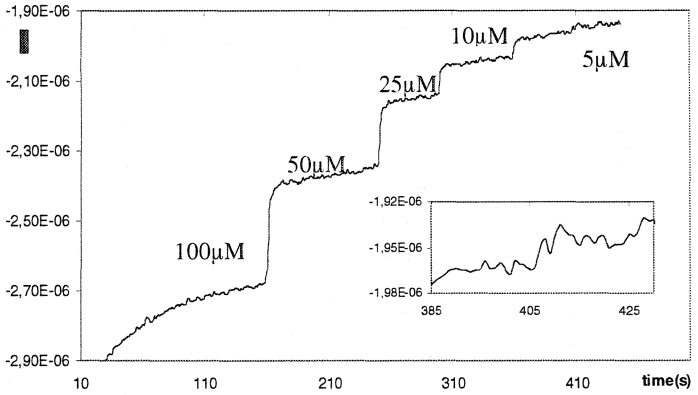


Figure 5.5.3.2: Amperometric bio-detection of 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM and 5 µM of Put on PDDA-APTES-Nafion-MWCNT-PuO modified GC electrode in 0.05 M phosphate buffer pH: 7. The inset is an enlargement of the detection of 5 µM, which appears to be the lower detection limit with a S:N of 3:1.

The biosensor performance was also evaluated by comparing the response obtained by 1 mM putrescine to 1 mM of some common electroactive interferents. Except for histamine, spermidine, spermine, histamine and cadaverine are biogenic amines produced by the same metabolic responsible for putrescine synthesis. All are involved in tissue regeneration and cell proliferation, making them good cancer markers [86]. Previous results demonstrated that putrescine has a more constant progression in some type of cancer, making the use of putrescine a better choice for tumor evolution [87].

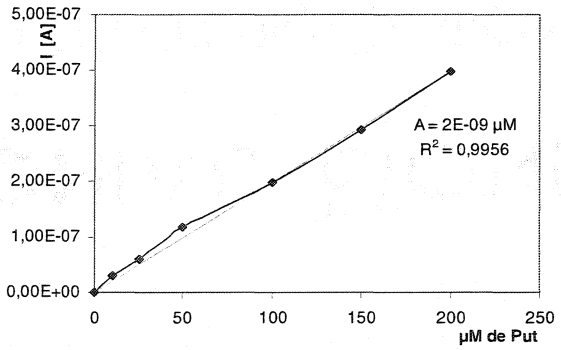


Figure 5.5.3.3 : Standard curve of putrescine biosensor detection showing a proportional increase of 2 nA per µM of PuT detected. All data were obtained with PDDA-APTES-Nafion-MWCNT-modified GC electrode in 0.05 M phosphate buffer, at a pH of 7.

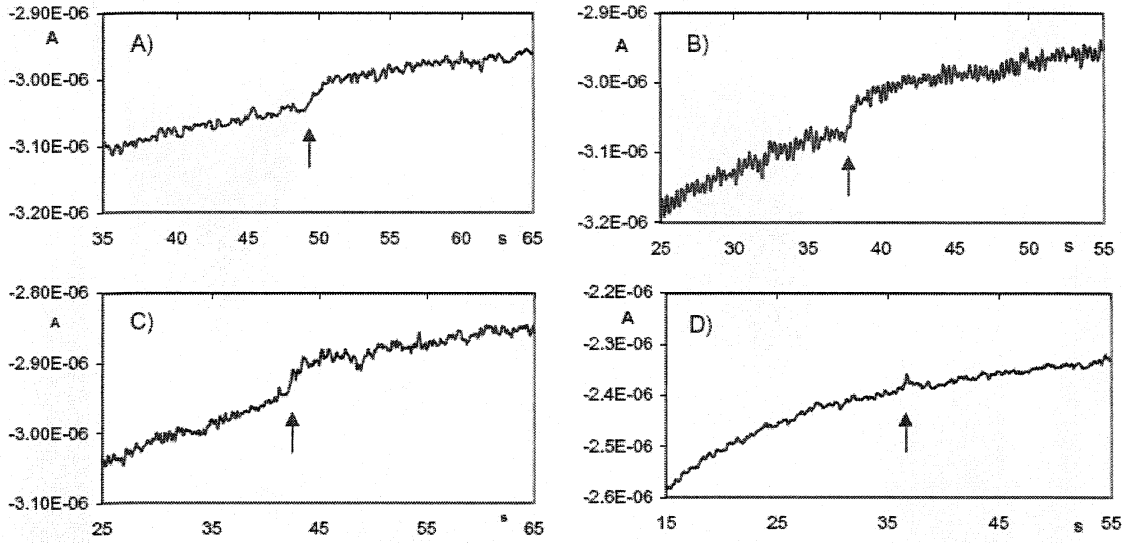


Figure 5.5.3.4: Detection of putrescine in three serum samples (A,B,C) from mice predisposed to develop tumors and on a healthy mouse (D).

Lyophilized human plasma dissolved in deionized water was used to prepare the all the solution, so as to reproduce conditions similar to actual plasma biodetection. The responses given by the interfering species were, in every case, less than 6.8% of the response of the same amount of putrescine (Figure 5.5.3.5).

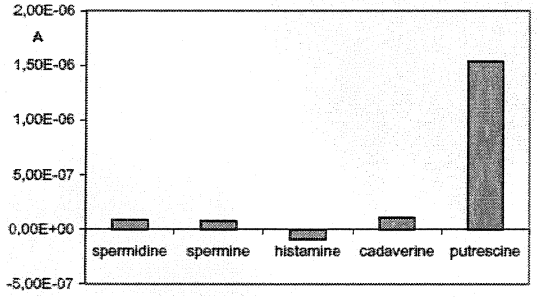


Figure 5.5.3.5: Amount of current increase caused by the injection of 1 mM of the most common interfering species and PuT into lyophilized human plasma, in our biosensor with the PDDA-APTES-Nafion-MWCNT-modified GC electrode.

The current increase caused by the putrescine was identical to that of the putrescine standard prepared in 0.05 mM phosphate buffer, suggesting that no plasma compounds interfered with putrescine quantification.

5.5.4 Mouse Plasma Putrescine Detection

Mouse plasma putrescine detection was run to evaluate how the biosensor performs in real biological fluids. Two types of genetically modified mice were used. The first was a MMTV (mouse mammary tumor virus) type that had no sign of a tumor. One ml of plasma was withdrawn from this mouse to perform the test. The second was an NDL1-2 type with an ErbB-2 mutated gene. These mice are predisposed to rapidly develop mammary tumors. A serum aliquot of 0.8 ml was extracted from three different mice to evaluate the presence of plasma putrescine. The serum putrescine detection was attempted at three different steps during the experiment. The first was on the pure serum without prior treatment. The second was made on neutralized serum immediately after acid hydrolysis; acid hydrolysis was used to liberate the putrescine from the blood complex that might interfere with the detection. The third was carried out after the dansyl chloride derivatization, using the same solution as for HPLC detection. From these three biodetection attempts, only the first, on pure serum, gave a response to the biosensor (Figure 5.5.3.4). For the second attempt on acid treated serum, the dilution caused by the acid hydrolysis probably brought the putrescine to a level too low to be detected by the biosensor. The absence of putrescine biodetection on derivatization might be explained by a complex formed between putrescine and dansyl chloride: once this complex is formed, the putrescine oxidase present on the electrode is no longer capable of reacting with the analyte.

Figure 5.5.3.4 shows the current jump given by the putrescine detection of three serums from tumerous mice (A, B, C) and from one healthy mouse (D). Referring to the calibration plot (Figure 5.5.3.3) and taking into consideration that 300 µl serum were

added to 1 ml of phosphate buffer (0.1 mM pH:7), instead of 10 to 100 µl putrescine solution (0.1M) to 10 ml of phosphate buffer (0.05 mM, pH 7), the calculation provides the following concentrations: A = 65 µM, B = 55 µM, C = 50 µM.

HPLC was performed on the dansyl chloride-derivatized serums to confirm the results obtained by the biosensor. Dansyl chloride is known to react with amine groups and is generally used to label polyamides to permit UV detection at 220 nm [88]. As shown in "Supporting Information", there is a strong signal detected after 23.7 min. This response could be due to the presence of putrescine in the solution. This solution was treated exactly as was the mice serum. Considering serum samples A, B and C, we also identify a strong signal around 23.5 min, which is, most likely, due to the presence of putrescine in mouse serum. Serum sample D, from the healthy mouse, is the only serum that does not show any signal around 23.5 min. The other peaks present in the results are due to other polyamines marked by the dansyl chloride during the derivitization process. The peak present at around 3 min on every HPLC result, except for pure water, is due to the detection of excess dansyl chloride present in solution. The peak at around 35 min, found on most of the HPLC results, is an artifact caused by the change of solvent; the presence of this peak in pure water confirms this hypothesis. To assure that the HPLC procedure was adequate for serum polyamines, a control was carried out on putrescine-cadaverine solution. These two compounds have two amino groups (H_2N-$(CH_2)_4$-NH_2 and H_2N-$(CH_2)_5$-NH_2), which made them a good challenge for HPLC separation.

As shown in the HPLC results of Supporting Information, the separation of putrescine and cadaverine is very efficient, with two distinct peaks at 24.98 (putrescine) and 25.8 (cadaverine) min. The reason why the putrescine peak appears around 23.5 min for mouse serum in the putrescine control and at 24.98 min during the putrescine-cadaverine control is explained by the fact that those two tests were not run on the same day. By comparing the putrescine biodetection results with the concentrations obtain by HPLC, those obtained by the biosensor are clearly higher (Table 5.5.4.1). This is partly

explained by the injection of a large amount of serum (300 µL) into only 1 ml of phosphate buffer. As shown in Figure D (dilution of healthy serum into phosphate buffer), the injection of 300 µl of liquid into 1 ml of phosphate buffer (at 36 s) creates a current disturbance. A second factor that may explain this high concentration of putrescine comes from the purification process of the serum on the Bio-Rex column. During the transfer of the resin containing the putrescine into a 1.5 ml vial under a nitrogen flow, some resin may have remained on the glass fiber plug that held the resin in place during the washing steps. Some resin may also have remained on the side of the syringe wall during the transfer process. The loss of some resin during those manipulations reduced the final concentration detected by HPLC analysis.

5.6 Conclusion

Our study demonstrates that PDDA can provide a very simple and efficient method to disperse MWCNTs that can than be used to fabricate very sensitive and selective amperometric biosensors based on direct electron transfer. Efficient and direct electrochemical reactions of redox enzymes and proteins at solid state electrodes also enable a new class of reagentless biosensors for various biosensing applications, and offer an excellent platform for a fundamental understanding of biological redox reactions. The detection limits of the putrescine biosensor and its selectivity with regard to potential interfering species, such as spermine, spermidine, cadaverine and histamine, have shown good results in artificial human plasma. Tests made on mouse blood indicate that putrescine detection is also possible in mammalian blood, using a very simple procedure compared to the standard HPLC method. Indeed, putrescine biodetection does not require any purification of the blood sample or derivatization of the analyte.

Table 5.5.4.1 : Putrescine concentration comparison of HPLC analysis and biosensor biodetection. A, B, C, are samples from mice predisposed to develop tumors and D is serum from a healthy mouse.

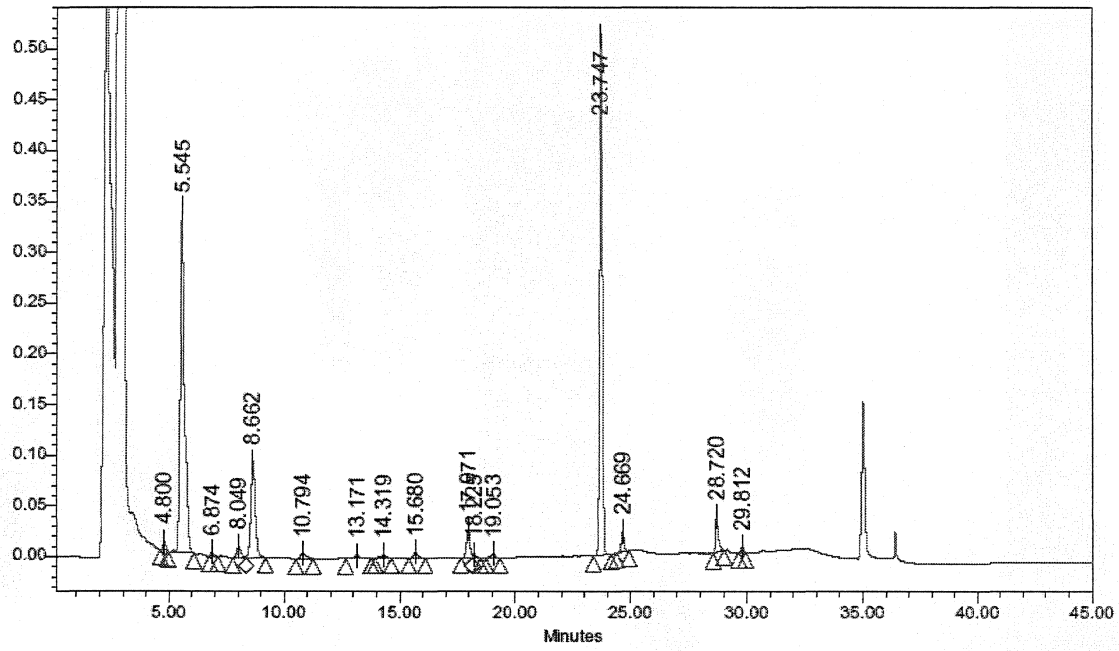
Sample	HPLC retention time (min)	Area of the putrescine peak	HPLC original concentration (μM)	HPLC concentration (μM) takeing into account the 1,6 dilution	Increase of current (μA) caused by the serum	Putrescine concentration according to the biosensor (μM)
Put 0.1 mM	23.747	4274583	100	na	na	na
A	23.467	737701	17.26	27.61	0.037	65
B	23.473	662572	15.50	24.80	0.031	55
C	23.497	544856	12.74	20.39	0.028	50
D	na	0	0	0	0	0

5.7 Acknowledgments

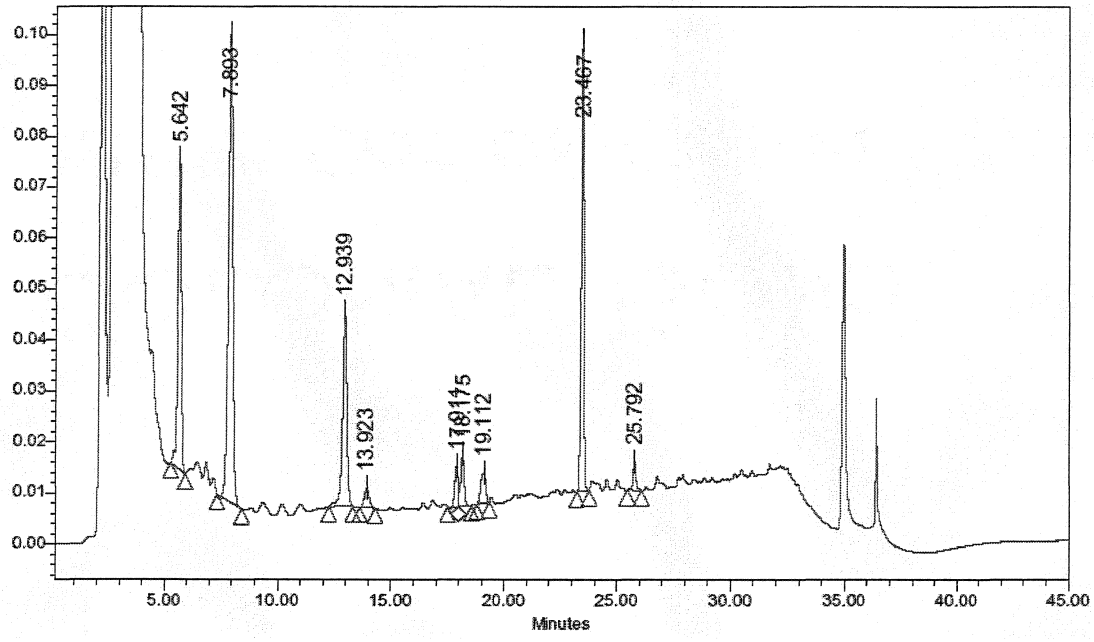
The authors thank Michael Trani of the Biotechnology Research Institute and Rebecca Pearce of the Molecular Oncology Group, Royal Victoria Hospital, for their assistance with experimental facilities. We also acknowledge the financial contribution of the Natural Science and Engineering Research Council of Canada.

Supporting Information: HPLC results

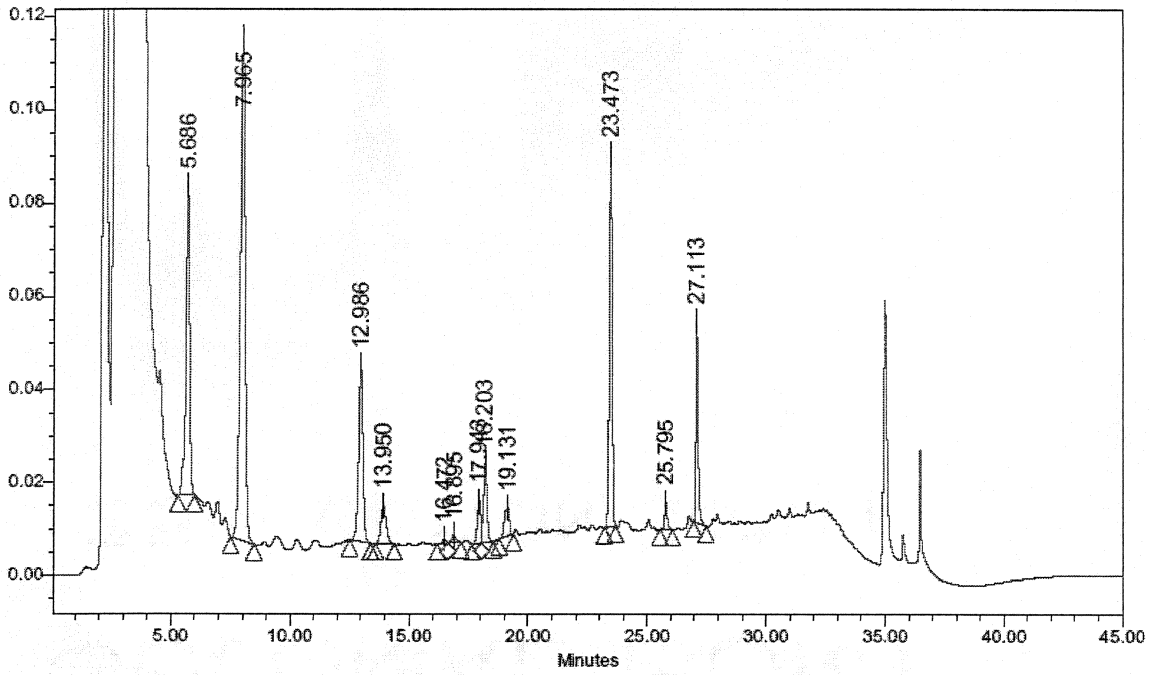
Putrescine control:



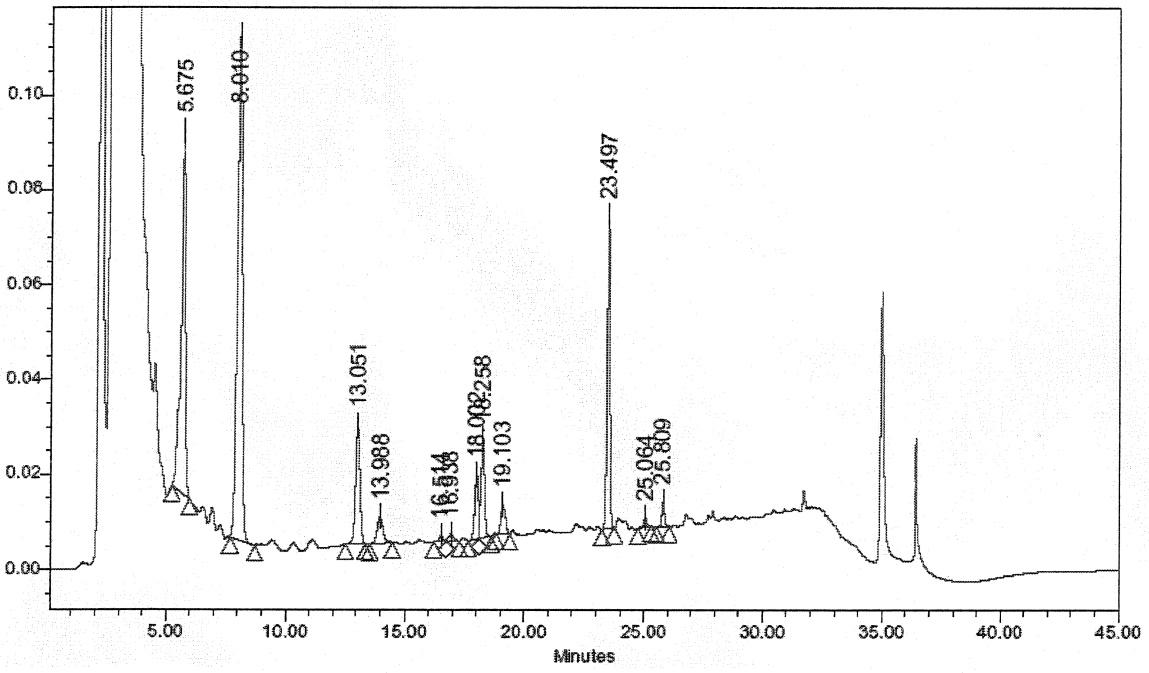
Sample A:



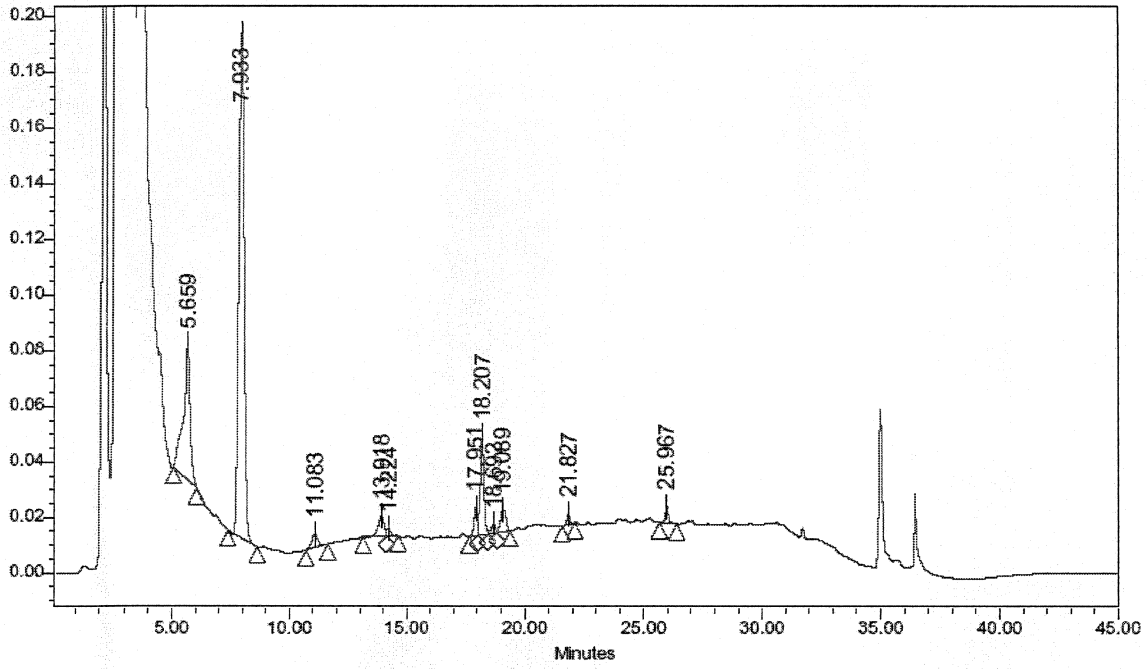
Sample B:



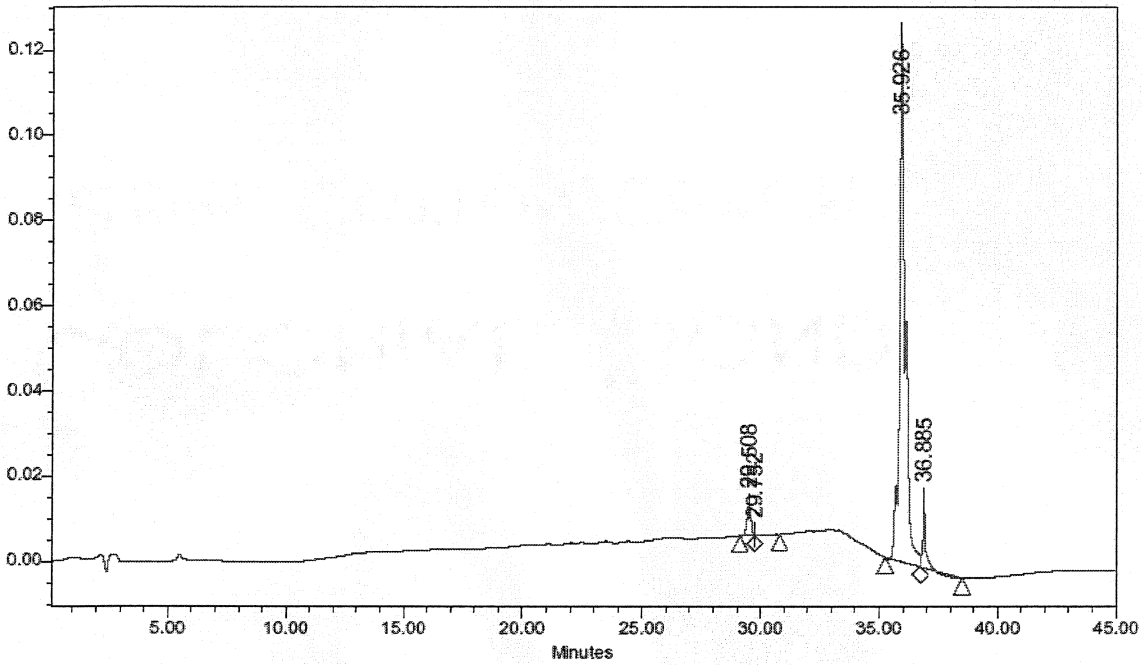
Sample C:



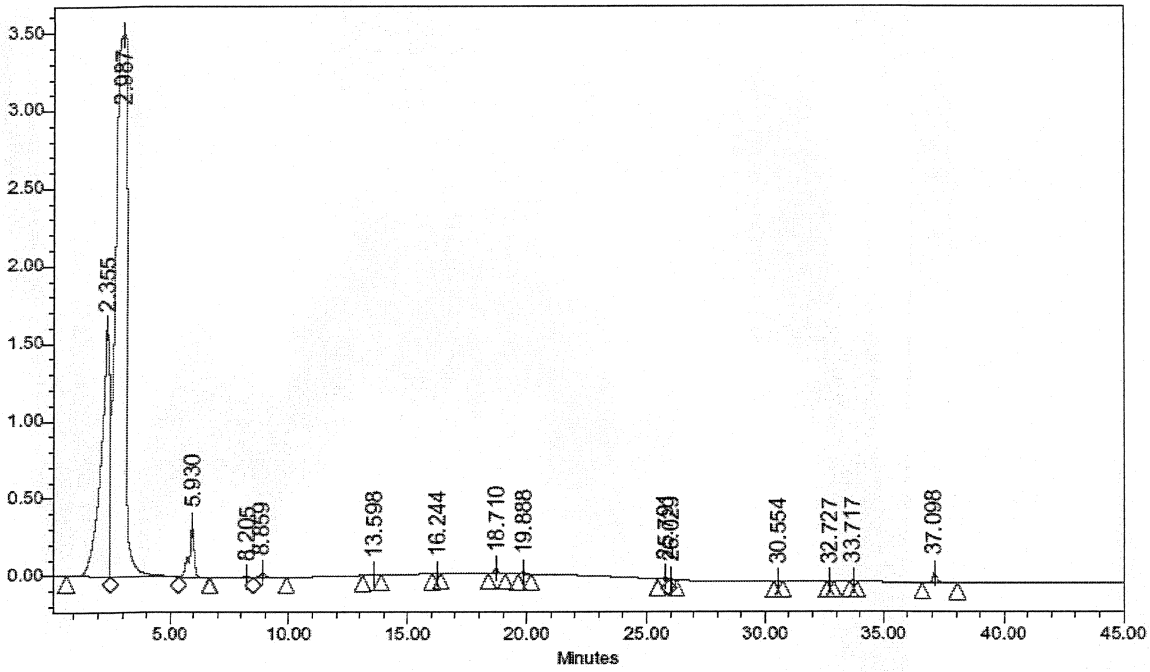
Sample D:



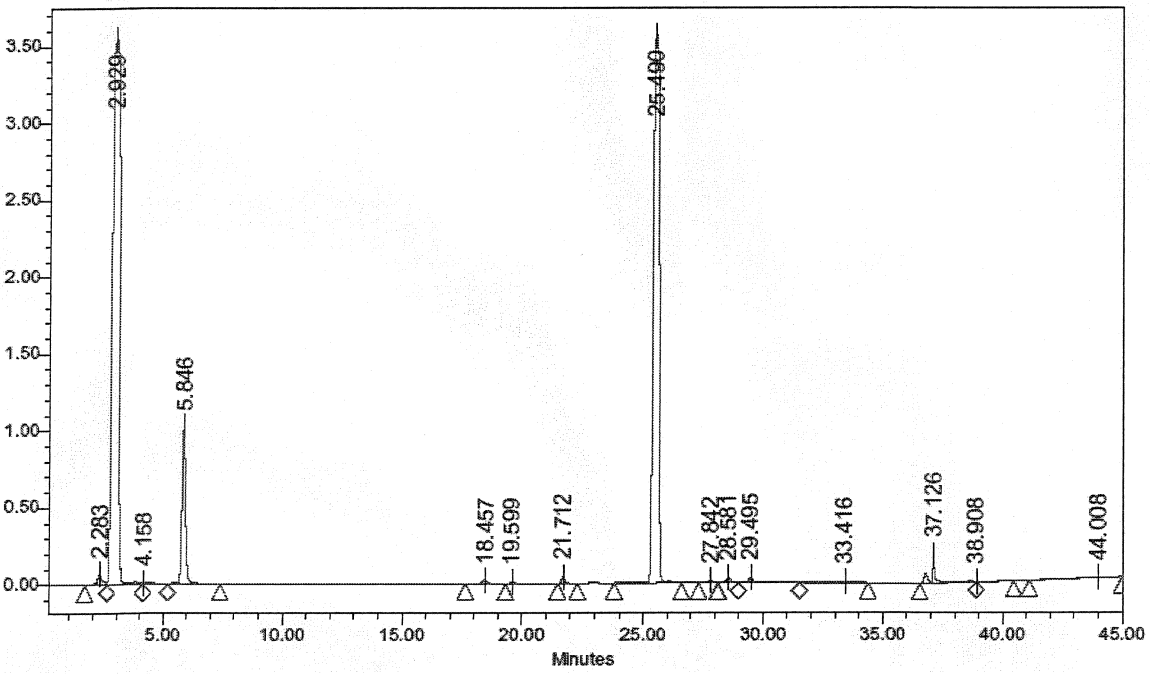
HPLC water-1



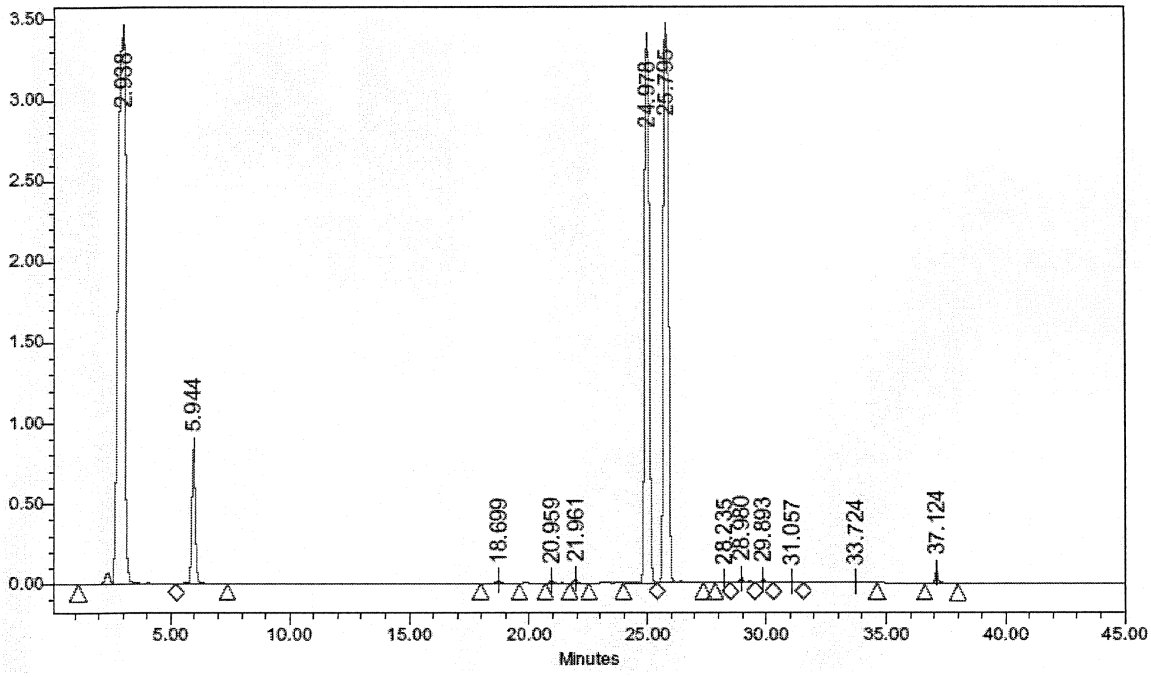
H_20 + dansyl



cadaverine



Putrescine et cadaverine



CHAPITRE 6 : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET RECOMMENDATIONS

6.1 Discussion général

L'objectif de ce projet consistait à mettre au point un biocapteur ampérométrique de troisième génération capable de détecter de faible quantité d'analyte. Les analytes ciblés au cours de ce projet, le glucose et la putrescine, ont dans les deux cas pu être détectés jusqu'à des concentration minimum de 5 µM. D'autre part, les travaux réalisés concernant l'optimisation des différents paramètres de la confection du biocapteur de glucose ont permis d'obtenir un dispositif sélectif et stable. Les mêmes paramètres ont par la suite été appliqués au développement un biocapteur de putrescine et des résultats similaires ou bien meilleurs ont été obtenus. Dans les deux cas, les biocapteurs ont présenté un seuil de détection satisfaisant de leur analyte respectif, avec un ratio signal/bruit supérieur à 3. Les problèmes causés par les molécules interférentes propres à chaque biocapteur ont pu, quand à eux, être grandement limités par l'utilisation de différents polymères. Concernant ce dernier critère de sélectivité, le biocapteur de putrescine a été supérieur au biocapteur de glucose. Les différents polymères utilisés ont également permis d'accroître la stabilité du biocapteur jusqu'à 3 semaines.

Les biocapteurs ampérométriques de troisième génération ont déjà démontré qu'ils offriraient une sensibilité et sélectivité accrue par rapport aux générations précédentes de biocapteur. Pour être efficace, cette nouvelle génération de biocapteurs ampérométriques nécessite un bon contact entre les sites actifs (FAD) des enzymes utilisées comme biorécepteur et la surface de l'électrode de travail comprise dans le système électrochimique servant de système de transduction. Dans ce projet, ce sont les nanotubes de carbone multiparois de la compagnie NanoLab qui ont été utilisés pour faciliter le transfert des électrons entre le biorécepteur et le transducteur du biocapteur.

Ce nanomatériau, reconnu pour ses propriétés conductrices, a donc pu servir efficacement de pont aux électrons, entre la sous-unité FAD de l'enzyme et la surface de l'électrode de travail. Comme les nanotubes de carbone multiparois ne sont pas solubles en milieu aqueux, des alternatives ont du être mises au point pour permettre les dispersions de NTCMPs en solution. La dispersion en solution des NTCMPs est nécessaire pour permetre une méthode de modification simple des électrodes de travail. Pour ce faire, de faibles concentrations variant de 0.1 à 1% de chlorure de polydiméthyldiallylammonium ont permis d'obtenir des dispersions homogènes et stables de NTCMP. Ce moyen simple et rapide de faire des suspensions NTCMPs a permis de faciliter les étapes de fabrication du biocapteur. Les études au FTIR ont mis en évidence que cette suspension des NTCMPs par le PDDA était possible grâce à un empilement des orbitaux π existant sur les NTCMPs et sur un contaminant retrouvé dans le PDDA. De plus comme cette interaction entre NTCMPs et PDDA ne modifie pas la structure atomique des NTCMPs, elle n'est pas néfaste à leurs propriétés conductrices.

6.2 Conclusions et recommandations

Enfin, des tests de détection de putrescine menés sur des fluides biologiques tels que du sang humain lyophilisé et du plasma de souris porteuses de cancer ont permis de confirmer que le biocapteur était pleinement opérationnel et suffisamment sensible et sélectif. Les performances du biocapteur de putrescine pourraient toutefois être améliorées en procédant à une optimisation exhaustive des différents paramètres comme cela a été fait pour le biocapteur de glucose. Par la suite, une étude à plus grande échelle, de la détection de la putrescine menée sur du plasma de mammifère porteur de différents types de cancer pourrait être réalisée. Ce test permettrait de réaliser quels types de cancer sont les plus susceptibles d'être détectés ou suivies par le biais du biocapteur de putrescine. Éventuellement, des tests de détection de putrescine devront être fait sur du plasma humain.

Dans un avenir rapprocher, certaines modifications pourraient être tentées au niveau du biocapteur afin d'augmenter ses performances sur le plan de la sensibilité et sélectivité. L'une de ces modifications est faire subir à l'enzyme, servant de biorécepteur, un traitement en présence d'ion Ca^{+} visant à rapprocher le groupement FAD des NTCMPs. Un tel traitement a pour effet de réduire l'adhésion non-covalente de la coenzyme FAD du reste de l'enzyme, laissant ainsi le groupement FAD s'extirper légèrement à l'extérieur de la structure protéique sans quitter celle-ci [89]. Une seconde proposition envisageable pour améliorer les performances du biocapteur est d'utilisé des électrodes de diamants dopés à l'azote et au bore comme électrode de travail. Ce type d'électrode est très inerte aux agents agressifs (acide et base) et aux températures. Leurs avantages par rapport aux électrodes de carbone vitreux sont, une fenêtre d'utilisation allant de -3 à 3 V et un courant résiduel beaucoup plus faible [90]. Ces deux atouts, des électrodes de diamants dopées, offre la possibilité de réduire le potentiel de détection pour diminuer l'oxydation des interférents et d'augmenter sensibilité du système grâce à la réduction du bruit de fond.

Le biocapteur ampérométrique développé au cours de ce projet possède l'avantage d'être peut coûteux et facilement adaptable à la détection d'autres types d'analytes. Seul une modification de l'enzyme utilisée comme biorécepteur suffie à changer la spécificité du biocapteur. La seule contrainte est qu'il doit s'agir d'enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction pour qu'ils puissent participer par au transfert direct d'électron qui est à la base du biocapteur ampérométrique de troisième génération. Heureusement ce type d'enzyme est très nombreux; il y a entre autre le cholestérol oxidase, le lactate oxidase, le xanthine oxidase, etc. Ces biocapteurs pouvant être fabriquées à faible coût seraient très prometteurs pour l'industrie de la «Biochip». On peut ainsi espérer accroître le nombre d'analyses menées simultanément par une seul «Biochip» en multipliant la quantité de biocapteur se trouvant à la surface d'un dispositif. Un second aspect de ce projet qui possède un potentiel immense pour des applications futures est l'augmentation de la surface des électrodes qui est offertes par les NTCMPs. Une des applications

possibles de ces NTCMPs est de les utiliser pour augmenter la surface des électrodes destinées à des neuroprotèses. L'augmentation de surface des électrodes utilisées dans les neuroprotèses est particulièrement intéressante. Elle permettrait de réduire la taille des électrodes qui sont implantées au niveau du cerveau limitant ainsi les dommages pouvant être causés au cortex lors de l'implantation de l'électrode. De plus, les nombreuses nano dendrites crées par le dépôt des NTCMPs sur les électrodes offriraient un meilleur ancrage de l'électrode dans le cortex résultant en une meilleure stabilité des signaux transmis. Pour assurer la biocompatibilité du dispositif, des protéines retrouvées dans les tissus cervicaux pourraient être fixées sur le NTCMPs. Finalement les NTCMPs peuvent être utilisé comme support pour la fixation facteurs de croissance cellulaire qui offrirait une orientation des dendrites neuronales vers les électrodes pour une meilleure transmission du signal.

Malgré les nombreuses avancés dans le monde des biocapteurs un défi demeure toujours présent ; celui de concevoir un dispositif sensible, sélectif et stable à coût minimum. Dans le cas des biocapteurs utilisant les nanotubes de carbone, cette diminution des coûts implique la mise au point de méthodes de production de masse, fournissant des nanotube de qualité. La poursuite de l'étude des propriétés physiques et chimiques des nanotubes de carbone est également essentielle à son l'implantation dans la fabrication de biocapteur. Lorsque les coûts de fabrication auront chuté considérablement il sera alors possible d'imaginer une utilisation routinière des biocapteurs dans les cabinets médicaux.

Références

[1]. Dai H., (2000), *Carbon nanotubes: opportunities and challenges*, Surface Science, 500, 218.

[2]. Sawata S, Kai E, Ikebukuro K, Iida T (1999), *Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction*, Biosens Bioelectron 14, 397.

[3]. Tuan Vo-Dinh, Brian Cullum (2000), *Biosensor and biochip: advances in biological and medical diagnostics*. Journal of Analytical Chemistry, 366, 540.

[4]. Fredenick, K. R., Tung, T., Emerick, R. S. et al., (1990), *Glucose oxidase from Aspergillus niger cloning, gene sequence, secretion from Saccharomyces cerevisiae and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme*, J. Biol. Chem., 265, 3793.

[5]. Uhegbu C., Reidy M., Soni P., Tierney M., Oliva M., Tamada J.A., (1999), *Management of Interferences in a Transdermal, Noninvasive Glucose Monitoring Device,* Clinical Chemistry, 45, 1679.

[6]. Jianzhong Z., Ziqiang Z., (2002), *Planar Amperometric Glucose Sensor Based on GlucoseOxidase Immobilized by Chitosan Film on Prussian Blue Layer*, Sensor, 2, 127.

[7]. Luong J.H.T., Hrapovic S., Wang D., Besnsebaa F., Simard B., (2004), *Solubilisation of Multiwall Carbon Nanotubes by 3-Aminopropyltriethoxysilane towards the Fabrication of Electrochemical Biosensors with Promoted Electron Transfer*, Electroanalysis, 16, 132.

---

[8]. Marcus R.A., Sutin N., (1985), *Electron transfers in chemistry and biology.* Biochim Biophys Acta, 811, 265.

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

[10]. Peter T. Kissinger, Ph.D., *Introduction to Amperometric Biosensor Configurations*, Purdue University and Bioanalytical Systems, Inc.

[11]. Updike S.J., Hicks G.P., (1967), *The Enzyme Electrode,* Nature, 214, 986.

[12]. GlucoWatch G2. (2004). [En ligne]. http://www.glucowatch.com (page consultée le 29 janvier 2004)

[13]. Cass A.E.G., Davis G., Green M. J. and Hill H.A.O. (1985), *Ferricinium ion as an electron acceptor for oxido-reductases,* Journal of Electroanalytical Chemistry, 190, 117.

[14]. Vaillancourt M., Chen J.W., Fortier G., and Bélanger D., (1998), *Electrochemical and Enzymatic Studies of Electron Transfer Mediation by Ferrocene Derivatives with Nafon-Glucose Oxidase Electrodes,* Electroanalysis, 11, 23.

[15]. Pandey P.C., Upadhyay S., Shukla N.K., Sharma S., (2002), *Studies on the electrochemical performance of glucose biosensor based on ferrocene encapsulated ORMOSIL and glucose oxidase modified graphite paste electrode*, Biosensors and Bioelectronics 18 1257.

[16]. Liu C.C., Lahoda E.J., Galasco R.T., (1975), *Immobilization of lactase on carbon,* Biotechnol. Bioengng., 17, 1695.

[17]. Stoner G.E., Gileadi E., Ludlon J.C., Kirwan D.J. (1975), *Immobilisation of Trypsine on Carbon,* Biotechnol. Bioengng.,

[18]. Cho Y.K., Bailey J.E., (1977), *Glucoarnylase and Glucose Oxidase Preparations and Their Combined Application for Conversion of Maltose to Gluconic Acid*, Biotechnol. Bioengng., 19, 1651.

[19]. Degani Y., Heller A., (1987), *Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. I. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme,* J.phys.Chem., 91, 1285.

[20]. Yabuki S., Shinohara H., Aizawa M., (1989), J. chem. Soc. Chem. Commun. 945.

[21]. Fiorito P. A., Córdoba de Torresi S.I., (2001), *Glucose Amperometric Biosensor Based on GOx and ferrocène in Poly(pyrrole) Generated from Ethanol/Water Mixtures.* J. Braz. Chem Soc., vol 12, no 6, 729.

[22]. Badea M., Curulli A., Palleschi G., (2002), *Oxidase enzyme immobilisation through electrpolymerised films to assemble biosensors for batch and flow injection analysis,* Biosensors and Bioelectronics, 18, 689.

[23]. Tang F. , Meng X., Chen D., Ran J., Zheng C., (2000), *Glucose biosensor enhanced by nanoparticles*, Science in China B, Vol. 43 No. 3. 268.

[24]. Anthony G-E., Cheng L., Ray H.B., (2002), *Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes.* Nanotechnology, 13, 559.

[25]. Navy L., Navy G., (2002), *Development and study of amperometric biosensor for the in vitro measurement of low concentration of putrescine in blood,* J.Biochem Biophys, 53, 165.

[26]. Keisuke F., Toshiharu N., (1976), *Urinary Putrescine, Spermidine, Spermine, in Human Blood and Solid Cancers and in and Experimental Gastric Tumor of Rats,* Cancer Research, 36, 1320.

[27]. Russell D. H., (1971), *Increased Polyamine Concentration in the Urine of Human Cancer Patients.* Nature New Biol., 233, 144.

[28]. Male K.B., Pierre B., H.T. Luong J.H.T., (1996), *Amperometric Biosensor for Total Histamine, Putrescine and Cadaverine using Diamine Oxidase.*, Journal of Food Science, vol: 61, no: 5, 1012.

[29]. Hornero-Méndez D., Garrido-Fernández A., *Biogenic amines in table olives. Analysis by high-performance liquid chromatography,* (1994), The Analyst, 119, 2037.

[30]. Mietz J.L., Karmas E.,(1977), *Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography.*, J. Food Sci., 42, 155.

[31]. Ages Kovacs, Livia Simon-Sarkadi, (1999), *Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis,* , Journal of Chromatography A, 836, 305.

[32]. Sayed A.M., Marzouk, Clarke X. Xu, Bogdan R. Cosofret, (1998), *Amperometric flow injection determination of putrescine and putrescine oxidase,* Anal. Chim. Acta, 363, 57.

[33]. Gèza Nagy, Clarke X. Xu, Vasile V. Cosofret, (1998), *Amperometric measurement cell for the determination of putrescine oxidase activity,* Talanta, 47, 367.

[34]. T. Yao, N. Kobayashi, Wasa, (1990), *Flow-injection analysis for glutamate using immobilized glutamate oxidase: comparison of an enzyme reactor and enzyme electrode*, Anal. Chim. Acta, 231,121.

[35]. Khuhawar MY, Memom AA, Jaipal PD, Bhanger MI. (1999), *Capillary gas chromatographic determination of putrescine and cadaverine in serum of cancer patients using trifluoroacetylacetone as derivatizing reagent.*, J. Chromatogr, B, Biomed Sci Appl, 723, 17.

[36]. Niculescu M., Nistor C., Frébort I., (2000), *Redox Hydrogel-Based Amperometric Bienzyme Electrodes for fish Freshness Monitoring,* Anal. Chem., 72, 1591.

[37]. Kroto H. W., Heath J R, O'Brien S C, (1985), *C60 : Buckminsterfullerene*, Nature, 318, 162,

[38]. Iijima S., (1991), *Helical microtubules of graphitic carbon*, Nature, 354, 56.

[39]. Iijima S., Ichihshi T., (1993) *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*, Nature, 363, 603.

[40]. Peng H. Y., Wang N., Zheng Y. F., Y. Lifshitz, (2000), *Smallest diameter carbon nanotubes,* Appl. Phys. Lett., 77, 2831.

[41]. Sawada S. et Hamada N, (1992), *Energetics of carbon nano-tubes,* Solid State Comm., 83, 917,.

[42]. Chong Z., Kong J., Dai H., 2000, *Intrinsic Electrical Properties of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes with Small Band Gaps,* Phys. Review Letters, 84, 5604.

[43]. Sinnott S.B., Andrews R., (2001), *Carbon Nanotubes: Synthesis, Properties, and Applications*, Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, 26, 145.

[44]. Bachtold A., Strunk C., Salvetat J-P., Bonard J-M., Forro L., Nussbaumer T., Schönenberger C, (1999) *Aharonov-Bohm oscillations in carbon nanotubes*, Nature, 397, 673.

[45]. Hermandez, E., Goze, C., Bernier, P., and Rubio, A., (1998), *Elastic Properties of C and BxCyNz Composite Nanotubes*, Phys. Rev. Lett.,80, 4502.

[46]. Lu, J.P., (1997), *Elastic Properties of Carbon Nanotubes and Nanoropes,* Phys.Rev. Lett., 79, 1297.

[47]. Zhang, P., Lammert P.E. and Crespi V.H., (1998), *Plastic Deformations of Carbon Nanotubes Phy.*, Rev. Lett., 81, 5346.

[48]. Chiang, Y.-M., III, D.B., and Kingery, W.D., (1997), *Physicalceramics: Principles for ceramic science and engineering*, John Wiley & Sons, Inc., New York,.

[49]. Xin Z., Jianjun Z., (2000), *Strain energy and Young's modulus of single-wall carbon nanotubes calculated from electronic energy-band theory*, Physical Review b, 62, 13692.

[50]. Tang, J. Qui, L.-C., Sasaki, T.., Yudasaka, M., Matsushita, A., and Iijima, S., (2000), *Compressibility and Polygonization of Single-Walled Carbon Nanotubes under Hydrostatic Pressure*, Phys. Rev. Lett., 85, 1887.

[51]. Treacy M.M.J., Ebbesen T.W., Gibson J. M., (1996), *Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes*, Nature, 381, 678.

[52]. Avouris P., Collins P. G., Arnold M.S., IBM T.J., (2000),*1/f Noise in Carbon Nanotubes,* Applied Physics Lett., 76, 894.

[53]. Rochefort A., (2000), *Electron Interference Effects on the Conductance of Doped Carbon Nanotubes*, The journal of physical chemistry, 104, 9807.

[54]. Liu J., Rinzler A. G., Dai H., Hafner J. H., Bradley R. K., Boul P. J., Lu A., Iverson T., Shelimov K., Huffman C. B., Rodriguez-Macias F., Shon Y. S., Lee T. R., Colbert D. T., Smalley R. E., (1998), *Fullerene Pipes*, Science, , 280, 1253.

[55]. Chen Y., Haddon R. C., Fang S., Rao A. M., Eklund P. C., Lee W. H., Dickey E. C., Grulke E. A., Pendergrass J. C., Chavan A., Haley B., Smalley R. E., (1998), *Chemical Attachment of Organic Functional Groups to Single Walled Carbon Nanotube Material,* J. Mat. Res., 13, 2423.

[56]. T.W. Ebbesen, P.M. Ajayan, (1992), *Large-scalesynthesis of carbon nanotubes*, Nature,358, 220.

[57]. Minjae Jung, Kwang Yong Eun, (2001), *Growth of carbon nanotubes by chemical vapor deposition*, Diamond and Related Materials, 10, 1235.

[58]. Z. F. Ren,, Z. P. Huang, (1998), *Synthesis of Large Arrays of Well-Aligned Carbon Nanotubes on Glass,* Science, 282, 1105.

[59]. A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, S. G. Kim, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, G. E. Scuseria, D. Tománek, J. E. Fischer, R. E. Smalley, (1996), *Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes*, Science, 273, 483.

[60]. Shojiro Komatsu, Yoshiki Shimizu and Yusuke Moriyoshi, Katsuyuki Okada and Mamoru Mitomo, (2001), *Nanoparticles and nanoballoons of amorphous boron coated with crystalline boron nitride,* , Applied Physics Letters, 79, 188.

[61]. Peter Grutter de McGill, Carrefour des nanomatériaux, 16 octobre 2003, Canada (communication oral).

[62]. Kang et al, (2003), Sensor for detecting biomolecule using carbon nanotubes, US 20030134267A1.

[63]. Kelley et al. (2001), DNA-Bridged Carbon Nanotube arrays, US 20020122766 A1.

[64]. Shankaran D.R., Uehara N., Kato T., (2003), *A metal dispersed sol_ gel biocomposite amperometric glucose biosensor*, Biosensors and Bioelectronics, 18, 721.

[65]. X. Yang , L. Hua, H. Gong, (2003), *Covalent immobilization of an enzyme (glucose oxidase) onto a carbon sol–gel silicate composite surface as a biosensing platform* ,Anal. Chim. Acta, 478, 67.

[66]. Velasco-Santos C., Martinez-Hernandez A. L., Lozada-Cassou M., Alvarez-Castillo A., Castano V. M. (2002), *Chemical functionalization of carbon nanotubes through an organosilane*, Nanotechnology, 13, 495.

[67]. Goethals E. J., (1980), *Polymeric amines and ammonium salts,* Pergamon Press, Belgium.

[68]. Teo B.K., Signh C., Chhowalla M., Milne W. I., (2003), *Catalytic synthesis of carbon nanotubes and nanofibers",* Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, X, 1.

[69]. J. Liu, M.J. Casavant, M. Cox, D.A. Walters, P. Boul, W. Lu, A.J. Rimberg, K.A. Smith, D.T. Colbert, R.E. Smalley, (1999), *Controlled deposition of individual single-walled carbon nanotubes on chemically functionalized templates*, Chem. Phys. Lett., 303, 125.

[70]. A. Star, J. S. Stoddart, D. Steuerman, M. Diehl, A. Boukai, E. W. Wong, X. Yang, S.W. Chung, H. Choi, J. R. Heath, (2001), *Preparation and Properties of Polymer-Wrapped Single-Walled Carbon Nanotubes*, Angew Chem. Int. Ed, 40, 1721.

[71]. R. Bandyopadhyaya, E. Nativ-Roth, O. Regev, (2002), R. Yerushalmi-Rozen, *Stabilization of Individual Carbon Nanotubes in Aqueous Solutions*, Nano Lett., 2, 25.

[72]. J. Chen, M. A. Hamon, H. Hu, Y. Chen, A. Rao, P. C. Ehlund, R. C. Haddon, (1998), *Solution Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes*, Science, 282, 95.

[73]. J. Wang, M. Musameh, Y. Lin, (2003), *Solubilization of Carbon Nanotubes by Nafion toward the Preparation of Amperometric Biosensors*, J. Am. Chem. Soc., 125, 2408.

[74]. K. C. S.Chen, P. S. Forsyth, T. M. Buchanan, K. K. Holmes, (1979), *Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginits*, J. Clin. Investig. 68, 828.

[75]. L. Nagy, G.Nagy, (2002), *Development and study of an amperometric biosensor for the in vitro measurement of low concentration of putrescine in blood*, J.Biochem Biophys, 53, 165.

[76]. T. Fangqiong , M. Xianwei , C. Dong , R. Junguo, Z. Changqiong, (2000), *Glucose biosensor enhanced by nanoparticles*, *Science* in China B, 43, 268.

[77]. Keisuke Fujita, Toshiharu Nagatsu, (1976), *Urinary Putrescine, Spermidine, Spermine, in Human Blood and Solid Cancers and in and Experimental Gastric Tumor of Rats*, Cancer Research, 36, 1320.

[78]. R.S. Gilbert, G.G. Gonzalez, (1991), *An ion-exchange chromatography procedure for the isolation and concentration of basic amino acids and polyamines from complex biological samples prior to high-performance liquid chromatography*., L., Anal. Biochem., 199, 86.

[79]. K. Blau, & King, G., Handbook of Derivatives for Chromatography. Heyden, London (1975).

[80]. R.S. Freire, C.A. Pessoa, (2003), *Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity*, J. Braz. Chem. Soc., 14, 230.

[81]. J.J. Davis, R.J. Coles, H.A.O. Hill, (1997), *Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry*, J. Electrochem. Chem., *440*, 279.

[82]. G. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, (2002), *Interfacing cytochrome c to electrodes with a DNA-carbon nanotube composite film, Electrochem.* Comm., 4, 506.

[83]. J.X. Wang, M.X. Li, Z.J. Shi, N.Q. Li, Z.N., Gu, (2002), *Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes*, Anal. Chem., 74, 1993.

[84]. Y.D. Zhao, W.D., Zhang, H. Chen, Q. M. Luo, (2002), *Direct electron transfer of glucose oxidase molecules adsorbed onto carbon nanotube powder microelectrode*, Anal. Sci., 18, 939.

[85]. C. Saby, T.V. Nguyen, J.H.T. Luong, (2004), *An Electrochemical Flow Analysis System for Putrescine Using Immobilized Putrescine Oxidase and Horseradish Peroxidase, Electroanalysis*, 16(4), 260.

[86]. D. Teti , M. Visalli , H.McNair, (2002), *Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions*, J Chromatogr. B, 781, 107.

[87]. S.I. Harik, C.H. Sutton, (1979), *Putrescine as a biochemical marker of malignant brain tumors*, Cancer Research, 39, 5010.

[88]. N.P.J. Price, J.L. Firmin, D.O. Gray, (1992), *Screening for amines by dansylation and automated high-performance liqid chromatography*, J. Chromatogr. A, 598, 51.

---

[89]. E. Katz, T. Lötzbeyer, D.D. Schlereth, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, (1994) *Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at gold and platinum electrode surfaces modified with a monolayer of pyrroloquinoline quinone. Effect of Ca 2+ cations,* J. Electroanal. Chem., 373, 189.

[90]. P.-A. Michaud, E. Mahé, W. Haenni, A. Perret, C. Comninellis, (2000), *Preparation of Peroxodisulfuric Acid using Boron-Doped diamond thin film Electrodes*, Electrochemical and Solid-State Letters, 2, 77.