

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Immobilisation d'enzymes par microcapsules polymérisées
pour le développement de biocapteurs**

par

Karine Gendron

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

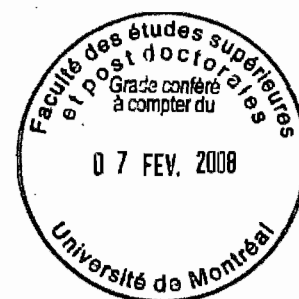
Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Août 2007

© Karine Gendron, 2007



Page d'identification du jury

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Immobilisation d'enzymes par microcapsules polymérisées
pour le développement de biocapteurs

présenté par

Karine Gendron

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Karen Waldron présidente – rapporteuse

Dr. Dominic Rochefort directeur de recherche

Dr. Marius D'Amboise membre du jury

Mémoire accepté le : _____

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'évaluer le potentiel de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation des enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs naturels qui possèdent la capacité de reconnaissance moléculaire. En raison de ces caractéristiques, elles sont utilisées comme éléments de reconnaissance dans les biocapteurs. La microencapsulation peut être utilisée comme méthode d'immobilisation. Elle consiste à confiner une espèce fragile (enzyme) dans une sphère creuse dont la paroi est faite d'un polymère. Les microcapsules peuvent par la suite être immobilisées sur différents supports. La membrane semi-perméable des microcapsules permet aux substrats de l'enzyme de pénétrer à l'intérieur de la sphère pour réagir avec l'enzyme.

Dans le cadre de ce projet, nous avons d'abord préparé et caractérisé des microcapsules faites à partir de polyéthylèneimine réticulé. Les microcapsules que nous avons préparées ont un diamètre moyen de 30 μm . Nous avons par la suite encapsulé une enzyme (la laccase) afin d'évaluer l'impact de la microencapsulation sur le comportement de l'enzyme et avons trouvé que la capsule favorise la réaction avec le substrat, mais que la paroi de la capsule ralentit la diffusion du substrat. Dans un troisième temps, nous avons évalué cette méthode d'immobilisation en immobilisant l'enzyme encapsulée sur une électrode pour en faire un biocapteur électrochimique. Nous avons également immobilisé l'enzyme encapsulée sur du papier pour créer un papier bioactif. Pour cette application, nous avons trouvé que les microcapsules contribuent efficacement à retenir l'enzyme dans le papier. Finalement, nous avons tenté d'appliquer ce genre de système à la détection d'analytes d'intérêt, soit les agents neurotoxiques, mais plusieurs défis restent à relever.

Mots clés : Immobilisation, enzyme, microencapsulation, biocapteur, papier bioactif, agents neurotoxiques, cinétique enzymatique, *p*-phénylènediamine, 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonate).

ABSTRACT

The principal objective of this research project is to evaluate the potential of microencapsulation as method of immobilization for enzymes. Enzymes are naturally occurring catalysts that have a capacity for molecular recognition. Because of these characteristics, they are used as recognition elements in biosensors. Microencapsulation can be used as an immobilization method. It consists of confining a fragile species (enzyme) in a sphere whose wall is made of a polymer. The microcapsules can be immobilized thereafter on various supports. The semipermeable membrane of the microcapsules makes it possible for the substrates of the enzyme to penetrate inside the sphere to react with the enzyme.

Within the framework of this project, we initially prepared and characterized microcapsules made from cross-linked polyethyleneimine. The microcapsules we have prepared have a diameter of about 30 μm . We encapsulated thereafter an enzyme (laccase) in order to evaluate the impact of microencapsulation on the behaviour of the enzyme and found that the capsule supports the reaction with the substrate, but that the wall of the capsule slowed down the diffusion of substrate. After that, we evaluated this method of immobilization by immobilizing some encapsulated enzyme on an electrode to make an electrochemical biosensor. We also immobilized some encapsulated enzyme on paper to create a bioactive paper. For this application, we found that the microcapsules effectively contribute to retention of the enzyme on paper. Finally, we tried to apply this kind of system to the detection of analytes of interest, specifically nerve agents, but several challenges remain to be overcome.

Keywords : Immobilization, enzyme, microencapsulation, biosensor, bioactive paper, nerve agents, enzyme kinetics, *p*-phenylenediamine, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate).

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
REMERCIEMENTS	xviii
1. INTRODUCTION	1
1.1 <i>Les biocapteurs</i>	2
1.1.1 <i>Le glucomètre</i>	3
1.2 <i>Méthodes d'immobilisation d'enzymes</i>	5
1.2.1 <i>Immobilisation par liaison</i>	6
1.2.1.1 <i>L'adsorption</i>	6
1.2.1.2 <i>Les liaisons covalentes et ioniques</i>	6
1.2.1.3 <i>La réticulation</i>	7
1.2.2 <i>Immobilisation par voie physique</i>	8
1.2.2.1 <i>L'inclusion dans une matrice</i>	8
1.2.2.2 <i>Le confinement dans une membrane</i>	11
1.3 <i>Les enzymes comme éléments de reconnaissance</i>	13
1.3.1 <i>La laccase</i>	15
1.3.2 <i>La phosphatase alcaline</i>	17
1.3.3 <i>L'activité enzymatique</i>	18
1.3.3.1 <i>Activité de la laccase</i>	18
1.3.3.2 <i>Activité de la phosphatase alcaline</i>	20
1.3.4 <i>Loi de Michaelis-Menten</i>	21

1.4	<i>Les papiers bioactifs</i>	24
1.4.1	<i>Le réseau SENTINEL</i>	24
1.4.2	<i>Exemple d'un papier bioactif</i>	25
1.5	<i>L'intérêt pour les agents neurotoxiques</i>	26
2.	PARTIE EXPÉRIMENTALE	30
2.1	<i>Microencapsulation des enzymes</i>	30
2.1.1	<i>Préparation des microcapsules</i>	30
2.1.1.1	<i>Préparation des microcapsules avec agitation mécanique</i>	32
2.1.1.2	<i>Préparation des microcapsules avec le microencapsulateur</i>	33
2.2	<i>Caractérisation des capsules</i>	35
2.2.1	<i>Forme des microcapsules</i>	35
2.2.2	<i>Distribution de taille par diffraction de la lumière</i>	36
2.3	<i>Mesure des paramètres cinétiques</i>	39
2.3.1	<i>Spectrophotométrie</i>	40
2.3.2	<i>Consommation d'oxygène</i>	41
2.4	<i>Immobilisation de la laccase</i>	43
2.4.1	<i>Immobilisation sur des électrodes</i>	43
2.4.2	<i>Immobilisation sur du papier</i>	45
2.5	<i>Évaluation de la décomposition d'agents neurotoxiques</i>	46
2.5.1	<i>Utilisation de la laccase</i>	46
2.5.2	<i>Détermination d'ions fluorures</i>	47
3.	PRÉPARATION DES MICROCAPSULES	48
3.1	<i>Maximisation du rendement en masse</i>	49
3.1.1	<i>Effet du mode d'agitation</i>	49
3.1.2	<i>Effet du temps de réaction</i>	50
3.1.3	<i>Effet de la concentration de réticulant</i>	51
3.1.4	<i>Effet du temps de repos</i>	52
3.1.5	<i>Effet des étapes de lavage</i>	53

3.2	<i>Distribution de taille</i>	53
3.2.1	<i>Effet de la vitesse de rotation</i>	54
3.2.2	<i>Effet de la concentration d'émulsifiant</i>	58
3.2.3	<i>Effet du pH</i>	59
3.2.4	<i>Effet de la concentration de réticulant</i>	59
3.2.5	<i>Effet du temps de réaction</i>	60
3.2.6	<i>Préparation de microcapsules avec le microencapsulateur</i>	61
4.	EFFET DE L'ENCAPSULATION SUR L'ENZYME	64
4.1	<i>Maintien de l'activité enzymatique</i>	64
4.1.1	<i>Efficacité d'encapsulation</i>	65
4.1.2	<i>Effet de l'encapsulation sur le pH d'activité enzymatique maximale</i>	67
4.1.3	<i>Maintien de l'activité enzymatique à long terme</i>	71
4.2	<i>Cinétique enzymatique</i>	72
4.2.1	<i>La vitesse maximale (V_{max})</i>	74
4.2.2	<i>La constante de Michaelis-Menten (K_M)</i>	75
5.	IMMOBILISATION D'ENZYMES PAR MICROENCAPSULATION	79
5.1	<i>Immobilisation sur une électrode</i>	79
5.1.1	<i>Détermination du potentiel appliqué pour la chronoampérométrie</i>	79
5.1.2	<i>Évaluation d'un biocapteur ampérométrique basé sur la laccase immobilisée par microencapsulation</i>	81
5.1.3	<i>Évaluation du K_M par chronoampérométrie</i>	83
5.2	<i>Immobilisation sur le papier</i>	85
5.2.1	<i>Rétention physique des enzymes immobilisées</i>	86
5.2.2	<i>Résistance thermique</i>	88
6.	DÉCOMPOSITION D'AGENTS NEUROTOXIQUES	91
6.1	<i>Laccase</i>	91
6.2	<i>Phosphatase alcaline</i>	98

7. CONCLUSION.....	104
8. RÉFÉRENCES.....	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Rendement de quelques préparations de microcapsules faites avec un barreau magnétique comme source d'agitation	48
Tableau II	Effet du temps de repos sur le rendement massique de microcapsules	51
Tableau III	Diamètre moyen des microcapsules, préparées avec agitation générée par une hélice, mesuré par diffraction de la lumière	55

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Schéma du fonctionnement d'un biocapteur montrant a) la reconnaissance moléculaire, b) la transduction et c) la génération du signal, adapté de la référence ^[3]	2
Figure 2 .	Oxydation catalytique du glucose par la glucose oxydase (GOx). La GOx oxyde le glucose en acide gluconique tout en réduisant l'oxygène en peroxyde d'hydrogène grâce à la flavine adénine dinucléotide (FAD), adapté de la référence ^[6]	3
Figure 3.	Détection ampérométrique du glucose par la GOx. La GOx oxyde le glucose en acide gluconique tout en réduisant un médiateur (méd), par exemple le ferrocène, qui est oxydé à une électrode de travail.	4
Figure 4.	a) Photo d'un glucomètre à usage personnel et b) Schéma d'une bandelette utilisée pour doser le glucose, tiré de la référence ^[2]	4
Figure 5.	Immobilisation d'enzymes (représentées par B) sur un support (porteur) par liaison a) d'adsorption, b) ionique, et c) covalente avec ou sans molécule de liaison, adapté de la référence ^[9]	7
Figure 6.	Immobilisation d'enzymes (représentées par B) par a) réticulation avec elle-même et b) co-réticulation avec un co-réticulant (représenté par C), tiré de la référence ^[9]	8
Figure 7.	Inclusion d'enzymes (représentées par \circ) dans une matrice polymérique de type gel (représentée par \square) sous forme a) de billes ou b) de fibres, adapté de la référence ^[9]	9
Figure 8.	Réaction de gélification de l'alginate de sodium par échange d'ions. Le remplacement des ions Na^+ par les ions Ca^{2+} réticule le polymère via les fonctions carboxylates.	10
Figure 9.	Immobilisation de la laccase par microencapsulation. La membrane semi-perméable permet au substrat de pénétrer à l'intérieur de la capsule pour réagir avec l'enzyme pour former le produit qui peut alors sortir de la capsule. Un biocapteur électrochimique pourrait fonctionner en mesurant le courant associé à la réduction du substrat à une électrode.....	11

Figure 10.	Structures des protéines. a) structure primaire (séquence des acides aminés), b) structure secondaire (repliement en hélice α ou feuillet β), c) structure tertiaire (disposition tridimensionnelle), d) structure quaternaire (arrangement des sous-unités). Illustration par Irving Geis ©, adaptée de la référence ^[16]	13
Figure 11.	Composition chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique, adapté de la référence ^[17]	15
Figure 12.	Schéma de biocapteur ampérométrique de la laccase, tiré de la référence ^[19]	16
Figure 13.	Portion du site actif de la phosphatase alcaline montrant les atomes de Zn impliqués dans l'hydrolyse d'un ester-phosphate, tiré de la référence ^[23]	17
Figure 14.	Équation de l'hydrolyse du MFP catalysée par l'APase.	17
Figure 15.	Structures des formes réduite (ABTS^{2-}) et oxydée ($\text{ABTS}^{\cdot-}$) de l'ABTS, tiré de la référence ^[26]	19
Figure 16.	Réaction d'hydrolyse du <i>p</i> -nitrophényl phosphate catalysée par l'APase.....	20
Figure 17.	Équation d'une réaction enzymatique de type Michaelis-Menten, tiré de la référence ^[23]	21
Figure 18.	Allure de la courbe de Michaelis-Menten.....	23

- Figure 19.** Dosage du glucose et des protéines sur papier bioactif. Les zones foncées ont été traitées avec une solution photorésistante, alors que les zones claires ne sont pas traitées. a) Absorption par capillarité d'une encre Waterman rouge (5 μ L) selon le patron du papier. L'échantillon est absorbé par capillarité au centre et est dirigé dans trois zones distinctes selon le patron. b) Essai complet après déposition des réactifs. La zone circulaire à gauche est celle du dosage du glucose et celle carrée à droite est celle du test de protéines. La zone circulaire centrale sert de contrôle. c) Contrôle négatif de glucose (gauche) et de protéines (droite) fait avec une solution d'urine artificielle (5 μ L). d) Essai positif du glucose (gauche) et de protéines (droite) fait avec une solution d'urine artificielle contenant 550 mM de glucose et 75 μ M d'albumine de sérum bovin (BSA). e) Détection et dosage du glucose et des protéines réalisée avec différentes concentrations de glucose et de BSA, tiré de la référence ^[27] 26
- Figure 20.** Structures du sarin et de ses composés modèles..... 28
- Figure 21.** Structures du VX et de son composé modèle le Demeton-S. 28
- Figure 22.** Réticulation des fonctions amines du PEI par le dichlorure de décanedioyle. 31
- Figure 23.** Schéma de la formation des microcapsules grâce à une microémulsion générée par une hélice. 32
- Figure 24.** Schéma de la formation de microgouttelettes par vibration d'une solution passant à travers une buse de faible diamètre (d_D). Lorsque qu'un jet laminaire s'écoulant à une vitesse (v_f) est soumis à une fréquence (f), il se brise pour former des gouttelettes de diamètre (d_r), adapté de la référence ^[33] 33
- Figure 25.** Schéma de l'encapsulateur (modèle IE-50 R) d'Inotech[®]. 1a) pompe pour seringue, 1b) seringue, 2) buse, 3) unité vibrationnelle, 4) unité de pulsation, 5) bécher de réaction, 6 a,b,c) filtres stériles, 7a,b) pompes péristaltiques, 8) unité de collection accessoire, 9) barreau magnétique, 10) unité de filtration, 11) capillaire, 12) bécher de récupération, 13) lumière stroboscope, 14) générateur de fréquence, adapté de la référence ^[33] 35

- Figure 26.** Diffraction de la lumière qui frappe une particule de taille inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente. Chaque frontière physique de la particule agit alors comme une nouvelle source de lumière ponctuelle et le patron de diffraction produit dépend des propriétés de la particule. 36
- Figure 27.** Distribution de la taille des billes de polystyrène réticulé d'un échantillon standard de diamètre moyen $42 \mu\text{m}$ —■— et $98 \mu\text{m}$ —○—, mesuré par diffraction de la lumière, où q (%) = fraction volumique. 38
- Figure 28.** Schéma de la configuration des lasers et des détecteurs dans l'analyseur de taille de particules LA-950 de Horiba, tiré de la référence ^[36]. 39
- Figure 29.** Réaction d'oxydation de l'OPD par la laccase. Le produit de la réaction est le 2,3-diaminophénazine qui est neutre quand le pH est supérieur à 6. 40
- Figure 30.** Oxydation du PPD par la laccase. Le produit de la réaction est un cation radical qui possède plusieurs formes de résonance. Ce cation est en fait instable et se polymérise rapidement. 40
- Figure 31.** Schéma du montage expérimental de la cellule à oxygène montrant la membrane de téflon semi-perméable séparant la cellule des électrodes, tiré de la référence ^[23]. 42
- Figure 32.** Courbe typique de la consommation d'oxygène par la laccase ($0,86 \mu\text{L}$) en réaction avec l'ABTS ($0,005 \text{ M}$) dans un tampon acétate pH 4,50 ($0,05 \text{ M}$). 42
- Figure 33.** Voltampérogramme cyclique du PPD ($0,5 \text{ mM}$) dans tampon phosphate $0,05 \text{ M}$ pH 5,75 mesuré à une électrode de carbone vitreux selon une vitesse de balayage de 50 mV/s 44
- Figure 34.** Chronoampérogramme de la réduction du PPD à l'électrode de travail ($+85 \text{ mV vs Ag/AgCl}$) après son oxydation par la laccase immobilisée par microencapsulation. Les augmentations de courant sont dues à des ajouts de $5 \mu\text{L}$ d'une solution de PPD (50 mM). Les plateaux représentent l'atteinte de l'état stationnaire. 45
- Figure 35.** Schéma de l'immobilisation de la laccase encapsulée dans des formettes. 46

- Figure 36.** Images prises par microscopie optique de capsules préparées dans les conditions standards montrant a) une capsule isolée et b) des agglomérats. 54
- Figure 37.** Distribution de la taille des microcapsules préparées avec agitation produite par un barreau magnétique à vitesse maximale, échantillon n = 30 capsules. 55
- Figure 38.** Relation linéaire sur une échelle log entre le diamètre moyen de microcapsules de poly(urée-formaldéhyde) et la vitesse de rotation de l'hélice, tiré de la référence ^[39]. 56
- Figure 39.** Distribution de la taille des microcapsules préparées avec agitation obtenue grâce à une hélice selon une vitesse de 1040 t/min —■—, 1640 t/min —◇— et 2400 t/min —▲— mesurée par diffraction de la lumière, où q (%) = fraction volumique. 58
- Figure 40.** Distribution de la taille des microcapsules préparées avec le microencapsulateur d'Inotech®. La distribution de taille est mesurée par diffraction de la lumière, où q (%) = fraction volumique. 62
- Figure 41.** Photo prise par microscopie optique à faible grossissement des microcapsules préparées grâce au microencapsulateur. L'échelle est approximative. 62
- Figure 42.** Mesure d'activité entre la laccase encapsulée (capsules 2,7 mg sèches) et le PPD (2,5 mM) dans un tampon phosphate pH 5,75. La variation d'absorbance en fonction du temps est convertie en unités d'activité (U) selon l'équation (1). 65
- Figure 43.** Effet du pH sur la vitesse initiale de la conversion du PPD par la laccase libre —◆— ($2,4 \times 10^{-8}$ mM Lcc, PPD 5mM) et encapsulée —■— (1mg/mL capsules sèches, PPD 5mM) mesurée par spectrophotométrie ($\lambda=520$ nm). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur deux mesures. 68
- Figure 44.** Effet du pH sur la vitesse initiale de la conversion de l'OPD par la laccase libre —◆— ($4,3 \times 10^{-5}$ mM Lcc, OPD 2mM) et encapsulée —■— (1,5 mg/mL capsules sèches, OPD 5mM) mesurée par consommation d'oxygène ($\Delta E=-0,6V$ vs Ag/AgCl). 71

- Figure 45.** Activité relative maintenue dans \blacklozenge une dilution de l'enzyme libre et dans \blacksquare les capsules lyophilisées conservées à 4°C vis-à-vis du PPD. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur 3 mesures. 72
- Figure 46.** Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase libre (0,28 U/mL) avec le PPD comme substrat dans un tampon phosphate 0,050 M pH 5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 1,00 [\text{PPD}] / (0,40 + [\text{PPD}])$ 73
- Figure 47.** Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase encapsulée (0,018 U/mL) avec le PPD comme substrat dans un tampon phosphate 0,050 M pH 5,75. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 0,068 [\text{PPD}] / (0,06 + [\text{PPD}])$ 74
- Figure 48.** Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase libre (0,94 U/mL) avec l'OPD comme substrat dans un tampon acétate 0,050 M pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 3,63 [\text{OPD}] / (1,09 + [\text{OPD}])$ 76
- Figure 49.** Courbe de Michaelis-Menton pour la laccase encapsulée (0,38 U/mL) avec l'OPD comme substrat dans un tampon McIlvaine 0,050 M pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 1,30 [\text{OPD}] / (0,50 + [\text{OPD}])$ 77
- Figure 50.** Dépendance du courant de l'état stationnaire de la réduction du PPD selon le potentiel appliqué à l'électrode de travail. Le courant mesuré correspond à celui obtenu après deux ajouts successifs de PPD ($[\text{PPD}]_{\text{finale}} = 10 \mu\text{M}$), adapté de la référence ^[47]. 80
- Figure 51.** Effet de la quantité de capsules immobilisées $3 \mu\text{g}$ – $6,5 \mu\text{g}$ – $9 \mu\text{g}$ sur l'atteinte de l'état stationnaire entre la laccase encapsulée et le PPD ($\Delta E = +85 \text{ mV vs Ag/AgCl}$). 82
- Figure 52.** a) Chronoampérogramme de la réduction électrochimique du PPD oxydé par la laccase immobilisée par microencapsulation. Chaque augmentation de courant est obtenue après un ajout de 50 μL d'une solution 0,50 mM de PPD. b) Représentation de Lineweaver-Burk obtenue d'après le même chronoampérogramme, permettant d'obtenir les paramètres cinétiques de l'équation de Michaelis-Menten, adapté de la référence ^[47]. 84

- Figure 53.** Absorbance (mesurée en continue) du PPD oxydé par la laccase dans l'eau de filtration passée à travers une section de formette avec laccase — simplement adsorbée et — immobilisée par microencapsulation. 86
- Figure 54.** Mesures de l'activité enzymatique avant et après filtration de 250 mL d'eau sur une section de formette (~ 6 mg) avec laccase simplement adsorbée et immobilisée par microencapsulation. L'activité est mesurée avec l'*o*-phénylènediamine (OPD) (2 mM) dans un tampon McIlvaine pH 4,5. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures. 87
- Figure 55.** Test qualitatif d'activité après 20 minutes entre le PPD (2 mM) et la laccase immobilisée par microencapsulation sur des formettes séchées à différentes températures entre 25°C et 140°C. 89
- Figure 56.** Essais enzymatiques entre la laccase libre (0,14 U/mL) et l'ABTS (0,5 mM) comme médiateur. L'ABTS est ajouté au point (1). Après l'oxydation de tout l'ABTS, de l'air est rajouté à la solution pour ne pas limiter la quantité d'oxygène disponible pour la réaction (2). — Ajout de Demeton-S (0,8 mM) (3) et — aucun ajout de Demeton-S (blanc). 92
- Figure 57.** Essai enzymatique entre la laccase libre (0,02 U/mL) et l'ABTS (0,2 mM), utilisé comme médiateur, qui est ajouté au point (1), puis d'un ajout de Demeton-S (0,02 mM) (2) et d'un deuxième ajout d'ABTS (0,2 mM) (3). 93
- Figure 58.** Essai enzymatique entre la laccase libre (0,02 U/mL) et un premier ajout d'ABTS (0,2 mM) (1) puis un deuxième ajout d'ABTS (0,02mM) (2). 93
- Figure 59.** Chromatogrammes en phase gazeuse (colonne DB-WAX, 30 m, diamètre interne = 0,25 µm, isotherme = 175°C) obtenu d'après un — essai enzymatique entre la laccase libre (0,5 U/mL) avec l'ABTS comme médiateur (0,5 mM) et le Demeton-S comme substrat (2 mM), et d'après un — blanc qui contient seulement le Demeton-S (2 mM). L'intégration du pic de Demeton-S (43 min) est de 13,9 unités pour l'essai enzymatique de 24 h et de 12,9 pour la solution de blanc. 95
- Figure 60.** Mise en évidence des différences structurales entre la molécule de VX et celle de Demeton-S. Le VX est un dérivé d'alkylphosphonate et le Demeton-S est un dérivé du phosphate. 96

- Figure 61.** Essais enzymatiques entre la laccase libre (0,5 U/mL) et l'ABTS (0,5 mM) utilisé comme médiateur ajouté au point (1), avec ajout d'air (2), et le DMMP comme substrat — 1 mM, = 2 mM et — 4 mM (3)..... 97
- Figure 62.** Essais enzymatiques entre la laccase libre (0,11 U/mL) avec l'ABTS (0,5 mM) utilisé comme médiateur (1), un ajout d'air (2) et le MFP (1 mM) comme substrat (3)..... 97
- Figure 63.** Essais enzymatiques entre l'APase libre et le MFP suivis par l'électrode sélective aux ions F⁻. —■— APase (0,5 U/mL) et MFP (0,5 mM) (vitesse initiale = 0,017 mM F⁻/h) , —○— APase (3 U/mL) et MFP (0,5 mM) (vitesse initiale = 0,073 mM F⁻/h), —▲— MFP seul (0,5 mM), —▼— tampon seul (TRIS-HCl (5mM) pH 7,2 MgCl₂ (1mM))..... 99
- Figure 64.** a) Essai enzymatique entre —■— l'APase encapsulée (9,8 U/mL d'après les unités données par le fournisseur) et le MFP (5 mM) dans tampon (TRIS-HCl (5mM) pH 7,2 MgCl₂ (1mM)) et —●— un blanc réalisé avec la même masse de capsules vides avec MFP (5 mM) dans tampon (TRIS-HCl (5mM) pH 7,2 MgCl₂ (1mM)). b) Agrandissement des 10 premières minutes..... 100
- Figure 65.** Comparaison entre — la courbe de calibration de l'électrode sélective à l'ion fluorure effectuée avec des solutions étalons de NaF et — le signal obtenu pour des solutions de NaCl dans les mêmes conditions expérimentales (tampon TRIS-HCl pH 7,2). 101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Symbole / Abréviation	Signification
A	Aire de l'électrode
a	Rayon de la particule
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonate)
ABTS ^{••}	Forme oxydée de l'ABTS
APase	Phosphatase alcaline
b	Épaisseur du téflon
BSA	Protéine d'albumine de sérum bovin
Cu _{T1}	Site de cuivre de type 1
d	Diamètre d'une particule
d_D	Diamètre de la buse
DFP	Diisopropyl fluorophosphonate
DIMP	Diisopropyl méthylphosphonate
DMMP	Diméthyl méthylphosphonate
d_r	Diamètre des gouttelettes
ES	Complexe enzyme-substrat
FAD	Coenzyme flavine adénine dinucléotide
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Cyclosarin
GOx	Glucose oxydase
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif
i_d	Courant associé à la réduction de l'oxygène
J_1	Fonction de Bessel de premier ordre
K_M	Constante de Michaelis-Menten
Lac _{oxi}	Forme oxydée de la laccase

Lac _{red}	Forme réduite de la laccase
Lcc	Laccase
MFP	Monofluorophosphate
OPD	<i>o</i> -phénylènediamine
OPH	Organophosphorus hydrolase
$P(O_2)$	Pression d'oxygène
PEI	Polyéthylèneimine
Ph _{oxi}	Forme oxydée d'un composé phénolique
Ph _{red}	Forme réduite d'un composé phénolique
P_m	Perméabilité du téflon
PPD	<i>p</i> -phénylènediamine
q (%)	Fraction volumique
Span [®] 80	Monooléate de sorbitan
t/min	Nombre de tours par minute
T2/T3	Site de réaction des atomes de cuivre de type T2 et T3
t _{90%}	Temps nécessaire pour atteindre 90 % du signal
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
Tween [®] 20	Polysorbate 20
U	Unité d'activité enzymatique
V'	Débit
V _c	Volume de la cellule de mesure
V _{enz}	Volume de la solution d'enzyme purifiée dans cellule
v _J	Vitesse du jet laminaire
vs Ag/AgCl	Potentiel mesuré par rapport à l'électrode au chlorure d'argent
vs ECS	Potentiel mesuré par rapport à l'électrode au calomel saturé
Zn ₁	Site de zinc de type 1

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon Professeur, monsieur Dominic Rochefort, qui a fait preuve de beaucoup de dynamisme et de compréhension tout au long du projet. Je suis très heureuse d'avoir contribué au démarrage du groupe de recherche et j'entrevois de belles réussites scientifiques car sa vision et ses idées innovatrices n'attendent qu'à être concrétisées.

Je suis également très reconnaissante de tout le travail des membres de mon groupe de recherche qui ont contribué, chacun à leur façon, à la réussite de ce projet, et plus particulièrement Lamfeddal Kouisni, Doudou Madoda-Nsiambote, Honorine Guillet, de même que Sylvie Renaud à Paprican et Julie Boivin à l'Université de Montréal. Je désire également souligner le soutien d'Anne-Laure Pont et de Georgiana Roman qui sont devenues plus que des collègues de travail.

Je remercie également Isabelle Theobald avec qui j'ai partagé beaucoup de bons moments au cours des deux dernières années.

Je tiens également à remercier mes parents qui m'ont transmis des valeurs dont je suis fière et qui m'ont encouragée tout au long de mes études. Sans eux, je n'aurais peut-être pas développé une aussi grande passion pour les sciences ni eu cet optimisme à toutes épreuves qui me permet de traverser bien des situations.

Finalement je veux remercier mon amoureux Alain Grandbois qui a toujours été à mes côtés, autant dans les moments festifs que dans les moments difficiles. Grâce à lui, ma maîtrise fut et restera toujours une belle période de ma vie.

1. INTRODUCTION

Les intérêts de recherche de notre groupe se situent au niveau de l'électrochimie analytique. Nous travaillons à développer des méthodes d'analyse appliquées à des systèmes électrochimiques et utilisons également l'électrochimie comme méthode d'analyse. Parmi les systèmes électrochimiques que nous étudions se trouvent les supercapacités, les biopiles ainsi que les biocapteurs. Ces derniers sont des dispositifs de détection particuliers puisqu'ils comprennent des molécules biologiques comme élément de reconnaissance. Parmi les biomolécules souvent utilisées comme élément de reconnaissance dans les biocapteurs se trouvent les enzymes en raison de leur sélectivité et de leur pouvoir catalytique. Toutefois, une limitation importante dans leur application est leur immobilisation. Ce projet de recherche a donc pour but principal de développer une plateforme d'immobilisation d'enzymes pour biocapteurs ou bioréacteurs. Pour y arriver, nous avons choisi la microencapsulation comme approche. Cette méthode a été choisie plutôt que d'autres en raison des avantages qu'elle procure et aussi parce que sa polyvalence permet de l'utiliser pour encapsuler différentes biomolécules et de les immobiliser sur différents supports.

La première étape fut de préparer et caractériser les microcapsules puis d'en étudier l'effet sur le comportement des enzymes encapsulées. Ces microcapsules ont par la suite été immobilisées sur le support. Dans le cadre de ce projet, les enzymes encapsulées ont d'abord été immobilisées sur des électrodes afin d'évaluer le potentiel de cette méthode d'immobilisation pour le développement de biocapteurs électrochimiques et dans un deuxième temps, sur du papier dans le but de développer des papiers bioactifs. Finalement, les enzymes à l'étude ont été évaluées sur leur potentiel à décomposer des molécules toxiques appartenant à la famille des agents neurotoxiques dans le souci d'appliquer ce genre de système à des analytes d'intérêt.

1.1 Les biocapteurs

Les biocapteurs se distinguent des méthodes d'analyse chimique conventionnelles parce qu'ils sont basés sur la complémentarité entre des réactions d'ordre biologique et des propriétés physicochimiques. Le principe de fonctionnement des biocapteurs repose sur la reconnaissance moléculaire d'un analyte par une biomolécule comme une enzyme, un anticorps, un microorganisme, une cellule, etc ^[1, 2]. La réponse est transmise à un transducteur qui l'amplifie et la convertit en signal facilement exploitable (figure 1). Les biocapteurs peuvent être potentiométrique, ampérométrique, capacitif, optique, thermique, ou encore acoustique selon le type de transduction sur lequel ils sont basés ^[1].

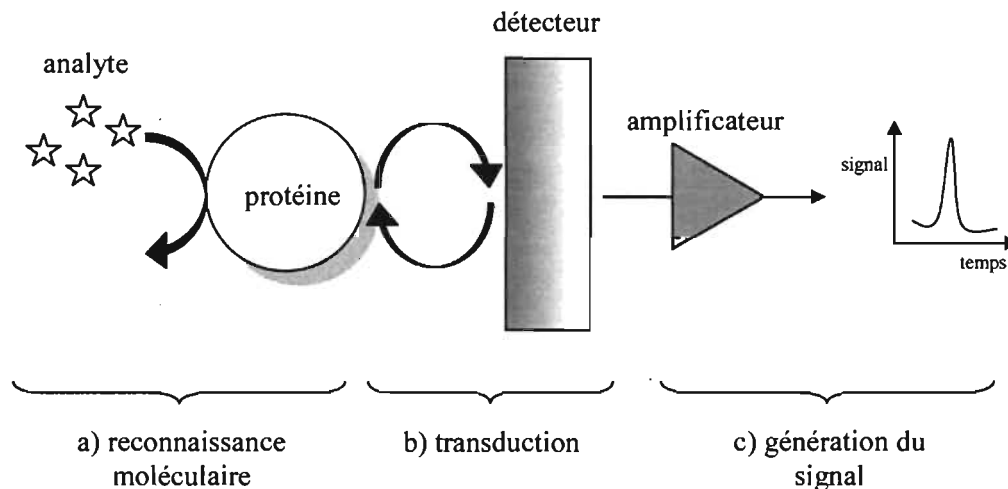


Figure 1. Schéma du fonctionnement d'un biocapteur montrant a) la reconnaissance moléculaire, b) la transduction et c) la génération du signal, adapté de la référence ^[3].

Les biocapteurs possèdent certains avantages par rapport aux méthodes d'analyse conventionnelles. D'abord, l'élément de reconnaissance biologique des biocapteurs leur confère une grande sélectivité envers l'analyte. Cette sélectivité est principalement utile pour l'analyse d'échantillons complexes, ce qui a pour avantage de diminuer les étapes de préparation d'échantillons et de permettre l'analyse sur le terrain. Les méthodes analytiques utilisées au laboratoire (chromatographie, spectrométrie, etc.) ne sont pas nécessairement aussi sélectives, ce qui nécessite

parfois le traitement des échantillons afin de séparer l'analyte de la matrice. De plus, elles sont souvent non portatives, ce qui implique le transport et la conservation des échantillons, ce qui peut augmenter les risques d'erreur. En revanche, la portabilité des biocapteurs peut facilement être atteinte grâce à leur miniaturisation. Les mesures peuvent donc être prises directement sur les sites d'échantillonnage, ce qui s'avère très utile pour l'analyse environnementale ou biomédicale ^[4]. De plus, la miniaturisation et la biocompatibilité peuvent être mises à profits dans des systèmes de mesure *in vivo* ^[5]. Toutefois, malgré ces avantages, les biocapteurs ne peuvent remplacer les méthodes conventionnelles puisqu'ils permettent difficilement l'identification des analytes dans un échantillon. Ils constituent plutôt des méthodes complémentaires. Essentiellement, les biocapteurs peuvent détecter et quantifier un analyte rapidement et avec une bonne sensibilité, ce qui permet la conception de dispositifs portatifs à usage personnel, comme le glucomètre par exemple.

1.1.1 Le glucomètre

Le glucomètre est le biocapteur le plus connu et le plus répandu. Étant donné que les personnes diabétiques doivent mesurer leur taux de glucose plusieurs fois par jour, il était nécessaire de fabriquer un dispositif portatif à réponse rapide. Le glucomètre est un biocapteur électrochimique dont l'agent de reconnaissance est une enzyme : la glucose oxydase (GOx). Celle-ci catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique tout en réduisant l'oxygène en peroxyde d'hydrogène grâce à la coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD) (figure 2) ^[6].



Figure 2 . Oxydation catalytique du glucose par la glucose oxydase (GOx). La GOx oxyde le glucose en acide gluconique tout en réduisant l'oxygène en peroxyde d'hydrogène grâce à la flavine adénine dinucléotide (FAD), adapté de la référence ^[6].

Toutefois, la reconversion du peroxyde d'hydrogène à une électrode exige un potentiel élevé ^[3]. Pour cette raison, un complexe de fer, comme le ferrocène ou le

$\text{Fe}(\text{CN})_6$, est préférablement utilisé comme médiateur (figure 3) [3]. Le médiateur assure le transport des électrons entre la glucose oxydase et l'électrode.

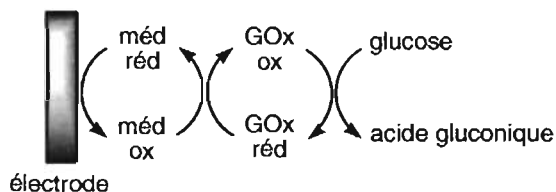


Figure 3. Détection ampérométrique du glucose par la GOx. La GOx oxyde le glucose en acide gluconique tout en réduisant un médiateur (méd), par exemple le ferrocène, qui est oxydé à une électrode de travail.

Le glucomètre est en fait composé de trois électrodes : une électrode de référence et deux électrodes de travail dont une est enduite de l'enzyme et du médiateur, tandis que l'autre est enduite seulement du médiateur (figure 4). Ainsi, pour doser le glucose, il suffit d'appliquer un potentiel (+0,16 V vs ECS) qui permette d'oxyder le médiateur réduit qui est généré par l'enzyme. À ce potentiel, le peroxyde d'hydrogène produit par la glucose oxydase, ainsi que d'autres espèces électroactives présentes dans le sang (acide ascorbique) ne sont pas détectables [7]. La différence de courant entre les deux électrodes de travail est mesurée et convertie en concentration de façon à doser le glucose dans le sang. Ce procédé dure moins de 20 s et nécessite seulement 4 μL d'échantillon non traité préalablement [2].

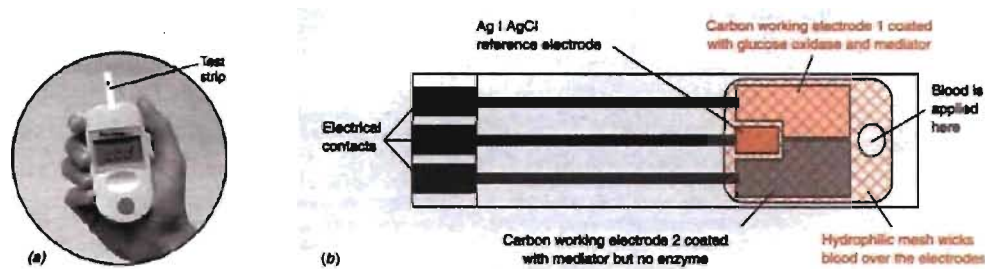


Figure 4. a) Photo d'un glucomètre à usage personnel et b) Schéma d'une bandelette utilisée pour doser le glucose, tiré de la référence [2].

Les biocapteurs électrochimiques ont été les premiers à être développés et le glucomètre est en fait un des rares biocapteurs à avoir connu un réel succès commercial [8]. Pourtant la littérature regorge d'articles sur les applications des

biocapteurs ^[8]. La difficulté vient du fait que les biomolécules sont très fragiles. Au niveau académique, les applications fonctionnent parce qu'il est facile de contrôler les conditions expérimentales et le travail à petite échelle est satisfaisant. En réalité, le passage de la recherche académique vers les véritables applications commerciales est difficile. Le défi réside principalement dans l'immobilisation des biomolécules sur le support. L'immobilisation est donc un aspect très important de la conception des biocapteurs afin que leur application dépasse les limites du laboratoire de recherche. Il existe d'ailleurs une panoplie de méthodes d'immobilisation qui ont chacune des avantages et des inconvénients dont il faut tenir compte afin de rentabiliser l'utilisation des biomolécules comme agents de reconnaissance.

1.2 Méthodes d'immobilisation d'enzymes

L'immobilisation consiste à « attacher » les biomolécules sur un support. Le terme immobilisation vient du fait que les biomolécules immobilisées ont une mobilité restreinte ^[9]. En ce qui concerne les enzymes, qui sont les biomolécules utilisées dans le cadre de ce projet et dont il sera question à la section 1.3, l'immobilisation répond à plusieurs besoins. Dans un premier temps, elle assure la rétention physique des enzymes sur le support sans quoi celles-ci seraient perdues lors du passage d'une solution aqueuse par exemple. Elle contribue également à augmenter la sensibilité du biocapteur grâce à la proximité entre l'enzyme et le transducteur. Idéalement, la méthode d'immobilisation doit protéger l'enzyme du milieu extérieur de façon à ce que celle-ci maintienne le plus possible son pouvoir catalytique. Ainsi la méthode d'immobilisation choisie doit retenir l'enzyme à proximité du transducteur, mais sans nuire à la reconnaissance moléculaire.

Les méthodes d'immobilisation des enzymes sont très nombreuses. Elles peuvent être classées selon la nature des interactions avec le support. L'immobilisation par liaison inclut l'adsorption, les liaisons ioniques ou covalentes de même que la réticulation et la co-réticulation de l'enzyme, tandis que

l'immobilisation par voie physique fait référence à l'emprisonnement dans une matrice ou à l'intérieur d'une membrane ^[9].

1.2.1 Immobilisation par liaison

1.2.1.1 L'adsorption

L'adsorption est la plus simple et la plus ancienne méthode d'immobilisation d'enzymes ^[9]. Les enzymes immobilisées par adsorption sont retenues sur le support par des forces physiques (Van Der Waals) (figure 5a) ^[9]. De plus, la plupart du temps, d'autres mécanismes de rétention comme des effets hydrophobes, des ponts hydrogène sont également impliqués ^[9]. De ce fait, il est complexe de caractériser exactement la nature des liens entre l'enzyme et le support. On parle alors d'adsorption au sens large même si les interactions impliquées ne sont pas seulement celles de Van Der Waals ^[9]. L'inconvénient de cette méthode d'immobilisation est qu'elle ne permet qu'une liaison faible entre le support et l'enzyme. L'enzyme peut alors être désorbée par un changement de température, de concentration du substrat ou de force ionique ^[9].

1.2.1.2 Les liaisons covalentes et ioniques

L'immobilisation par liaison peut également être réalisée par liaison ionique (figure 5b) ou covalente (figure 5c). La liaison ionique est l'attraction provoquée par des charges opposées. Les conditions d'immobilisation sont douces, mais les mesures sont sujettes aux interférences provoquées par d'autres ions ^[9]. Quant à la méthode d'immobilisation par liaison covalente, elle permet une adhésion plus forte que celle par liaison ionique et permet d'immobiliser des enzymes grâce à leur affinité avec certains matériaux comme l'or ou le platine, car les groupes cystéine; ou les fonctions thiols, des protéines ont des affinités pour ces métaux ^[6, 10]. L'immobilisation par

liaison covalente peut également être faite en utilisant une molécule de liaison entre le support et l'enzyme. Les avantages de l'immobilisation par liaison sont d'assurer un lien fort et une grande proximité entre l'enzyme et le support, mais les inconvénients sont qu'elle ne permet d'immobiliser qu'une petite quantité d'enzymes et n'en assure pas la protection.

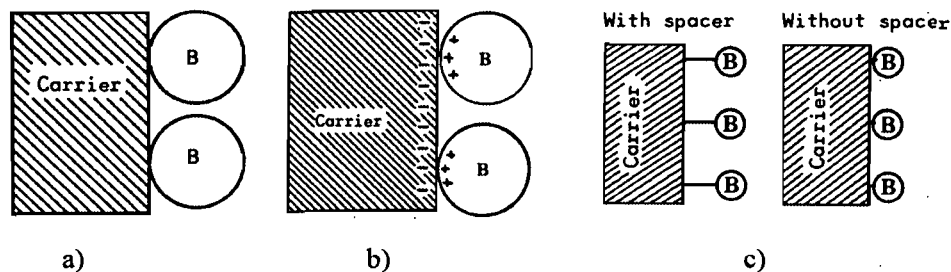


Figure 5. Immobilisation d'enzymes (représentées par B) sur un support (carrier) par liaison a) d'adsorption, b) ionique, et c) covalente avec ou sans molécule de liaison, adapté de la référence [9].

1.2.1.3 La réticulation

La réticulation et la co-réticulation de l'enzyme servent à augmenter la quantité d'enzymes immobilisées. Il s'agit de créer des liens entre les enzymes elles-mêmes ou avec un co-réticulant pour retenir les enzymes ensemble (figure 6). L'agent de réticulation le plus fréquemment utilisé est le glutaraldéhyde qui forme un lien entre deux fonctions amines des enzymes et ses deux extrémités aldéhyde. Généralement, la réticulation forme des agrégats insolubles de haute masse moléculaire. Les enzymes peuvent donc constituer le support en elles-mêmes ou être retenues à la surface d'un support par adsorption ou fonctionnalisation chimique [11]. La limite principale de cette méthode est que la formation d'un film trop épais (dense) nuit au transport du substrat, ce qui affecte la sensibilité.

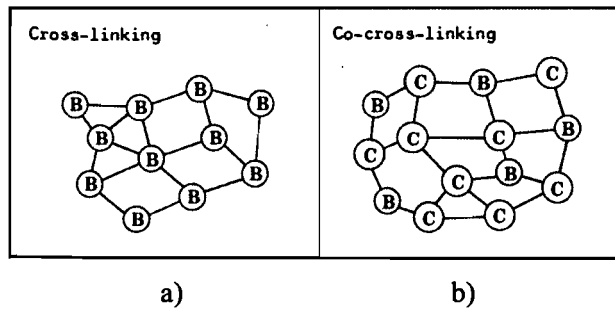


Figure 6. Immobilisation d'enzymes (représentées par B) par a) réticulation avec elle-même et b) co-réticulation avec un co-réticulant (représenté par C), tiré de la référence ^[9].

Les méthodes d'immobilisation par liaison ont donc comme désavantage commun la faible quantité d'enzymes qui peut être immobilisée sur le support, ce qui affecte la sensibilité. L'immobilisation par voie physique peut être une façon d'augmenter cette quantité.

1.2.2 Immobilisation par voie physique

1.2.2.1 L'inclusion dans une matrice

Parmi les méthodes d'immobilisation par voie physique, l'inclusion dans une matrice consiste à incorporer l'enzyme dans une matrice polymérique de type gel (figure 7) ^[9]. Le gel peut former des billes ou des fibres et peut être inerte (alginate) ou actif dans la transduction (polymère conducteur).

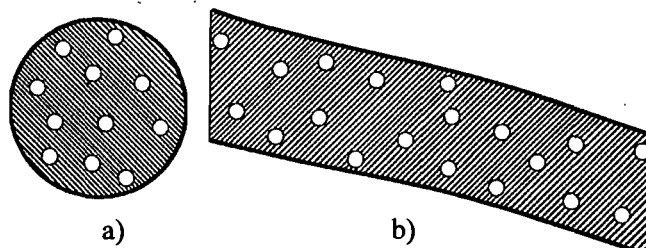


Figure 7. Inclusion d'enzymes (représentées par \circ) dans une matrice polymérique de type gel (représentée par ▨) sous forme a) de billes ou b) de fibres, adapté de la référence ^[9].

L'alginate est un polymère biocompatible inerte sur lequel la recherche pour immobiliser des enzymes est très active. La gélification de l'alginate de sodium est basée sur le remplacement des ions monovalents Na^+ par des ions bivalents Ca^{2+} (figure 8). Toutefois, les gels basés sur ce type de réaction peuvent être instables en présence d'ions de même charge que ceux requis pour la formation du gel ^[9]. En effet, les billes d'alginate qui sont durcies grâce aux ions Ca^{2+} sont sensibles à une concentration élevée en Na^+ qui crée une compétition avec les Ca^{2+} ce qui a pour effet de désintégrer graduellement les billes d'alginate. Les ions phosphates peuvent également désintégrer l'alginate réticulé ^[9]. Lorsque l'alginate est utilisé seul, les pores des billes ou des fibres sont trop grands pour retenir des molécules de la taille des enzymes (kDa) ^[9]. Il faut donc enrober les billes ou combiner d'autres polymères pour immobiliser des enzymes.

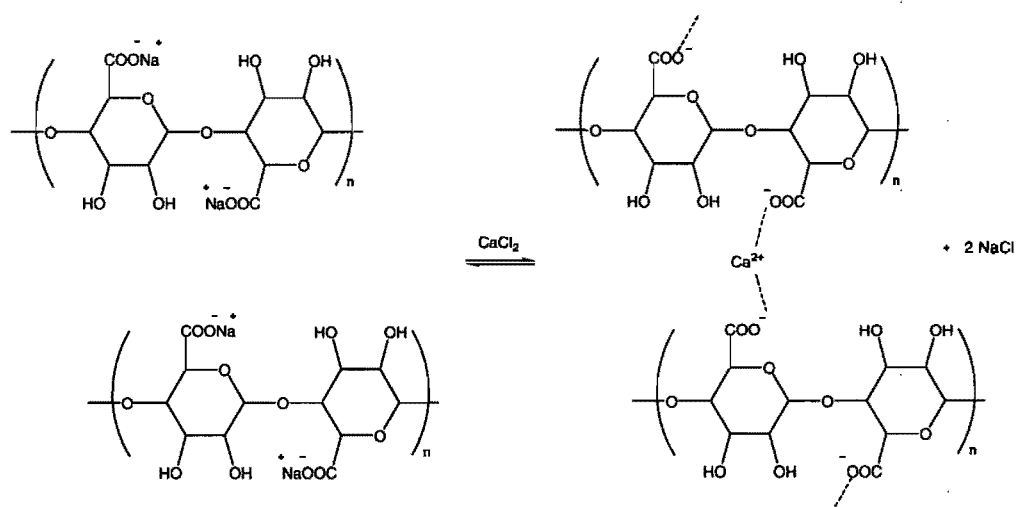


Figure 8. Réaction de gélification de l'alginate de sodium par échange d'ions. Le remplacement des ions Na^+ par les ions Ca^{2+} réticule le polymère via les fonctions carboxylates.

Au niveau des gels actifs, ceux-ci sont non seulement impliqués dans l'immobilisation des enzymes, mais également dans la transduction. Les polymères conducteurs en sont un bon exemple. Ils peuvent être utilisés pour les biocapteurs électrochimiques et les biopiles. Parmi les exemples à citer se trouvent les travaux de Mano et du groupe Heller qui utilisent des polymères redox sur lequel sont liés des complexes d'osmium afin d'immobiliser des enzymes dans les compartiments d'une biopile en plus de contribuer au transfert électronique ^[12]. Les travaux de Barrière portent également sur l'utilisation de polymères redox, cette fois-ci liés avec des complexes d'osmium et de ruthénium, afin d'immobiliser des enzymes et de contribuer au transfert électronique dans une biopile ^[13].

L'inclusion dans une matrice est une méthode qui permet d'immobiliser une grande quantité d'enzymes, mais la sensibilité des gels aux conditions extérieures est un désavantage. De plus, la mobilité des enzymes à l'intérieur des gels peut être limitée et l'accès des substrats au site actif également diminué. La conséquence sur un éventuel biocapteur est une faible sensibilité car l'inclusion dans une matrice ne contribue pas à maintenir l'enzyme à son maximum d'activité, comme il est possible de le faire grâce au confinement dans une membrane.

1.2.2.2 Le confinement dans une membrane

Le confinement dans une membrane consiste à placer l'enzyme dans une sphère creuse composée d'une membrane semi-perméable et d'une phase aqueuse interne (figure 9). La membrane peut être macro comme pour une membrane à dialyse ou micro comme avec des microcapsules. Cette méthode est aussi appelée microencapsulation. Les microcapsules peuvent être des micelles, des liposomes, ou faites à partir de polymère réticulé. Les microcapsules polymérisées ont commencé à être développées par Thomas Chang, de l'Université McGill, dans le but de créer des cellules artificielles ^[14]. Dans son premier article paru en 1964, les microcapsules sont utilisées afin de protéger les enzymes pour des applications *in vivo* ^[14], ce qui est encore un sujet très actuel aujourd'hui.

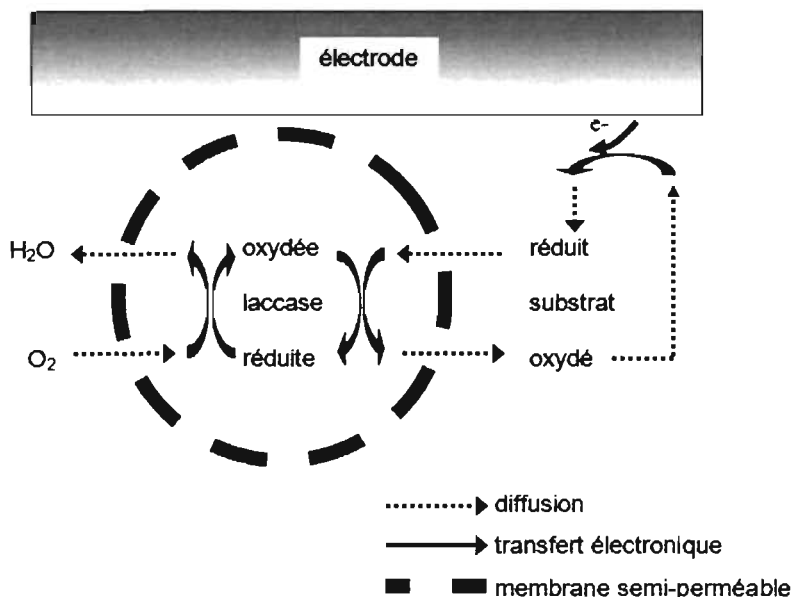


Figure 9. Immobilisation de la laccase par microencapsulation. La membrane semi-perméable permet au substrat de pénétrer à l'intérieur de la capsule pour réagir avec l'enzyme pour former le produit qui peut alors sortir de la capsule. Un biocapteur électrochimique pourrait fonctionner en mesurant le courant associé à la réduction du substrat à une électrode.

Grâce aux microcapsules, plusieurs problèmes liés aux autres méthodes d'immobilisation sont éliminés. L'enzyme ne subit pas de modification chimique qui

pourrait la désactiver et peut être immobilisée en grande quantité. Elle est d'ailleurs protégée par la microcapsule qui la maintient dans un microenvironnement favorable. Elle peut donc être immobilisée à proximité du transducteur afin de maximiser la sensibilité. Par ailleurs, la microencapsulation est une méthode d'immobilisation très polyvalente. En effet, les microcapsules permettent d'immobiliser différentes biomolécules et ce sur différents supports. La grande variété des polymères synthétiques et naturels disponibles permet aussi de fonctionnaliser la microcapsule en fonction du support. L'utilisation de polymères biocompatibles permet également des applications *in vivo*. Le contrôle de la taille et des pores des capsules contribue à l'adaptation de cette méthode selon l'application désirée. Cette méthode d'immobilisation a donc été choisie plutôt que les autres en raison des avantages qu'elle procure et parce qu'elle est très polyvalente.

La façon de préparer les microcapsules qui sera utilisée ici est la condensation interfaciale entre un polymère hydrosoluble et un agent réticulant soluble dans un solvant organique. Une microémulsion permet de former des gouttelettes d'eau à la périphérie desquelles le polymère est réticulé par l'agent réticulant en phase organique. Puisque la réticulation n'a lieu qu'à l'interface entre les deux phases, le résultat est une sphère creuse qui peut contenir un agent bioactif en solution. La membrane ainsi formée est semi-perméable et permet la diffusion de petites molécules (comme le substrat) sans toutefois laisser échapper l'enzyme ^[15]. Les détails de la synthèse utilisée seront donnés à la partie expérimentale (chapitre 2).

Pour étudier la microencapsulation comme méthode d'immobilisation, nous avons choisi d'utiliser les enzymes comme biomolécules à immobiliser. Certaines enzymes sont oxydo-réductrices, ce qui facilite leur étude par électrochimie et qui permet leur utilisation dans des biocapteurs électrochimiques. Les enzymes sont d'ailleurs très utilisées comme élément de reconnaissance dans les biocapteurs.

1.3 Les enzymes comme éléments de reconnaissance

Les enzymes sont des biomolécules produites par les organismes vivants. Elles peuvent être d'origine bactérienne, fongique, végétale ou animale. Elles sont synthétisées dans les cellules vivantes et remplissent des fonctions métaboliques intra ou extra cellulaires.

Les enzymes sont en fait des protéines. Elles sont composées de chaînes d'acides aminés reliés par des liens amides, aussi appelés liaisons peptidiques. La séquence des acides aminés constitue la structure primaire (figure 10a). Ces chaînes peuvent se replier de deux façons, soit en hélices α ou en feuillets β , qui représentent la structure secondaire (figure 10b). La structure tertiaire est la disposition tridimensionnelle qu'occupent les chaînes dans l'espace (figure 10c). Enfin, la structure quaternaire est l'arrangement des différentes sous-unités de la protéine retenues ensemble (figure 10d). La structure tertiaire est importante dans le rôle de reconnaissance moléculaire que jouent les enzymes, car elle est responsable de leur spécificité et de leur action catalytique.

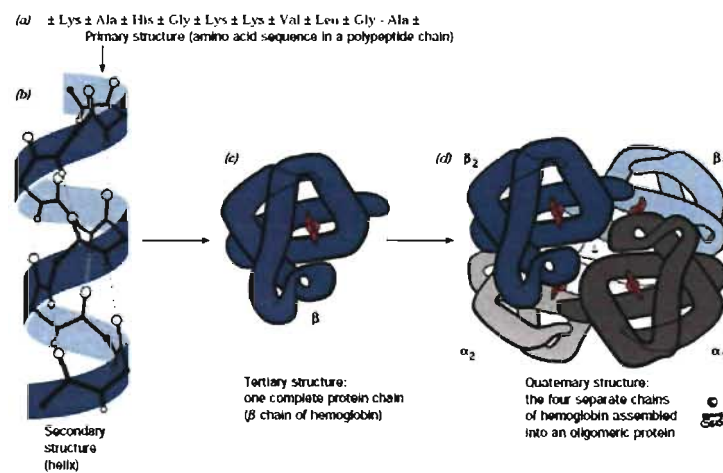


Figure 10. Structures des protéines. a) structure primaire (séquence des acides aminés), b) structure secondaire (repliement en hélice α ou feuillet β), c) structure tertiaire (disposition tridimensionnelle), d) structure quaternaire (arrangement des sous-unités). Illustration par Irving Geis ©, adaptée de la référence ^[16].

La reconnaissance moléculaire des enzymes leur permet de convertir certains substrats en produits grâce à leur site actif. Le site actif d'une enzyme est une région tridimensionnelle de celle-ci où le substrat s'associe préférentiellement pour être converti en produit. Le substrat s'associe à l'enzyme parce que son site actif est spécifique. Cette spécificité est le premier avantage d'utiliser les enzymes dans les biocapteurs parce qu'elle permet le dosage d'analytes dans des échantillons complexes. En effet, la nature du site actif des enzymes en fait des catalyseurs plus spécifiques que les catalyseurs chimiques ^[16]. La chiralité du site actif confère à certaines enzymes une stéréospécificité qui peut être très limitante (un seul substrat possible), comme pour les enzymes du métabolisme du glucose qui agissent seulement sur les résidus D-glucose ^[16]; ou plus étendue, comme pour la laccase dont il sera question plus loin, qui répond à plusieurs molécules ayant des structures similaires ^[16]. Dans tous les cas, la spécificité des enzymes est un avantage pour les biocapteurs, car ceci diminue la possibilité d'interférence sur le signal, diminue le nombre de produits de réactions secondaires et permet de limiter les étapes de préparation d'échantillon. Le deuxième avantage d'utiliser les enzymes comme éléments de reconnaissance est leur action catalytique.

Les enzymes sont en effet des catalyseurs qui accélèrent certaines réactions en abaissant l'énergie d'activation requise pour convertir un substrat en produit et, puisqu'elles sont des catalyseurs, sont régénérées à la fin de la réaction. Elles peuvent accélérer une réaction par plusieurs ordres de grandeur ($10^6 - 10^{12}$) comparativement aux réactions faites sans catalyseur ^[16]. Ceci diminue la quantité d'échantillon nécessaire et procure une réponse rapide. De plus, elles fonctionnent dans des conditions plus douces que les catalyseurs chimiques ^[16], ce qui en fait un bon choix comme élément de reconnaissance dans les biocapteurs.

Les enzymes sont donc des éléments de reconnaissance spécifiques dont la diversité permet un vaste éventail d'applications. En plus de ces avantages, les réactions catalysées par certaines enzymes impliquent des transferts électroniques comme c'est le cas pour la glucose oxydase (présentée précédemment), la fumarate

réductase et la laccase entre autres. Cette caractéristique permet d'utiliser les enzymes avantageusement pour des biocapteurs électrochimiques. La diversité des enzymes est très grande et la liste des enzymes utiles pour les biocapteurs est longue. Des bases de données enzymologiques, comme BRENDA par exemple, répertorient environ 3500 enzymes différentes. Dans le cadre de ce projet, deux enzymes ont été choisies pour étudier la microencapsulation comme méthode d'immobilisation et l'appliquer à un système concret. Il s'agit de la laccase et de la phosphatase alcaline.

1.3.1 La laccase

La laccase appartient à la classe des oxydoréductases. Elle réduit l'oxygène lors de la conversion du substrat. Son site actif est composé d'ions de cuivre qui contribuent à oxyder ses différents substrats (figure 11). Les quatre ions de cuivre sont classés selon trois types qui dépendent de leur environnement (ligands) dans l'enzyme et de leur fonction, car chaque type de cuivre est impliqué dans un processus différent de la conversion du substrat ^[17]. L'oxydation du substrat a lieu à l'emplacement du cuivre de type 1 (Cu_{T1}), puis le transfert électronique se fait via l'enzyme jusqu'au site des cuivre de type 2 et 3 (Cu_{T2} et Cu_{T3}) où la réduction de l'oxygène en eau a lieu ^[18].

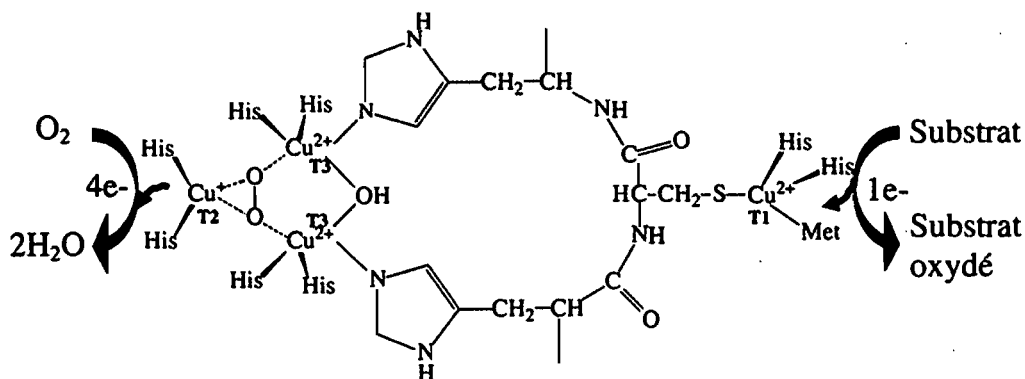


Figure 11. Composition chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique, adapté de la référence ^[17].

La laccase est connue pour son action sur les molécules phénoliques ^[19], les hydrocarbures polycycliques aromatiques ^[20] et les biphenyl polychlorés ^[21]. Le dosage des phénols est important au niveau environnemental puisque ces molécules sont souvent des produits secondaires de la production industrielle de même que de l'utilisation anthropique de médicaments, colorants, antioxydants, pâte à papier et pesticides ^[19]. Pour cette raison, les biocapteurs à base de laccase sont utiles pour l'analyse d'échantillons environnementaux complexes. Le dosage repose sur la conversion de l'analyte par l'enzyme. Pour un biocapteur ampérométrique, le phénol oxydé par l'enzyme est réduit à l'électrode et le courant mesuré est représentatif de la quantité de phénol en solution (figure 12).

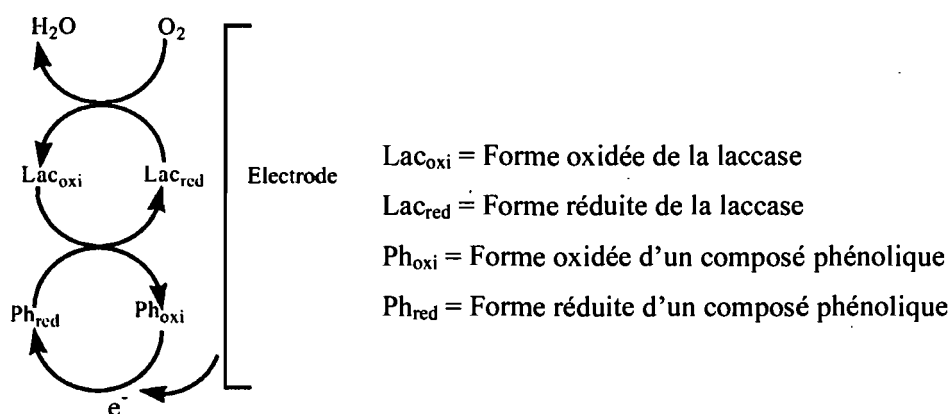


Figure 12. Schéma de biocapteur ampérométrique de la laccase, tiré de la référence ^[19].

La laccase peut également être utilisée pour des biocapteurs de poisons respiratoires, comme l'azoture de sodium ^[22]. La détection repose sur l'inhibition du site réactionnel T2/T3. Ainsi, une électrode modifiée avec la laccase permet de doser l'azoture de sodium d'après la baisse du courant catalytique mesurée en présence d'oxygène et d'un médiateur ^[22].

Les oxydoréductases sont donc très pratiques pour les biocapteurs électrochimiques. Toutefois, d'autres classes d'enzymes peuvent aussi être utilisées dans les biocapteurs vu la vaste possibilité de transducteurs. La phosphatase alcaline, qui est une hydrolase, en est un exemple.

1.3.2 La phosphatase alcaline

Comme les autres hydrolases, la phosphatase alcaline (APase) utilise l'eau pour rompre certaines liaisons. Son site actif est composé entre autre de deux atomes de zinc. Le substrat se lie à l'emplacement du zinc de type 1 (Zn_1) et le zinc de type 2 (Zn_2) fait un lien de coordination avec un groupement phosphate du substrat. L'hydrolyse a lieu via le Zn_2 et le résidu sérine voisin (figure 13) [23]. Le résultat est la formation d'une fonction alcool à la place du phosphate. Cette enzyme est peu spécifique, ce qui veut dire qu'elle peut hydrolyser plusieurs esters-phosphates différents. Toutefois, certains articles montrent le potentiel de cette enzyme sur d'autres substrats.

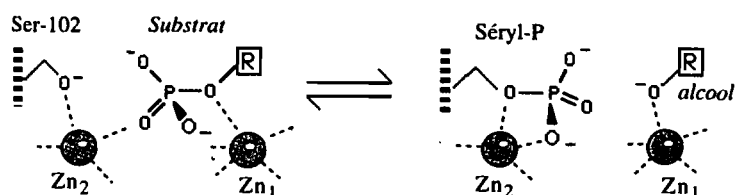


Figure 13. Portion du site actif de la phosphatase alcaline montrant les atomes de Zn impliqués dans l'hydrolyse d'un ester-phosphate, tiré de la référence [23].

Un article de Yoza paru en 1997 montre la possibilité d'utiliser la phosphatase alcaline pour couper le lien P-F du monofluorophosphate (MFP) (figure 14) [24], une molécule apparentée à l'*o*-isopropyle méthylphosphonofluoridate, aussi connu sous le nom de gaz sarin. Si la réaction entre l'APase et le MFP indique la possibilité de l'utiliser pour décomposer le sarin afin d'en diminuer la toxicité, l'utilisation de cette enzyme est envisageable comme élément de reconnaissance dans un biocapteur. Cette réaction sera donc utilisée à la section 6.2 pour évaluer le potentiel de l'APase pour la détection d'agents neurotoxiques. De plus, cette enzyme est disponible commercialement et possède une bonne stabilité.

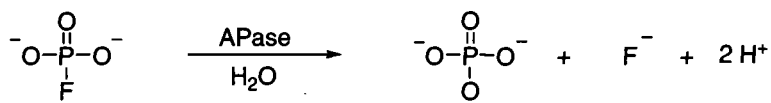


Figure 14. Équation de l'hydrolyse du MFP catalysée par l'APase.

Afin d'évaluer le potentiel de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation d'enzymes, il faut entre autre en évaluer les impacts sur l'enzyme. À cette fin, l'activité enzymatique ainsi que la cinétique enzymatique sont des bons moyens pour comparer le comportement de l'enzyme libre avec celui de l'enzyme encapsulée.

1.3.3 L'activité enzymatique

L'activité enzymatique est un paramètre clé de la caractérisation d'une enzyme au niveau de la catalyse. Elle représente la portion des enzymes qui sont réellement actives par rapport à un substrat donné et est exprimée en unités (U). La concentration d'enzymes, quant à elle, représente la quantité totale d'enzymes en solution et est exprimée en M ou mg de protéine/L. Autrement dit, ce n'est pas la quantité totale d'enzymes en solution qui est nécessairement sous forme active. Pour cette raison, la mesure de l'activité est une meilleure référence que la concentration totale d'enzymes pour une application pratique. L'activité d'une enzyme est habituellement déterminée par rapport à un substrat précis dans des conditions de pH et de température déterminées.

1.3.3.1 Activité de la laccase

Pour la laccase, le substrat de référence est le 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS) dont la réaction d'oxydoréduction est présentée (figure 15). La forme oxydée (ABTS^{•+}) a un maximum d'absorption à 420 nm ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [25] et des mesures spectrophotométriques peuvent être utilisées pour le calcul d'activité de l'enzyme libre. L'activité est exprimée en unités selon qu'une unité (1 U) est définie comme étant la quantité d'enzymes nécessaire pour oxyder 1 μmol d'ABTS par minute. L'activité volumique d'une solution de laccase peut être calculée selon l'équation 1 à partir de mesures spectrophotométriques de l'ABTS oxydé.

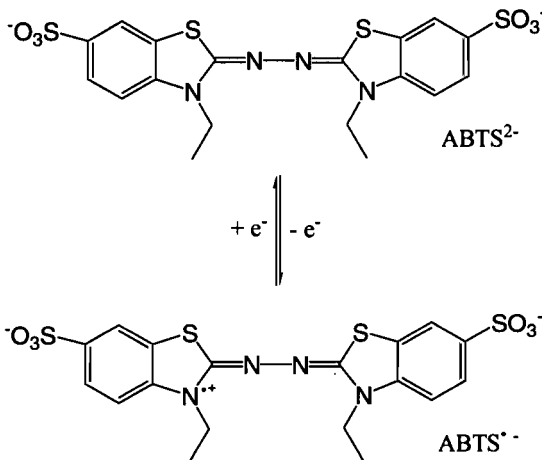


Figure 15. Structures des formes réduite (ABTS^{2-}) et oxydée ($\text{ABTS}^{\bullet-}$) de l'ABTS, tiré de la référence ^[26].

$$\text{Activité} = \frac{\frac{\partial A}{\partial t} V_c \cdot 1 \times 10^6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mol}}}{\epsilon \ell V_{\text{enz}}} \quad (1)$$

où $\frac{\partial A}{\partial t}$ = variation de l'absorbance de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ en fonction du temps (Abs/min)

V_c = volume de la cellule de mesure (L)

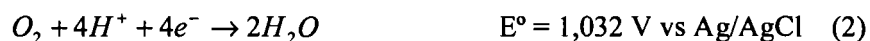
ϵ = coefficient d'absorptivité molaire de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

ℓ = chemin optique (cm)

V_{enz} = volume de la solution d'enzyme purifiée dans cellule (mL)

Pour ce qui est de l'activité de la laccase encapsulée, la mesure d'activité par spectrophotométrie permet difficilement une analyse quantitative puisque les capsules en suspension créent une solution turbide, ce qui fausse le résultat d'absorbance. La mesure de la consommation d'oxygène est toutefois possible pour une enzyme réductase comme la laccase.

Grâce à une électrode à membrane sélective, il est possible de mesurer la quantité d'oxygène consommée en fonction du temps. Cette membrane perméable aux gaz laisse passer l'oxygène qui est automatiquement réduit en eau grâce à l'application d'un potentiel suffisamment négatif (-0,6 V vs Ag/AgCl) à l'électrode de travail (équation 2).



La réaction d'oxydation complémentaire a lieu à l'électrode Ag/AgCl (réaction 3).



Le courant associé à la réduction de l'oxygène est proportionnel à la pression d'oxygène, qui est elle-même reliée à sa concentration (équation 4). Ainsi, une baisse de la concentration d'oxygène dans la cellule induit une diminution du courant électrique qui peut être traduite en consommation du substrat par la laccase. En pratique, l'électrode est d'abord calibrée d'après une solution d'eau saturée en air pour laquelle la concentration en oxygène est connue. Cette concentration correspond alors au 100 %. Les données obtenues en pourcentage d'oxygène sont converties en concentration d'oxygène d'après la valeur du 100%. Cette méthode peut être appliquée à la fois pour les mesures d'activité de la laccase libre et celles de la laccase encapsulée. Pour l'enzyme encapsulée, les unités de l'activité deviennent des $\mu\text{mol substrat} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg capsules})^{-1}$.

$$i_d = \frac{4F \cdot P_m \cdot A \cdot P(O_2)}{b} \quad (4)$$

où F = constante de Faraday ($96\,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 P_m = perméabilité du téflon à O_2 ($\text{mol} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 A = aire de l'électrode (cm^2)
 $P(O_2)$ = pression d'oxygène (atm)
 b = épaisseur du téflon (cm)

1.3.3.2 Activité de la phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline libre peut être mesurée par spectrophotométrie selon la conversion du substrat *p*-nitrophényl phosphate en *p*-nitrophénol (figure 16) qui a un maximum d'absorption à 405 nm, dans un tampon diéthanamine 5mM pH 9,8.

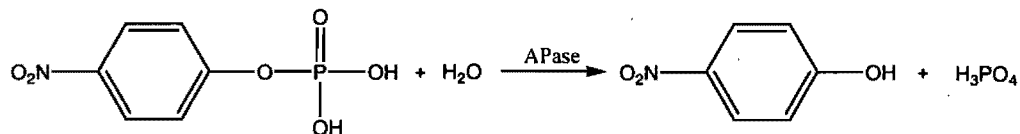


Figure 16. Réaction d'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate catalysée par l'APase.

Pour cette enzyme encapsulée, la mesure de consommation d'oxygène ne s'applique pas. Il faut donc adapter la mesure d'activité en fonction des substrats hydrolysés afin d'éviter les problèmes dus aux solutions turbides des capsules qui nuisent à la mesure par spectrophotométrie. Dans cette étude, la phosphatase alcaline est utilisée pour hydrolyser le monofluorophosphate (MFP), ce qui produit des ions fluorures, ainsi l'activité peut être mesurée par électrochimie grâce à une électrode sélective aux ions fluorures.

En plus de l'activité enzymatique, d'autres paramètres cinétiques peuvent être considérés pour évaluer la microencapsulation comme méthode d'immobilisation d'enzymes. Une des lois les plus fondamentale en cinétique enzymatique est celle de Michaelis-Menten.

1.3.4 Loi de Michaelis-Menten

Selon la loi de Michaelis-Menten, le processus de conversion d'un substrat par une enzyme est le suivant : dans une première étape rapide, une enzyme (E) et un substrat (S) s'associent via le site actif de l'enzyme pour former un complexe enzyme-substrat (ES), puis le substrat est converti en produit (P) puis, relâché (figure 17). L'enzyme revient alors à son état initial (régénération du catalyseur).

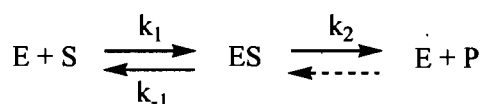


Figure 17. Équation d'une réaction enzymatique de type Michaelis-Menten, tiré de la référence ^[23].

La vitesse totale de la réaction dépend donc de ces deux étapes. De façon générale, la constante k_2 est beaucoup plus faible que k_1 ($k_2 \ll k_1$), ce qui veut dire que la transformation en produit est l'étape limitante par rapport à l'association entre le substrat et l'enzyme.

Au début de la réaction, c'est-à-dire lorsque le substrat est mis en contact avec l'enzyme, il n'y a pas encore de produit formé. Dans ces conditions, la constante inverse de k_2 peut être négligée, et la constante de vitesse totale devient alors $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ (exprimée en s^{-1} ou min^{-1}). La vitesse mesurée dans ces conditions est appelée vitesse initiale. La plupart du temps, les réactions enzymatiques suivant la loi de Michaelis-Menton sont étudiées dans les conditions de vitesse initiale où la conversion du substrat varie linéairement selon le temps.

La vitesse totale du processus dépend également de plusieurs facteurs dont la concentration de substrat, la quantité d'enzymes actives ainsi que des conditions expérimentales. Une enzyme a toutefois une vitesse maximale qu'elle ne peut pas dépasser (V_{max}) pour un substrat donné dans des conditions expérimentales définies. Lorsqu'il y a peu de substrat, la quantité de substrat convertit par unité de temps est faible puisqu'elle est limitée par les rencontres enzyme/substrat. Puis, plus la concentration de substrat est élevée, plus la vitesse de réaction est grande jusqu'à atteindre un plateau. À ce moment, la concentration de substrat n'a plus d'influence sur la vitesse de la réaction. L'enzyme est saturée en substrat et la vitesse est limitée par l'enzyme elle-même. La loi de Michaelis-Menten (équation 5) suit une relation hyperbolique selon laquelle la vitesse dépend de la concentration de substrat ainsi que de la constante d'affinité (K_M) entre le substrat et l'enzyme (figure 18).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

où v = vitesse initiale (mol/s)
 V_{max} = vitesse maximale (mol/s)
 $[S]$ = concentration du substrat (M)
 K_M = constante de Michaelis-Menten (M)

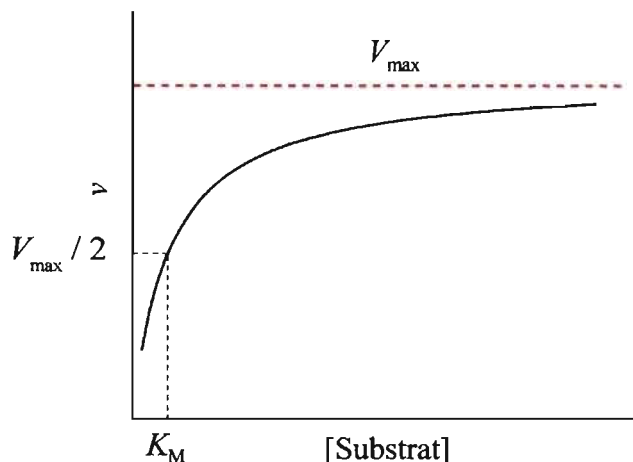


Figure 18. Allure de la courbe de Michaelis-Menten.

Un premier élément à vérifier au niveau de l'immobilisation est de voir si la réaction avec l'enzyme encapsulée suit l'allure de la courbe de Michaelis-Menten. Puis, la constante de Michaelis-Menten ainsi que la vitesse maximale pourront être comparées avec celles de l'enzyme libre. La constante K_M est un indicateur de l'affinité entre le site actif et le substrat. Plus elle est petite, plus cette affinité est grande, c'est-à-dire qu'il faut moins de substrat pour obtenir la moitié de la vitesse maximale. La variation du K_M pour des enzymes immobilisées peut être étudiée pour déterminer les changements dans l'environnement de l'enzyme. Quant à la vitesse maximale, elle tient compte de tous les phénomènes en solution qui influencent l'accès au site actif ce qui permet des conclusions par rapport à l'effet des capsules sur la réaction enzymatique. Ce traitement permettra donc d'évaluer la microencapsulation comme méthode d'immobilisation pour des applications pratiques.

Comme il en a déjà été fait mention, la laccase fut d'abord immobilisée sur des électrodes afin de vérifier le potentiel de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation pour des biocapteurs électrochimiques. Dans un deuxième temps, la laccase encapsulée fut immobilisée sur du papier dans le cadre d'un projet sur les papiers bioactifs.

1.4 Les papiers bioactifs

La littérature sur les papiers bioactifs est encore limitée à ce jour [1, 27, 28], même si le papier comporte plusieurs avantages comme support pour le biocapteur. Ce matériau peut prendre plusieurs formes. Il peut être utilisé en bandelettes, en serviettes, en masque de protection, etc. Il peut aussi être conservé avec ou sans humidité. Et, couplé avec une détection colorimétrique, le papier pourrait permettre la création de dispositifs petits, légers, portatifs et à usage unique, utilisables sur le terrain. Mais l'idée d'utiliser le papier comme support vient principalement du fait que celui-ci est très répandu. La fonctionnalisation du papier avec des biomolécules actives permettrait ainsi de créer un produit avec une valeur ajoutée. Cette philosophie est d'ailleurs celle du réseau canadien SENTINEL.

1.4.1 Le réseau SENTINEL

Le réseau canadien de recherche sur les papiers bioactifs, SENTINEL, a vu le jour en septembre 2005. Il réunit des membres académiques, industriels et gouvernementaux qui oeuvrent dans différents domaines des sciences biologiques, des matériaux et des surfaces afin d'unir les efforts pour l'élaboration et la commercialisation de papiers bioactifs. Notre groupe de recherche fait partie de ce réseau où notre but est de développer une plateforme d'immobilisation de biomolécules pour le papier. La microencapsulation d'enzymes servira donc à démontrer le potentiel de cette méthode d'immobilisation.

Afin de mieux comprendre le concept de papiers bioactifs, voyons un exemple récent.

1.4.2 Exemple d'un papier bioactif

Le groupe de Whitesides a développé une plateforme d'essai enzymatique sur le papier ^[27]. Le système permet de détecter le glucose et les protéines dans 5 μ L d'urine et ce, sans besoin de réactif supplémentaires ni de source d'énergie externe. Le papier est d'abord exposé à une solution photorésistante pour imprimer un patron hydrophobe qui délimite l'écoulement des solutions dans des zones hydrophiles prédéterminées (figure 19). Le glucose est dosé par une réaction enzymatique combinée. La glucose oxydase convertit le glucose en acide gluconique et produit du peroxyde d'hydrogène (figure 2). Ce peroxyde est par la suite réduit en eau par la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*) qui oxyde simultanément l'iodure en iode. Cette dernière réaction produit une coloration brune. Le dosage de protéine est basé sur le changement de couleur du bleu de tétrabromophénol lorsqu'il se lie aux protéines (figure 19) ^[27]. Cet exemple illustre à quel point ce genre de dispositifs peut être utile sur le terrain vu sa miniaturisation (1cm).

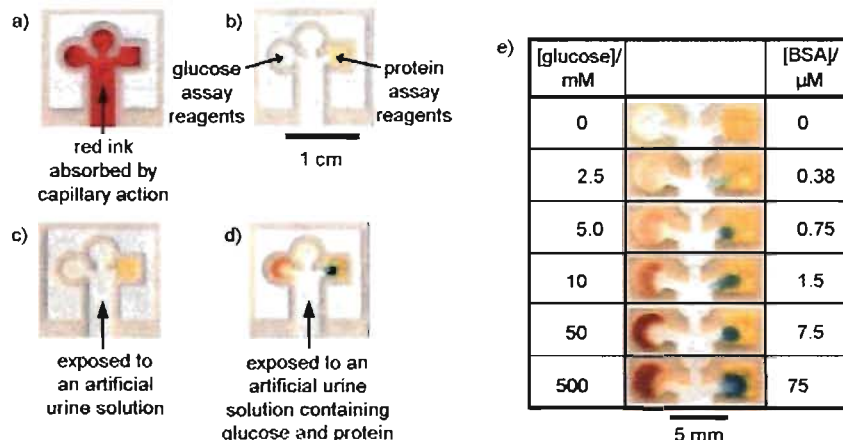


Figure 19. Dosage du glucose et des protéines sur papier bioactif. Les zones foncées ont été traitées avec une solution photorésistante, alors que les zones claires ne sont pas traitées. a) Absorption par capillarité d'une encre Waterman rouge (5 μ L) selon le patron du papier. L'échantillon est absorbé par capillarité au centre et est dirigé dans trois zones distinctes selon le patron. b) Essai complet après déposition des réactifs. La zone circulaire à gauche est celle du dosage du glucose et celle carrée à droite est celle du test de protéines. La zone circulaire centrale sert de contrôle. c) Contrôle négatif de glucose (gauche) et de protéines (droite) fait avec une solution d'urine artificielle (5 μ L). d) Essai positif du glucose (gauche) et de protéines (droite) fait avec une solution d'urine artificielle contenant 550 mM de glucose et 75 μ M d'albumine de sérum bovin (BSA). e) Détection et dosage du glucose et des protéines réalisée avec différentes concentrations de glucose et de BSA, tiré de la référence ^[27].

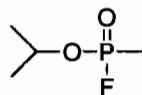
En plus de démontrer l'utilité de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation, nous jugeons également essentiel d'appliquer la détection enzymatique à un problème concret et d'intérêt. À cette fin, la détection d'agents neurotoxiques semble une voie intéressante.

1.5 L'intérêt pour les agents neurotoxiques

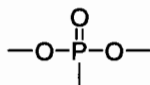
La décomposition et/ou détection d'agents neurotoxiques est une application pratique pour les enzymes. Les agents neurotoxiques sont des molécules hautement toxiques qui affectent la transmission de l'influx nerveux. Ils bloquent la transmission synaptique ce qui a pour effet de cesser l'activité musculaire du corps, incluant celle des muscles des poumons et du cœur ^[29]. Ces molécules sont donc extrêmement

létales pour l'homme d'autant plus que leur action est rapide. Pour cette raison, ils ont été utilisés comme arme chimique dans certains attentats terroristes. L'attentat au gaz sarin du métro de Tokyo en 1995 est l'exemple le plus connu d'emploi d'agents neurotoxiques comme arme chimique^[30]. La toxicité de ces molécules et leur action rapide exigent des moyens de détection ou de protection à action rapide. Ceci pourrait être atteint grâce à des biocapteurs électrochimiques portatifs ou encore des masques fabriqués à partir de papier bioactifs.

Les agents neurotoxiques peuvent être classés en différentes catégories selon leur structure. La première classe est celles des agents G, nommée selon la nationalité allemande de leur inventeur (en anglais *German*). Elle inclut le tabun (GA), le sarin (GB), le soman (GD) et le cyclosarin (GF)^[31]. Il y a également les agents de type V (V pour *venomous* en anglais) auxquels appartient le VE, VG, VM et le VX. La toxicité de ces agents est environ 10 fois plus grande que celle de la classe G^[31]. Vu leur toxicité, il est d'ailleurs préférable de travailler avec des composés modèles qui ont une structure similaire, mais dont la toxicité est beaucoup moins grande. Les figures 20 et 21 montrent la structure de quelques agents neurotoxiques ainsi que de leurs composés modèles.

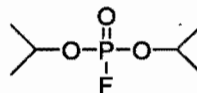


Sarin (GB)

Composés modèles

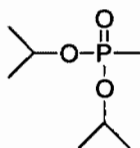
DMMP

dimethyl methylphosphonate



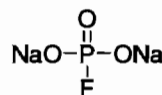
DFP

diisopropyl fluorophosphonate



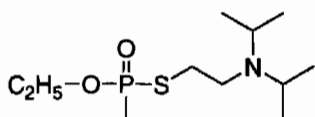
DIMP

diisopropyl methylphosphonate

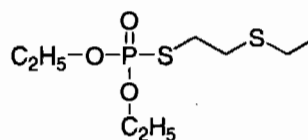


MFP

monofluorophosphate

Figure 20. Structures du sarin et de ses composés modèles.**Composé modèle**

VX



Demeton-S

Figure 21. Structures du VX et de son composé modèle le Demeton-S.

En résumé, nous avons vu que les biocapteurs sont des méthodes de détection complémentaires aux méthodes d'analyse conventionnelles principalement parce qu'ils sont sélectifs, généralement portatifs et peuvent donc être utilisés sur le terrain. Parmi les biomolécules pouvant être utilisées comme agent de reconnaissance, les enzymes sont avantageuses parce qu'elles sont sélectives et catalytiques. Toutefois, le développement des biocapteurs est limité par l'immobilisation et la fragilité des enzymes, puisque celles-ci peuvent être facilement désactivées. Dans ce contexte, la microencapsulation est une approche novatrice qui permettrait d'immobiliser des enzymes sur des supports tout en les protégeant du milieu extérieur de façon à maintenir leur activité. Afin de démontrer le potentiel de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation, nous avons d'abord préparé et caractérisé les microcapsules nécessaires à l'immobilisation. Puis, nous avons évalué l'impact de la microencapsulation sur le comportement des enzymes d'après les paramètres de cinétique enzymatique. Par la suite, nous avons immobilisé la laccase sur des électrodes afin de l'appliquer aux biocapteurs électrochimiques. Parallèlement, nous avons aussi immobilisé la laccase sur du papier afin de développer des papiers bioactifs. Cette deuxième application illustre également la polyvalence de cette méthode puisqu'elle permet d'immobiliser des enzymes sur différents supports. Finalement, nous avons tenté d'utiliser les enzymes laccase et phosphatase alcaline afin de détecter des molécules d'intérêt, soit des agents neurotoxiques.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1 *Microencapsulation des enzymes*

2.1.1 *Préparation des microcapsules*

Les microcapsules utilisées pour encapsuler la laccase et la phosphatase alcaline ont été préparées selon une procédure élaborée par le groupe de Poncelet ^[32]. Elles sont composées de polymère réticulé par polymérisation interfaciale. Le polymère hydrosoluble est le polyéthylèneimine (PEI) et l'agent réticulant en solution organique est le dichlorure de décanedioyle. Celui-ci réagit avec les fonctions amines primaires et secondaires du polymère selon une réaction d'addition-élimination (figure 22). Les ions chlorures sont éliminés par lavage avec l'eau. L'agent émulsifiant est le monooléate de sorbitan (Span[®]80) ; le solvant organique est le cyclohexane et l'eau utilisée est de qualité millipore. Tous les produits chimiques utilisés ont été achetés chez Sigma-Aldrich ou VWR. La formation des microgouttelettes a été atteinte de deux façons, soit par une microémulsion obtenue par agitation mécanique ainsi qu'avec un microencapsulateur commercial (modèle IE-50 R) de la compagnie Inotech[®].

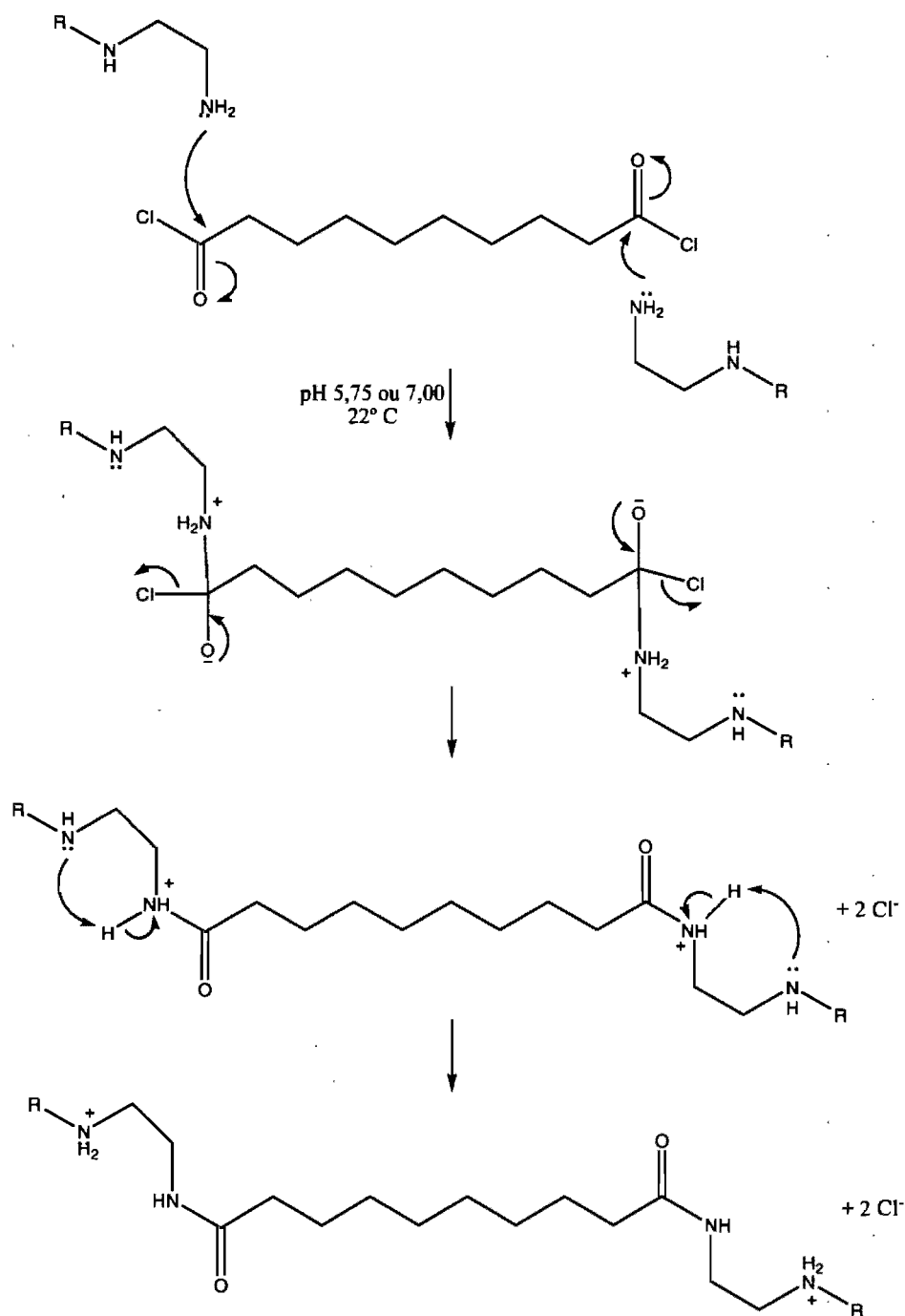


Figure 22. Réticulation des fonctions amines du PEI par le dichlorure de décanedioyle.

2.1.1.1 Préparation des microcapsules avec agitation mécanique par hélice

La phase aqueuse (10 mL, eau pure ou tampon phosphate pH 5,75) contenant le polymère, (1 mL, PEI $M_w = 1300$, 50 % (m/m)) et l'enzyme (laccase, 0,6 mL, ~ 4000 U/mL vs ABTS) est dispersée dans le cyclohexane (50 mL, 2 % (v/v) Span[®]80) sous agitation mécanique par hélice pendant 2 minutes (figure 23). Le dichlorure de décanedioyle ($2,3 \times 10^{-3}$ mol) dissout dans le cyclohexane (20 mL) est ajouté et l'émulsion est agitée pendant 10 minutes. Du cyclohexane additionnel (50 mL) est ajouté, puis la préparation repose 7 minutes. Le surnageant est jeté et du cyclohexane (50 mL) est rajouté. Les microcapsules obtenues sont rincées avec une solution de polysorbate 20 aussi appelé Tween[®]20 (50 mL, 1% (v/v)) puis 150 mL d'eau est ajouté. Les capsules sont ensuite filtrées et lavées avec de l'eau, puis du cyclohexane. Les capsules sont conservées à 4°C ou lyophilisées. L'agitateur mécanique utilisé est de marque Canlab Caframo de Wiarion, ON, et la vitesse de rotation de l'hélice est 1640 t/min.

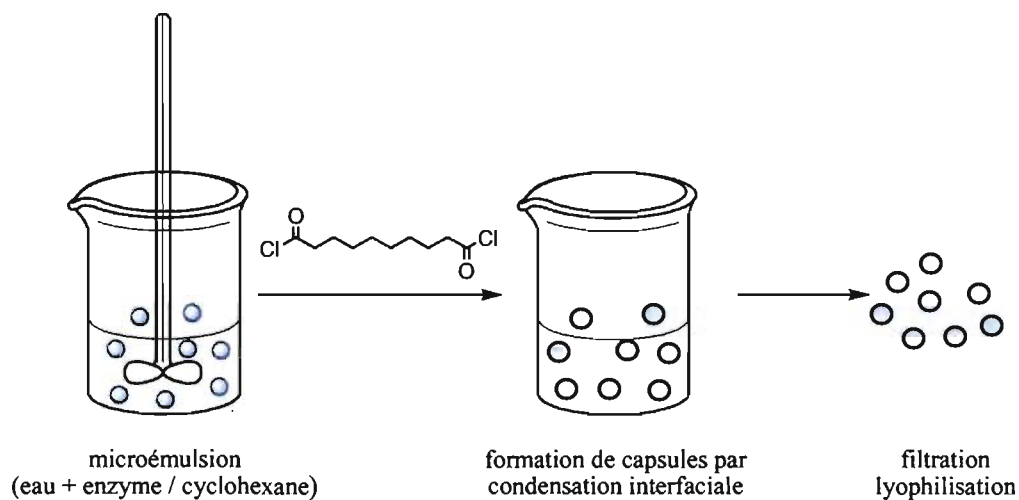


Figure 23. Schéma de la formation des microcapsules grâce à une microémulsion générée par une hélice.

2.1.1.2 Préparation des microcapsules avec le microencapsulateur

Le principe de formation des gouttelettes repose sur la vibration de la solution qui traverse une buse de faible diamètre ($d_D = 100 \mu\text{m}$). La solution s'écoule de façon constante à travers la buse ce qui en fait un jet laminaire, c'est-à-dire qui est régulier dans l'espace et le temps. Lorsqu'une fréquence (f) est appliquée à ce jet, celui-ci se brise pour former des gouttelettes de diamètre uniforme (d_r) (figure 24).

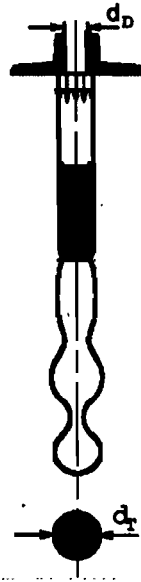


Figure 24. Schéma de la formation de microgouttelettes par vibration d'une solution passant à travers une buse de faible diamètre (d_D). Lorsque qu'un jet laminaire s'écoulant à une vitesse (v_j) est soumis à une fréquence (f), il se brise pour former des gouttelettes de diamètre (d_r), adapté de la référence ^[33].

Le diamètre des microgouttelettes (d_r) dépend du débit (V') ainsi que de la fréquence appliquée (f) selon l'équation 6, où le débit est lui-même dépendant de la vitesse d'écoulement (v_j) et du diamètre de la buse (d_D) (équation 7).

$$d_r = \sqrt[3]{\frac{6V'}{\pi f}} \quad (6)$$

$$V' = \frac{\pi v_j d_D^2}{4} \quad (7)$$

où d_r = diamètre des microgouttelettes (m)
 V' = débit (m³/s)
 f = fréquence (Hz)
 v_j = vitesse d'écoulement (m/s)
 d_D = diamètre de la buse (m)

Les microgouttelettes ainsi formées sont dispersées grâce à un champ électrique appliqué avant de tomber dans le becher de réaction. Dans ce cas-ci, la phase aqueuse contenant le polymère ainsi que l'enzyme est placée dans la seringue et s'écoule à travers la buse pour tomber dans la phase organique contenant le surfactant et l'agent réticulant (figure 25). La réaction de réticulation se produit donc au niveau du becher de réaction. Les proportions utilisées pour la préparation de microcapsules sont les mêmes que celles de la préparation par agitation mécanique. Les microgouttelettes sont récupérées dans un plus grand volume de phase organique (100 mL). Les paramètres affectant la formation des capsules sont le diamètre de la buse, le débit d'écoulement du liquide, la fréquence de vibration appliquée, la viscosité de la solution, le temps de réaction ainsi que les proportions des agents réticulant et tensioactifs.

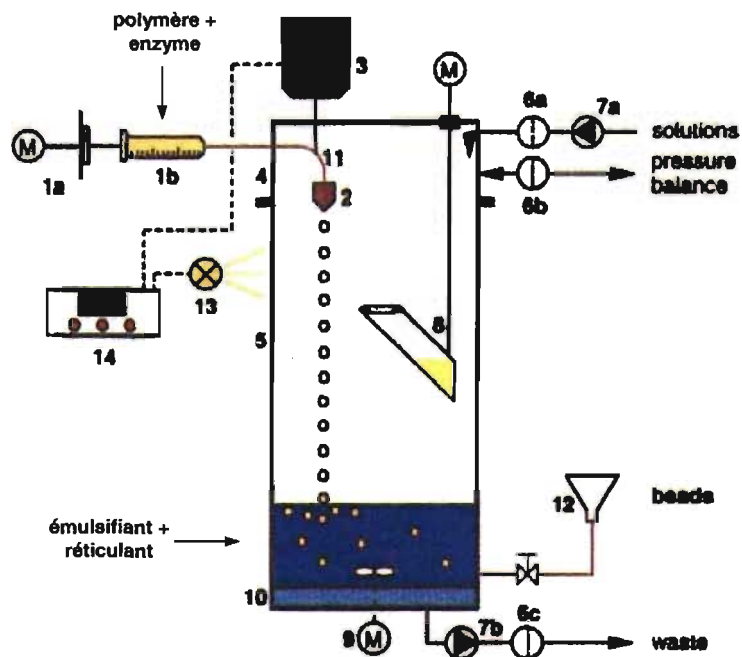


Figure 25. Schéma de l'encapsulateur (modèle IE-50 R) d'Inotech®. 1a) pompe pour seringue, 1b) seringue, 2) buse, 3) unité vibrationnelle, 4) unité de pulsation, 5) bécher de réaction, 6 a,b,c) filtres stériles, 7a,b) pompes péristaltiques, 8) unité de collection accessoire, 9) barreau magnétique, 10) unité de filtration, 11) capillaire, 12) bécnet de récupération, 13) lumière stroboscopique, 14) générateur de fréquence, adapté de la référence^[33].

2.2 Caractérisation des capsules

2.2.1 Forme des microcapsules

La forme des microcapsules a été évaluée grâce à des photos prises par microscopie optique avec un microscope Zeiss ou Leica. Ces photos ont initialement permis d'évaluer la taille moyenne des microcapsules, mais cette méthode était fastidieuse et peu représentative statistiquement. Nous avons donc opté pour une méthode basée sur la diffraction de la lumière afin de mieux quantifier la taille moyenne et la distribution de taille des microcapsules que nous avons préparées.

2.2.2 Distribution de taille par diffraction de la lumière

La distribution de taille des microcapsules a été évaluée selon la diffraction de la lumière. Lorsqu'une petite particule est exposée à un rayon lumineux, une partie de cette lumière incidente est redirigée selon un processus appelé diffraction (figure 26) [34]. Le patron de diffraction dépend de plusieurs caractéristiques de la particule, dont sa taille, sa forme, son orientation, sa composition et sa structure [34]. Dans le cas où la taille des particules est inférieure à la longueur d'onde utilisée, la loi de Rayleigh s'applique. Si la taille des particules est proche de la longueur d'onde utilisée, c'est plutôt le modèle de Mie qui s'applique, tandis que si la taille des particules est supérieure à la longueur d'onde, la loi de Fraunhofer s'applique. Dans ce cas-ci, les microcapsules mesurées ont entre 10 et 200 μm de diamètre, ce qui est nettement supérieur aux longueurs d'onde des lasers utilisés (655 et 405 nm), ce qui nous place dans la loi de Fraunhofer. La diffraction de Fraunhofer est aussi appelée diffraction en champ lointain ou à l'infini [35].

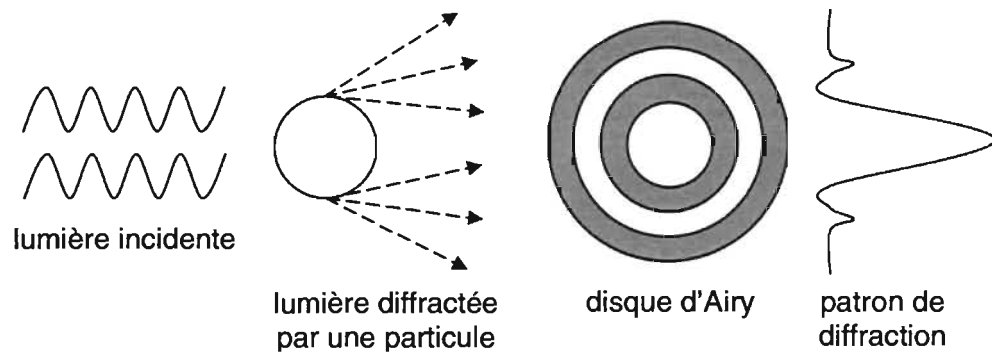


Figure 26. Diffraction de la lumière qui frappe une particule de taille inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente. Chaque frontière physique de la particule agit alors comme une nouvelle source de lumière ponctuelle et le patron de diffraction produit dépend des propriétés de la particule.

Selon cette loi, une particule de diamètre (d) produit un patron de diffraction selon le disque de Airy. Les petites particules produisent un patron de faible intensité selon des angles de diffraction plus grands que pour une particule plus grosse qui produit un patron de diffraction plus intense selon des angles plus petits. En mesurant

l'intensité de la lumière diffractée à différents angles de l'échantillon, la taille peut être trouvée d'après les équations 8 et 9.

$$d = \frac{n\lambda}{\sin \theta} \quad (8)$$

où d = diamètre de la particule
 n = ordre de diffraction
 λ = longueur d'onde de la lumière
 θ = angle de diffraction

$$I(\theta) = I_0 \left(\frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right)^2 \quad (9)$$

où $I(\theta)$ = intensité du rayon diffracté à l'angle θ
 I_0 = intensité du rayon incident
 J_1 = fonction de Bessel de premier ordre
 $k = 2\pi/\lambda$
 a = rayon de la particule

En réalité, l'appareil a d'abord été calibré avec des échantillons de billes de polystyrène réticulé dont la distribution de taille est connue. Des échantillons de 42 μm et de 98 μm ont permis de s'assurer de la validité de la méthode. Le résultat pour les billes de 42 μm est un diamètre moyen de 44 μm avec une distribution de taille de 3 μm et pour l'échantillon de 98 μm , le diamètre moyen trouvé est 96 μm avec une distribution de taille de 7 μm (figure 27)

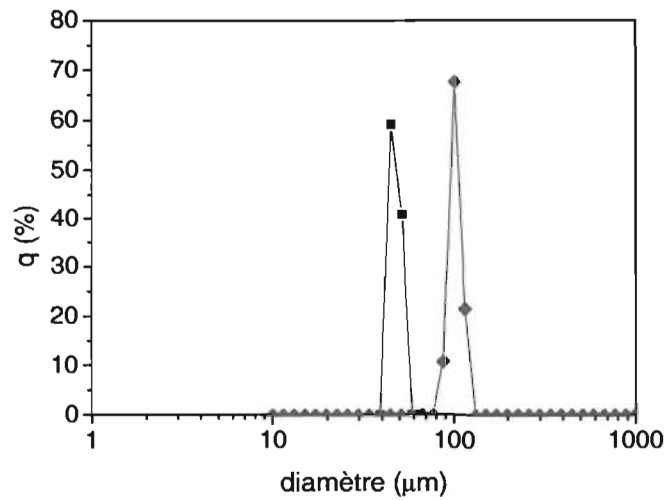


Figure 27. Distribution de la taille des billes de polystyrène réticulé d'un échantillon standard de diamètre moyen $42 \mu\text{m}$ —■— et $98 \mu\text{m}$ —◆—, mesuré par diffraction de la lumière, où q (%) = fraction volumique.

L'analyseur de taille de particules utilisé est de marque Horiba, modèle LA-950. Il est composé d'une série de détecteurs placés à différents angles de l'échantillon (figure 28), ce qui permet de mesurer l'intensité de la lumière transmise. Le domaine de mesure de cet appareil s'étend de $0,01 \mu\text{m}$ à $3000 \mu\text{m}$, ce qui inclut le diamètre des capsules avec lesquelles nous travaillons qui varie entre 10 et $200 \mu\text{m}$. Les longueurs d'onde des lasers sont de 655 nm et 405 nm .

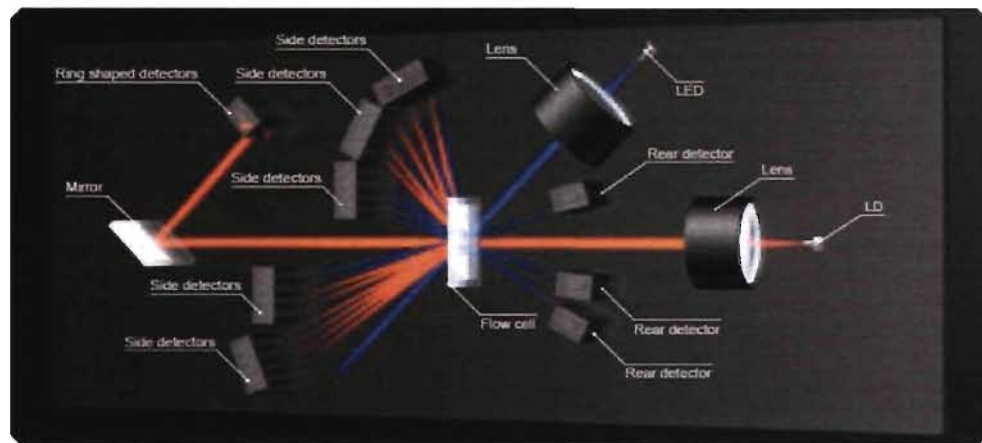


Figure 28. Schéma de la configuration des lasers et des détecteurs dans l'analyseur de taille de particules LA-950 de Horiba, tiré de la référence [36].

Les échantillons de capsules sont d'abord dispersés dans l'eau, puis cette suspension circule entre le cône d'échantillonnage et la cellule de mesure. L'échantillon est soumis à des ultrasons et une agitation mécanique. La masse de capsules requise dépend de la taille des capsules et doit permettre de donner une intensité de transmittance entre 70 % et 90 % pour le laser bleu de 405 nm et entre 80 % et 90 % pour le laser rouge 655 nm. Ainsi les masses ne sont pas les mêmes d'un échantillon à l'autre, mais environ 10 mL d'une solution entre 0,020 et 0,040 g/mL sont utilisés pour les mesures. Le volume de la cellule de mesure est 200 mL lorsqu'elle est remplie au niveau moyen.

2.3 Mesure des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques ont été évalués pour la laccase encapsulée et comparés à ceux de la laccase libre. La vitesse de réaction de la laccase libre par rapport à un substrat peut être évaluée par spectrométrie et par électrochimie selon la consommation d'oxygène, tandis que celle de la laccase encapsulée est préférablement mesurée par électrochimie.

2.3.1 Spectrophotométrie

Les réactions enzymatiques suivies par spectrophotométrie sont détaillées en introduction (section 1.3.3). Les vitesses de réaction sont obtenues en mesurant l'absorbance en fonction du temps pour une longueur d'onde donnée. La loi de Beer-Lambert permet de relier l'absorbance à la concentration de substrat oxydé.

Le spectrophotomètre utilisé est le Cary-100 Bio UV-visible et les cuvettes en verre optique ont un trajet optique de 1 cm. Le zéro expérimental est fait avec le tampon et l'enzyme avant que le substrat ne soit ajouté. L'ABTS et l'*o*-phénylènediamine (OPD) oxydés sont suivis à 420 nm et le *p*-phénylènediamine (PPD) oxydé, à 520 nm (figure 29 et 30).

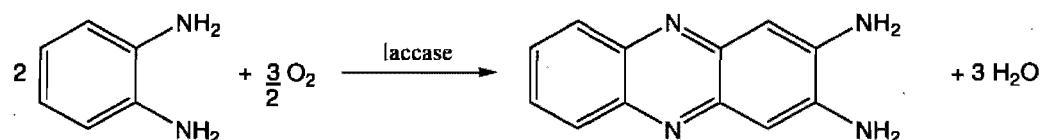


Figure 29. Réaction d'oxydation de l'OPD par la laccase. Le produit de la réaction est le 2,3-diaminophénazine qui est neutre quand le pH est supérieur à 6.

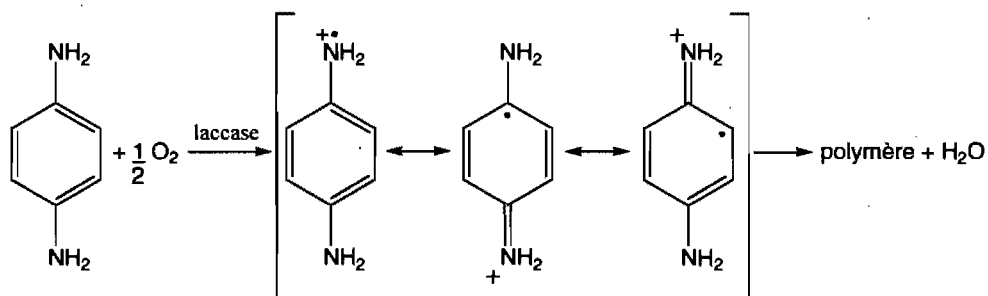


Figure 30. Oxydation du PPD par la laccase. Le produit de la réaction est un cation radical qui possède plusieurs formes de résonance. Ce cation est en fait instable et se polymérise rapidement.

Cette méthode s'applique seulement pour les mesures sur des enzymes libres. En effet, la présence des capsules nuit à la diffusion de la lumière et interfère sur le signal d'absorbance. Cette méthode ne peut donc servir que d'indication qualitative pour l'activité des enzymes encapsulées.

2.3.2 Consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène peut être mesurée malgré la présence de microcapsules en suspension. Tant que l'agitation est suffisante pour que les microcapsules ne bloquent pas l'accès à la membrane, l'oxygène peut diffuser sans problème à travers la membrane pour être réduit à l'électrode de travail. Selon l'équation (4), le courant mesuré peut être relié à la concentration d'oxygène qui est elle-même reliée à la conversion du substrat.

La cellule utilisée est le modèle Digital Model 10 de Rank Brothers (figure 31). L'électrode de travail en platine est fixée à un potentiel constant de $-0,6$ V vs Ag/AgCl, ce qui permet de réduire l'oxygène qui traverse la membrane perméable aux gaz. Avant une mesure, une solution d'eau est saturée en oxygène de façon à fixer le 100 % d'oxygène en solution. À la température de travail de 27°C , 100 % d'oxygène en solution aqueuse correspond à $7,968$ mg/L. Le signal est stabilisé durant environ 10 minutes, puis le 100 % est fixé. Pour les mesures, l'enzyme et une solution tampon sont placées dans la cellule puis le signal se stabilise. Le substrat est ensuite ajouté et la consommation d'oxygène s'en suit. La pente du graphique obtenu en $\%O_2/s$ représente la vitesse initiale de la réaction. Un exemple de courbe typique est montré à la figure 32. La pente peut être utilisée directement pour tracer une courbe de Michaelis-Menten ou encore convertie en activité en convertissant le nombre de moles d'oxygène en moles de substrat converti d'après la stoechiométrie de la réaction.

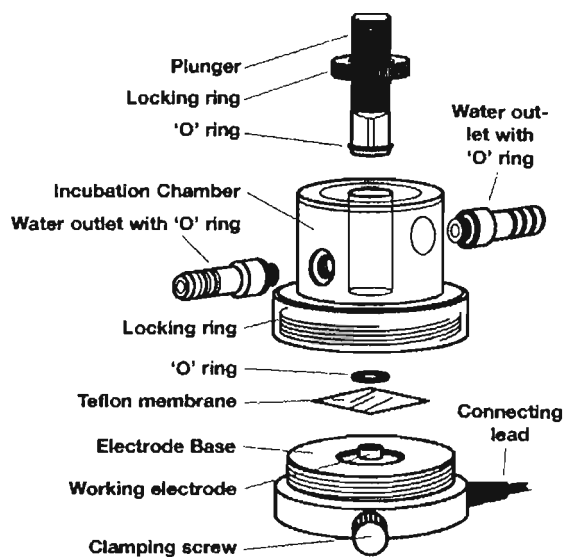


Figure 31. Schéma du montage expérimental de la cellule à oxygène montrant la membrane de téflon semi-perméable séparant la cellule des électrodes, tiré de la référence ^[23].

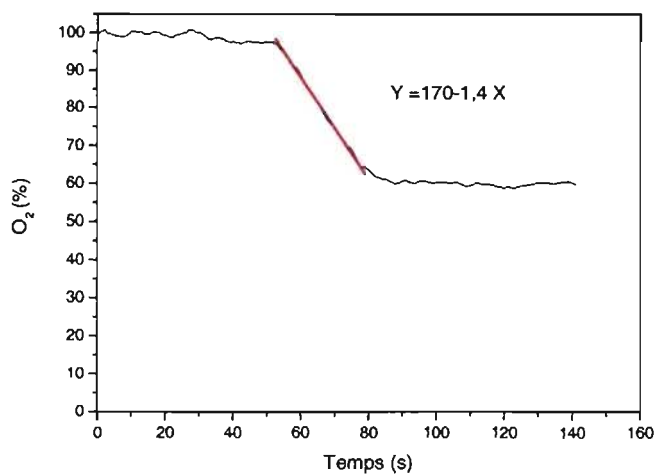


Figure 32. Courbe typique de la consommation d'oxygène par la laccase (0,86 μ L) en réaction avec l'ABTS (0,005 M) dans un tampon acétate pH 4,50 (0,05 M).

2.4 Immobilisation de la laccase

La laccase a servi d'enzyme modèle pour évaluer la microencapsulation comme méthode d'immobilisation puisque son activité peut être mesurée facilement par électrochimie (oxydoréductase) et par colorimétrie (changement de couleur associé à la conversion de substrat). Elle peut donc être utilisée à la fois pour immobilisation sur des électrodes et sur le papier.

2.4.1 Immobilisation sur des électrodes

Les microcapsules sont immobilisées à la surface de l'électrode par adsorption. Pour y arriver, une suspension de microcapsules (0,6 mg/mL) est préparée dans un tampon approprié (par exemple, un tampon phosphate pH 5,75 est utilisé pour la réaction avec le PPD). Un volume (10 μ L) de cette suspension est déposé sur une électrode préalablement polie de façon à en couvrir toute la surface (diamètre = 3 mm). L'électrode est ensuite placée à 4°C pendant environ 15h afin que l'eau s'évapore et que les capsules restent adsorbées à la surface de l'électrode. Avant les mesures par électrochimie, les capsules sont réhydratées dans le même tampon.

Les mesures consistent à appliquer un potentiel constant et mesurer le courant en fonction du temps. Ce type de mesure est aussi appelé chronoampérométrie. L'électrode de travail doit donc être placée à un potentiel suffisamment négatif pour réduire automatiquement le substrat oxydé par l'enzyme sans toutefois provoquer de réaction secondaire, comme la réduction de l'oxygène en eau par exemple. Pour déterminer ce potentiel, on effectue une expérience de voltampérométrie cyclique sur le substrat seul afin de connaître ses potentiels d'oxydo-réduction. Pour le PPD, qui est utilisé comme substrat de la laccase immobilisée, le potentiel appliqué est +85 mV vs Ag/AgCl, ce qui est inférieur à son potentiel de réduction d'après un balayage par voltampérométrie cyclique (figure 33).

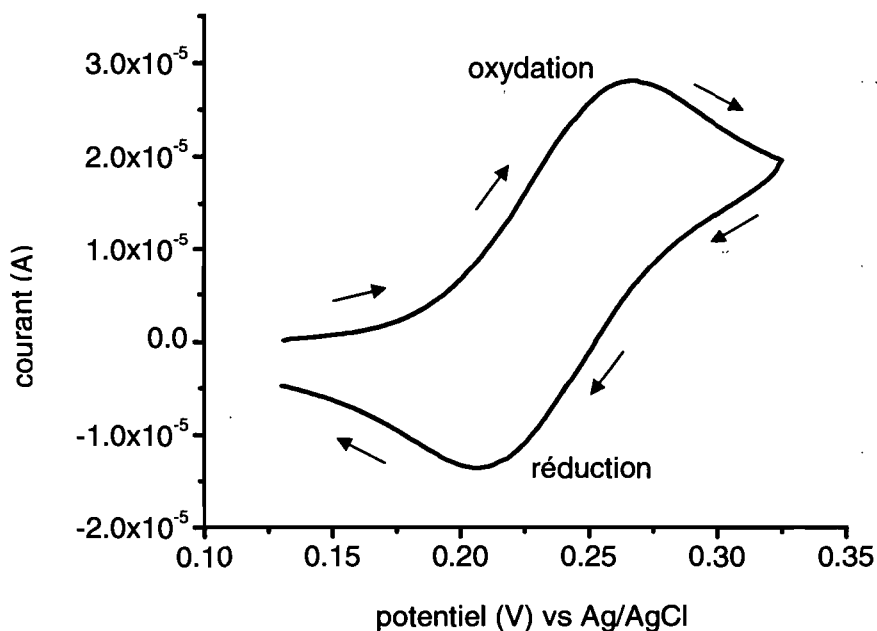


Figure 33. Voltampérogramme cyclique du PPD (0,5 mM) dans tampon phosphate 0,05 M pH 5,75 mesuré à une électrode de carbone vitreux selon une vitesse de balayage de 50 mV/s.

Donc, en ajoutant un substrat sous sa forme réduite, la laccase immobilisée l'oxyde et l'électrode le réduit à nouveau, ce qui produit un signal de courant (figure 9). Ce courant augmente jusqu'à un état stationnaire où les deux réactions se produisent à la même vitesse (figure 34). L'enzyme a alors atteint sa vitesse de conversion maximale et l'électrode reconvertis automatiquement tout le substrat oxydé par l'enzyme. Le courant mesuré à l'électrode est donc constant. D'après ce genre de mesure, on peut évaluer la microencapsulation comme méthode d'immobilisation pour un biocapteur électrochimique.

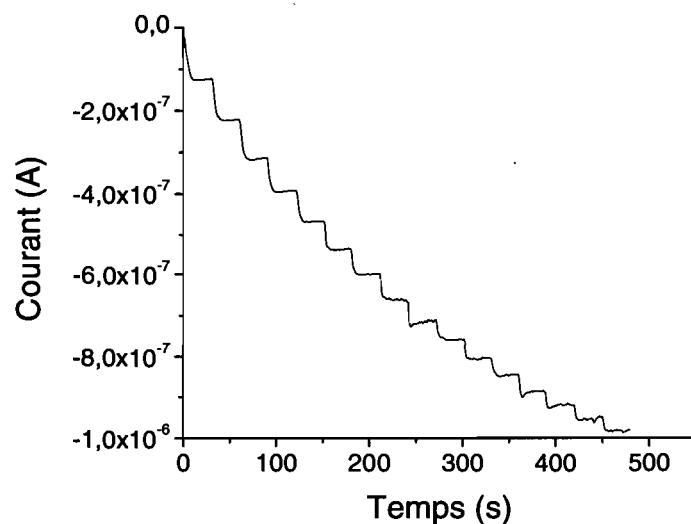


Figure 34. Chronoampérogramme de la réduction du PPD à l'électrode de travail (+85 mV vs Ag/AgCl) après son oxydation par la laccase immobilisée par microencapsulation. Les augmentations de courant sont dues à des ajouts de 50 μ L d'une solution de PPD (0,50 mM). Les plateaux représentent l'atteinte de l'état stationnaire.

Le potentiostat utilisé pour les mesures est de la marque Bioanalytical Systems Inc., modèle Epsilon. L'électrode de travail est en carbone vitreux, la contre-électrode de platine et la référence est Ag/AgCl.

2.4.2 Immobilisation sur du papier

Les enzymes sont immobilisées sur le papier en mélangeant une suspension de capsules (0,200 g sec) directement avec la pâte à papier (4 g sec) avant de faire la feuille de papier (figure 35). Les capsules sont ainsi retenues dans les pores du réseau fibreux du papier puisque leur taille est supérieure à celles des pores de ce papier. De plus, comme les microcapsules de PEI réticulé ont une charge de surface globalement positive, elles sont également retenues par attraction électrostatique avec la cellulose qui est négative.

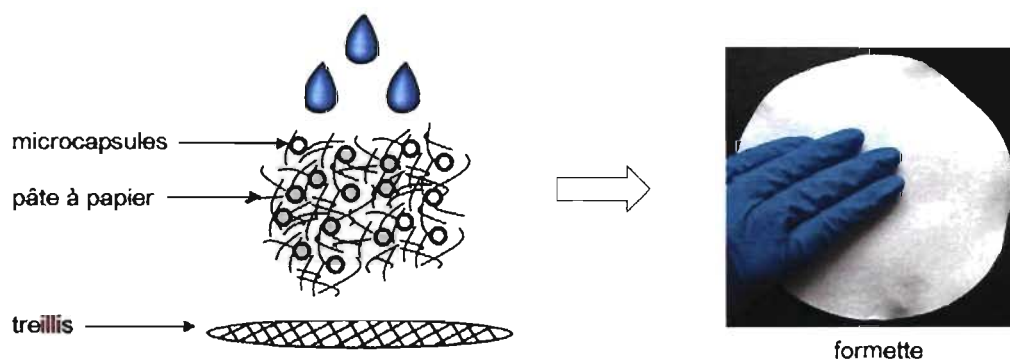


Figure 35. Schéma de l'immobilisation de la laccase encapsulée dans des formettes.

Le type de feuille préparée est appelé formette. Elles ont un diamètre de 16 cm et sont habituellement utilisées afin d'évaluer les propriétés du papier, comme la brillance, la blancheur, etc. La pâte, en suspension dans l'eau, est d'abord mélangée mécaniquement de façon à bien en séparer les fibres. Puis, la suspension est placée dans un cylindre muni d'un treillis pour y être filtrée par gravité. La formette résultante est ensuite pressée, puis placée dans une chambre à humidité contrôlée afin d'être séchée. Elle peut aussi être placée sous une plaque chauffante pour séchage à température contrôlée.

2.5 Évaluation de la décomposition d'agents neurotoxiques

2.5.1 Utilisation de la laccase

La laccase a été testée avec le DMMP, le demeton-S et le MFP. Dans tous les cas, la réaction est suivie par la consommation d'oxygène de la laccase telle que décrite précédemment (section 2.3.2.).

2.5.2 Détermination d'ions fluorures

La phosphatase alcaline a été testée avec le MFP. Pour suivre cette réaction, la génération d'ions fluorures est mesurée par électrochimie. Une électrode Orion® 9409BN sélective aux ions fluorures et une électrode de référence modèle 900100 d'Orion® permettent d'en mesurer la concentration en solution. Les mesures sont réalisées dans un bécher de polypropylène sur un volume de 50 mL à température ambiante. Les électrodes sont branchées sur un pH-mètre modèle 8005 de VWR. Le principe de la mesure a été expliqué à la section 1.3.3.2. La sélectivité du cristal vient donc de son dopage avec EuF_2 qui laisse des « trous » de la taille des ions F^- dans le cristal. L'ion Cl^- n'est pas une interférence, car il est trop gros pour les espaces laissés par le dopage, mais les ions OH^- peuvent interférer sur le signal à haut pH. Avec la phosphatase alcaline, les mesures sont faites à pH neutre (TRIS-HCl pH 7,2) où les ions hydroxydes ne sont pas un problème.

3. PRÉPARATION DES MICROCAPSULES

Les microcapsules que nous avons préparées au laboratoire nous ont été inspirées par un article de Denis Poncelet parut en 1994 ^[32]. Selon cet article, le but d'utiliser le polyéthylèneimine (plutôt que le polyamide ^[14]) était de trouver une méthode de synthèse douce, relativement au pH, à la force ionique et aux solvants organiques, pour produire des microcapsules par polymérisation interfaciale. Ainsi, nous avons utilisé la même réaction de réticulation (figure 22) afin de produire des microcapsules selon nos critères.

Les caractéristiques que nous recherchons sont : une géométrie sphérique, un petit diamètre (entre 10 et 100 μm), une membrane résistante et semi-perméable, le tout dans une maximisation du rendement en masse. La forme sphérique est importante pour l'uniformité du produit et pour maximiser la surface de contact avec l'extérieur, tandis que la taille recherchée en μm est appropriée pour maximiser le contact de la microcapsule avec une électrode sans bloquer totalement la surface. Si les capsules étaient trop grosses, elles augmenteraient l'épaisseur de la couche de diffusion, ce qui n'est pas souhaité car la réaction globale serait ralentie.

À ce stade du projet, toutes les propriétés des microcapsules n'ont pas encore été évaluées. Des travaux sont actuellement en cours pour évaluer l'épaisseur de la paroi, ainsi que la résistance mécanique des microcapsules. L'étude de la taille des pores est également à venir. Jusqu'à maintenant, seul le rendement en masse et la distribution de taille des microcapsules furent étudiés. Le rendement en masse fut maximisé selon les effets du mode d'agitation, du temps de réaction, de la concentration de réticulant, du temps de repos ainsi que des étapes de lavage ; tandis que la distribution de taille des microcapsules fut évaluée selon l'effet de la vitesse de rotation, de la concentration d'émulsifiant, du pH, de la concentration de réticulant ainsi que du temps de réaction. Finalement, nous verrons également la distribution de taille des microcapsules préparées avec le microencapsulateur.

3.1 Maximisation du rendement en masse

Le rendement en masse est calculé par rapport à la somme de la masse du polymère (PEI) et du réticulant (dichlorure de décanedioyle) initialement en solution. Il faut toutefois mentionner que ces deux réactifs sont en excès dans cette préparation, ce qui explique les faibles rendements. Selon les expériences menées par Poncelet ^[32], la masse de la membrane est fonction de la concentration de chlorure d'acide décanoïque, mais dépend peu de la quantité de PEI. De plus, la masse de la membrane est toujours inférieure à la somme de la masse des deux réactifs. Ceci explique que les rendements en masse obtenus sont généralement faibles. Selon la méthode de préparation des microcapsules, ce rendement est très variable. Il dépend donc énormément des conditions de préparation.

3.1.1 Effet du mode d'agitation

Le mode d'agitation est primordial puisque l'émulsion est la source de la formation des microgouttelettes donc des microcapsules. Durant les premières préparations, le rendement en masse était très inégal. Il pouvait varier entre 5% et 54% pour un même mode de préparation (tableau I). L'agitation faite avec un barreau magnétique peut expliquer en partie l'inégalité des rendements obtenus, puisque cette agitation est peu uniforme comparativement à l'agitation produite par une hélice (figure 23). De plus, le barreau magnétique risque de briser les microcapsules qui se déposent au fond du bécher, car celui-ci est en contact direct avec le fond du bécher.

Tableau I. Rendement de quelques préparations de microcapsules faites avec un barreau magnétique comme source d'agitation.

Masse de PEI (g)	Masse de dichlorure de décanedioyle (g)	Masse de capsules (g) (humide)	Quantité eau (%)	Masse de capsules (g) (sèche)	Rendement (%)
0,54	0,55	7,38	92	0,59	54
		7,50	96	0,30	28
		3,05	94	0,18	17
		1,07	95 ^a	0,05	5

^a selon une estimation moyenne

L'agitation obtenue grâce à une hélice est plus constante, plus facile à contrôler et produit une meilleure émulsion que l'agitation obtenue avec un barreau magnétique. Les rendements obtenus grâce à ce mode d'agitation sont meilleurs que ceux obtenus avec le barreau magnétique, soit entre 55 et 80 %. Nous croyons que moins de microcapsules sont brisées par l'hélice parce que les pâles ne touchent aucune paroi du bécher, ce qui n'écrase pas de microcapsules. Donc, aussitôt qu'un agitateur avec hélice fut disponible, il fut utilisé pour toutes les préparations suivantes.

Le mode d'agitation n'est toutefois pas la seule explication de l'inégalité des rendements. Les autres étapes de la préparation furent donc analysées avec attention.

La première étape de la préparation est la stabilisation de l'émulsion. Selon l'article de Poncelet ^[32], l'agitation de la phase aqueuse dans la phase organique est maintenue pendant 2 min afin d'obtenir une émulsion stable. Cette partie de la préparation ne fut toutefois pas modifiée puisqu'elle semblait correcte pour la production des capsules.

3.1.2 Effet du temps de réaction

Concernant le temps de réaction de la réticulation entre le polymère et le réticulant durant l'émulsion, celui-ci a été varié entre 3 min et 10 min. Selon le groupe de Poncelet qui a mis au point cette synthèse, une grande proportion de la paroi de la microcapsule est formée dès la première minute de réaction, ce qui indique une réaction rapide ^[32]. En effet, le dichlorure de décanedioyle est extrêmement réactif. Il réagit donc immédiatement au contact d'un groupement électrodonneur comme les amines primaires et secondaires du PEI. Une augmentation du temps de réaction aurait pour effet de renforcer la paroi en augmentant le degré de réticulation du polymère. Au niveau de ce projet, les microcapsules ont été formées dans un temps de 10 minutes et le rendement en masse est d'environ 34 % versus 33 % pour une réaction faite en 3 minutes. Ceci confirme en effet que ce paramètre n'a pas

d'impact sur le rendement au-delà des premières minutes de réaction (entre 1 et 3). Les capsules sont donc formées pendant 10 minutes pour obtenir une paroi assez résistante. La résistance de la paroi n'a toutefois pas été quantifiée, mais pourrait l'être en soumettant des échantillons de capsules à différentes forces et en observant les capsules résultantes au microscope. Au laboratoire, nous vérifions que les capsules n'étaient pas brisées en les observant au microscope.

3.1.3 *Effet de la concentration de réticulant*

L'agent réticulant doit être en excès pour la préparation des capsules, car celui-ci est très sensible à l'eau. Le caractère nucléophile de l'eau est suffisant pour provoquer la réaction d'addition-élimination sur le carbonyle, ce qui entraîne la formation de l'acide décanedioïque qui est stabilisé par rapport au dichlorure et ne pourra donc pas réagir avec le PEI. Il existe donc une certaine compétition entre l'eau et le PEI pour le dichlorure de décanedioyle. Pour vérifier l'excès de réticulant, le groupe de Poncelet avait titré le dichlorure de décanedioyle restant et prouvé qu'il en restait après la réaction ^[32]. Nous n'avons toutefois pas refait cette expérience puisqu'elle avait déjà été faite. Cependant, si on estime, d'après leurs résultats que seulement 30 % de l'agent réticulant initialement en solution organique contribue à la formation des microcapsules, le rendement en masse passe de 54 % à 91 % dans le meilleur cas. Ceci car la masse attendue n'est pas directement la somme de la masse du réticulant et du polymère, mais seulement 30 % de la masse initiale du réticulant plus la masse du polymère.

Nous avons quand même fait la préparation avec différentes proportions de réticulant. La préparation standard a donné une masse sèche de capsules de 0,37 g ce qui donne un rendement massique de 34 %, alors que la préparation faite avec deux fois plus de réticulant donne 0,85 g en masse sèche, ce qui correspond à un rendement de 52 %. Une plus grande concentration de réticulant forme une membrane plus massive, ce qui s'explique par le fait que plus de molécules de réticulant réussissent à réagir avec le PEI malgré la compétition avec l'eau.

3.1.4 Effet du temps de repos

Un autre paramètre de la préparation qui peut affecter le rendement en masse est le temps de repos après la réaction. Selon la procédure originale, la préparation de microcapsules repose pendant 1 minute avant que les microcapsules soient récupérées par décantation du liquide surnageant ^[32]. Au laboratoire, le temps de repos a été varié entre 1 minute et 1h15 (tableau II). Un temps de repos d'une minute ne semblait pas suffisant pour récupérer toutes les microcapsules, car seulement 30 % de la masse attendue était récupérée. Il était visible à l'œil nu que certaines capsules étaient toujours en suspension. En effet, le temps de repos nécessaire pour récupérer les capsules est inversement proportionnel à leur taille ^[37]. Selon les conditions expérimentales du groupe de D. Poncelet ^[32], les microcapsules ont un diamètre moyen d'environ 100 μm , ce qui est supérieur au diamètre moyen des capsules que nous avons préparées (environ 30 μm). Les capsules que nous avons préparées prennent donc plus de temps pour se déposer au fond du bécher. Dans ce cas, il fallait attendre au moins 7 minutes avant de décanter le liquide surnageant. Nous avons également essayé d'utiliser un temps de repos plus long afin de récupérer une plus grande quantité de microcapsules, mais le rendement n'a pas été amélioré. Il est toutefois suffisant de constater qu'un temps de repos de 7 minutes permet de récupérer le maximum de microcapsules. Un temps d'attente plus long n'apporte aucun avantage.

Tableau II. Effet du temps de repos sur le rendement massique de microcapsules

Temps de repos (min)	Rendement (%)
1	30
7	49
15	34
75	15

3.1.5 *Effet des étapes de lavage*

Une autre étape de la préparation est le changement du cyclohexane. Après que les capsules aient reposé pendant 7 minutes, celles-ci se déposent dans le fond du bécher, le liquide surnageant est donc jeté pour être remplacé par du cyclohexane propre (sans surfactant). On retire ainsi les réactifs non réagis. De plus, la filtration subséquente des capsules est beaucoup plus facile lorsque le cyclohexane est exempt du surfactant parce qu'autrement le papier filtre devient vite bloqué et la filtration est très lente. Finalement, les microcapsules sont lavées avec un peu de cyclohexane (50 mL) afin d'enlever le reste des réactifs organiques, puis avec l'eau (500 mL) pour enlever le reste de PEI et le HCl formé. Les capsules résultantes sont donc humides car leur cœur contient de l'eau et le PEI qui est hydrophile retient également de l'eau. Cette eau représente en moyenne 95 % de la masse des capsules pesées. Ce pourcentage d'eau a été évalué sur des échantillons séchés à l'étuve de même que sur des échantillons lyophilisés. Les capsules ainsi formées peuvent donc être évaluées quant à leur taille.

3.2 *Distribution de taille*

La taille des microcapsules a d'abord été évaluée par microscopie optique. Les photos prises ont permis de mesurer le diamètre des capsules afin de faire une moyenne (figure 36). Cette méthode est toutefois limitée puisqu'elle est plutôt fastidieuse et ne permet pas de prendre en compte un grand nombre de capsules. La mesure manuelle du diamètre peut également être une cause d'erreur comparativement à d'autres méthodes basées sur la diffraction de la lumière par exemple. Pour utiliser des instruments basés sur ce principe, il faut préalablement disperser les capsules sans toutefois les briser. En effet, les forces électrostatiques attirent les capsules les unes sur les autres (figure 36 b), ce qui pourrait nuire à des mesures faites par diffraction de la lumière. Le seul avantage à utiliser la microscopie optique est qu'il est possible de juger de la taille des capsules même si celles-ci sont agglomérées. La diffraction de la lumière demeure tout de même une mesure plus

représentative statistiquement puisqu'elle permet d'évaluer un échantillon plus grand et nécessite moins de temps. Les capsules doivent être dispersées avant et pendant la mesure. Cette méthode a d'ailleurs été validée en mesurant la distribution de taille de deux échantillons de référence (figure 27).

La plupart des résultats concernant les effets des paramètres sur la distribution de taille des capsules ont été faits au début du projet et à ce moment seule la microscopie optique était disponible. Ainsi, seul l'effet de la vitesse de rotation a été réévalué par la méthode de diffraction de la lumière. Parmi les facteurs qui peuvent influencer la taille des capsules, il y a la vitesse de rotation (barreau magnétique ou hélice), la concentration d'émulsifiant ainsi que le pH de la phase aqueuse de départ.

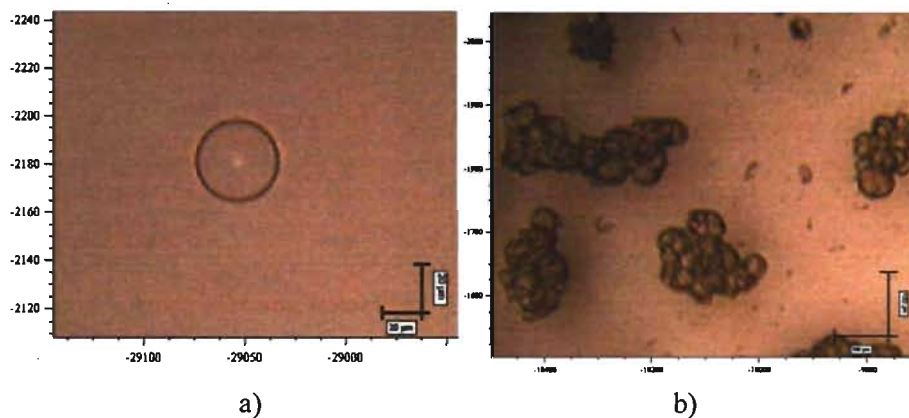


Figure 36. Images prises par microscopie optique de capsules préparées dans les conditions standards montrant a) une capsule isolée et b) des agglomérats.

3.2.1 Effet de la vitesse de rotation

Concernant la vitesse de rotation, plus celle-ci est grande, plus les gouttelettes formées par l'émulsion sont petites et conséquemment les capsules. Avec le barreau magnétique, les capsules ont toujours été préparées avec l'agitation maximale de façon à obtenir les plus petites microcapsules possibles. D'autres vitesses de rotation n'ont pas été testées puisque des capsules plus grosses n'étaient pas désirées. Les microcapsules obtenues ont un diamètre moyen de 31 μm et la distribution de taille

s'étend sur $\pm 15 \mu\text{m}$ (figure 37). Cette méthode d'agitation ne permet pas une distribution étroite du diamètre puisque la taille des capsules varie entre 10 et 69 μm . Ceci peut avoir des conséquences sur le comportement du système enzyme-capsule puisque celles-ci n'ont pas toute la même taille. Malgré tout, les capsules peuvent être utilisées pour des résultats préliminaires de l'activité des enzymes encapsulées. On remarque également que la distribution de taille ne suit pas l'allure d'une courbe gaussienne. Ceci confirme que cette méthode d'évaluation de la taille permet difficilement une représentation statistique, possiblement parce que le nombre de capsules mesurées n'est pas suffisant (30 capsules mesurées).

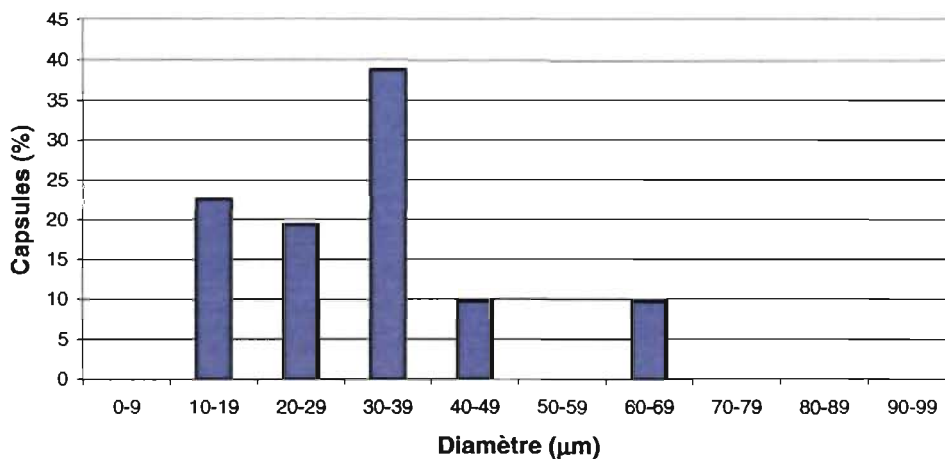


Figure 37. Distribution de la taille des microcapsules préparées avec agitation produite par un barreau magnétique à vitesse maximale, échantillon $n = 30$ capsules.

L'agitation générée par une hélice a été testée à des vitesses de rotation de l'hélice : 1040 t/min, 1640 t/min et 2400 t/min. Les mesures sur ces échantillons ont été faites grâce à la diffraction de la lumière qui est une méthode beaucoup plus représentative statistiquement que les photos par microscopie optique.

D'après les résultats obtenus, il ne semble pas y avoir de différence significative entre le diamètre moyen des capsules faites à 2400 t/min qui ont un diamètre moyen de 38 μm et celles faites à 1640 t/min qui ont un diamètre de 36 μm ,

tandis que celles faites à 1040 t/min ont un diamètre moyen de 47 μm , soit environ 10 μm de plus (tableau III).

Tableau III. Diamètre moyen des microcapsules, préparées avec agitation générée par une hélice, mesuré par diffraction de la lumière.

Vitesse de rotation de l'hélice (t/min)	Diamètre moyen (μm)	Distribution de taille ($\pm \mu\text{m}$)
1040	47	16
1640	36	18
2400	38	25

L'augmentation de 1040 t/min à 1640 t/min est donc suffisante pour produire des microgouttelettes plus petites, mais le fait d'augmenter à 2400 t/min ne semble pas permettre de produire des microgouttelettes encore plus petites. En théorie, le diamètre moyen diminue quand la vitesse de rotation augmente puisque la plus grande énergie fournie par l'hélice brise plus de microgouttelettes, ce qui favorise une microémulsion plus fine ^[38]. Selon des résultats sur d'autres microcapsules formées grâce à une microémulsion ^[38, 39], la relation entre la vitesse de rotation et le diamètre moyen des capsules suit une relation linéaire selon une échelle log-log (figure 38).

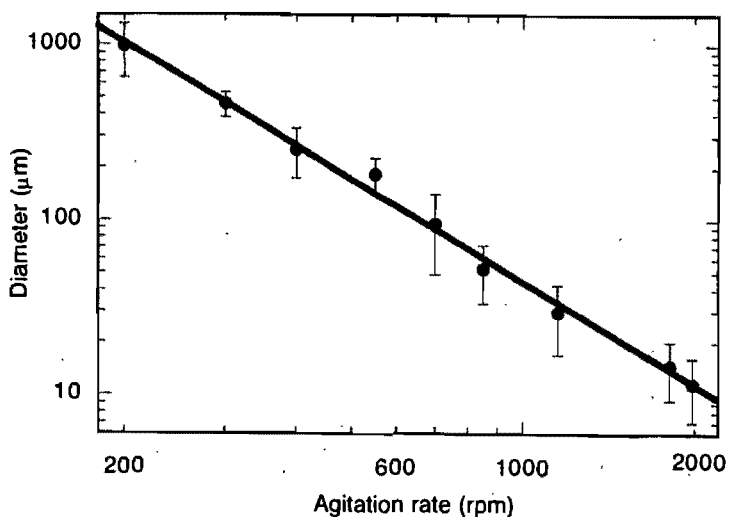


Figure 38. Relation linéaire sur une échelle log entre le diamètre moyen de microcapsules de poly(urée-formaldéhyde) et la vitesse de rotation de l'hélice, tiré de la référence ^[39].

Toutefois, avec les trois mesures que nous avons prises, la dépendance entre la vitesse de rotation de l'hélice et le diamètre moyen des microcapsules ne peut être démontrée. Pour confirmer cette relation, il faudrait prendre d'autres mesures afin de représenter un plus grand domaine de vitesses de rotation.

Au niveau de la distribution de taille, on trouve que les plus petites vitesses de rotation (1040 et 1640 t/min) produisent des capsules dont la distribution de taille est plus étroite qu'à haute vitesse (2400 t/min) puisqu'elle s'étend respectivement sur $\pm 16 \mu\text{m}$ et $\pm 18 \mu\text{m}$ comparativement à $\pm 25 \mu\text{m}$ (figure 39). La distribution de taille obtenue grâce à une faible vitesse de rotation de l'hélice est d'ailleurs comparable à celle obtenue grâce à l'agitation par barreau magnétique. En effet, elle était de $\pm 15 \mu\text{m}$ pour des capsules dont le diamètre moyen de $31 \mu\text{m}$. À haute vitesse de rotation (2400 t/min), la distribution de taille est plus large alors que selon des articles parus sur le même sujet, elle devrait être plus étroite [38, 40-42]. Pour le moment, cette observation est difficile à expliquer, car on s'attend effectivement à trouver qu'à plus forte agitation, la distribution de taille soit plus étroite parce qu'à cette force, la différence de taille entre les microgouttelettes qui sont proches et loin de l'hélice est plus petite qu'à faible agitation. En effet, une faible agitation produit des plus petites gouttelettes près de l'hélice que loin de l'hélice pour un même volume d'émulsion comparativement à une force d'agitation plus grande. Donc concernant les résultats que nous avons eu, il faudrait analyser des microcapsules faites à d'autres vitesses de rotation pour s'assurer de ces explications. Ceci sera important pour des applications pratiques où il est préférable d'avoir des microcapsules monodisperses.

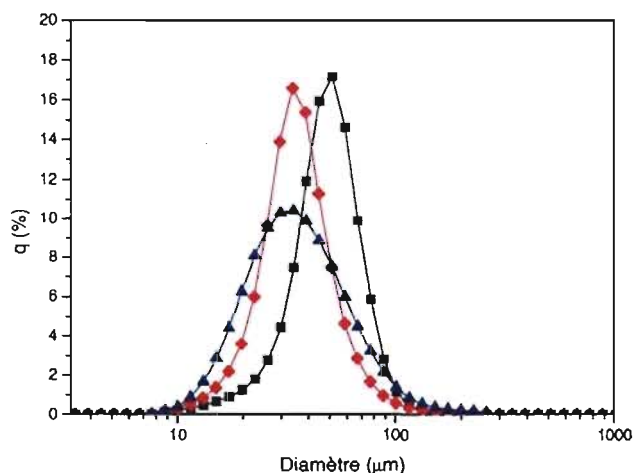


Figure 39. Distribution de la taille des microcapsules préparées avec agitation obtenue grâce à une hélice selon une vitesse de 1040 t/min —■—, 1640 t/min —●— et 2400 t/min —▲— mesurée par diffraction de la lumière, où q (%) = fraction volumique.

3.2.2 Effet de la concentration d'émulsifiant

L'émulsifiant stabilise l'émulsion en réduisant la tension de surface entre la phase aqueuse et la phase organique grâce à sa structure chimique qui comprend une tête hydrophile et une queue hydrophobe qui lui permet de s'adsorber entre les deux phases. Ainsi, la phase aqueuse est dispersée dans la phase organique de façon à former des microgouttelettes. Une plus grande concentration d'émulsifiant a pour effet de diminuer la taille des microgouttelettes formées, ce qui pourrait alors affecter la taille des microcapsules^[43, 44].

Avec 4 % (v/v) de Span[®]80, les microcapsules affichent un diamètre moyen de 36 μm et une distribution de taille étendue sur ± 15 μm (mesuré par microscopie), ce qui n'est pas plus petit que 31 μm et une distribution de taille étendue sur ± 15 μm, obtenues avec moitié moins de Span[®]80. L'impossibilité d'observer l'effet de la concentration d'émulsifiant sur la taille des microcapsules vient de sa faible

influence. En effet, selon plusieurs études [32, 43], le contrôle de la taille s'exerce principalement par la vitesse de rotation plutôt que par la concentration d'émulsifiant.

3.2.3 *Effet du pH*

L'effet du pH a été vérifié sommairement puisque pour encapsuler une enzyme (comme la laccase), le pH ne peut pas être varié à l'infini. Il faut demeurer dans la zone de stabilité de l'enzyme. L'effet vient du fait que le PEI est un polymère chargé positivement. Plus le pH est acide, plus la protonation des fonctions amines augmente, ce qui modifie la viscosité de la solution aqueuse ce qui a un impact sur la taille des microgouttelettes formées. La viscosité de la phase aqueuse, aussi appelée phase discontinue, a un effet sur la taille des microgouttelettes car elle est reliée à la tension superficielle nécessaire pour former les gouttelettes. Pour une solution plus visqueuse, il faudra atteindre une plus grande tension superficielle que pour une solution moins visqueuse afin de produire des microgouttelettes de la même taille.

Dans le cadre de ce projet, les préparations ont été faites avec de l'eau millipore ou avec un tampon phosphate pH 5,75 comme phase aqueuse. Dans les deux cas, la taille n'est pas grandement modifiée puisqu'elle est de 31 μm à pH neutre et 36 μm à pH 5,75.

3.2.4 *Effet de la concentration de réticulant*

Nous avons vérifié que la quantité de réticulant n'avait pas d'effet sur la taille des capsules. Les résultats montrent un diamètre moyen de 39 μm pour une préparation faite avec $4,6 \times 10^{-3}$ mol de dichlorure de décanedioyle plutôt que $2,3 \times 10^{-3}$ mol habituellement utilisé. Une plus grande quantité de réticulant semble produire des capsules légèrement plus grosses. Puisque les mesures ont été prises sur des photos de microscope optique, on ne peut être certain de l'exactitude de la mesure. La différence est due soit à la méthode de mesure soit à l'épaisseur de la

paroi qui, si elle est plus épaisse, induit un diamètre de microcapsules plus grand. L'épaisseur de la paroi est une caractéristique des capsules qui est à l'étude présentement par imagerie par microscopie confocale à fluorescence. Ceci pourrait apporter la réponse. Nous croyons néanmoins que la concentration de réticulant a davantage d'impact sur le rendement en masse que sur la distribution de taille des microcapsules.

3.2.5 *Effet du temps de réaction*

Le temps de réaction ne devrait pas modifier beaucoup la taille des capsules puisque la majorité de la réaction se produit durant la première minute. Une préparation faite avec un temps de réaction de 30 minutes a donné des capsules dont le diamètre moyen est $26 \mu\text{m}$ avec une étendue de $\pm 14 \mu\text{m}$. À première vue, cette taille semble inférieure à celle obtenue en un temps de réaction de 10 min qui est de $31 \mu\text{m}$ avec une étendue sur $\pm 15 \mu\text{m}$. En fait, pour comparer ces résultats selon des tests statistiques, il faudrait faire au moins trois préparations de capsules en utilisant un temps de réaction de 30 minutes et faire la même chose avec un temps de réaction de 10 minutes. Ceci permettrait d'obtenir le diamètre moyen des capsules obtenues selon ces temps de réaction, ainsi que l'écart-type qui permettrait la comparaison. En ce qui concerne les buts de ce projet, un temps de réaction de 10 min est satisfaisant et permet d'obtenir des microcapsules suffisamment petites pour les applications envisagées.

D'après tous les résultats obtenus, on constate que la vitesse de rotation de l'hélice est le principal paramètre ayant une influence sur la distribution de taille des microcapsules. Ainsi en travaillant à la vitesse de 1640 t/min, on forme les plus petites capsules possibles et une distribution plus fine. Une augmentation de la concentration d'agent tensioactif ou une diminution du pH n'affectent pas de façon significative la taille des microcapsules. Il serait toutefois intéressant de mesurer la

taille des capsules selon une autre méthode, puisque la mesure sur photos prises par microscope optique provoque une grande incertitude sur la mesure.

3.2.6 Préparation de microcapsules avec le microencapsulateur

Avec le microencapsulateur, les gouttelettes sont formées grâce à une buse tel qu'expliqué précédemment (section 2.1.1.2). La plus petite buse disponible pour le moment est de 100 μm . Dans ce cas-ci, la taille des capsules est dépendante de la viscosité des solutions, du débit, ainsi que de la fréquence de vibration. Habituellement, cet appareil est utilisé pour préparer des billes d'alginate. Son utilisation pour des microcapsules de PEI est une première, donc aucune étude n'est disponible sur les effets quantifiés de ces paramètres par rapport à la synthèse avec le PEI. Nous n'avons pas encore évalué tous ces paramètres, mais dans un premier temps tenté de former des capsules puis d'y encapsuler la laccase. La taille des capsules obtenues est environ 142 μm selon la distribution de taille obtenue par diffraction de la lumière (figure 40). Ces capsules sont assez grosses pour être visibles avec un microscope à faible grossissement (figure 41).

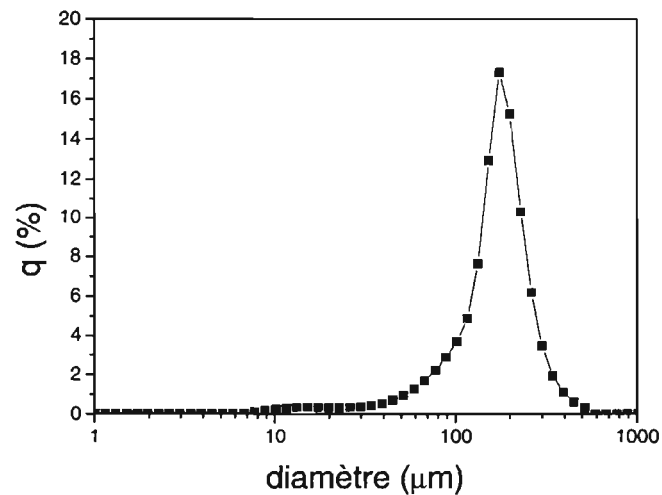


Figure 40. Distribution de la taille des microcapsules préparées avec le microencapsulateur d'Inotech®. La distribution de taille est mesurée par diffraction de la lumière, où q (%) = fraction volumique.



Figure 41. Photo prise par microscopie optique à faible grossissement des microcapsules préparées grâce au microencapsulateur. L'échelle est approximative.

La caractérisation des microcapsules n'est donc pas exhaustive puisqu'elle comprend seulement le rendement en masse ainsi que la distribution de taille. D'autres propriétés telles que la porosité, l'épaisseur de la paroi, la rigidité de la paroi pourraient contribuer à mieux expliquer l'impact de l'encapsulation sur l'enzyme.

Des mesures sont actuellement en cours afin d'évaluer l'épaisseur de la paroi grâce à des marqueurs fluorescents. De plus l'encapsulation d'une enzyme marquée permettrait de localiser l'enzyme dans la microcapsule. La microscopie confocale serait donc un bon outil pour obtenir une image tridimensionnelle des microcapsules. L'évaluation et le contrôle de la porosité permettraient également d'obtenir des microcapsules dont la porosité réponde aux besoins des applications. Or, dans le but de vérifier le potentiel de cette méthode d'immobilisation, une priorité fut mise sur les essais enzymatiques. La laccase fut donc la première enzyme encapsulée puisque ses réactions enzymatiques peuvent facilement être suivies grâce à son caractère oxydo-réducteur, sa consommation d'oxygène.

4. EFFET DE L'ENCAPSULATION SUR L'ENZYME

Dans la recherche d'une méthode d'immobilisation d'enzyme, il est important de considérer les effets de la méthode d'immobilisation sur le comportement de l'enzyme. Ainsi, il est essentiel que la méthode d'immobilisation ne dénature pas l'enzyme pour que celle-ci conserve ses capacités catalytiques.

Un moyen de vérifier si l'enzyme conserve ses capacités catalytiques après l'encapsulation est de mesurer l'efficacité d'encapsulation. Ensuite, on peut évaluer l'effet de la microcapsule sur certaines propriétés de l'enzyme, comme le pH d'activité maximale et le maintien de l'activité à long terme.

Finalement, pour évaluer l'impact de la méthode d'immobilisation sur le comportement enzymatique, une étude cinétique permet de comparer l'affinité entre l'enzyme et un substrat ainsi que la vitesse maximale de conversion du substrat par l'enzyme libre et par l'enzyme encapsulée.

4.1 Maintien de l'activité enzymatique

Une des premières choses à vérifier après l'encapsulation d'une enzyme est donc le maintien de son activité catalytique. En effet, il est primordial de conserver l'activité enzymatique et au mieux d'en minimiser la perte. Avec la laccase encapsulée, les mesures d'activité ont d'abord été faites par spectrophotométrie puis par consommation d'oxygène. Nous n'avons toutefois pas pu utiliser l'ABTS pour mesurer l'activité de la laccase encapsulée puisqu'en raison de la charge négative (2⁻) de l'ABTS sous sa forme réduite, celui-ci est attiré par la paroi positive de la microcapsule. Nous avons donc choisi d'utiliser le PPD qui est un substrat neutre aux valeurs de pH utilisées. Les premiers résultats de spectrophotométrie à 520 nm ont révélé la présence du PPD oxydé par l'enzyme, ce qui veut dire que la laccase est encore active dans les capsules (figure 42). La variation d'absorbance en fonction du

temps peut donc être utilisée dans le calcul de l'activité enzymatique selon l'équation 1 (section 1.3.3.1).

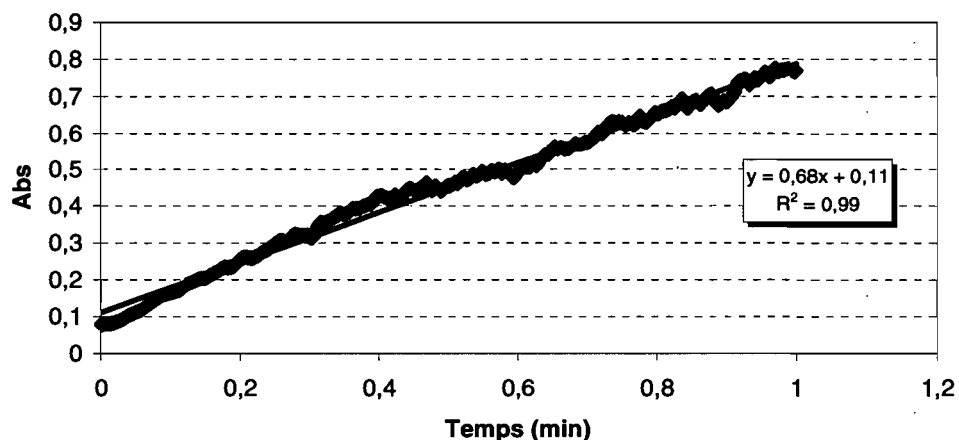


Figure 42. Mesure d'activité entre la laccase encapsulée (capsules 2,7 mg sèches) et le PPD (2,5 mM) dans un tampon phosphate pH 5,75. La variation d'absorbance en fonction du temps est convertie en unités d'activité (U) selon l'équation (1).

Malgré que le signal d'absorbance soit bruyant, il permet de poursuivre les recherches sur l'encapsulation de la laccase avec le PEI réticulé puisqu'une certaine quantité d'activité est maintenue. Toutefois, il est essentiel de quantifier l'efficacité d'encapsulation.

4.1.1 Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation se situe à deux niveaux : l'efficacité d'encapsulation de l'enzyme, c'est-à-dire combien d'enzymes de la solution initiale se retrouvent dans les capsules, et sa désactivation. D'une part, il peut y avoir une perte d'enzymes au moment de l'encapsulation. Celles-ci peuvent avoir diffusé en phase organique ou s'être retrouvées à l'extérieur de la paroi ce qui occasionne une perte d'enzymes. D'autre part, le procédé d'encapsulation peut causer une désactivation de l'enzyme. Ainsi, certaines enzymes peuvent se retrouver dans les capsules mais avoir perdu leur caractère catalytique ou encore se comporter

différemment dans les capsules comparativement à la solution libre. L'activité résultante dans les capsules est donc la somme des ces deux effets. Une perte d'activité enzymatique dans les capsules peut donc être due à un faible taux d'encapsulation des enzymes bien que celles-ci restent actives. Il peut également s'agir d'une importante désactivation des enzymes, ou bien entendu, une combinaison de ces deux facteurs.

L'efficacité nette d'encapsulation est calculée d'après l'activité totale de la laccase initiale et l'activité totale trouvée dans les capsules. Comme la solution de laccase concentrée a une activité spécifique de 1920 U/mL envers le PPD et que 0,600 mL ont été utilisés pour la synthèse, on peut estimer que l'activité totale est 1150 U. Quant à l'enzyme encapsulée, elle a une activité de 0,134 U/mg de capsules sèches et 0,862 g ont été produits, ce qui donne une activité totale de 115 U. Ainsi, on trouve une efficacité nette d'encapsulation de 10 %. Ce résultat englobe la perte d'enzymes et la désactivation.

Pour évaluer la perte d'enzymes, il faut quantifier l'enzyme dans la solution purifiée utilisée pour l'encapsulation et dans les microcapsules produites. Pour la solution d'enzymes, la concentration peut être mesurée facilement grâce l'absorbance de la laccase mesurée par spectrophotométrie. D'après des résultats précédents^[17], il y a 60 μ M de laccase dans la solution concentrée. Avec les capsules, la quantification n'est pas aussi facile. Nous pourrions faire une digestion acide sur des échantillons de laccase encapsulée afin de doser le cuivre contenu dans la laccase par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif), une méthode utilisée pour le dosage de métaux traces. Ceci demanderait beaucoup de microcapsules afin d'obtenir une concentration de cuivre qui soit supérieure à la limite de détection de l'appareil qui est d'environ 10 μ g/L. Une autre stratégie pourrait être de mesurer la quantité d'une protéine encapsulée dans les mêmes conditions grâce à des méthodes connues comme Biuret ou Lowry pour le dosage de protéines. Pour y arriver, il faudrait d'abord ouvrir les capsules afin de libérer les protéines. Ce type d'expérience nécessiterait alors une moins grande quantité

d'échantillon. Des travaux sont actuellement en cours afin de développer une façon d'ouvrir les capsules après leur formation en utilisant initialement des agents réticulant différents. Pour le moment, la quantification de la laccase dans les microcapsules n'a pas encore été faite.

Concernant la désactivation de l'enzyme, celle-ci peut être déduite d'après la quantité d'enzymes encapsulées et l'activité nette trouvée dans les capsules. En faisant la distinction entre la perte d'activité due à la perte d'enzymes et celle due à la désactivation, il serait alors possible d'améliorer l'efficacité nette d'encapsulation en agissant sur les paramètres qui affectent ces pertes. Toutefois, peu d'auteurs font cette distinction et parlent généralement que de l'efficacité nette d'encapsulation.

La désactivation de la laccase peut être provoquée par la réaction de réticulation. En effet, la réaction entre le polymère et l'agent réticulant forme des liens peptidiques entre les fonctions amines du polymère et les fonctions carboxyliques de l'agent réticulant. Il est très possible que cet agent réticulant réagisse également avec l'enzyme en solution, ce qui pourrait la désactiver en changeant sa structure tridimensionnelle. De plus, si l'enzyme est réticulée soit avec elle-même ou avec le polymère, il est possible que l'accès à son site actif soit limité, ce qui aurait pour conséquence de diminuer son activité. Pour ces raisons, il serait logique d'envisager une autre réaction de réticulation entre un polymère et un agent réticulant afin de minimiser la désactivation de l'enzyme.

4.1.2 Effet de l'encapsulation sur le pH d'activité enzymatique maximale

Un autre paramètre important dans la mesure de l'activité enzymatique est le pH. Pour vraiment mesurer l'activité enzymatique et non pas seulement la vitesse initiale de la réaction, il faut être dans les conditions où la vitesse initiale est maximale.

Pour la laccase (libre et encapsulée) et le PPD, différents pH entre 3 et 7 ont été testés. Afin de pouvoir comparer les résultats de l'enzyme libre à ceux de la laccase encapsulée, il est préférable d'utiliser les vitesses initiales relatives. En effet, la vitesse initiale de la réaction entre la laccase libre et le PPD est exprimée en $\text{mol de produit formé} \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{mL de solution de laccase purifiée})^{-1}$, tandis qu'elle est exprimée en $\text{mol de produit formé} \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{mg capsules})^{-1}$ dans le cas de la laccase encapsulée. Puisque les vitesses initiales ne sont pas exprimées dans les mêmes unités, les vitesses initiales ont toutes été rapportées par rapport à la vitesse initiale qui fut maximale pour chaque série de mesures (figure 43).

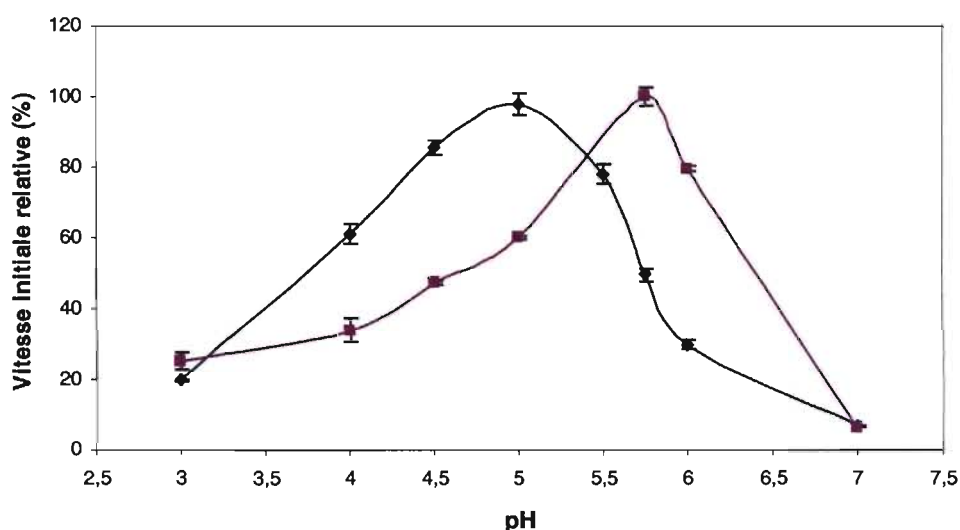


Figure 43. Effet du pH sur la vitesse initiale de la conversion du PPD par la laccase libre \blacksquare ($2,4 \times 10^{-8}$ mM Lcc, PPD 5mM) et encapsulée \blacksquare (1mg/mL capsules sèches, PPD 5mM) mesurée par spectrophotométrie ($\lambda=520$ nm). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur deux mesures.

Dans les deux cas, l'allure de la courbe reste la même, soit celle d'une cloche qui est caractérisée par une augmentation de la vitesse en fonction du pH jusqu'à l'atteinte d'un maximum, puis d'une décroissance lorsque le pH continue d'augmenter (figure 43). Cette allure de courbe vient du fait que deux effets dépendants du pH agissent sur la réactivité de la laccase: la différence de potentiel entre le PPD et la laccase ainsi que l'inhibition du site réactionnel $\text{Cu}_{T2}/\text{Cu}_{T3}$ par les ions OH^- [45]. Vu le

caractère oxydoréducteur de la laccase, son activité envers le PPD dépend de la différence de potentiel entre celui-ci et le site de liaison Cu_{T1} . Pour des substrats dont le mécanisme implique un ou des protons, cette différence de potentiel dépend du pH. Ainsi, quand le pH augmente, le potentiel d'oxydation du PPD augmente ^[46], ce qui diminue la différence de potentiel entre le PPD et la laccase et qui augmente l'activité enzymatique ^[45]. Cet effet est responsable de l'augmentation de la vitesse initiale de conversion entre le pH 3 et le pH donnant la vitesse maximale. Au-delà ce pH, la vitesse initiale diminue car les ions OH^- se lient au site réactionnel composé des atomes de cuivre de type 2 et 3 et le transfert électronique en provenance du cuivre de type 1 est ralenti, ce qui diminue l'activité de la laccase ^[45].

Au niveau de l'effet de l'encapsulation, un tampon phosphate 0,050 M pH 5,75 a permis d'obtenir la plus grande vitesse initiale pour l'enzyme encapsulée alors qu'un tampon phosphate 0,050 M pH 5,00 a permis d'obtenir la vitesse initiale la plus haute pour l'enzyme libre (figure 43). La différence entre le pH donnant la vitesse maximale pour la laccase libre et la laccase encapsulée s'explique par deux raisons : l'effet du polymère de la membrane de la microcapsule et la charge du substrat PPD. Comme il a été dit à la section 3.2.3, le PEI est un polymère chargé positivement à cause de la protonation de ses fonctions amines. Ainsi, plus le pH est faible, plus le polymère est protoné et plus grande est la charge positive portée. Donc si on compare la force ionique entre la solution de laccase libre à pH 5,00 et la suspension de capsules au même pH, on trouve que celle-ci est plus grande dans le cas des capsules. Et comme l'activité de la laccase dépend de la force ionique ^[47], cette augmentation de la force ionique due à la paroi chargée de la microcapsule peut être en partie responsable de la baisse d'activité à pH 5, ce qui déplace la vitesse maximale vers un pH plus élevé (5,75) où les fonctions amines sont moins protonées. Cet effet a également été observé sur la laccase immobilisée dans des billes d'alginate et de chitosan, car l'alginate peut absorber des ions H^+ ^[48]. Cette explication a toutefois plus de sens si la laccase se trouve à proximité de la membrane chargée, ce qui tend à être démontré par des études en cours au laboratoire. La deuxième raison qui explique le déplacement du pH procurant la vitesse maximale est que le PPD possède

également des fonctions amines qui peuvent être protonées. En effet, le PPD possède 2 pKa : un premier à 3,3 et un deuxième à 6,1. Ainsi, à pH 5, la majorité des molécules de PPD ont une de leurs deux fonctions amines protonée. Les molécules de PPD sont donc chargées positivement et pénètrent plus difficilement à travers la paroi de la capsule puisque celle-ci est également chargée positivement. Ceci explique pourquoi la vitesse obtenue au pH 5 avec la laccase encapsulée correspond seulement à 60 % de la vitesse maximale obtenue avec les capsules alors que ce même pH permet d'obtenir la vitesse maximale avec l'enzyme libre. Vers pH 5,75, la vitesse maximale est atteinte avec la laccase encapsulée. À ce pH, une plus grande quantité de molécules de PPD sont neutres et peuvent pénétrer à travers la paroi de la capsule sans subir de répulsion électrique.

Pour ce qui est de l'OPD dont la structure est pourtant similaire au PPD, le déplacement du pH donnant la vitesse initiale maximale n'a pas été observé. Dans ce cas, le tampon donnant la vitesse initiale maximale est McIlvaine (acide citrique et phosphate de sodium) 0,050 M pH 4,5 autant pour l'enzyme libre que pour l'enzyme encapsulée (figure 44). Une des différences entre le PPD et l'OPD est la valeur des pKa des fonctions amines. Les valeurs de pKa de l'OPD sont environ 1,6 et 4,5. Dans ce cas-ci la vitesse maximale obtenue avec l'enzyme encapsulée s'obtient environ au pH équivalent au deuxième pKa, où la moitié des molécules d'OPD sont neutres.

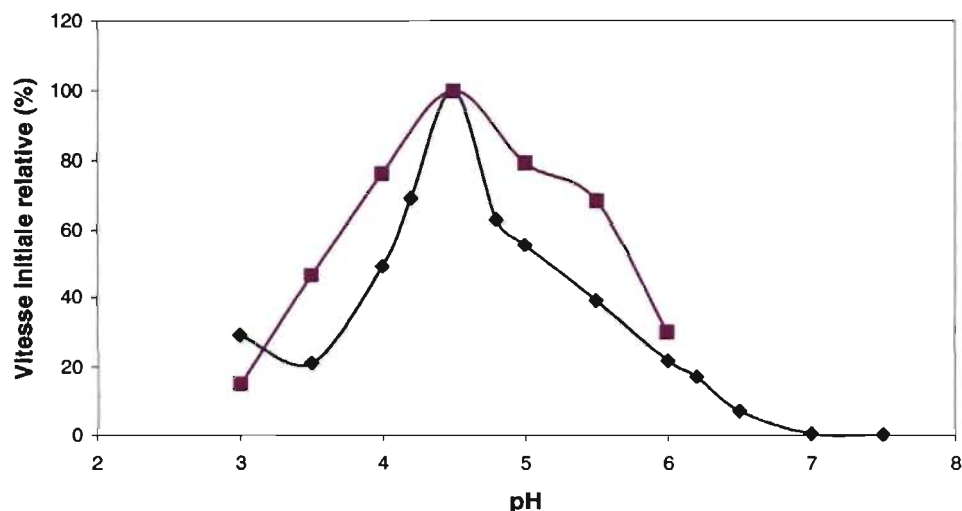


Figure 44. Effet du pH sur la vitesse initiale de la conversion de l'OPD par la laccase libre \blacklozenge ($4,3 \times 10^{-5}$ mM Lcc, OPD 2mM) et encapsulée \blacksquare (1,5 mg/mL capsules sèches, OPD 5mM) mesurée par consommation d'oxygène ($\Delta E = -0,6V$ vs Ag/AgCl).

Pour ce qui est de l'ABTS qui est le substrat de référence pour la laccase, il n'y a pas de comparaison possible puisque la réaction entre l'ABTS et la laccase encapsulée n'a pas lieu. Les résultats et éléments de discussion seront présentés à la section sur l'immobilisation sur une électrode (*section 5.1.1*).

4.1.3 Maintien de l'activité enzymatique à long terme

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les microcapsules contribuent au maintien de l'activité enzymatique, l'activité de l'enzyme encapsulée est comparée à celle de l'enzyme libre.

Les capsules lyophilisées ont été conservées à 4°C. Après 1 an, l'activité dans les capsules maintenues à 4°C était de 35 % par rapport à l'activité initiale lors de la préparation des capsules (figure 45). En comparaison, une solution de laccase libre conservée à 4°C maintient 93% de son activité initiale sur une période de 7 mois. À

cette température, l'encapsulation ne contribue pas de façon significative au maintien de l'activité enzymatique.

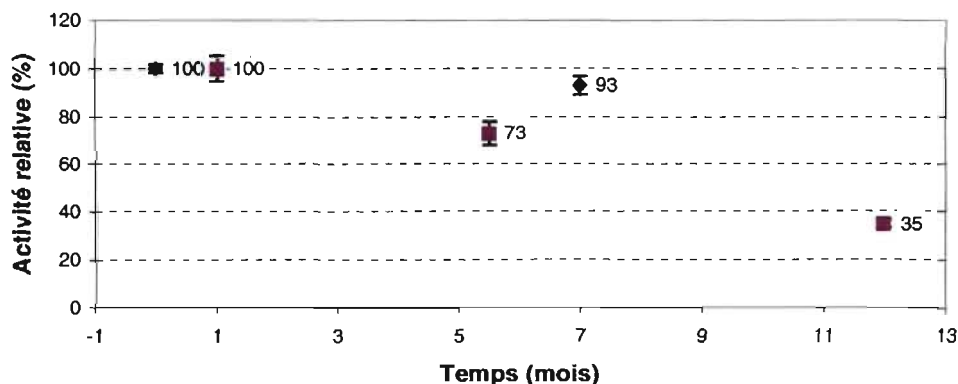


Figure 45. Activité relative maintenue dans \bullet une dilution de l'enzyme libre et dans \blacksquare les capsules lyophilisées conservées à 4°C vis-à-vis du PPD. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur 3 mesures.

Il serait intéressant de connaître cet effet à température ambiante. Malheureusement, nous n'avons pas conservé de dilution de l'enzyme à température ambiante, alors il est impossible de faire la comparaison pour le moment. Nous espérons que les microcapsules contribuent à maintenir l'activité enzymatique de la laccase puisque ça permettrait d'utiliser la microencapsulation pour maintenir les enzymes encapsulées actives plus longtemps que l'enzyme native à température ambiante. Pour créer des biocapteurs portatifs, le maintien de l'activité enzymatique à température ambiante est un avantage. Ce résultat laisse également croire que la microencapsulation a un effet sur le comportement de l'enzyme, ce qui peut être analysé d'une meilleure façon par la mesure des paramètres cinétiques.

4.2 Cinétique enzymatique

Le meilleur moyen de comparer le comportement de l'enzyme libre et de l'enzyme encapsulée vis-à-vis un substrat donné est de tracer les courbes de Michaelis-Menton afin d'en extraire les paramètres cinétiques. Les courbes de Michaelis-Menten ont d'abord été tracées avec le PPD comme substrat (figure 46 et

47). La première observation possible est que l'allure des deux courbes suit la loi de Michaelis-Menten, ce qui indique que le comportement général de l'enzyme active est maintenu dans les capsules. Bien que les deux courbes n'aient pas été faites avec la même quantité d'enzymes actives, l'analyse des paramètres cinétiques obtenus n'en dépend pas. Avec les capsules, il a été difficile d'utiliser la même quantité d'enzymes actives en raison de l'insolubilité des capsules qui limite la quantité maximale de capsules en suspension. En effet, si trop de capsules sont mises en suspension, celles-ci s'agglomèrent et les aliquots de cette suspension ne sont pas représentatifs de la quantité initiale.

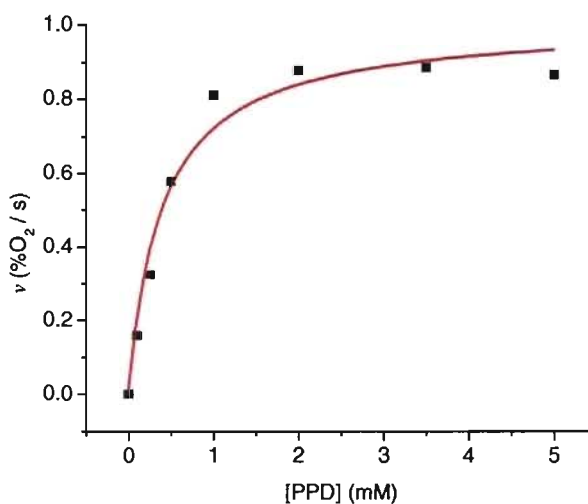


Figure 46. Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase libre (0,28 U/mL) avec le PPD comme substrat dans un tampon phosphate 0,050 M pH 5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 1,00 [PPD] / (0,40 + [PPD])$.

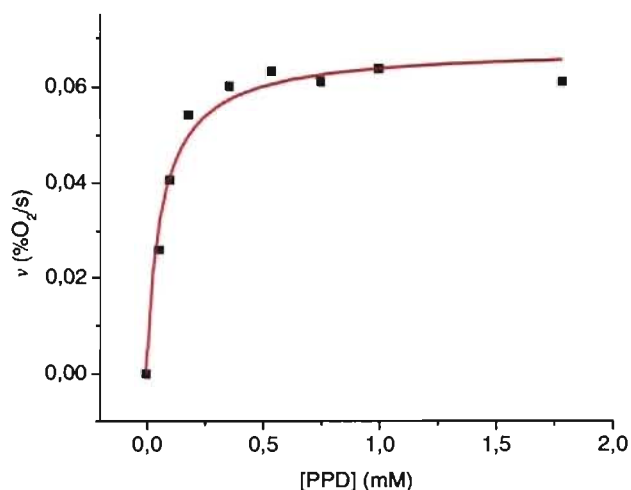


Figure 47. Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase encapsulée (0,018 U/mL) avec le PPD comme substrat dans un tampon phosphate 0,050 M pH 5,75. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 0,068 [\text{PPD}] / (0,06 + [\text{PPD}])$.

4.2.1 La vitesse maximale (V_{max})

Puisque la concentration d'enzyme est exprimée en enzymes actives d'après une mesure par spectrophotométrie, il est logique de trouver la même vitesse maximale pour l'enzyme libre et l'enzyme encapsulée. En effet, la vitesse maximale est de $1,00 \pm 0,06$ % O₂/s pour 0,32 U/mL alors qu'elle est de $0,068 \pm 0,002$ % O₂/s pour 0,018 U/mL. En faisant le rapport, on trouve que la vitesse maximale de la laccase encapsulée (1,21 pour 0,32 U/mL) est similaire à celle de la laccase libre. On ne peut donc pas vraiment tirer de conclusion à ce niveau puisque la vitesse maximale est le résultat de la concentration d'enzymes actives en solution et que cette concentration est fixée par l'expérimentateur. En fait, il faut comparer les concentrations d'enzymes nécessaires pour atteindre cette même vitesse maximale et voir s'il faut une plus grande quantité d'enzymes encapsulées que libres, ce qui voudrait dire que la capsule affecte le comportement de l'enzyme et diminue son caractère catalytique. Comme il a été mentionné à la section 4.1.1, nous soupçonnons que la laccase soit désactivée au cours de l'encapsulation à cause de la réticulation des fonctions amines, ce qui sous-entend que pour obtenir cette même vitesse initiale,

il faudrait effectivement une plus grande concentration d'enzymes en tenant compte qu'une certaine quantité d'entre-elles sont désactivées.

4.2.2 *La constante de Michaelis-Menten (K_M)*

La constante de Michaelis-Menten (K_M) peut également servir de comparaison entre les deux systèmes. Cette constante est représentative de l'affinité entre l'enzyme et le substrat et est indépendante de la concentration d'enzymes actives. Donc ici, bien que l'on ait le même système enzyme-substrat, on obtient des K_M différents pour la laccase libre ($0,40 \pm 0,05$ mM) et la laccase encapsulée ($0,06 \pm 0,01$ mM). Il faut dire qu'un K_M plus petit indique une meilleure affinité entre l'enzyme et le substrat puisqu'il faut une moins grande quantité de substrat pour atteindre la moitié de la vitesse maximale. Donc, nous croyons que dans le cas de la laccase encapsulée, le confinement de l'enzyme dû à la capsule favorise la réaction avec le substrat. Cette explication est une hypothèse qui pourrait être vérifiée par la préparation de capsules plus grosses. L'effet du confinement serait alors différent. D'autre part, plusieurs facteurs modifient également l'environnement de l'enzyme, ce qui affecte du même coup son comportement. Parmi les effets qui peuvent être provoqués par l'encapsulation se trouve la limitation de la diffusion du substrat à travers la membrane, l'accumulation ou la répulsion du substrat sur la paroi, la diminution d'oxygène dans la capsule, ainsi que la charge du microenvironnement créé par la capsule ^[47].

En fait, nous avons peu d'indices sur l'effet de la paroi de la capsule sur la diffusion du substrat à l'intérieur de la capsule, mais nous croyons que la réaction avec l'enzyme peut être limitée par la diffusion du substrat à travers la membrane de la capsule. Une expérience réalisée avec une électrode à disque tournant semble démontrer qu'effectivement la paroi des capsules limite la diffusion du substrat ^[47]. Pour le moment, nous n'avons toutefois pas quantifié cet effet. Il faudrait probablement comparer la vitesse de réaction entre des capsules de différentes porosités, ce qui induirait une diffusion différente du substrat. Pour arriver à cette fin,

il faudrait d'abord contrôler et mesurer la taille des pores des capsules, ce qui n'a pas été fait dans le cadre de ce projet.

Afin de confirmer les résultats obtenus, la courbe de Michaelis-Menten a également été tracée avec un substrat différent (OPD) (figures 48 et 49). Pour ce système, on trouve aussi que la vitesse maximale est proportionnelle à l'activité de l'enzyme en solution : $3,63 \pm 0,09$ %O₂/s pour 0,94 U/mL de laccase libre comparativement à $1,30 \pm 0,06$ %O₂/s pour 0,38 U/mL de laccase encapsulée, ce qui correspond à $3,21$ %O₂/s pour la même quantité d'enzymes actives. Au niveau de la constante de Michaelis-Menten, elle est de $1,09 \pm 0,08$ mM pour la laccase libre, tandis qu'elle est de $0,50 \pm 0,09$ mM pour la laccase encapsulée. L'effet reste donc le même, il semblerait que la microencapsulation favorise la réaction entre la laccase et son substrat (OPD).

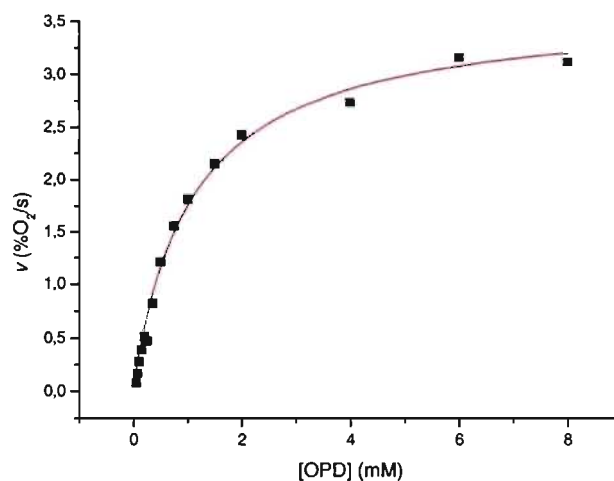


Figure 48. Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase libre (0,94 U/mL) avec l'OPD comme substrat dans un tampon acétate 0,050 M pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 3,63 [\text{OPD}] / (1,09 + [\text{OPD}])$.

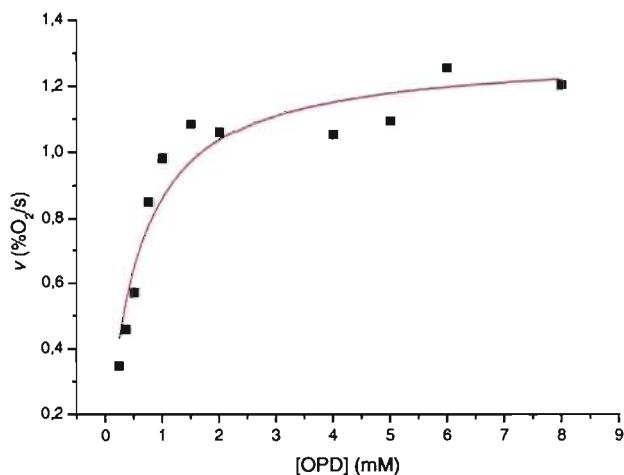


Figure 49. Courbe de Michaelis-Menton pour la laccase encapsulée (0,38 U/mL) avec l'OPD comme substrat dans un tampon McIlvaine 0,050 M pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 1,30 [OPD] / (0,50 + [OPD])$.

Maintenant, nous savons que la laccase reste active après son encapsulation, mais que seulement 10 % de l'activité initiale est maintenue dans les capsules. Afin d'augmenter l'efficacité d'encapsulation, il faudrait peut-être changer les conditions d'encapsulation et utiliser une autre réaction de réticulation que la formation de liens peptidiques puisque l'enzyme peut également être réticulée par cette réaction, ce qui est probablement une cause de sa désactivation. Concernant l'effet du pH sur l'activité enzymatique de la laccase encapsulée, il agit sur la protonation des fonctions amines du PPD. Ceci modifie la charge du substrat et affecte sa possibilité de traverser la paroi, ce qui déplace l'activité maximale vers un pH plus haut (5,75) avec laccase encapsulée comparativement à celui de la laccase libre (5,00). Au niveau de la stabilité à long terme, les expériences n'ont pas montré de différence significative entre l'activité de l'enzyme native et celle encapsulée lorsque celles-ci sont maintenues à 4°C. Pour avoir une meilleure idée et un autre point de comparaison, cette expérience aurait avantage à être recommencée, mais cette fois-ci en conservant l'enzyme libre et encapsulée à température ambiante. En ce qui concerne la cinétique enzymatique, la conclusion principale est que le confinement

créé par l'encapsulation semble favoriser la conversion du substrat et que la paroi de la capsule limite la diffusion du substrat.

5. IMMOBILISATION D'ENZYMES PAR MICROENCAPSULATION

5.1 *Immobilisation sur une électrode*

L'immobilisation sur une électrode a pour but d'évaluer le potentiel de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation pour la conception de biocapteurs électrochimiques. Dans cette optique, les défis de l'immobilisation sont de retenir l'agent bioactif à la surface du support de façon à maximiser la quantité d'enzymes immobilisées et maximiser l'efficacité du transfert électronique afin d'augmenter la sensibilité du biocapteur. Les expériences menées au laboratoire avaient pour premier but de vérifier le maintien de l'activité enzymatique dans les capsules immobilisées sur des électrodes puis de maximiser le signal afin d'améliorer la sensibilité du biocapteur.

5.1.1 *Détermination du potentiel appliqué pour la chronoampérométrie*

Dans l'expérience de chronoampérométrie, le substrat converti par l'enzyme est ensuite réduit par l'électrode (figure 9). Le courant résultant est représentatif de la vitesse de l'enzyme à convertir le substrat. Le courant augmente jusqu'à un état stationnaire où la conversion enzymatique est aussi rapide que la conversion électrochimique. Le but est de minimiser le temps requis pour atteindre l'état stationnaire, tout en maximisant le courant observé.

Une limitation des microcapsules chargées est toutefois que les substrats portant une charge opposée à celle de la paroi des microcapsules ne peuvent pénétrer la microcapsule pour réagir avec l'enzyme. C'est le cas de l'ABTS qui porte une charge négative (2^-) sous sa forme réduite. En effet, nous n'avons observé aucun signal pour la réaction entre l'ABTS et la laccase encapsulée, alors qu'il est possible de le mesurer avec l'enzyme libre. Nous avons donc dû choisir un autre substrat qui

puisse pénétrer la paroi chargée de la capsule pour réagir avec l'enzyme. Notre choix s'est tourné vers le PPD qui est un substrat de l'enzyme neutre dans son état réduit et qui possède également une bonne réversibilité d'oxydo-réduction (figure 33).

Afin que la conversion électrochimique ne soit pas limitée par la cinétique de la réaction à l'électrode, mais seulement par le transfert de masse du substrat, il faut appliquer un potentiel suffisamment négatif pour que toutes les molécules de PPD oxydées par l'enzyme qui arrivent à l'électrode soient instantanément réduites. Selon le voltampérogramme de l'oxydoréduction du PPD (figure 33), le pic de réduction se situe aux environs de +200 mV vs Ag/AgCl. Le courant de réduction dépend du potentiel appliqué lorsque celui-ci se situe près de la vague de réduction. Lorsque le potentiel appliqué est d'environ 100 mV inférieur au potentiel du pic de réduction, le courant de réduction devient indépendant du potentiel appliqué et les conditions sont celles où le courant est limité par le transport de masse. Ainsi, différents potentiels de cet intervalle ont été appliqués à une solution de PPD afin de mesurer le courant de réduction correspondant, une fois l'état stationnaire atteint (figure 50).

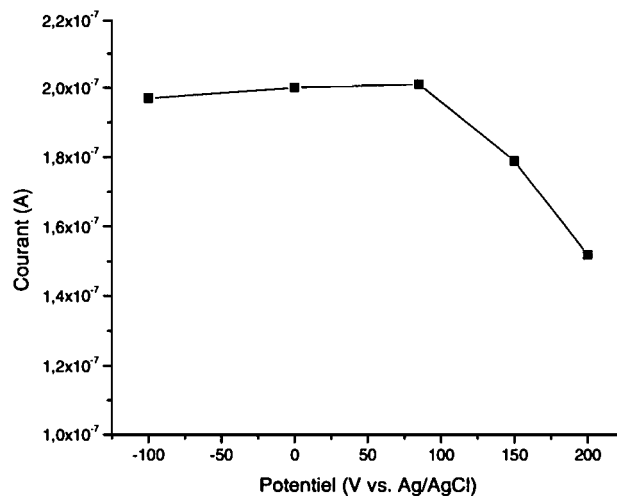


Figure 50. Dépendance du courant de l'état stationnaire de la réduction du PPD selon le potentiel appliqué à l'électrode de travail. Le courant mesuré correspond à celui obtenu après deux ajouts successifs de PPD ($[PPD]_{\text{finale}} = 10 \mu\text{M}$), adapté de la référence ^[47].

On trouve qu'un potentiel de +85 mV est suffisant pour obtenir le plus grand courant à l'état stationnaire pour la réduction électrochimique du PPD. À ce potentiel, le courant mesuré dépend uniquement du transfert de masse. Cette valeur est d'ailleurs concordante avec ce que Quan et ses collaborateurs avaient trouvé pour le PPD [46]. Le temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire dépend donc de la diffusion et peut donc donner des indications sur la résistance à la diffusion provoquée par les capsules. Ce potentiel de +85mV est donc utilisé pour les mesures de chronoampérométrie subséquentes.

5.1.2 *Évaluation d'un biocapteur ampérométrique basé sur la laccase immobilisée par microencapsulation*

Si on compare les résultats de chronoampérométrie obtenus avec une autre étude de la laccase et du PPD, on peut évaluer l'impact de la microencapsulation sur certaines caractéristiques du biocapteur.

Premièrement, le temps nécessaire pour atteindre 90 % du signal de l'état stationnaire ($t_{90\%}$) est de 7 s, ce qui est court. Cependant, comparativement aux travaux de Quan et de ses collaborateurs qui portent sur l'immobilisation de la laccase par liaison covalente sur des électrodes de platine modifié, ce temps est plus long que le $t_{90\%}$ de 2 s qu'ils ont obtenu avec le PPD [46]. La différence est sûrement due à la différence de proximité entre la laccase immobilisée par liaison covalente qui est plus proche de l'électrode que la laccase immobilisée par microencapsulation, ce qui assure un temps de diffusion plus petit pour le PPD. Au niveau de la sensibilité de notre système, elle est de 16 nA/ μ M PPD pour 0,02 U de laccase immobilisée, ce qui veut dire que pour une variation de 1 μ M de la concentration de PPD, le signal varie de 16 nA. Selon la définition de la sensibilité, plus celle-ci est grande, plus la méthode permet de distinguer de petites concentrations d'analytes [49]. Comparativement à ce que Quan a obtenu, soit 330 nA/ μ M PPD pour 2 U de laccase [46], cette sensibilité est beaucoup plus faible. Toutefois, il serait mieux d'avoir des

activités de laccase similaires pour comparer cette valeur. Finalement, le domaine de linéarité s'étend jusqu'à $30 \mu\text{M}$ dans notre cas, ce qui est correspondant à $29 \mu\text{M}$ [46]. Ce résultat est encourageant car il est obtenu avec une moins grande quantité d'enzymes actives, ce qui veut dire qu'on peut élargir le domaine de linéarité du biocapteur en utilisant la microencapsulation comme méthode d'immobilisation.

De plus, afin de maximiser la sensibilité du biocapteur, une attention particulière fut portée sur la quantité d'enzymes immobilisées. En supposant que les enzymes soient également réparties dans toutes les microcapsules, différentes quantités de capsules ont été adsorbées sur les électrodes ($3 \mu\text{g}$; $6,5 \mu\text{g}$ et $9 \mu\text{g}$) (figure 51).

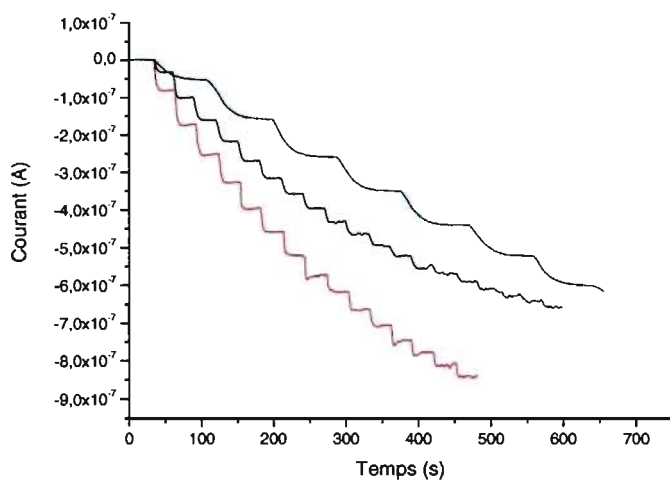


Figure 51. Effet de la quantité de capsules immobilisées — $3\mu\text{g}$ — $6,5\mu\text{g}$ — $9\mu\text{g}$ sur l'atteinte de l'état stationnaire entre la laccase encapsulée et le PPD ($\Delta E = +85 \text{ mV}$ vs Ag/AgCl).

L'effet de la quantité de capsules immobilisées influence deux aspects du système : le temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire et le courant résultant (réponse). On s'attend à ce que le courant mesuré augmente selon la quantité d'enzymes immobilisées puisqu'une plus grande quantité d'enzymes permet d'atteindre une vitesse maximale plus grande. Le courant est en effet une indication de la vitesse de la réaction enzymatique, car c'est une mesure de charge par unité de temps (C/s) et

que cette charge est proportionnelle au nombre d'électrons échangés pour la conversion du substrat. Le courant atteint après 5 additions de PPD est de $-2,68 \times 10^{-7}$ A pour 3 μg de capsules, de $-3,98 \times 10^{-7}$ A pour 6,5 μg et de $-4,39 \times 10^{-7}$ A pour 9 μg , ce qui confirme nos attentes selon lesquelles une plus grande quantité de capsules permet de convertir plus de substrat par seconde, ce qui produit un plus grand signal de courant. Au niveau du temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire, on constate qu'une grande quantité de capsules augmente ce temps de réponse. Nous croyons que ceci est dû aux contraintes imposées par la couche de microcapsules immobilisées sur la diffusion du PPD. Ainsi, la quantité intermédiaire de 6,5 μg de capsules permet d'obtenir le meilleur rapport entre la rapidité d'atteinte de l'état stationnaire et la maximisation du courant produit.

5.1.3 Évaluation du K_M par chronoampérométrie

La constante de Michaelis-Menten peut également être déterminée grâce aux mesures de chronoampérométrie. En rapportant l'inverse de la vitesse initiale (exprimée en unités de courant) sur l'inverse de la concentration de substrat, on obtient la représentation de Lineweaver-Burk (équation 10).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (10)$$

où v = vitesse initiale (mol/s)
 K_M = constante de Michaelis-Menten (M)
 V_{\max} = vitesse maximale (mol/s)
 $[S]$ = concentration de substrat (M)

Selon cette représentation, l'ordonnée à l'origine correspond à la valeur $1 / V_{\max}$ et l'abscisse à l'origine correspond à $-1/K_M$. Donc d'après une mesure de chronoampérométrie, on peut porter l'inverse du courant en fonction de l'inverse de la concentration du substrat en solution (figure 52).

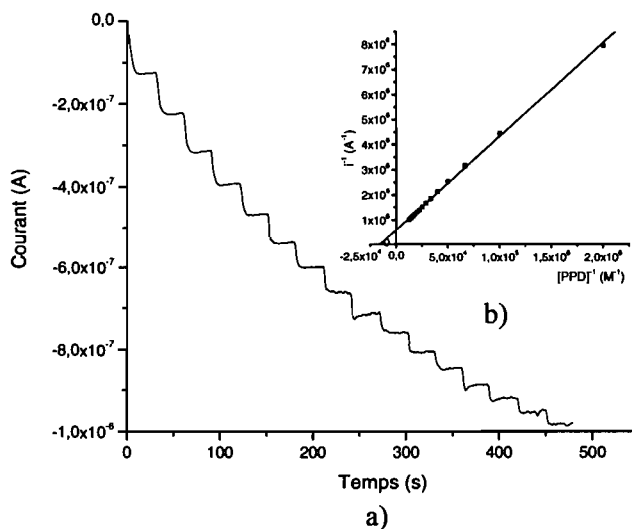


Figure 52. a) Chronoampérométrie de la réduction électrochimique du PPD oxydé par la laccase immobilisée par microencapsulation. Chaque augmentation de courant est obtenue après un ajout de 50 μL d'une solution 0,50 mM de PPD. b) Représentation de Lineweaver-Burk obtenue d'après le même chronoampérométrie, permettant d'obtenir les paramètres cinétiques de l'équation de Michaelis-Menten, adapté de la référence ^[47].

D'après cette représentation mathématique, la constante de Michaelis-Menten apparente est 64 μM , ce qui est concordant avec ce qui a été obtenu d'après les mesures de consommation d'oxygène ($60 \pm 10 \mu\text{M}$) (section 4.2.2.). Il semblerait que le fait que les capsules soient immobilisées à la surface d'une électrode comparativement à une suspension n'affecte pas la cinétique enzymatique au niveau de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Ce résultat est encourageant parce qu'il démontre le potentiel d'utiliser la microencapsulation comme méthode d'immobilisation d'enzymes sur des électrodes pour la conception de biocapteurs.

Donc, au niveau de l'immobilisation sur des électrodes, la microencapsulation est envisageable parce qu'elle permet au substrat de réagir avec l'enzyme tout en assurant la proximité avec l'électrode. Le temps de réponse est toutefois plus grand que pour la laccase adsorbée directement sur une électrode, mais demeure assez court pour la conception d'un biocapteur. Au niveau de la sensibilité, nous avons trouvé qu'elle est plus faible que pour d'autres électrodes modifiées qui comportent plus

d'enzymes actives. Aussi, nous avons constaté qu'une trop grande quantité de microcapsules immobilisées tend à limiter la diffusion du PPD, ce qui a pour effet d'augmenter le temps de réponse. Pour obtenir un temps de réponse court de même qu'un grand signal, il faut donc immobiliser peu de capsules, mais celles-ci doivent idéalement contenir beaucoup d'enzymes actives. Un effort au niveau de la microencapsulation pourrait être dirigé dans ce sens. Finalement, nous avons également trouvé une constante de Michaelis-Menten pour les microcapsules adsorbées comparable à celle que nous avons trouvée pour les microcapsules en suspension, ce qui indique que l'immobilisation des microcapsules n'affecte pas la cinétique (affinité) entre la laccase et le PPD.

Une limitation demeure toutefois dans le fait que la paroi des microcapsules soit chargée, ce qui limite le nombre de substrats possibles. Néanmoins, ceci pourrait s'avérer un avantage pour une application où une discrimination basée sur la charge des substrats serait nécessaire^[47]. Par exemple, le nafion a déjà été utilisé avec succès pour détecter la dopamine malgré des interférents comme l'acide ascorbique^[47]. Les microcapsules pourraient également être préparées à partir de polymères neutres ou enrobées d'un polymère négatif, ce qui annulerait la charge globale.

Maintenant, afin de vérifier la polyvalence de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation, celle-ci fut appliquée à la conception de papiers bioactifs.

5.2 *Immobilisation sur le papier*

Le concept de papiers bioactifs est relativement nouveau. Parmi les fonctions que pourraient remplir de tels papiers, il y a la détection, la capture et la désactivation de substances toxiques. Dans tous les cas, le premier défi est d'immobiliser les agents de reconnaissance biologiques afin de les retenir à la surface du papier tout en maintenant leur activité. Du point de vue pratique, il est essentiel que l'étape d'immobilisation d'enzyme soit la plus compatible possible avec les procédés de fabrication du papier déjà existants. Nous avons donc commencé l'évaluation de cette

méthode d'immobilisation en vérifiant la rétention des enzymes sur le papier, ainsi que leur résistance à la chaleur.

5.2.1 Rétention physique des enzymes immobilisées

Afin de vérifier la capacité des capsules à retenir l'enzyme sur le papier, de l'eau a été passée au travers d'une section de formette où la laccase avait été immobilisée. L'eau ainsi filtrée a par la suite été soumise à une mesure d'activité enzymatique par spectrophotométrie (figure 53). La comparaison est faite entre une formette où la laccase libre a été déposée directement sur le papier et une formette où la laccase a été immobilisée grâce aux microcapsules.

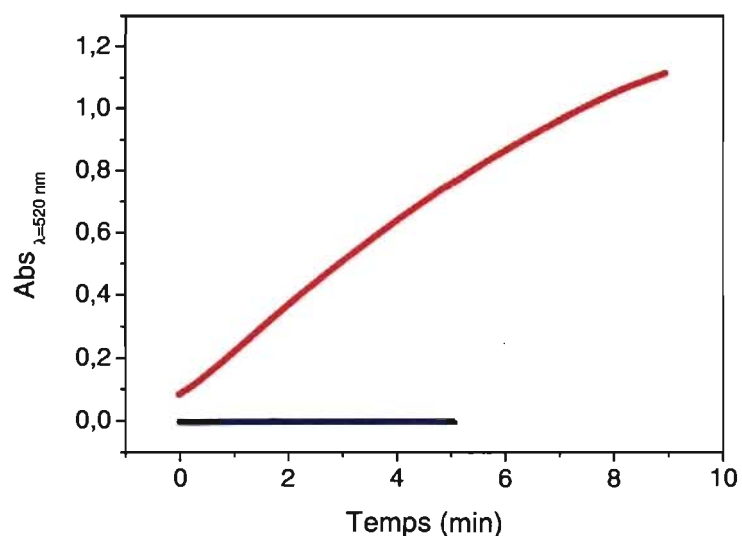


Figure 53. Absorbance (mesurée en continue) du PPD oxydé par la laccase dans l'eau de filtration passée à travers une section de formette avec laccase — simplement adsorbée et — immobilisée par microencapsulation.

Les résultats montrent une importante activité enzymatique dans l'eau utilisée sur la formette avec la laccase simplement adsorbée comparativement à l'eau utilisée sur le papier où la laccase était immobilisée avec les microcapsules. Ceci montre que

l'encapsulation contribue à la rétention de l'enzyme sur le papier. Cependant, une limite de cette méthode de mesure est que seul un petit volume d'eau (20 mL) peut être filtré pour réaliser ce test puisque la mesure par spectrophotométrie ne peut être faite sur un volume supérieur à 2,8 mL. Si le volume d'eau filtrée est grand, la laccase y est donc très diluée et les mesures de spectrophotométrie ne sont pas assez sensibles. Nous avons donc pensé à une autre stratégie pour mesurer l'activité de la laccase après la filtration d'eau, en mesurant l'activité directement sur le papier avec la cellule à oxygène.

En procédant de cette façon, on peut utiliser n'importe quel volume d'eau puisqu'on mesure l'activité résiduelle de l'enzyme sur le papier et non pas dans l'eau de lavage. Encore une fois, de l'eau a été filtrée sur une section de formette (diamètre = 6 mm) avec la laccase simplement adsorbée et avec laccase immobilisée par encapsulation. L'activité a ensuite été mesurée sur le papier résultant d'après la consommation d'oxygène. La comparaison avec des morceaux de formettes qui n'ont pas subi de filtration d'eau permet de calculer le pourcentage d'activité retenue sur le papier après le passage de 250 mL d'eau (figure 54). Les résultats sont éloquentes.

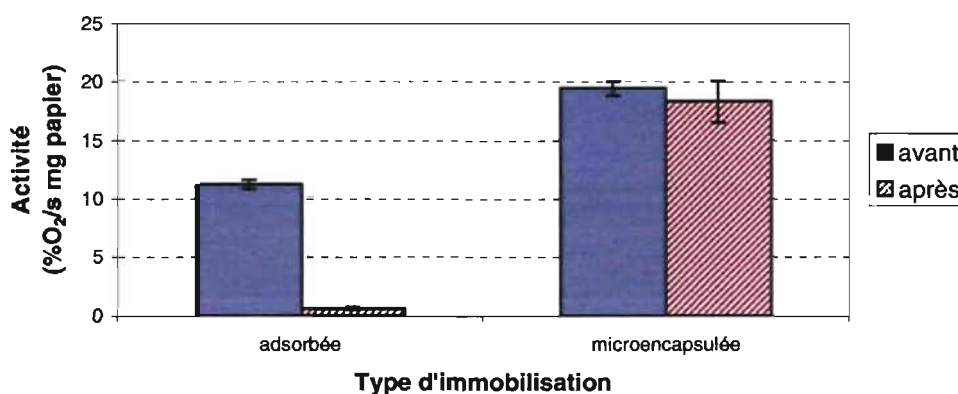


Figure 54. Mesures de l'activité enzymatique avant et après filtration de 250 mL d'eau sur une section de formette (~ 6 mg) avec laccase simplement adsorbée et immobilisée par microencapsulation. L'activité est mesurée avec l'*o*-phénylènediamine (OPD) (2 mM) dans un tampon McIlvaine pH 4,5. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois mesures.

L'activité sur le papier avec la laccase simplement adsorbée est retenue à 6% seulement, tandis que celle sur les formettes avec laccase immobilisée par microencapsulation est retenue à 94% même après la filtration de 250 mL d'eau. Ceci indique que les microcapsules contribuent efficacement à retenir l'enzyme sur le papier. La méthode d'immobilisation par microencapsulation pourrait donc servir à la conception de papier bioactifs afin de retenir les biomolécules à la surface du papier. Il reste toutefois des difficultés à utiliser les enzymes comme éléments de reconnaissance, car celles-ci sont fragiles à la désactivation par la chaleur utilisée dans le processus de fabrication de papiers.

5.2.2 Résistance thermique

Nous avons voulu vérifier si le fait d'encapsuler l'enzyme avant de l'immobiliser sur le papier avait une influence sur le maintien de son activité à différentes températures. La résistance à la température pourrait être un avantage intéressant de l'utilisation de microcapsules pour la production industrielle de papiers bioactifs. En effet, certaines étapes de la production du papier nécessitent de hautes températures. Si les enzymes utilisées pour les papiers bioactifs sont désactivées à ces étapes de la production du papier, elles deviennent alors inutiles. Pour cette raison, nous avons voulu voir si les microcapsules de PEI que nous avons préparées contribuent à maintenir l'activité de la laccase à plus haute température.

Plusieurs formettes ont été préparées avec des enzymes encapsulées et ont été séchées à différentes températures allant de 25°C à 140°C pendant des temps qui varient entre 15 et 55 minutes selon la température appliquée. Selon un test qualitatif de la coloration violette du PPD oxydé, nous avons vu que seules les formettes séchées à des températures inférieures à 60°C ont maintenu une activité enzymatique (figure 55).



Figure 55. Test qualitatif d'activité après 20 minutes entre le PPD (2 mM) et la laccase immobilisée par microencapsulation sur des formettes séchées à différentes températures entre 25°C et 140°C.

Comparativement à la laccase immobilisée par simple adsorption pour laquelle nous avons observé un changement de couleur sur les formettes séchées à 25°C et 60°C, il n'y a pas de différence au niveau de l'activité avec celles immobilisées par microencapsulation. Dans les deux cas, aucune activité n'est maintenue au-delà de 60°C. Dans ce cas-ci, les microcapsules de PEI ne contribuent donc pas à protéger la laccase de la désactivation par la chaleur. Toutefois, le test que nous avons réalisé n'est pas représentatif d'un réel procédé industriel puisque nous avons soumis le papier à de hautes températures pendant des temps beaucoup plus longs (15 à 55 minutes) que pour un procédé industriel réel. Si nous avions vu que l'activité de la laccase était maintenue malgré ces conditions plus rudes, nous aurions estimé qu'elle aurait pu résister à une telle température pendant moins de temps. Mais comme elle n'a pas résisté, nous pouvons toujours nous demander si les microcapsules de PEI auraient contribué à maintenir l'activité des enzymes soumises à l'application d'une température élevée pendant moins de temps.

Dans l'éventualité où le PEI ne contribuerait pas à protéger l'enzyme de l'effet de la température, nous pourrions penser à une autre approche qui serait de procéder à l'immobilisation des enzymes après le séchage du papier. Il s'agirait alors d'imprimer les capsules sur le papier pour en faire un revêtement. Dans ce cas, il faudrait donc révéifier le potentiel de la méthode à maintenir les capsules sur le papier.

Pour résumer cette section sur l'immobilisation sur le papier, nous pouvons souligner l'excellent résultat obtenu pour la rétention des enzymes sur le papier grâce

à la microencapsulation. Toutefois, la résistance thermique de la laccase n'est pas améliorée par le fait qu'elle soit encapsulée. Il faudra donc privilégier l'utilisation d'enzymes thermostables ou l'immobilisation des microcapsules après que le papier ait été séché. Le prochain défi au niveau de ce genre de capteur sera la production du signal.

Finalement, nous croyons avoir démontré la polyvalence de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation puisque la laccase encapsulée a pu être immobilisée avec succès sur des électrodes ainsi que sur du papier. Dans les deux cas, il a été possible de maintenir une activité suffisante pour pouvoir détecter le PPD comme substrat. Pour l'immobilisation sur des électrodes, il est possible de comparer la méthode d'immobilisation avec d'autres méthodes existantes et de trouver des avantages, tandis qu'il n'est pas encore vraiment possible de le faire au niveau du papier, puisque ce champ de recherche est très nouveau.

Pour ce qui est des applications pratiques, les biocapteurs ampérométriques pourraient être utilisés pour la détection d'analytes d'intérêt, comme les polluants de l'eau par exemple. Plusieurs enzymes convertissent ou sont inhibées par les molécules organophosphorées qui sont à la base de plusieurs pesticides trouvés dans l'eau. Dans la même lignée, on peut aussi penser aux agents neurotoxiques qui sont également des molécules organophosphorées dont la toxicité n'est plus à prouver. Pour ces molécules, il serait donc nécessaire de les désactiver et non pas seulement de les détecter. Les papiers bioactifs pourraient être employés à cet effet.

6. DÉCOMPOSITION D'AGENTS NEUROTOXIQUES

Les agents neurotoxiques sont des molécules d'un grand intérêt puisqu'elles sont hautement toxiques et peuvent être utilisées comme armes chimiques. Il pourrait donc être extrêmement intéressant de disposer de méthodes de détection rapides ou encore de dispositifs de protection personnelle.

D'après l'article d'Amitai paru en 1998 ^[50], il semblerait que la laccase de *Pleurotus ostreatus* arrive à oxyder l'agent neurotoxique VX en coupant le lien P-S, ce qui en diminue la toxicité (figure 21). Nous avons donc eu l'idée d'utiliser la laccase pour la décomposition d'agents neurotoxiques. Dans cette optique, l'encapsulation de la laccase serait utilisée pour l'immobilisation, que ce soit sur une électrode pour un biocapteur ou sur du papier pour un masque de protection.

Nous avons également utilisé la phosphatase alcaline qui a déjà été appliquée à la décomposition d'un composé modèle du sarin.

6.1 Laccase

Comme nous ne voulons, ni ne pouvons, travailler directement avec le VX qui est hautement toxique, nous avons tenté de reproduire cette réaction à l'aide d'un de ses composés modèles, le Demeton-S. Pour cette réaction, un médiateur (ABTS) avait également été utilisé ^[50]. Le médiateur est une molécule qui assure le transfert électronique entre l'enzyme et le substrat. La première étape fut donc de vérifier la faisabilité de la réaction avec la laccase native (non encapsulée) provenant de *Trametes versicolor*.

Les mesures de consommation d'oxygène avec l'enzyme native n'ont pas démontré que le Demeton-S était oxydé par la laccase (figure 56). Selon les résultats, la laccase oxyde bien l'ABTS (médiateur) mais la comparaison entre une solution

contenant le Demeton-S et une solution n'en contenant pas (blanc) ne montre pas de preuve de la décomposition du Demeton-S.

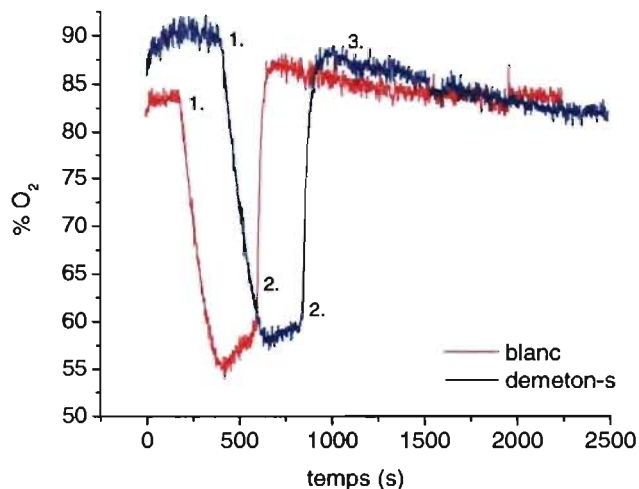


Figure 56. Essais enzymatiques entre la laccase libre (0,14 U/mL) et l'ABTS (0,5 mM) comme médiateur. L'ABTS est ajouté au point (1). Après l'oxydation de tout l'ABTS, de l'air est rajouté à la solution pour ne pas limiter la quantité d'oxygène disponible pour la réaction (2). — Ajout de Demeton-S (0,8 mM) (3) et — aucun ajout de Demeton-S (blanc).

À ce niveau, deux hypothèses sont possibles : cette enzyme n'agit effectivement pas sur le Demeton-S, ou le Demeton-S est décomposé via sa réaction avec l'ABTS, mais le produit formé est un inhibiteur de la laccase, ce qui ferait en sorte que le signal de consommation d'oxygène n'est pas visible. Pour vérifier ces hypothèses, la mesure a été refaite et suite à l'ajout du Demeton-S, de l'ABTS a de nouveau été ajouté. La consommation d'oxygène significative révèle que la laccase semble toujours active (figure 57).

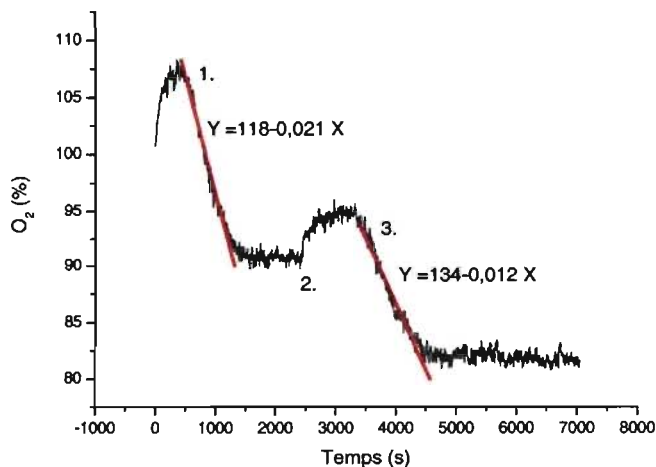


Figure 57. Essai enzymatique entre la laccase libre (0,02 U/mL) et l'ABTS (0,2 mM), utilisé comme médiateur, qui est ajouté au point (1), puis d'un ajout de Demeton-S (0,02 mM) (2) et d'un deuxième ajout d'ABTS (0,2 mM) (3).

Si on réalise un essai enzymatique sans Demeton-S (blanc) (figure 58), on obtient une première consommation d'oxygène qui s'effectue à une vitesse de 0,022 % O₂/s due au premier ajout d'ABTS et une deuxième consommation d'oxygène qui s'effectue à une vitesse de 0,013 % O₂/s due au deuxième ajout d'ABTS.

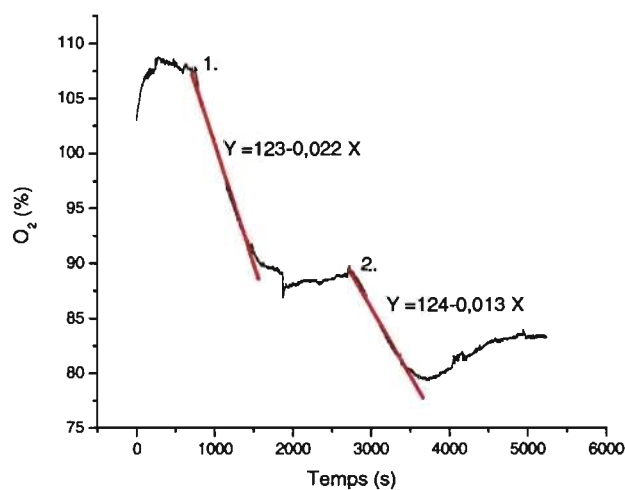


Figure 58. Essai enzymatique entre la laccase libre (0,02 U/mL) et un premier ajout d'ABTS (0,2 mM) (1) puis un deuxième ajout d'ABTS (0,02mM) (2).

Comparativement aux vitesses obtenues pour l'essai enzymatique réalisé avec le Demeton-S (0,021 % O₂/s et 0,012 % O₂/s), on trouve dans l'essai réalisé sans Demeton-S que les pentes sont respectivement les mêmes pour le premier et le deuxième ajout d'ABTS. Ces résultats indiquent que la laccase de *Trametes versicolor* ne semble pas être inhibée par le Demeton-S, puisque le deuxième ajout d'ABTS provoque la même consommation d'oxygène pour les deux essais enzymatiques. De plus, ces essais laissent croire que la laccase n'oxyde pas le Demeton-S.

Pour connaître les produits de réaction exacts, il faudrait soumettre un échantillon à la spectrométrie de masse. Ceci permettrait de dire si de nouveaux produits sont formés suite à l'essai enzymatique. En fait, avec l'équipement disponible au laboratoire, nous avons soumis des échantillons à la chromatographie en phase gazeuse avec le FID comme détecteur afin de vérifier si le signal de Demeton-S diminue après un essai enzymatique de 24 h (figure 59). Nous avons trouvé que le signal de Demeton-S ne semble pas diminuer après une réaction de 24 h avec la laccase libre et l'ABTS comme médiateur (aire = 13,9 unités), comparativement au blanc (aire = 12,9 unités). Il semblerait donc que cette laccase ne puisse décomposer le Demeton-S.

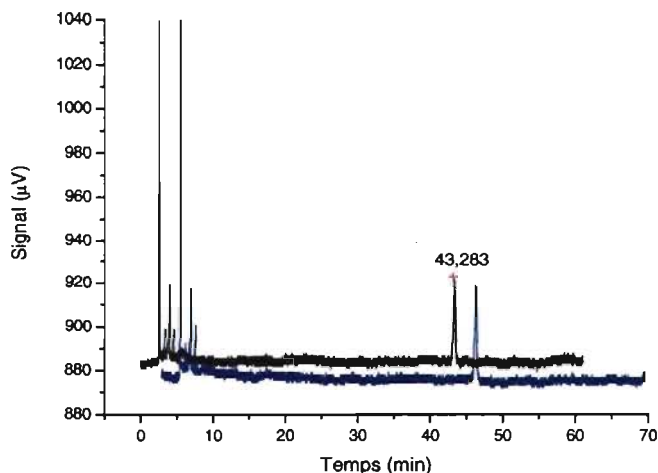


Figure 59. Chromatogrammes en phase gazeuse (colonne DB-WAX, 30 m, diamètre interne = 0,25 µm, isotherme = 175°C) obtenu d'après un — essai enzymatique entre la laccase libre (0,5 U/mL) avec l'ABTS comme médiateur (0,5 mM) et le Demeton-S comme substrat (2 mM), et d'après un — blanc qui contient seulement le Demeton-S (2 mM). L'intégration du pic de Demeton-S (43 min) est de 13,9 unités pour l'essai enzymatique de 24 h et de 12,9 pour la solution de blanc.

D'après l'article d'Amitai, la laccase a été utilisée avec l'ABTS comme médiateur et le VX comme substrat ^[50]. Nous n'avons trouvé aucun autre article faisant état de la décomposition du Demeton-S par la laccase bien que cette molécule soit fréquemment utilisée comme composé modèle du VX. Les deux seules différences entre les essais enzymatiques d'Amitai et les nôtres sont la source de laccase et la nature du substrat. La source de laccase n'est pas en cause dans l'impossibilité de décomposer le Demeton-S puisque l'ABTS utilisé avec les deux sources de laccase a bel et bien été oxydé. La source du problème viendrait donc de la différence entre la molécule de Demeton-S et celle de VX (figure 60). Selon l'article d'Amitai, le lien qui est brisé lors de l'essai enzymatique est le lien P-S ^[50]. Ce lien est bien présent dans les deux molécules, mais l'environnement électronique autour du phosphore est bien différent puisqu'il est lié à un méthyl dans le cas du VX et à un oxygène dans le cas du Demeton-S. Le Demeton-S est donc un dérivé du phosphate, tandis que le VX est un dérivé d'alkylphosphonate, ce qui fait que le Demeton-S est moins susceptible à une attaque nucléophile que le VX puisque le phosphonate est un

meilleur électrophile que le phosphate. Ainsi pour déterminer quel en est l'effet sur l'oxydation enzymatique, il faudrait connaître le mécanisme de la réaction. Malheureusement, le mécanisme d'oxydation du VX par le système laccase/médiateur est encore mal connu. Selon l'hypothèse du groupe d'Amitai, il s'agirait d'une oxydation du soufre suivie par la rupture du lien P-S^[50]. Ils avancent également que l'azote en position β joue un rôle dans l'oxydation enzymatique^[50]. Ceci voudrait dire que le Demeton-S n'est en fait pas un si bon composé modèle du VX pour cette réaction.

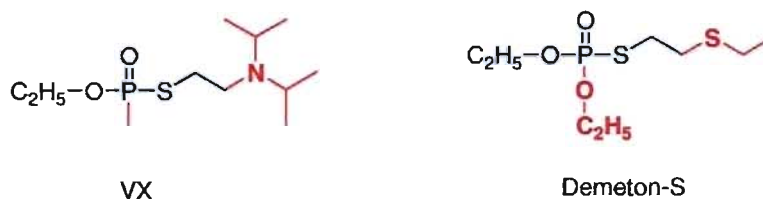


Figure 60. Mise en évidence des différences structurales entre la molécule de VX et celle de Demeton-S. Le VX est un dérivé d'alkylphosphonate et le Demeton-S est un dérivé du phosphate.

La laccase a également été utilisée avec des composés modèles du gaz sarin, soit le diméthyl méthylphosphonate (DMMP) et le monofluorophosphate (MFP). Dans tous les cas, l'allure des courbes prises par mesure de consommation d'oxygène demeure la même que celle obtenue pour le Demeton-S, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de consommation d'oxygène par la laccase lorsque les composés modèles sont ajoutés aux solutions (figure 61 et 62). Des essais ont été faits avec différentes concentrations de substrat, de médiateur et avec différents médiateurs et aucun de ces essais n'a donné de résultats encourageant l'utilisation de la laccase.

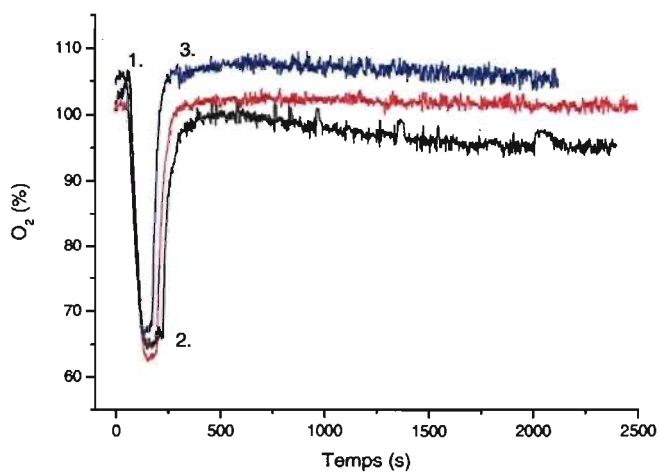


Figure 61. Essais enzymatiques entre la laccase libre (0,5 U/mL) et l'ABTS (0,5 mM) utilisé comme médiateur ajouté au point (1), avec ajout d'air (2), et le DMMP comme substrat — 1 mM, — 2 mM et — 4 mM (3).

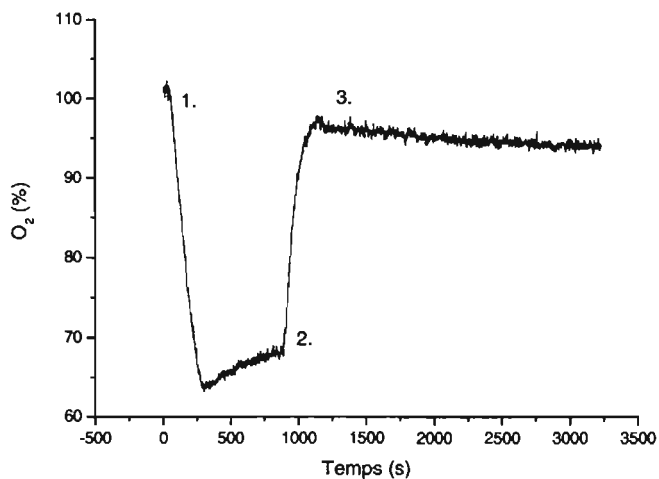


Figure 62. Essais enzymatiques entre la laccase libre (0,11 U/mL) avec l'ABTS (0,5 mM) utilisé comme médiateur (1), un ajout d'air (2) et le MFP (1 mM) comme substrat (3).

Étant donné les résultats négatifs obtenus avec la laccase native, nous n'avons pas pu évaluer l'effet de la microencapsulation sur ces réactions et avons jugé injustifiable de poursuivre les essais avec cette enzyme pour ces composés modèles.

Une autre enzyme a donc été sélectionnée pour la décomposition d'agents neurotoxiques, la phosphatase alcaline.

6.2 *Phosphatase alcaline*

Selon plusieurs articles dont celui de Yoza ^[24], la phosphatase alcaline peut être utilisée pour décomposer le monofluorophosphate de sodium qui est un composé modèle du sarin, ce qui en fait un cas intéressant. La première étape fut encore une fois de suivre la réaction entre l'enzyme libre et le substrat, sauf que cette fois, la consommation d'oxygène ne peut être utilisée. La réaction est donc suivie par rapport à la détermination d'ions F^- faite grâce à une électrode sélective à l'ion fluorure qui est d'abord calibrée avec des solutions étalons de NaF dont la concentration de F^- est située entre 0,1 et 10 mM. Pour les essais enzymatiques sur le MFP, la présence d'ions F^- révèle la rupture du lien P-F qui libère des F^- . Cette réaction est d'ailleurs très envisageable comme réaction de décomposition du sarin car la rupture du lien avec le fluor diminue la toxicité de cette molécule ^[24].

Les essais enzymatiques entre l'APase et le MFP sont comparés à des solutions de blanc : MFP seul et tampon seulement (figure 63). D'après le blanc fait avec seulement le MFP dans le tampon, il ne semble pas y avoir de dissociation significative du F^- due à l'hydrolyse non catalysée. Donc, on peut déduire que l'augmentation du signal de F^- obtenu pour les deux essais enzymatiques est due à l'hydrolyse enzymatique du MFP par l'APase. Une plus grande quantité d'enzymes actives (3 U/mL) a permis de dégrader plus rapidement le MFP, comparativement à 0,5 U/mL d'APase. Avec 3 U/mL, 114 % du MFP a été dégradé, alors que 80 % du MFP a été dégradé avec 0,5 U/mL. Le fait qu'on obtienne une concentration de F^- supérieure à celle de MFP initialement en solution est dû à l'incertitude sur la mesure.

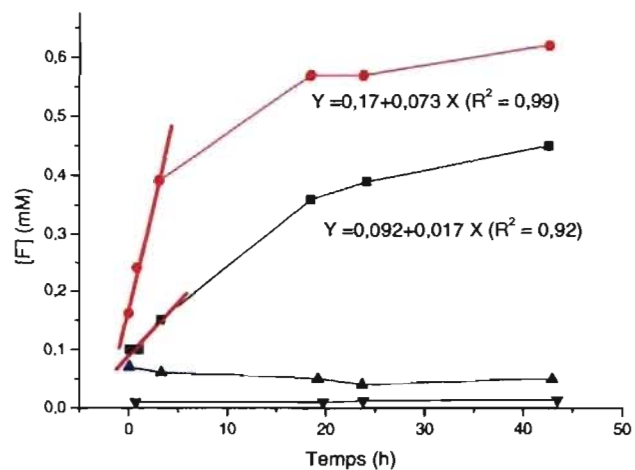


Figure 63. Essais enzymatiques entre l'APase libre et le MFP suivis par l'électrode sélective aux ions F^- . —■— APase (0,5 U/mL) et MFP (0,5 mM) (vitesse initiale = 0,017 mM F^- /h), —●— APase (3 U/mL) et MFP (0,5 mM) (vitesse initiale = 0,073 mM F^- /h), —▲— MFP seul (0,5 mM), —▼— tampon seul (TRIS-HCl (5mM) pH 7,2 $MgCl_2$ (1mM)).

L'étape suivante est de vérifier si l'APase encapsulée peut également dégrader le MFP (figure 64).

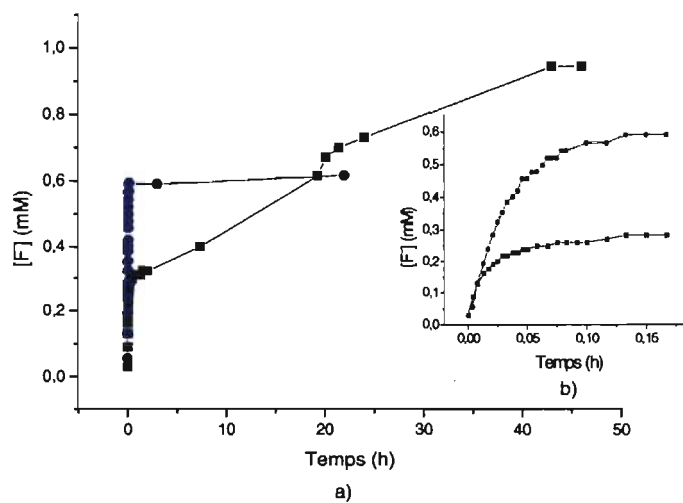


Figure 64. a) Essai enzymatique entre \blacksquare l'APase encapsulée (9,8 U/mL d'après les unités données par le fournisseur) et le MFP (5 mM) dans tampon (TRIS-HCl (5mM) pH 7,2 MgCl₂ (1mM)) et \bullet un blanc réalisé avec la même masse de capsules vides avec MFP (5 mM) dans tampon (TRIS-HCl (5mM) pH 7,2 MgCl₂ (1mM)). b) Agrandissement des 10 premières minutes.

Malheureusement, avec les microcapsules de PEI telles qu'elles ont été préparées, la réaction avec un substrat chargé négativement est peu probable, puisque la charge positive de la paroi empêche le MFP de pénétrer à l'intérieur pour réagir avec l'APase. En effet, le signal d'ions F^- sur l'essai réalisé entre la laccase encapsulée et le MFP ne montre pas l'atteinte de 5 mM de F^- , ce qui correspondrait à l'hydrolyse complète du MFP. Au terme de l'essai, seulement 19 % de la quantité de MFP semble avoir été dégradé. Nous croyons qu'à cause des capsules, l'hydrolyse est plus lente. Toutefois, le fait que le blanc montre une concentration de F^- supérieure à celle de l'essai enzymatique semble incorrect. En fait, ceci s'explique principalement par le temps nécessaire à l'équilibrage de l'électrode à membrane sélective. En effet, une électrode sélective aux ions F^- demande environ 3 minutes afin d'atteindre l'équilibre. Pour cette raison, il ne faut pas tenir compte de ces premières minutes. La différence entre le blanc et l'essai enzymatique démontre, en outre, que la présence de phosphate alcaline encapsulée permet la dégradation du MFP. En effet, l'essai enzymatique

permet d'atteindre une concentration d'ions fluorures supérieure à celle mesurée sur une solution contenant les capsules vides et le MFP (0,6 mM).

Bien que l'électrode soit sélective à l'ion fluorure, il peut subsister des sources d'interférence. Dans notre cas, nous avons d'abord pensé aux ions Cl^- . Lors de la préparation des capsules, les ions Cl^- provenant de la réaction entre le PEI et le dichlorure de décanedioyle sont lavés par l'eau, mais il se peut qu'il y ait des Cl^- résiduels dans la paroi des microcapsules. Si c'est le cas, le fait d'ajouter du MFP, qui est également négativement chargé, à une suspension de capsules de PEI aurait pour effet de déplacer les ions Cl^- qui seraient alors une interférence. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience dans laquelle une solution tampon est additionnée de NaCl. Le signal obtenu montre que le Cl^- n'est pas une interférence sur le signal généré par l'électrode. Si on compare le signal pour différentes concentrations de Cl^- à la courbe de calibration faite avec NaF, on trouve bien que le Cl^- n'est pas une interférence significative sur le signal de F^- (figure 65).

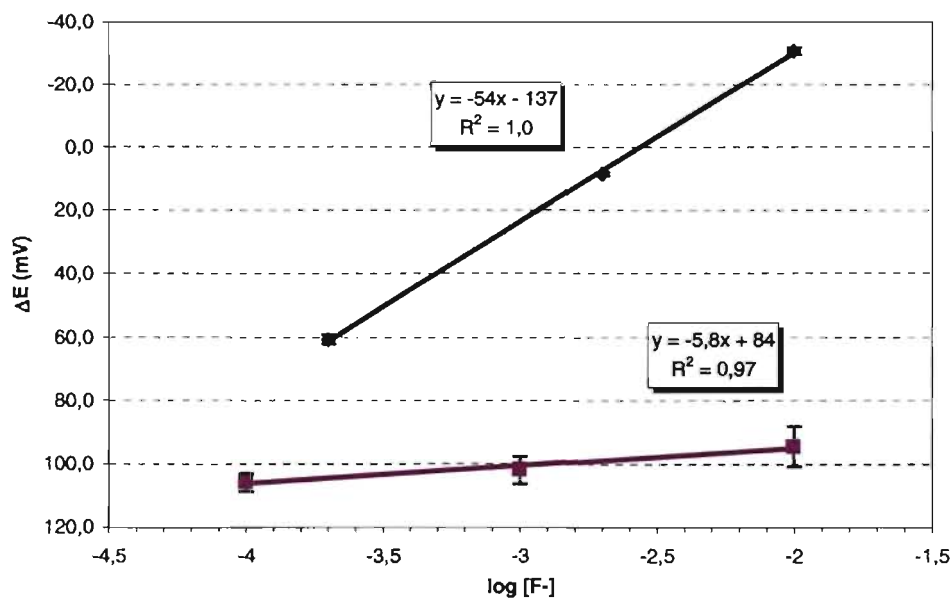


Figure 65. Comparaison entre — la courbe de calibration de l'électrode sélective à l'ion fluorure effectuée avec des solutions étalons de NaF et — le signal obtenu pour des solutions de NaCl dans les mêmes conditions expérimentales (tampon TRIS-HCl pH 7,2).

Une autre source possible d'interférence sur l'électrode sélective à F^- sont les ions OH^- présents en plus grande quantité à pH élevé. Cette interférence pourrait avoir lieu si la concentration d'ions OH^- est 10 fois plus élevée que la concentration d'ions F^- . Normalement, comme nous avons fait la réaction en milieu tamponné, les variations de pH devraient être faibles. Dans ce cas, l'hypothèse de l'interférence par les ions OH^- est très peu probable parce que le pH n'est pas suffisamment basique.

Après l'équilibrage de l'électrode (trois premières minutes), l'essai réalisé sans enzyme (blanc) se stabilise et la concentration d'ions F^- n'augmente pas plus. Sur l'essai enzymatique, le signal continue d'augmenter. Nous croyons que cette deuxième zone du graphique représente réellement l'hydrolyse enzymatique du MFP par l'APase (figure 64). Toutefois, la réaction est très lente. Donc pour une application pratique, ce système ne pourrait pas fonctionner tel qu'il est présenté ici parce que la production du signal est trop lente. La réaction peut se faire, mais la vitesse est trop faible pour qu'elle puisse être appliquée à la détection d'un analyte en solution.

Pour conclure cette partie du projet, il reste en fait beaucoup de pistes à suivre. Au niveau de la laccase, nous n'avons pas réussi à trouver de système enzyme-substrat parmi ceux essayés (Demeton-S, DMMP, MFP) qui puisse être utilisé comme système modèle au niveau des agents neurotoxiques. Comme nous avons d'abord utilisé la laccase pour vérifier la méthode d'immobilisation, nous avons tenté de l'utiliser également dans ce deuxième objectif, mais il s'agissait principalement d'un essai. Nous avons trouvé un (seul) article faisant état du potentiel pour un neurotoxique, mais n'avons pas été capable de reproduire la réaction avec la laccase native de *Trametes versicolor*. Nous avons donc utilisé une autre enzyme ayant un meilleur potentiel, mais encore peu d'essais enzymatiques ont été faits dans notre laboratoire. Le potentiel de l'APase pourrait donc faire l'objet de futures études avec le MFP comme composé modèle du sarin, puisque cette réaction avec l'enzyme semble fonctionner. La deuxième option serait d'utiliser une autre hydrolase qui s'applique particulièrement aux molécules organophosphorées, soit

« *l'organophosphorus hydrolase* » (OPH). Cette enzyme fait l'objet de plusieurs recherches pour la décomposition de neurotoxiques et de pesticides organophosphorés ^[51-53]. Nous croyons qu'en fait, elle serait sûrement une meilleure enzyme pour la décomposition d'agents neurotoxiques, mais elle n'est pas disponible commercialement. Comme la vocation de notre laboratoire n'est pas la production d'enzymes, nous n'avons pas pu la produire nous-mêmes au cours de ce projet et avons tenté de nous en procurer auprès d'autres groupes, mais sans succès. Pour les prochaines années, des efforts seront mis à trouver une source de cette enzyme afin de l'utiliser avec les microcapsules pour la décomposition d'agents neurotoxiques. Autrement, nous pouvons également rediriger l'application des enzymes encapsulées vers d'autres analytes d'intérêt.

7. CONCLUSION

À travers les différentes étapes de ce projet, nous avons tenté de démontrer la valeur et la polyvalence de la microencapsulation comme méthode d'immobilisation. Pour y arriver, nous avons d'abord caractérisé les microcapsules que nous avons préparées. Nous avons étudié l'effet de la microencapsulation sur le comportement de l'enzyme, puis nous avons immobilisé les enzymes encapsulées sur différents supports, soit une électrode et du papier. Finalement, nous avons tenté d'appliquer ce système à des analytes d'intérêts, les agents neurotoxiques.

Tout d'abord, les microcapsules ont été préparées par polymérisation interfaciale du PEI avec le dichlorure de décanedioyle grâce à une microémulsion eau dans huile. D'après l'étude des différents paramètres influençant le rendement, nous avons maximisé le rendement en masse des microcapsules en utilisant une agitation par hélice à vitesse de rotation suffisamment élevée (1640 t/min) et en laissant les capsules reposer assez longtemps (7 minutes) afin d'en récupérer le maximum. Nous avons également confirmé qu'un des facteurs les plus influents sur la taille des microcapsules est la vitesse de rotation de l'hélice utilisée pour la génération de l'émulsion. En utilisant les conditions expérimentales mentionnées précédemment (*section 2.1*), nous avons réussi à préparer des microcapsules dont la taille moyenne est environ 30 μm , ce qui est à la fois approprié pour l'immobilisation sur une électrode et sur du papier.

Afin de mieux comprendre les effets de la microencapsulation sur les réactions enzymatiques, il reste encore beaucoup de caractérisation à faire sur les microcapsules. Il serait intéressant d'évaluer l'épaisseur de la paroi, ainsi que la localisation des enzymes à l'intérieur des capsules. Pour y arriver, des expériences sur le marquage du polymère et des enzymes sont actuellement en cours. Grâce à des sondes fluorescentes, l'épaisseur de la paroi ainsi que la localisation des enzymes dans les capsules peuvent être évaluées par microscopie confocale à fluorescence. La résistance mécanique des capsules serait également intéressante à connaître afin de

prédire si les capsules résisteront à leur immobilisation sur du papier dans les conditions de production. Ainsi, il reste beaucoup de travail à faire pour mieux expliquer l'impact de la microencapsulation sur l'enzyme grâce à une meilleure connaissance de la capsule elle-même.

Par ailleurs, concernant l'effet de l'encapsulation sur le comportement de l'enzyme, nous avons trouvé une faible efficacité nette d'encapsulation de 10 % par rapport à l'activité de l'enzyme. Pour distinguer la désactivation de l'enzyme par rapport à la perte d'enzymes, il ne resterait qu'à déterminer la concentration d'enzymes dans les capsules. Ceci pourrait aider à modifier le mode de préparation des capsules afin de maximiser l'efficacité d'encapsulation. Pour ce faire, une bonne idée serait de mesurer l'absorption du cuivre de la laccase, mais la difficulté réside dans la limite de détection puisqu'il s'agit de petites quantités ($[laccase] = 60 \mu M$) et qu'il faut extraire la laccase de la capsule pour effectuer certains types de mesure. Parmi les effets de l'encapsulation sur le comportement enzymatique, nous avons trouvé que le pH d'activité maximale n'est pas le même pour l'enzyme encapsulée que pour l'enzyme libre par rapport au PPD, tandis qu'il est le même par rapport à l'OPD. Nous expliquons cet effet par la charge positive des substrats en fonction du pH et leurs pKa respectifs. Au niveau du maintien de l'activité à long terme, l'encapsulation ne permet pas de maintenir autant d'activité qu'en solution libre à 4°C. À cette température, nous avons obtenu une plus faible activité dans les capsules (73 %) comparativement à l'enzyme libre (93 %) pour une période d'environ 7 mois. Il reste donc encore à évaluer l'activité maintenue dans les capsules conservées à température ambiante afin de la comparer avec celles conservées 4°C. Le maintien de l'activité à température ambiante pourrait être un avantage pour la fabrication de papiers bioactifs qu'il est plus pratique de conserver à température ambiante qu'à 4°C. Au niveau de la cinétique enzymatique, le résultat principal est que la microencapsulation de l'enzyme semble favoriser la conversion du substrat par rapport à la réaction en solution libre. Nous croyons que ceci peut être dû au confinement de l'enzyme dans la microcapsule, mais cette hypothèse doit être prouvée par d'autres expériences, par exemple, sur des capsules de différentes tailles.

Au niveau de l'immobilisation sur des électrodes, nous avons trouvé qu'il est effectivement possible d'immobiliser les microcapsules par adsorption. Nous avons obtenu un temps de réponse ($t_{90\%}$) de 7 s avec la laccase encapsulée alors qu'il est possible d'atteindre 2 s avec la laccase immobilisée par liaison covalente [46]. Toutefois, nous avons obtenu une meilleure sensibilité et un plus grand domaine de linéarité si on rapporte par rapport à la quantité d'enzymes actives utilisées. Nous croyons qu'une des conséquences majeures de l'encapsulation de l'enzyme est la contrainte imposée sur la diffusion des substrats ou des médiateurs. L'immobilisation par la microencapsulation demeure donc une voie intéressante pour développer de nouveaux biocapteurs puisque la paroi semi-perméable permet effectivement de détecter des analytes en solution. Il reste à appliquer ce genre de biocapteurs à des analytes d'intérêts.

En ce qui concerne l'immobilisation sur du papier, nous avons trouvé que la microencapsulation permet de retenir fortement les enzymes dans le papier (96 % d'activité maintenue) comparativement à la simple adsorption des enzymes (4 % d'activité maintenue). Ce résultat est certainement un des plus prometteurs de ce projet sur l'immobilisation par microencapsulation. Les microcapsules pourraient donc être utilisées avantageusement pour la conception de papiers bioactifs. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à améliorer le maintien de l'activité enzymatique à haute température avec les microcapsules. D'un côté, le problème pourrait être contourné en « imprimant » les capsules sur le papier après que celui-ci ait séché de façon à limiter l'exposition des enzymes à des températures élevées. Autrement, on pourrait également utiliser des enzymes thermostables. Ce champ de recherche contient encore beaucoup de défis, puisqu'il est encore peu développé, dont entre autre la production d'un signal visible et quantitatif sur le papier.

Au niveau de la décomposition d'agents neurotoxiques, nous avons eu des premiers résultats peu concluants, car les essais avec la laccase libre n'ont pas permis de décomposer les composés modèles du VX et du sarin que nous avons choisis. En

réalité, les buts recherchés par l'utilisation de la laccase ont été atteints puisque celle-ci avait plutôt été sélectionnée pour évaluer la méthode d'immobilisation. Son utilisation pour les agents neurotoxiques n'a servi que de point de départ. Selon la littérature, elle a été très peu étudiée concernant ce type de réaction et n'a fait l'objet que d'un seul article sur lequel nous nous sommes basés. Nous avons donc rapidement opté pour une autre enzyme qui semblait offrir un meilleur potentiel, l'APase. Celle-ci a donc fourni des résultats préliminaires encourageants pour la dégradation du MFP, composé modèle du Sarin. Nous n'avons toutefois pas encore bien étudié la réaction avec l'enzyme encapsulée, puisque la paroi positive de la capsule semble gêner la pénétration du MFP négatif ce qui provoque une hydrolyse très lente. Des efforts pourraient être mis à ce niveau en utilisant d'autres polymères comme par exemple l'alginate. Autrement, nous croyons que l'OPH serait un meilleur choix pour étudier la décomposition enzymatique des agents neurotoxiques puisque ceux-ci sont des substrats de cette catégorie d'enzymes. Il faudra donc trouver des collaborateurs afin de pouvoir étudier cette réaction. Sinon, on pourrait également penser à d'autres analytes.

En conclusion, pour atteindre les buts fixés pour ce projet, nous avons dû suivre une suite logique en partant de la préparation et la caractérisation des capsules jusqu'à l'application à des analytes d'intérêt en passant par l'immobilisation sur différents supports. Nous avons choisi d'explorer plusieurs voies afin de sélectionner celles qui représentent le meilleur potentiel. Ainsi, nous n'avons pas effectué toutes les caractérisations et approfondie toutes les expériences à travers les différentes étapes du projet afin d'avancer le plus rapidement possible vers les étapes suivantes. De plus, comme il s'agit du premier projet sur l'immobilisation par microencapsulation au sein de notre groupe de recherche, il ouvre la voie pour développer chacun des aspects explorés. En effet, il reste encore suffisamment de paramètres et d'effets à étudier au niveau des microcapsules pour en faire un projet en soit. Le même raisonnement s'applique aussi pour l'immobilisation sur des électrodes ou encore sur le papier, de même que pour l'application à des analytes d'intérêts.

8. RÉFÉRENCES

- [1] S. Aikio, S. Grönqvist et L. Hakola, *Bioactive paper and fibre products Patent and literary survey*, VTT Technical Research Centre of Finland, Kaitoväylä, **2006**, 83.
- [2] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis 6^e édition*, Éditions W.H. Freeman and Company, New York, **2003**, p. 383.
- [3] A. Manz, *Bioanalytical Chemistry*, Imperial College Press, Londres, **2004**, p. 129.
- [4] E. V. Olsen, S. T. Pathirana, A. M. Samoylov, J. M. Barbaree, B. A. Chin, W. C. Neely et V. Vodyanoy, *Journal of Microbiological Methods* **2003**, *53*, 273-285.
- [5] E. A. Moschou, B. V. Sharma, S. K. Deo et S. Daunert, *Journal of Fluorescence* **2004**, *14*, 535-547.
- [6] S. K. Jung et G. S. Wilson, *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 591-596.
- [7] S. R. Mikkelsen et E. Corton, *Bioanalytical Chemistry*, Éditions John Wiley & Sons, Hoboken, **2004**, p. 136.
- [8] P. T. Kissinger, *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 2512-2516.
- [9] W. Hartmeier, *Immobilized Biocatalysts*, Éditions Springer-Verlag, Berlin, **1988**, p. 15-43.
- [10] S. F. Wang et D. Du, *Sensors* **2002**, *2*, 41-49.
- [11] W. H. Scouten, J. H. T. Luong et R. S. Brown, *Trends in Biotechnology* **1995**, *13*, 178-185.
- [12] N. Mano, F. Mao et A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6588-6594.
- [13] F. Barriere, Y. Ferry, D. Rochefort et D. Leech, *Electrochemistry Communications* **2004**, *6*, 237-241.
- [14] T. M. S. Chang, *Science* **1964**, *146*, 524-525.
- [15] A. Kondo, *Microcapsule Processing and Technology*, Éditions Marcel Dekker Inc., New York, **1979**, p. 42.

- [16] D. Voet et J. G. Voet, *Biochimie 2^e édition*, Éditions De Boeck & Larcier, Bruxelles, **2005**, p. 459-463.
- [17] D. Rochefort, *Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier*, Thèse de doctorat, Université de Montréal, Département de chimie, Montréal, **2001**.
- [18] M. H. Thuesen, O. Farver, B. Reinhammar et J. Ulstrup, *Acta Chemica Scandinavica* **1998**, *52*, 555-562.
- [19] J. J. Roy, T. E. Abraham, K. S. Abhijith, P. V. S. Kumar et M. S. Thakur, *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 206-211.
- [20] S. Gomes, J. M. F. Nogueira et M. J. F. Rebelo, *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *20*, 1211-1216.
- [21] Y. J. Kim et J. A. Nicell, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2006**, *81*, 1344-1352.
- [22] D. Leech et F. Daigle, *Analyst* **1998**, *123*, 1971-1974.
- [23] J. Pelmont, *Enzymes Catalyseurs du monde vivant*, Éditions Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, **1995**, p. 361.
- [24] N. Yoza, S. Nakashima et T. Nakazato, *Chemistry Letters* **1997**, 53-54.
- [25] R. Bourbonnais, M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier et M. Yaguchi, *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, *61*, 1876-1880.
- [26] G. T. R. Palmore et H. H. Kim, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, *464*, 110-117.
- [27] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte et G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 1318-1320.
- [28] M. Shikida, K. Takayanagi, H. Honda, H. Ito et K. Sato, *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2006**, *16*, 1875-1883.
- [29] Y. Sun et K. Y. Ong, *Detection technologies for chemical warfare agents and toxic vapors*, Éditions CRC Press, **2005**, p. 16.
- [30] O. Lepick et J.-F. Daguzan, *Le terrorisme non conventionnel*, Éditions Presses universitaires de France, Paris, **2003**, p. 5.
- [31] *Nerve Agents*, http://en.wikipedia.org/wiki/Nerve_agent#Classes, consulté le 2 avril 2007.

- [32] D. Poncelet, T. Alexakis, B. P. Desmet et R. J. Neufeld, *Journal of Microencapsulation* **1994**, *11*, 31-40.
- [33] Inotech Biosystems International, *Instruction manual for the Inotech Encapsulator Research IE-50 R*, Inotech Labor AG, **2005**.
- [34] M. Jonasz, *Size, Shape, composition and structure of microparticles from light scattering*, dans Principles, methods, and application of particle size analysis, (Ed. C. U. Press), Cambridge, **1991**, pp. 143-162.
- [35] F. L. Pedrotti et L. S. Pedrotti, *Introduction to Optics*, **1993**, p. 323-348.
- [36] C. Bukh, M. Lund et M. J. Bjerrum, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, *100*, 1547-1557.
- [37] D. T. Mandal, *Module 3 SUSPENSIONS & EMULSIONS*, <http://webusers.xula.edu/tmandal/pharmaceutics/suspensions-emulsions.htm>, consulté le 3 mai 2007.
- [38] L. Yuan, G. Z. Liang, J. Q. Xie et S. B. He, *Colloid and Polymer Science* **2007**, *285*, 781-791.
- [39] E. N. Brown, M. R. Kessler, N. R. Sottos et S. R. White, *Journal of Microencapsulation* **2003**, *20*, 719-730.
- [40] Y. Kawashima, T. Niwa, T. Handa, H. Takeuchi, T. Iwamoto et K. Itoh, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1989**, *78*, 68-72.
- [41] L. Dobbetti et V. Pantaleo, *Journal of Microencapsulation* **2002**, *19*, 139-151.
- [42] N. S. Berchane, F. F. Jebrail, K. H. Carson, A. C. Rice-Ficht et M. J. Andrews, *Journal of Microencapsulation* **2006**, *23*, 539-552.
- [43] S. Freitas, H. P. Merkle et B. Gander, *Journal of Controlled Release* **2005**, *102*, 313-332.
- [44] H. Jeffery, S. S. Davis et D. T. Ohagan, *Pharmaceutical Research* **1993**, *10*, 362-368.
- [45] F. Xu, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 924-928.
- [46] D. Quan, Y. Kim et W. Shin, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *561*, 181-189.
- [47] D. Rochefort, L. Kouisni et K. Gendron, *Journal of Electroanalytical chemistry*, soumis le 24 juillet 2007.

- [48] L. Lu, M. Zhao et Y. Wang, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2007**, *23*, 159-166.
- [49] D. A. Skoog, F. J. Holler et T. A. Nieman, *Principes d'analyse instrumentale*, Éditions De Boeck, Paris, **2003**, p. 11-12.
- [50] G. Amitai, R. Adani, G. Sod-Moriah, I. Rabinovitz, A. Vincze, H. Leader, B. Chefetz, L. Leibovitz-Persky, D. Friesem et Y. Hadar, *Febs Letters* **1998**, *438*, 195-200.
- [51] A. L. Simonian, A. W. Flounders et J. R. Wild, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1896-1906.
- [52] J. Orbulescu, C. A. Constantine, V. K. Rastogi, S. S. Shah, J. J. DeFrank et R. M. Leblanc, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 7016-7021.
- [53] A. H. Mansee, W. Chen et A. Mulchandani, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2005**, *32*, 554-560.