

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun – TIARET
Faculté des Sciences de la Matière
Département de chimie



Mémoire

Présenté par :

Mr: MAZOUZ El-hadj
Melle: BERKANE Zineb

Pour obtenir le diplôme de

Master

Filière : Chimie
Spécialité : Chimie Physique des Matériaux

Sujet :

***Etude et préphase de réalisation d'un biocapteur
à base de glucose oxydase et liquides ioniques***

Soutenu le : 30 Mai 2016

Devant le jury:

- | | | |
|------------------------|-----|-----------|
| • Mr : KADARI Ahmed | MCA | Président |
| • Mr : BADAOUI Mohamed | MAA | Examineur |
| • Mr : BOUHADJAR Larbi | MAA | Examineur |
| • Mr : DEBDAB Mansour | MCA | Encadreur |

Remerciements

*Nos remerciements vont en premier lieu à **ALLAH** le tout puissant qui nous a donné le courage, la force et la santé pour réaliser ce travail.*

Nous remercions ainsi les personnes qui contribuent à son succès, grâce à leur soutien, leur conseil ou tout simplement leur bonne humeur.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de synthèse et catalyse (LSCT) à l'Université " Ibn Khaldoun ", - Tiaret.

*Nos remerciements vont à notre encadreur Monsieur **DEBDAB MANSOUR**, Maitre de conférences classe "A"*

Nous remercions très vivement les membres de jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail :

*Nos sincères remerciements vont à Monsieur **KADARI Ahmed**, Maitre de conférences classe "A" à la faculté des sciences de la Matière de l'Université "Ibn Khaldoun", de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*Nous adressons nos respectueux remerciements au **BADAoui Mohamed**, Maitre-assistant Classe "A" à l'Université " Ibn Khaldoun ", Qui a bien voulu accepter que cette soutenance se fasse devant elle, ce qui nous honore et nous comble.*

*Nos remerciements iront également au **BOUHADJAR Larbi**, Maitre-assistant Classe "A" à l'Université " Ibn Khaldoun ", pour sa présence.*

*Nous adressons nos respectueux remerciements à la responsable de spécialité **Mme drissi mokhtaria**, Maitre-assistant Classe "A" à l'Université " Ibn Khaldoun ", et Mme **MABRAK.H** Maitre-assistant Classe "A" à l'Université " Ibn Khaldoun ", pour leurs contributions de près ou de loin aux accomplissements de ce travail.*

En fin nous remercions les enseignants et toutes personnes Qu'ils nous soutenu dans les moments les plus difficiles.

Sommaire

Sommaire

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Chapitre I : Les Biocapteurs

I. Introduction.....	2
II. Histoire des biocapteurs.....	2
III. Définition.....	3
IV. Qualités métrologiques du biocapteur.....	4
V. Description du biocapteur.....	4
V.1 Le biorécepteur.....	4
V.2 Le transducteur.....	6
VI. Différents types de biocapteurs.....	6
VI.1 Biocapteurs manométriques.....	6
VI.2 Biocapteurs piézoélectriques.....	7
VI.3 Biocapteurs thermiques.....	8
VI.4 Biocapteurs optiques.....	8
VI.5 Biocapteurs électrochimiques.....	9
VI.5.1 Biocapteur conductimétrique.....	9
VI.5.2 Biocapteur potentiométrique.....	10
VI.5.3 Biocapteurs ampérométriques.....	11
VI.5.3.1 Les biocapteurs de première génération.....	12
VI.5.3.2 Les biocapteurs de deuxième génération.....	13
VI.5.3.3 Les biocapteurs de troisième génération.....	15
VII. Applications des biocapteurs.....	18
VII-1 Le secteur biomédical.....	18
VII.2 Le secteur agroalimentaire.....	18
VII.3 Le secteur environnemental.....	18
VII.3.1 Les pesticides.....	19
VII.3.2 Les métaux lourds.....	20
VI.3.3 Autres pollutions.....	20
VIII. Glucose oxydase.....	20
VIII.1 Définition.....	20
VIII.2 Activité.....	21
VIII.3 Applications.....	22
Références.....	23

Sommaire

Chapitre II : Les Liquides ioniques

I.	Introduction	26
II.	Historique	27
III.	Définition	27
IV.	Structure des liquides ioniques.....	28
IV.1	Cations	28
IV.2	Anions	30
V.	Synthèse des liquides ioniques	31
VI.	Propriétés générales des liquides ioniques	33
VI.1	Propriétés physicochimiques.....	33
VI.2	Viscosité, Densité et Température de fusion.....	34
VI.3	Polarité	35
VI.4	Solubilité	35
VI.5	Toxicité des liquides ioniques	36
VII.	Applications en synthèse organique	38
VII.1	Les réactions nucléophiles	38
VII.2	Les réactions de condensation	38
VII.3	Les réactions électrophiles.....	39
VII.4	Les réactions catalysées par les métaux de transition	40
VII.5	Applications en synthèse enzymatique	41
	Références	42

Chapitre III : Partie expérimentale

Appareillage	47
1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	47
1.1. Principe et méthodes	47
2. Spectrométrie de masse Impact Electronique EI.....	48
Source LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) :	48
Précision de la matrice et du mode positif ou négatif.....	48
Synthèse de la phase liquide ionique.....	49
1. Synthèse de chlorure de 3-(2-carboxyethyl)-1-methylimidazol-3-ium	49
Réaction de quaternisation d'amine.....	49

Sommaire

2. Synthèse de chlorure de 1,3-bis (2-hydroxyethyl)imidazol-3-ium.....	50
Réaction de quaternisation d'amine.....	50
3. Synthèse de chlorure de 1-méthyl-3-(4-vinylbenzyl)imidazol-3-ium	52
Réaction de quaternisation d'amine.....	52
4. Synthèse de chlorure de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium.....	54
a) Réaction de quaternisation d'amine	54
b) Réaction de métathèse anionique :.....	55
Conclusion générale.....	61

Liste des abréviations

(AgBF₄): Tétrahydroborate d'argent

[bdmim] [PF₆]: Hexafluorophosphate de butyl diméthyl imidazolium

[bm₂im] : 1-butyl-2,3-diméthylimidazolium

[bmim] : butylméthyl imidazolium

[bmpy] : 1-butyl-1-méthylpyridinium

[emim] [BF₄] :Tétrahydroborate d'éthylméthylimidazolium

[emim] [Cl] : Chlorure d'éthylméthylimidazolium

[EtNH₃] [NO₃]: Nitrate d'ammonium d'éthyle

[hmim] [PF₆] : Hexafluorophosphate d'hexylméthyl imidazolium

[K] : Potassium

[Li] : Lithium

[Ms₂N] : bis (méthylsulfonyl)imide

[N(CN)₂] : dicyanamide

[Na] : Sodium

[NTf₂] : Bis (trifluorométhyl) sulfonimide

AChE : Acétylcholine stérase

DBO : Demande biochimique en oxygène

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide dihydrogène

FIA 11 : Système d'analyse par injection en flux continue

GA : Glutaraldehyde

GCE : Modified glassy carbon electrode (électrode de carbone vitreux modifiée).

GOD : Glucose oxydase

GR : Graphène

Liste des abréviations

IL : Ionic liquid (liquide ionique)

ISE : Ion Sélective électrode

ISFET: Ion Sensitive Field Effect Transistor

K_{cat} : Constante catalytique

KM : Constante de Michaelis

LB : Langmuir-Blodgett

Ld : Limites de détection

LDH : Lactate déshydrogénase

LSIMS: Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry

MOSFET: Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor

ODA : Octodécylamine

QSPR : Quantitative Structure Property Relationship

SPR : Résonance plasmonique de surface

Tc : Température critique

TELISA : Thermométrie Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

VM : Vitesse maximale

V_m : Vitesse maximale de la réaction enzymatique.

Liste des figures

Figure.I.1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	4
Figure.I.2. Exemple d'un biocapteur manométrique : biocapteur à glucose développé par Jenkins & Delwiche [20] (précision du biocapteur 0.2 mM, gamme de travail : de 0 à 5 mM).....	7
Figure.I.3. Représentation schématique des différents biorécepteur	
Figure.I.4. Exemple d'un biocapteur piézoélectrique [21].....	7
Figure.I.5. Exemple d'un biocapteur thermique [23] (gamme de travail : de 0,5 à 16 mMol.L ⁻¹).	8
Figure.I.6. Exemple d'un biocapteur à onde évanescente [24].	9
Figure.I.7. Migration d'ions, résistance	10
Figure.I.8. Accumulation de charge, potentiel.....	10
Figure.I.9. Schéma d'une électrode ionique et de la chaîne de mesure.	13
Figure.I.10. Principe des biocapteurs ampérométriques de première génération pour la Détection de la consommation de dioxygène (a) et la production de peroxyde d'hydrogène (b).	14
Figure.I.11. Principe des biocapteurs ampérométriques de deuxième génération.	14
Figure.I.12. Echelle des potentiels standards des couples rédox mis en jeu dans une bioanode (/Ag/AgCl) dédiée à l'oxydation du glucose.....	15
Figure.I.13. Principe des biocapteurs ampérométriques de troisième génération.....	15
Figure. I.14. Structure et caractéristiques générale de la glucose oxydase.....	21
Figure.II .1. Nombre de publications et de brevets sur les liquides ioniques.	26
Figure.II.2. Structures des cations les plus utilisés.	28
Figure.II.3. Influence du cation dans le cas d'une réaction de nitration aromatique.	29
Figure.II.4. Structures des anions les plus utilisés.	30
Figure.II.5. Synthèse des liquides ioniques.....	31
Figure.II.6. Hydrophobicité des cations et des anions	36
Figure.II.7. La réaction de substitution nucléophile du carboxylate de potassium sur l' α -tosyloxyacétone	39
Figure.II.8. La réaction de condensation.....	39
Figure.II.9. La réaction de condensation comme la glycine catalyseur	40
Figure.II.10. La réaction électrophiles	40
Figure.II.11. Le rapporté une étude du couplage de Suzuki dans le [bmim] [PF ₆].....	41

Liste des tableaux

Tableau.I.1 Récapitulatif des caractéristiques de quelques biocapteurs	16.17
Tableau.II.1 Réactivité et sélectivité du cation utilisé.....	29
Tableau.II.2 Les points de fusion de différents liquides ioniques [Rmim] [X].....	34
Tableau.II.3 Densité et viscosité de [bmim] ⁺	35

Introduction générale

Introduction générale

Introduction générale

Depuis une dizaine d'années, les liquides ioniques représentent un domaine en plein essor pour ce qui est de leurs applications comme solvants en synthèse organique, en catalyse et en électrochimie.

L'association de ces sels fondus aux enzymes telle que la glucose oxydase (GOD) se révèle être une méthodologie de choix pour la synthèse de nouveaux biocapteurs.

L'objectif de ce travail est d'étudier et de faire une préphase de réalisation d'un biocapteur à base d'un liquide ionique et de glucose oxydase.

Ce travail sera dédié en trois parties dans les quelles seront abordés les point suivants :

Le chapitre I sera dédié aux rappels bibliographiques concernant les biocapteurs, leurs descriptions, et leurs applications.

Le chapitre II sera consacré pour des rappels bibliographiques concernant les liquides ioniques et leurs structures, synthèses, propriétés et leurs applications dans différents domaines.

Le chapitre III décrit le mode opératoire de la synthèse de la phase liquide ionique, et nous interprétons les résultats obtenus par la spectroscopie, RMN et spectromètre de masse.

On finalise ce manuscrit par une conclusion générale soulignant l'essentiel de ce travail de recherche.

Chapitre I
Les Biocapteurs

Chapitre I : Les Biocapteurs

I. Introduction

La détection d'une espèce chimique ou biologique ainsi que l'évaluation de sa quantité ou sa concentration ont été l'objet de nombreuses recherches ces dernières années du fait de leurs nombreuses applications dans des domaines très variés (biologie, biochimie, médecine, sécurité, agriculture et environnement) [1]. Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce chimique ou biologique sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. Les biocapteurs sont considérés comme une solution alternative particulièrement intéressante, aux techniques analytiques traditionnelles telle que la chromatographie ou la spectrométrie. De plus, leur petite taille, leur facilité d'utilisation ou encore la possibilité de réaliser des mesures sur site, font des biocapteurs des outils particulièrement intéressants [2]. L'évolution de ces instruments a commencé depuis une cinquantaine d'années, sous la pression de trois facteurs principaux [3].

Le besoin en capteurs fiables qu'entraîne la croissante sévérité des normes dans le domaine biochimique (pharmacie, monitoring médical)

- La généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés
- La recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse biomédical ou environnemental.

Dans ce chapitre, nous présentons des généralités sur les biocapteurs ainsi que les différentes méthodes de transduction et les différents types de biorécepteurs utilisées dans la conception des biocapteurs, en mettant l'accent sur les biocapteurs enzymatiques.

II. Histoire des biocapteurs

L'histoire des biocapteurs a débuté dans les années 1950 grâce au développement par L.C Clark d'une l'électrode permettant de mesurer l'oxygène dissous dans le sang des patients ayant subi des interventions chirurgicales [4]. Par la suite, Lyons et Clark [5] ont proposé de coupler cette électrode à une enzyme en vue d'une application dans le domaine de la chirurgie cardiovasculaire. Dans ce premier biocapteur, l'enzyme glucose oxydase (GOD), immobilisée sur l'électrode à oxygène via une membrane de dialyse, catalysait l'oxydation du glucose en consommant l'oxygène. Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce premier biocapteur à glucose [6] ou dans le but d'appliquer son principe au développement d'autres biocapteurs enzymatiques. Guilbault et Montalvo ont réalisé un biocapteur potentiométrique en 1969 pour la détection de l'urée [7], mais ce n'est qu'en 1975 que le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du

Chapitre I : Les Biocapteurs

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fut commercialisé par la société Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique). Depuis, l'engouement pour ce type d'outil n'a cessé de croître, conduisant à des évolutions considérables. Les enzymes ont été remplacées par des bactéries dans les biocapteurs proposés par Diviès [8] dans la dernière moitié des années 70. L'incorporation du biocapteur à glucose électrochimique dans le pancréas a pu être réalisée par Clemens et al [9]. A la même période, un biocapteur enzymatique utilisant le lactate déshydrogénase (LDH), a été commercialisé par Roche (Suisse) pour la détection du lactate. Il a été le précurseur d'une nouvelle génération de biocapteurs employant un médiateur soluble, les sels de ferrocyanure, dont le rôle est d'améliorer le transfert des électrons issus de la réaction enzymatique entre les biomatériaux et l'électrode. L'utilisation de ces sels et de leurs dérivés a été ensuite étendue aux capteurs utilisant des oxydoréductases, telles que la GOD [10] en 1984. Des anticorps ont également été employés pour la construction d'immuno-capteurs [11]. De nouvelles techniques de détection permettant le suivi en temps réel des réactions d'affinité, telle que la Résonance plasmonique de surface (SPR), ont été développées dans les années 90. C'est également à cette époque qu'ont été commercialisées par la société MediSense's les premières électrodes de carbone sérigraphiées. Enfin, les progrès réalisés dans le domaine des biocapteurs depuis le début du 21^{ème} siècle ont été possibles grâce à l'évolution des micro- et des nanotechnologies, des sciences des matériaux, de la biotechnologie ou de l'informatique. Les chercheurs sont maintenant capables d'isoler et de manipuler des structures, telles que l'ADN ou les récepteurs, de les associer avec des nanotubes de carbones ou des nanoparticules d'or ou d'argent. Les transducteurs sont par ailleurs de natures très variées et de tailles de plus en plus petites. Les performances et la simplicité de fonctionnement des biocapteurs ont été fortement améliorées. Les techniques de traitement du signal deviennent plus rapides et précises. La possibilité de combiner une large gamme d'entités biologiques et de transducteurs permet la résolution de problèmes analytiques très variés dans le domaine de la santé, de l'agroalimentaire ou encore de l'environnement.

III. Définition

Un biocapteur est un outil ou système analytique conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique [12]. Ce dispositif est basé sur l'accouplement spatial direct d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé « biorécepteur » ou « éléments de reconnaissance biologique », avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique [13]. Le biocapteur emploie les systèmes biologiques à différents niveaux d'intégration pour identifier spécifiquement la substance à déterminer. La première étape

Chapitre I : Les Biocapteurs

de cette interaction est la formation d'un complexe spécifique de la substance active immobilisée avec l'analyte.

La figure (I-1) représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans l'échantillon, toute information utile à son évaluation.

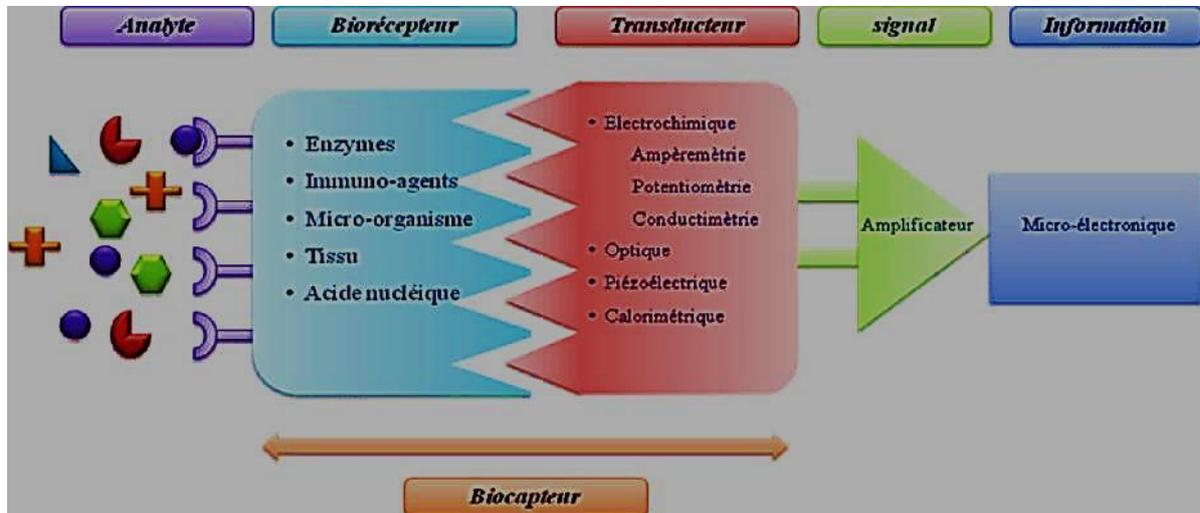


Figure. I.1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

IV. Qualités métrologiques du biocapteur

Un biocapteur, comme tout outil d'analyse, est un organe de saisie d'informations. Les performances des biocapteurs sont généralement évaluées expérimentalement par leur sensibilité, leur limite de détection (LD), leur gamme linéaire et dynamique, leur reproductibilité et/ou leur sélectivité. Les autres paramètres évalués incluent le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et de stockage du capteur. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable. Toutefois, dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut être plus adapté.

V. Description du biocapteur

V.1 Le biorécepteur

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une molécule active (par exemple : enzyme, anticorps, ADN, cellule entière, micro-organisme) immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur. Dans un biocapteur, le biorécepteur offre une spécificité et une sensibilité élevée

Chapitre I : Les Biocapteurs

pour un groupe particulier d'analyte, ainsi qu'une réponse rapide. Plusieurs types de biorécepteurs ont été utilisés comme moyen de reconnaissance moléculaire pour le développement de biocapteurs. Parmi ces biorécepteurs on cite par exemple les biocapteurs à enzymes qui utilisent généralement des enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, thermiques, acoustiques...).

Ce type de biocapteurs a été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques Le biorécepteur microorganisme est utilisé comme biocapteur pour la synthèse pharmaceutique, le traitement des eaux usées et l'industrie alimentaire.

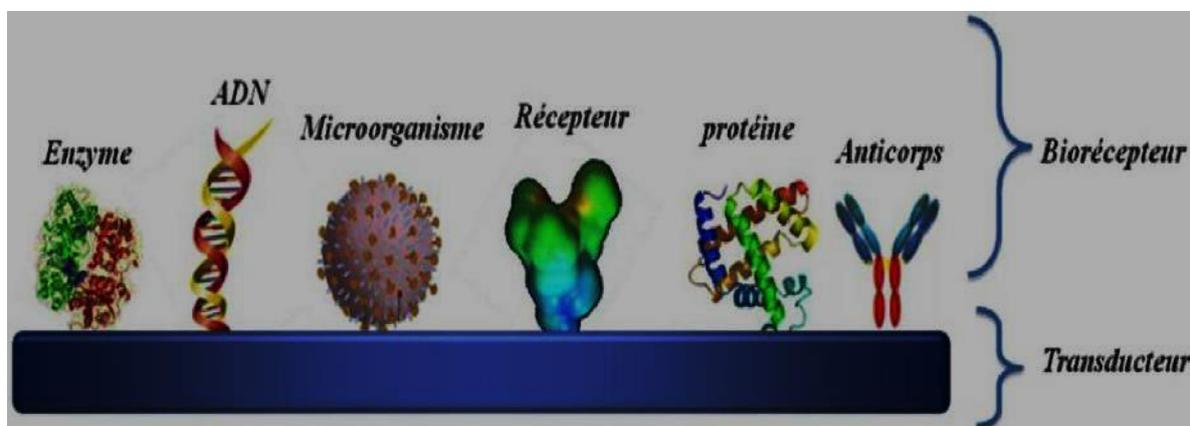


Figure. I.2. Représentation schématique des différents biorécepteurs

Comme l'illustre la figure (I-2) ci-dessus, ils existent différents types de biorécepteur :

- Les enzymes [14] qui sont les plus utilisées et les plus commercialisées. En effet, elles présentent un grand nombre d'avantages notamment la reproductibilité des lots mais par contre il peut y avoir une instabilité de leur fonctionnement et la nécessité d'utiliser un cofacteur ou plusieurs enzymes associées pour un même biocapteur.
- Les microorganismes [15] (cellules entières) principalement utilisés en cas de systèmes réactionnels complexes puisque les enzymes et cofacteurs essentiels y sont intrinsèquement présents.
- Les tissus et [16,17] (structures spécialisées contenues dans les cellules) aussi bien d'origine animale que végétale. Ils sont surtout utilisés pour la détection des aminoacides de par leur robustesse et leur bonne cohésion.

Chapitre I : Les Biocapteurs

- Les immunorécepteurs et les chémorécepteurs [18,19] fonctionnant sur le principe de réaction antigène/anticorps qui induit généralement une faible variation de signal (variation de potentiel par exemple). Cette modification est très difficile à détecter, c'est pourquoi il faut amplifier le signal (en utilisant par exemple un marquage de l'antigène ou de l'anticorps) qui catalysera la production d'un composé détectable.

Ainsi, selon la nature de l'élément biologique immobilisé, plusieurs types de biocapteurs peuvent être cités

- Les biocapteurs microbiens,
- Les biocapteurs immunologiques,
- Les biocapteurs enzymatiques.

V.2 Le transducteur

Le transducteur représente l'autre élément du biocapteur. Il sert à exploiter la modification biochimique du substrat par le biorécepteur pour la transformer en signal exploitable. Dans le sens général, on peut dire que le transducteur assure la conversion d'un type d'énergie dans un autre. Suivant le type de réaction et les substances libérées ou consommées, on choisira le transducteur correspondant. Le choix du transducteur dépend aussi de l'application du biocapteur. Différents systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal exploitable. d'une part, des transducteurs non spécifiques et applicables peuvent être employés, indiquant des paramètres généraux tels que l'enthalpie de réaction (thermistance), le changement de la masse (cristal piézoélectrique), ou l'épaisseur de la couche (réflectométrie). D'autre part, une indication spécifique peut être réalisée avec les électrodes potentiométriques pour des espèces comme H^+ , OH^- , NH_3 , CO_2 ou H_2O_2 .

VI. Différents types de biocapteurs

VI.1 Biocapteurs manométriques

Les biocapteurs manométriques reposent sur la détection des changements de pression. En effet, une variation de la concentration d'un gaz dans une cavité close peut être considérée comme un changement de la pression partielle du gaz. Le ligand est, en général, une enzyme qui permet de transformer l'espèce à détecter en gaz [20]. Ce type de capteur présente l'avantage de ne jamais être en contact direct avec l'échantillon à analyser comme l'illustre la figure (I-3).

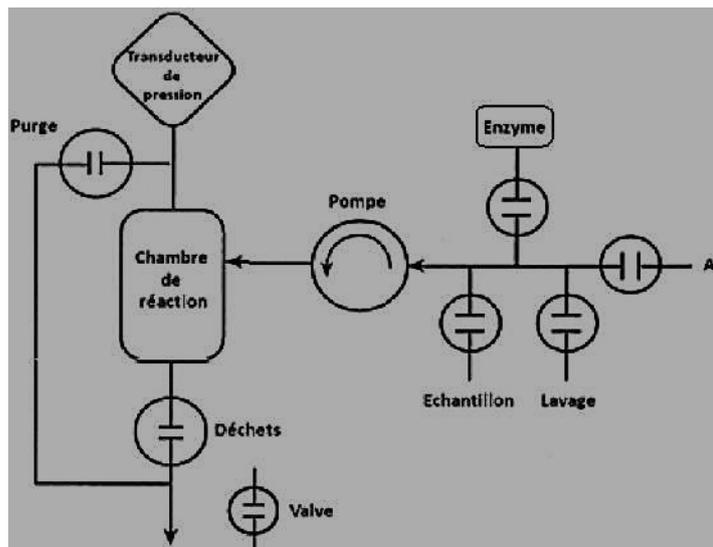


Figure. I. 3.Exemple d'un biocapteur manométrique : biocapteur à glucose développé par Jenkins & Delwiche [20] (précision du biocapteur 0.2 mM, gamme de travail : de 0 à 5 mM).

VI.2 Biocapteurs piézoélectriques

Ces biocapteurs sont basés sur la mesure de l'oscillation d'un cristal de quartz sur lequel est immobilisé le composé biologique (**figure I-4**). En effet, un cristal de quartz présente l'avantage de pouvoir osciller sous l'effet d'un stimulus électrique lorsqu'il est plongé partiellement ou totalement dans un milieu liquide. Cette caractéristique permet de quantifier tout changement de masse à la surface du cristal de quartz à condition que les propriétés physico-chimiques du milieu soient connues. Effectivement, une modification de la masse va entraîner un changement quantifiable de la fréquence de résonance. Ces biocapteurs présentent l'avantage de donner des réponses rapides mais ont une sélectivité qui dépend de la couche active et peuvent manquer de sensibilité en fonction du système oscillant utilisé.

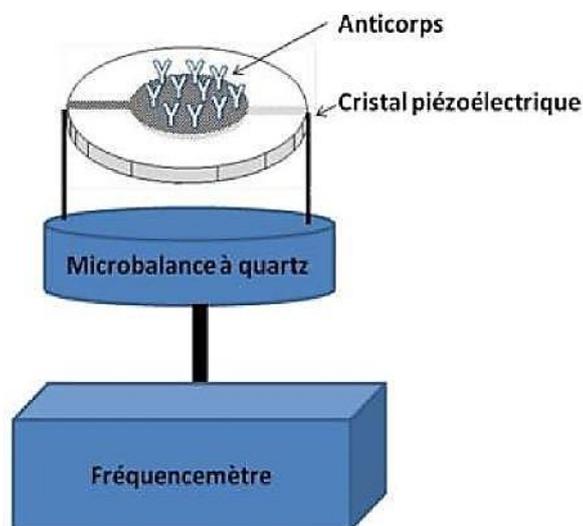


Figure. I. 4. Exemple d'un biocapteur piézoélectrique [21].

VI.3 Biocapteurs thermiques

Ces biocapteurs, développés dans les années 1970, permettent de transformer un signal biochimique en un signal thermique. Un microcalorimètre ou une résistance thermique, raccordé au composé biologique, permet de mesurer les modifications d'enthalpie ou de température dues à une réaction entre le biorécepteur et l'espèce à détecter (**figure I-5**). Lorsque ces biocapteurs thermiques sont immunochimiques, on les appelle « TELISA » [22]

(Thermometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Ces biocapteurs ont été utilisés notamment dans la détection d'insuline. Les principaux avantages de ce genre de biocapteurs sont leur rapidité de réponse, leur reproductivité, l'absence d'interférence des produits dérivés et d'interférence électrochimique ou optique et la stabilité des colonnes d'enzymes.

Cependant, leur coût est relativement élevé du fait de la lourde instrumentation nécessaire à leur mise en œuvre, l'obligation d'un prétraitement pour des échantillons spécifiques et l'aviissement (encrassement) pour une utilisation prolongée.

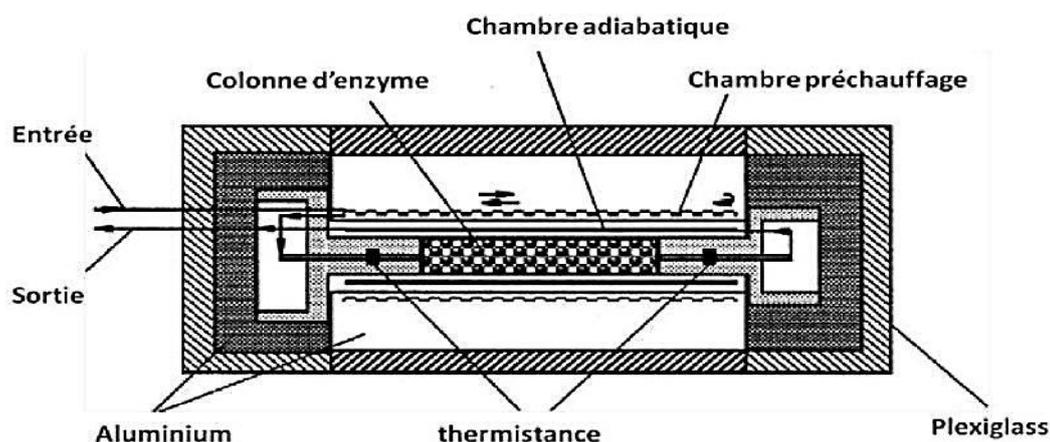


Figure. I. 5. Exemple d'un biocapteur thermique [23] (gamme de travail : de 0,5 à 16 mMol.L⁻¹).

VI.4 Biocapteurs optiques

Les Biocapteurs optiques à enzymes, appelés parfois 'optodes' ou 'optrodes' par analogie avec les électrodes, sont en général des capteurs optochimiques qui exploitent la variation des propriétés optiques du milieu ou d'un récepteur immobilisé, en présence d'une grandeur chimique ou physico-chimique à mesurer (**figure I-6**).

De nombreuses techniques optiques ont été adaptées afin d'être utilisées pour l'élaboration de biocapteurs. Les principales méthodes sont : la mesure de l'absorbance, de la chemiluminescence, de la fluorescence, de la résonance plasmonique de surface ou encore de l'onde évanescente.

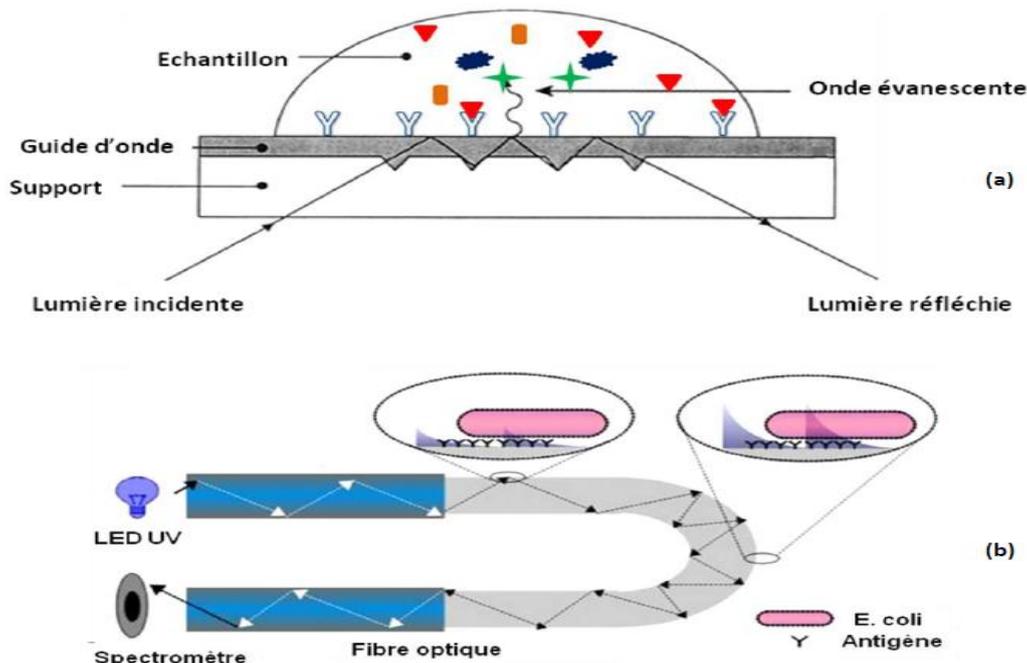


Figure. I. 6. Exemple d'un biocapteur à onde évanescente [24].

VI.5 Biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques ont pour principe de transformer la réponse biochimique en signal électrique qui peut être amplifié et mesuré. Les biocapteurs électrochimiques ont pour principaux avantages leur simplicité, leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité. En effet, quand le potentiel appliqué est élevé, si l'échantillon à analyser contient des substances électroactives contaminantes ou des protéines, celles-ci vont avoir tendance à s'agglomérer sur l'électrode. Ces biocapteurs peuvent être ampérométriques, potentiométriques ou conductimétriques.

VI.5.1 Biocapteur conductimétrique

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie [25]. La conductimétrie permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques, **figure (I-7)**.

Chapitre I : Les Biocapteurs

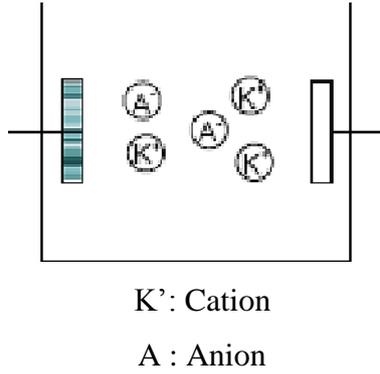


Figure. I. 7. Migration d'ions, résistance

La conductance d'un corps est donnée par l'équation (I-1)

$$G = \gamma \frac{A}{\lambda} \quad (\text{I-1})$$

La constante γ (en $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) qui est la constante caractéristique d'un produit connu, est la conductance ou conductivité spécifique; A/λ (en cm) est la constante géométrique de la cellule; A est la surface de l'électrode et λ est la longueur de l'électrode. La mesure de la conductance d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes dont la surface A et la longueur λ sont données. L'étalonnage ou le contrôle de la cellule sont effectués en mesurant sa conductance G_e pour un électrolyte de conductivité γ_e connue : $k = G_e / \gamma_e$. Lorsque l'on connaît la constante de conductivité de la cellule k , on peut déterminer la conductivité γ d'un électrolyte quelconque, en mesurant la conductance G de la cellule immergée dans cet électrolyte : $\gamma = G / k$.

VI.5.2 Biocapteur potentiométrique

Le potentiomètre permet de mesurer l'accumulation de charge sur une électrode indicatrice (électrode de mesure), (**figure I-8**).

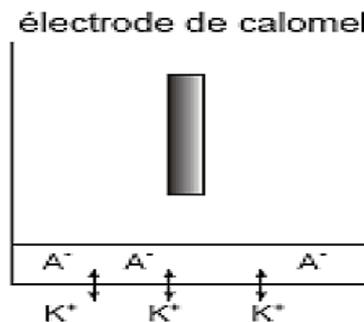


Figure. I. 8. Accumulation de charge, potentiel

Chapitre I : Les Biocapteurs

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence (figure I-09). La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser [26].

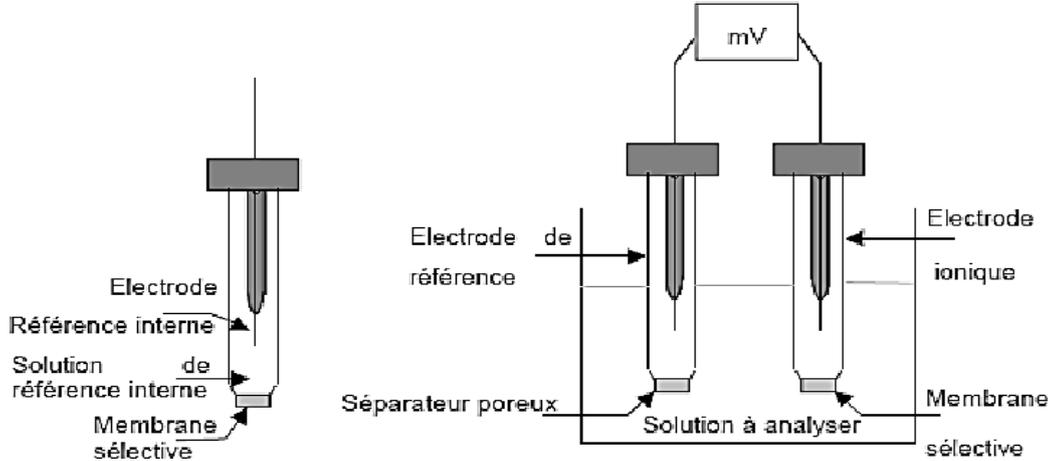


Figure. I. 9. Schéma d'une électrode ionique et de la chaîne de mesure.

Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration (activité) de l'échantillon selon le model Bernstein :

Où :

$$E_p = E_{ox/red}^0 + \frac{RT}{nF} * \ln a_{Ox} / a_{Red}$$

E_p : représente le potentiel du couple redox.

$E_{ox/red}^0$: le potentiel normal standard du couple redox.

R : la constante des gaz parfaits (8,314 J. K⁻¹.mol⁻¹).

a_{Ox}/a_{Red} : le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état Réduit.

T : la température absolue en Kelvin.

F : constante de Faraday = 96500 C.mol⁻¹.

VI. 5. 3 Biocapteurs ampérométriques

Les biocapteurs ampérométriques [27-29] font partie des dispositifs les plus répandus et les plus commercialisés. La biotechnologie analytique a débuté par ces biocapteurs suite aux travaux de Clark en 1956. Par la suite, un grand nombre de travaux ont été réalisés par différentes équipes. Ces dispositifs reposent sur la mesure du courant produit lors d'une réaction chimique.

Chapitre I : Les Biocapteurs

De ce fait, ce type de capteur nécessite un biorécepteur qui consomme ou produit une espèce électroactive. La détection d'un substrat en solution est alors réalisée via l'oxydation ou la réduction de cette espèce directement à la surface de l'électrode (potentiel constant et enregistrement de l'intensité).

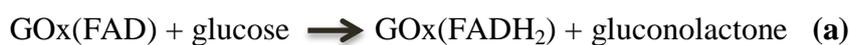
On distingue trois groupes de biocapteurs ampérométriques: les biocapteurs de première génération, les biocapteurs de deuxième génération et les biocapteurs de troisième génération.

VI.5.3.1 Les biocapteurs de première génération

La première génération de biocapteurs ampérométriques (**figure I-10**) a été développée par Leland Clark [4]. Dans ces systèmes, l'analyte, obtenu suite à la réaction avec l'enzyme, est directement oxydé ou réduit au niveau de l'électrode. En prenant l'exemple d'un biocapteur à glucose utilisant la glucose oxydase comme enzyme (le biorécepteur),

Nous avons les réactions rédox suivantes :

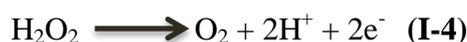
(équations I-3-a et I-3-b).



(I-3)



Par la suite, ce principe a été amélioré et développé notamment par Updike et Hicks qui, en 1967, ont mis au point un système à deux électrodes à oxygène, dont une recouverte d'enzyme, ce qui permet de mesurer une différence de courant par rapport à l'électrode référence [6]. En 1973, Guilbault et Lubrano [30] ont finalisé une électrode enzymatique quantifiant le glucose par la mesure du courant résultant cette fois de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction enzymatique, sur une anode polarisée, selon l'équation (I-4) :



Dans ce type de système, deux cas de figure se présentent donc. On peut mesurer soit la Consommation de dioxygène (**figure I-10. a**) soit la production d'eau oxygénée (**figure I-10. b**).

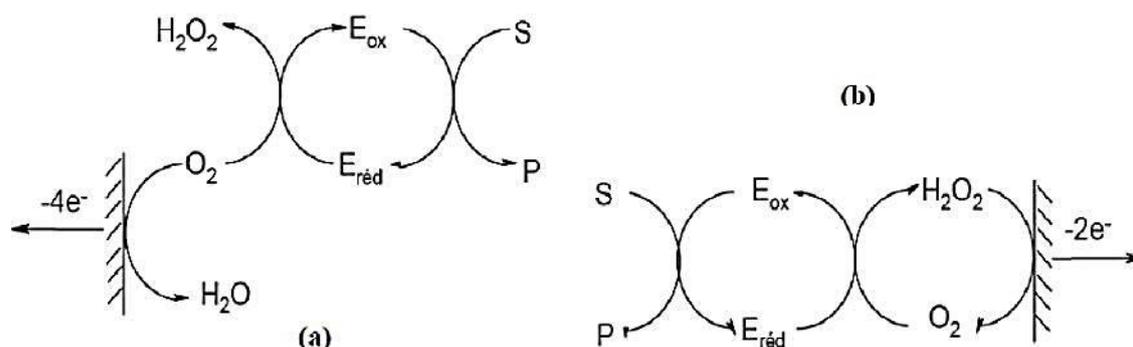


Figure. I.10. Principe des biocapteurs ampérométriques de première génération pour la Détection de la consommation de dioxygène (a) et la production de peroxyde d'hydrogène (b).

Quel que soit le mode de détection choisi des limitations existent. Effectivement, les biocapteurs à glucose, basés sur la détection de la consommation de dioxygène, sont assujettis aux fluctuations de la pression partielle en oxygène et à la limitation stoechiométrique d'oxygène (concentration en oxygène dissous bien inférieure à la concentration physiologique en glucose).

De ce fait, la réponse de ces biocapteurs perd en linéarité vis-à-vis de la concentration de glucose dans le milieu. De même les biocapteurs à glucose, basés sur la détection de la production de peroxyde d'hydrogène, présentent également des limitations. En effet, un grand nombre de substances « électroactives », telles l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion ou encore les catécholamines présentes dans les organismes vivants, sont susceptibles d'être oxydées au potentiel d'oxydation du peroxyde d'hydrogène (+0,65V / ECS). De ce fait, cela va créer des interférences dans la réponse du biocapteur vis-à-vis du glucose rendant la mesure non sélective. Bien d'autres pistes ont été proposées afin de s'affranchir de telles interférences, mais une nouvelle génération de biocapteurs ampérométriques a également été développée dans le but d'augmenter la sélectivité de l'électrode.

VI.5.3.2 Les biocapteurs de deuxième génération

La seconde génération de biocapteurs ampérométriques (**figure I-11**) est constituée de transducteurs qui utilisent d'autres espèces oxydantes, appelées médiateurs, comme transporteurs d'électrons entre l'électrode et le centre rédox de l'enzyme (**équation I-5**).

Chapitre I : Les Biocapteurs

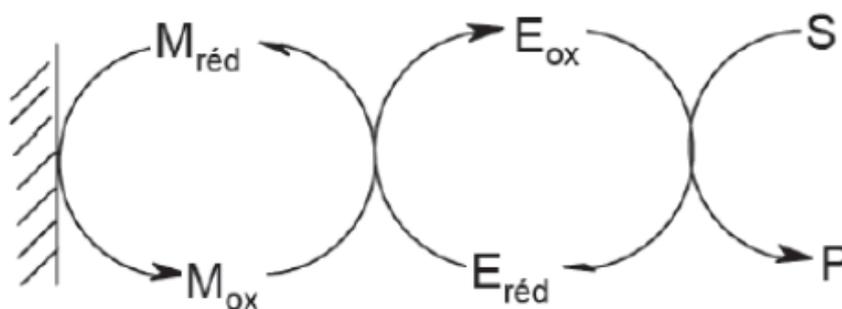


Figure. I.11. Principe des biocapteurs ampérométriques de deuxième génération.

Par conséquent cette catalyse enzymatique mettant en jeu un troisième couple redox ($M(ox) / M(red)$) permet de travailler à des potentiels plus faibles, ce qui diminue sensiblement l'influence de l'oxygène et les interférences dues aux substances contaminantes. Un grand nombre des espèces présentes naturellement dans les organismes vivants, ont un potentiel redox faible et souvent inférieur à celui de l'oxygène. On comprend donc bien la nécessité d'abaisser le potentiel de travail des biocapteurs, en utilisant un médiateur (figure I-12), afin de s'affranchir des interférences dues à ces substances.

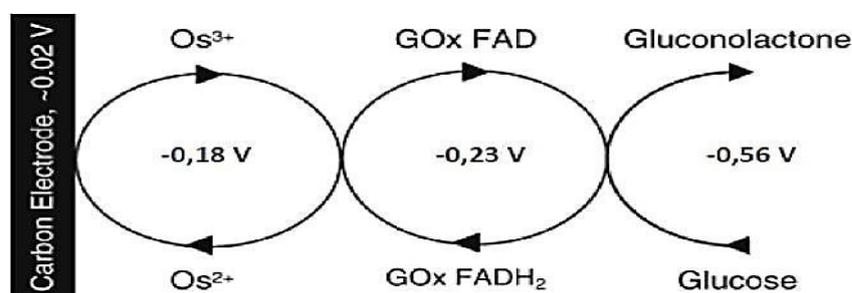


Figure. I.12. Echelle des potentiels standards des couples redox mis en jeu dans une bioanode (/ Ag/AgCl) dédiée à l'oxydation du glucose.

Les médiateurs sont, en général, des espèces de faible poids moléculaire. Le cofacteur de l'enzyme lui-même peut être utilisé en tant que médiateur. Malheureusement celui-ci ne peut se régénérer spontanément à un potentiel convenable à l'anode. Les médiateurs peuvent être utilisés soit en solution, soit de préférence en l'immobilisant à la Surface de l'électrode. En solution, la mise en œuvre est plus facile mais n'est pas Technologiquement viable en tant que biocapteur in vivo. En effet, certains médiateurs sont toxiques et les immobiliser permet de limiter leur impact sur l'organisme. De plus,

Chapitre I : Les Biocapteurs

L'immobilisation du médiateur permet une utilisation sur la durée et donc baisse les coûts ce qui est un facteur non négligeable. Cependant, ces biocapteurs ampérométriques présentent L'inconvénient d'avoir une stabilité assez réduite. De plus, un certain nombre de critères doivent être respectés afin de sélectionner le médiateur :

- La tension appliquée ne doit pas dépasser le potentiel de réduction de l'oxygène.
- Le médiateur réduit ne doit pas réagir avec l'oxygène.
- Le transfert des électrons entre le médiateur et l'enzyme doit être très rapide.
- Le médiateur ne doit pas être influencé par le pH.
- Le médiateur doit être non toxique.

Ces systèmes sont donc soumis à un grand nombre de contraintes et donc une troisième génération de biocapteurs a été étudiée.

VI.5.3.3 Les biocapteurs de troisième génération

Dans la troisième génération de biocapteur, le principe est ici d'avoir un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode via le site actif de l'enzyme (figure I-13). Ceci se fait tout en gardant une séparation spatiale minimale entre les deux sites (accepteur et donneur d'électrons).

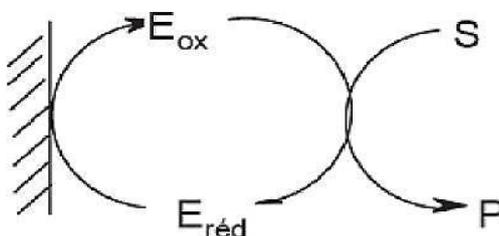


Figure. I.13. Principe des biocapteurs ampérométriques de troisième génération.

Ces systèmes présentent l'avantage de limiter fortement les interférences que l'on peut rencontrer lors de dosage dans des milieux complexes [31], et ce du fait que le potentiel de travail est très bas, proche du potentiel rédox de l'enzyme. Cependant très peu d'enzymes permettent le transfert direct des électrons avec des électrodes dites conventionnelles. Cet état de fait fut à l'origine de la nécessité de développer de nouveaux matériaux d'électrode. Les biocapteurs ampérométriques de troisième génération présentent théoriquement une bonne sélectivité et de ce fait possèdent un fort potentiel de développement. Néanmoins, très peu de biocapteurs ampérométriques de troisième génération le sont réellement. En effet, la plupart des technologies développées, hormis certaines à base de nanotubes de carbone qui Permettent une connexion intime avec le site actif de l'enzyme [32], nécessitent l'incorporation de médiateur dans le matériau d'électrode.

Chapitre I : Les Biocapteurs

Structure de LI	Temps de réponse	Concentration	Limite de detection	Durée de vie	Interférents	Enzyme	Type d'électrode	Type de caractérisation	Type de biocapteur	Références (Auteurs année)
1-(3-aminopropyl)-3-methylimidazolium bromide (IL-NH₂)	5 min	0,25 à 5 mg ml ⁻¹	carbaryl : $5,3 \times 10^{-15}$ M monocrotophos : $4,6 \times 10^{-14}$ M	15 jours	/	AChE (acetylcholinesterase)	GCE (modified glassy carbon electrode)	Raman FTIR UV-visible	GA/AChE-IL-GR-Gel	Y. Zheng et al. / Sensors and Actuators B 210 (2015)
n-octyl-pyridiniumhexafluorophosphate (OPPF₆)	< 10 s	$5,0 \times 10^{-6}$ à $1,2 \times 10^{-3}$ et $2,6 \times 10^{-3}$ à $1,3 \times 10^{-2}$ M,	$3,5 \times 10^{-6}$ M	> 2 mois	l'acide ascorbique (AA), l'acide urique(UA)	GOD	Au-CILE	TEM	GOD-Au-CILE	X. Liu et al. / Biosensors and Bioelectronics 25 (2010)
1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphates (BMIMPF₆)	150 s	$1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$2,52 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹	/	l'ibuprofène	HSA	GCE	UV-visible	BMIMPF ₆ /HSA/GCE	D. Abd El-Hady, A.K. Youssef / Analytica Chimica Acta 772 (2013)
1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIm][BF₄])	10 s	0,05-1,0 mM 1,0-8,0 mM	0,01 mM	15 jours	AA, UA, l-cystine, l-tyrosine et CA	HRP, GOD	Nf-GOD-HRP/3DM-PTMSPA-IL/ITO	Electrochimique al impédance spectroscopie (EIS), cyclique voltamètre (CV)	Nf-GOD-HRP/3DM-PTMSPA-IL/ITO	X. Chen et al. / Sensors and Actuators B 163 (2012)
(1-butyl-3-méthylimidazolium)tétrahydroborate, [bmim] BF₄	3 s	0,01 à 4,2 mM	5 µM	40 jours	AA, UA	GOx	Pt	CV C-A EIS	GOx/Chi/IL/PB/Pt	Y. Zhang et al. / Sensors and Actuators B 176 (2013)

Chapitre I : Les Biocapteurs

Nbutylpyridiniumhexafluorophosphate (BPPF6)	2 s	5.0 Mm	$3.8 \times 10^{-9} \text{M}$	60 jours	Acide citrique, acide urique, glycine, acide Ascorbique	peroxidase	glassy carbon electrode (GCE)	differential pulse voltammetry (DPV) Cyclic voltammetry (CV)	microperoxidase-11 (MP-11)	Jun Wan et al /Analytical Biochemistry 386 (2009) 256–261
1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (Ir-BMI.PF6)	60 s	3.48×10^{-6} à $4.95 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$	$9.15 \times 10^{-7} \text{mol L}^{-1}$	150 jours	Acide caféique, acide citrique, fructose, glucose, acide glutamique	polyphénol oxydase	Ag/Ag Cl	SWV TEM	Ir-BMI.PF6 + polyphénol oxydase	Suellen C. Fernandes et al/Talanta 79 (2009) 222–228
1-butyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide (BMI·Tf2N)	/	0.9×10^{-7} to $4.46 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$	$7.25 \times 10^{-8} \text{mol L}^{-1}$	300 jours	Acide caféique, eriodictyol-7-O-glucoside, hesperetin, hesperidin,	Peroxydaz	carbon paste electrode (CPE)	UV-visible SWV Square-wave voltammetry.	peroxidase-BMI-Tf ₂ N	Kamila dos Santos Maguerroski et al/Enzyme and Microbial Technology 44 (2009)
1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (Pt-BMI.PF6)	/	9.99×10^{-7} à $2.13 \times 10^{-4} \text{mol L}^{-1}$	2.93×10^{-7}	90 jours	/	Nujol	Pt	SWV X-ray	Nujol:Pt.BMIPF6	Daniela Brondania et al/Sensors and Actuators B 140
bamboo-like multi-walled carbon nanotubes (BCNTs)	2 s	5 mg mL ⁻¹	$4.5 \times 10^{-7} \text{M}$	/	Choline Acide ascorbique acide urique	choline	ChOx/Ni-PB/BG/GC NTs/IL/GC BCNTs/GC BG/GC PB/BG/GC	Raman FTIR	Choline + ChOx/Ni-PB/BG/GC	Amir Homayoun Keihan et al / Sensors and Actuators B 204

Tableau I.1. récapitulatif des caractéristiques de quelques biocapteurs

Chapitre I : Les Biocapteurs

VII. Applications des biocapteurs

Les biocapteurs font partie de l'instrumentation qui touche un grand nombre de secteurs d'activité industrielle, notamment le secteur médical en domaine hospitalier ou à domicile, le secteur agro-alimentaire pour le contrôle des processus de fabrication, le secteur de la protection de l'environnement et le secteur de la défense.

VII-1 Le secteur biomédical

A l'heure actuelle, ce sont les capteurs enzymatiques les plus utilisés en raison de la spécificité du dosage et de la facilité de mise en œuvre. Les enzymes et les transducteurs correspondants sont aussi disponibles en général dans le commerce. Dans le domaine médical, c'est l'électrode à glucose oxydase qui retient l'attention, à cause de l'intérêt qu'elle présente pour le dosage du glucose dans le sang et dans l'urine pour le diagnostic du diabète. Cependant, l'utilisation du biocapteur in vivo demande la résolution des problèmes de biocompatibilité. Outre l'électrode de glucose, d'autres biocapteurs sont capable de doser les métabolites en milieu biologique : l'électrode d'urée et de créatinine permet le contrôle de la fonction rénale, l'électrode de cholestérol pour le dépistage et la prévention de l'artériosclérose, l'électrode d'acétylcholine pour le suivi du neurotransmetteur en relation avec la transmission chimique au niveau des synapses et l'électrode de lactate pour l'évaluation de l'effort musculaire [38].

VII.2 Le secteur agroalimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les applications des biocapteurs sont multiples, grâce à leur sensibilité aux produits biologiques. Les biocapteurs se prêtent au dosage des ingrédients, additifs alimentaires, contaminants ou toxines. L'utilisation de l'électrode de glucose permet de déterminer la fraîcheur de la viande par la consommation du sucre par les microbes présents à la surface [39]. De même, il est possible d'avoir une indication de l'état de fraîcheur des poissons par un capteur sensible à l'hypoxanthine, a linosine et a l'inosine 5 monosphate [40, 41].

VII.3 Le secteur environnemental

Afin de répondre aux nouvelles dispositions législatives concernant le contrôle des rejets de polluants, les biocapteurs présentent des avantages certains sur les techniques d'analyses chimiques conventionnelles même si elles sont extrêmement précises, n'en demeurent pas moins coûteuses et nécessitent une main d'œuvre qualifiée. Les biocapteurs sont, pour leur part, très sensibles et peuvent détecter de très faibles concentrations de toxiques [42]. Ils peuvent également

Chapitre I : Les Biocapteurs

opérer dans des matrices complexes directement prélevées dans le milieu naturel, les délais de réponse sont donc courts puisque la préparation des échantillons est rapide. Ceci permet alors d'envisager l'emploi de tels outils pour instrumenter des sites et obtenir des informations en continu et en temps réel quant à la présence de polluants. Depuis une vingtaine d'années, de nombreux biocapteurs destinés au contrôle environnemental ont été développés, et dans certains cas commercialisés, pour détecter les grandes familles de substances susceptibles de polluer les écosystèmes aquatiques.

VII.3.1 Les pesticides

Différents types de biocapteurs ont été développés afin de détecter les pesticides [42]. Un grand nombre de ces biocapteurs repose sur l'inhibition des enzymes cholinestérases par des composés organophosphorés et carbamates et utilisent des capteurs électrochimiques comme transducteurs. Cremisini et al. (1995) proposent, par exemple, un capteur ampérométrique à acétylcholinestérase pour la détection de paraoxon dans la gamme 1 à 15ppb [43]. On trouve également des capteurs conductimétriques ou ISFET pour la détection de méthyl-parathion ou de méthyl-paraoxon avec des limites de détection (Ld) inférieures à 25 ppb [44, 45]. L'utilisation de systèmes FIA 11 (le système d'analyse par injection en flux continue) permet de se rapprocher de la configuration la plus adaptée aux mesures sur site et a été utilisée par Pogacnik et Franko (2001) pour étudier l'inhibition de cholinestérases de différentes origines par du paraoxon (Ld inférieure à 0,5ppb) et du carbofuran (Ld inférieure à 5ppb) afin d'optimiser le choix du biorécepteur [46].

Quelques immunocapteurs ont également fait l'objet de recherches. La plupart est basée sur des détections optiques et permet la mise en évidence d'atrazine, de s-triazines et de carbaryl [47].

Enfin, des capteurs à cellules entières sont apparus récemment et reposent généralement sur la mesure de l'activité photosynthétique de cellules algales perturbée en présence d'herbicides.

En mesurant la fluorescence chlorophyllienne, Frense et al. (1998) ont mis en évidence la présence d'atrazine jusqu'à 1ppb [48]. Les travaux menés par Védrine (2003) ont débouché sur la mise au point d'un biocapteur à cellules algales sensible à des concentrations inférieures à 0,25 ppb en atrazine, à 0,025ppb en diuron et isoproturon et à 0,5 ppb en simazine [49].

D'autres auteurs se sont intéressés aux variations de la consommation d'O₂ ou de la production de CO₂ lors de la photosynthèse pour détecter la présence d'herbicides [50 - 52].

Chapitre I : Les Biocapteurs

VII.3.2 Les métaux lourds

Pour la détection de métaux lourds, des enzymes purifiées ont permis la mise au point de biocapteurs adaptés pour la détection des métaux lourds notamment l'uréase [53, 54] et la phosphatase alcaline [55, 56]. Des biocapteurs optiques utilisant des algues *Chlorella vulgaris* comme biorécepteurs ont permis de suivre l'activité des phosphatases alcalines membranaires ainsi que leurs perturbations en présence de divers métaux lourds avec des limites de détection d'environ 10 ppb pour Cd^{2+} et Pb^{2+} [57]. D'autres capteurs basés sur la fluorescence chlorophyllienne d'algues immobilisées peuvent également servir à la détection du mercure et du cuivre comme l'ont montré Campanella et al. (2000) [51].

VII.3.3 Autres pollutions

Les phénols sont des molécules dont l'usage est très répandu (pesticides, plastiques, surfactants, médicaments...). L'enzyme tyrosinase utilisant des dérivés phénoliques comme substrat a permis de développer de nombreux capteurs. Mai Anh et al. (2002) ont ainsi proposé des capteurs ISFET à tyrosinase pour la détection de phénol dans l'eau avec une limite de détection de 20 ppm pour le 4-chlorophénol [58]. De nombreux autres capteurs électrochimiques avec des limites de détection inférieures à 0,5ppb ont également fait l'objet d'études [42, 59]. Enfin, l'évaluation de la pollution organique globale peut être réalisée grâce à des biocapteurs basés sur la mesure de la DBO de bactéries immobilisées. La dégradation de molécules organiques par les microorganismes s'accompagne en effet d'une augmentation de leur consommation en Oxygène modifiant le signal mesuré par le capteur [12].

VIII. Glucose oxydase

VIII.1 Définition

La glucose oxydase (GOx, GOD) est une enzyme oxydo-réductase (EC 1.1.3.4) qui catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et en D-glucono- δ -lactone (figure I-14). Dans les cellules, elle participe à cliver les sucres (oses), notamment les accharose (Glc-Fru) en métabolites. La GOx est largement utilisée pour déterminer la concentration en glucose libre dans les fluides corporels (diagnostic), et dans les aliments (industrie). Elle a de nombreuses applications en biotechnologies, typiquement les tests enzymatiques de biochimie [60]. Elle est le plus souvent extraite d'*Aspergillus niger*. Structure La GOx est une protéine dimérique contenant des glucides, dont la structure tridimensionnelle est élucidée. Le site actif où le glucose se lie est une poche profonde.

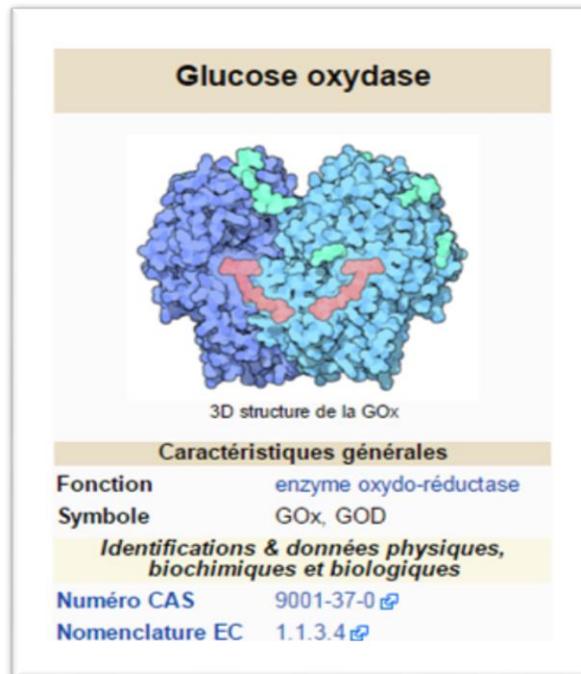


Figure. I.14. Structure et caractéristiques générale de la glucose oxydase.

VIII.2 Activité

La glucose oxydase se lie spécifiquement au β -D-glucopyranose (forme hémiacétal du glucose). Il n'agit pas sur l' α -D-glucose, mais est capable d'agir sur le glucose, car en solution le glucose est sous forme cyclique (à pH7: 36,4 % de α -D-glucose et 63,6 % de β -D-glucose, 0,5 % sous forme linéaire) et car l'oxydation déplace l'équilibre vers le β -D-glucose [61].

La GOx catalyse l'oxydation du β -D-glucose en D-glucono-1,5-lactone, qui ensuite s'hydrolyse en acide gluconique. ($K_m = 33-110$ mM; 25 °C; pH 5.6).

La catalyse requiert un cofacteur, la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD, un composant majeur d'oxydation-réduction dans les cellules. Le FAD sert d'accepteur d'électron initial, il est réduit en $FADH_2$ qui sera re-oxydé en FAD (régénération) par l'oxygène moléculaire (O_2 , plus réducteur que le FAD). L' O_2 est enfin réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Chapitre I : Les Biocapteurs

VIII.3 Applications

La glucose oxydase est largement utilisée, couplée à une réaction de la peroxydase (POD, HRP) qui visualise la formation d' H_2O_2 , et donc permet de doser le glucose libre, ceci dans le sérum ou le plasma en diagnostic clinique [62]. Le test spectrométrique du dosage par la glucose oxydase est manuel ou automatisé, et existe en tests rapides au chevet du patient. Ce test est aussi réalisé par des méthodes nanotechnologiques, avec des biosenseurs: ces capteurs détectent le nombre d'électrons qui passent au travers de l'enzyme connectée à une électrode. Ceci peut servir le control qualité en industrie comme le suivi médical du diabète.

En fabrication par ailleurs, la GOx est utilisée comme additif pour son potentiel d'oxydo-réduction : en boulangerie, il rend la pâte plus ferme, remplaçant des oxydants comme le bromate et l'acide ascorbique. Il sert aussi à éliminer l'oxygène en emballage alimentaire, et le D-glucose du blanc d'œuf pour éviter le brunissement (Réaction de Maillard). La glucose oxydase est présente dans le miel ou il agit comme agent naturel de préservation, réduisant l'oxygène atmosphérique en peroxyde d'hydrogène, qui détruit les bactéries. On retrouve cette activité bactéricide dans diverses cellules (champignons, cellules immunitaires). Cette enzyme peut être aussi utilisée dans une biopile enzymatique. L'oxydation du glucose libère deux électrons qui peuvent être transférés à un médiateur RedOx, puis à l'anode de la pile ce qui génère un courant électrique. La réaction couplée (deuxième demi-pile) peut être la réduction du dioxygène en eau par la bilirubine oxydase ou lalaccase. Enzymes apparentées : Notatine et autres la Notatine, extraite de *Penicillium notatum*, fut initialement appelée Penicilline A, mais renommée pour éviter la confusion avec la penicilline [63]. À présent, la notatine est considérée identique à la Penicilline B et la glucose oxydase [64].

Chapitre I : Les Biocapteurs

Références

- [1] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet, Techniques de l'Ingénieur, Doc. R 420, 360.
- [2] B. Torbiero, Thèse de doctorat, Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS De Toulouse, 21 novembre (2006).
- [3] Anh Tuan Mai. Thèse de doctorat, L'université Claude Bernard, Lyon. N° d'ordre : 194-2004, (2004).
- [4] L. C. Clark, Monitoring and control of blood and tissue O₂ tensions. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 2 (1956), 41-48
- [5] L. C. Clark, C. Lyons, Ann. Ny Acad. Sci, 102, (1962), 29.
- [6] S. J. Updike, G. P. Hicks, Nature, 214, (1967), 986.
- [7] G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, J. Am. Chem. Soc, 91, (1969), 2164.
- [8] C. Diviès, Ann. Microbiol. 126, (1975), 175.
- [9] A. H. Clemens, P. H. Chang, R. W. Myers, Journ. Annu. Diabetol. Hôtel-Dieu, (1976), 269.
- [10] A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. Allen, O. Hill, Anal. Chem, 56, (1984), 667.
- [11] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, Sens. Actuators, 4, (1983), 299.
- [12] C. Tran-Minh, Les biocapteurs. Principes, construction et applications. Paris, Masson. (1991).
- [13] E. A. H. Hall, Biosensors, Open University Press, Buckingham, (1990).
- [14] M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne, Biosensors and Bioelectronics 18, (2003), 943.
- [15] J. J. Pancrazio, J. P. Whelan, D. A. Borkholder, W. Ma and D. A. Stenger, Annals of Biomedical Engineering 27, (1999), 697.
- [16] B. R. Eggins, C. Hickey, S. A. Toft and D. M. Zhou, Analytica Chimica Acta, 347, (1997), 281.
- [17] R. Rizzuto, P. Pinton, M. Brini, A. Chiesa, L. Filippin, T. Pozzan, Cell Calcium 26, (1999), 193.
- [18] P. Blinder, Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 5, (1990), 23.
- [19] R. M. Buch, G. A. Rechnitz, Biosensors, 4, (1989), 215.
- [20] D. M. Jenkins, M. J. Delwiche, Biosensors and Bioelectronics 18, (2003), 101.
- [21] K. Bizet, C. Gabrielli, H. Perrot, J. Thérasse, Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 10 (1995), 205.
- [22] K. Ramanathan, B. Danielsson, Biosensors and Bioelectronics, 16, (2001), 417.
- [23] U. Harborn, B. Xie, R. Venkatesh, B. Danielsson, Clinica Chimica Acta, 267, (1997), 225.

Chapitre I : Les Biocapteurs

- [24] R. Bharadwaj, V.V.R. Sai, K. Thakare, A. Dhawangale, T. Kundu, S. Titus, P.K. Verma, S. Mukherji, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, (2011), 3367.
- [25] A. J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, J. Willey & Sons, (1980).
- [26] A. J. Killard, M. R. Smyth, *Creatinine biosensors: principles and designs, reviews*, (2000).
- [27] Q. Chi, S. Dong, *Analytica Chimica Acta*, 310, (1995), 429.
- [28] S. Wolfgang, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, (1995), 181.
- [29] Z.B. Zhang, S.J. Yuan, X.L. Zhu, K.G. Neoh, E.T. Kang, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, (2010), 1102.
- [30] G.G. Guilbault, G.J. Lubrano, *Analytica Chimica Acta*, 64, (1973), 439.
- [31] W. Schuhmann, C. Kranz, J. Huber, H. Wohlschlager, *Synth. Met.*, 61, (1993), 31.
- [32] S. Xu, X. Zhang, T. Wan, C. Zhang, *Microchimica Acta*, 172, (2011), 199.
- [33] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, (Eds.), *Biosensors, fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford, (1987).
- [34] G. G. Guilbault, *Handbook of immobilized enzymes*. Marcel Dekker, New York, (1984).
- [35] L. J. Blum, P. R. Coulet, (Eds.), *Biosensors principles and applications*, Marcel Dekker, New York, (1991).
- [36] Y. G. Li, Y. X. Zhou, J. L. Freng, Z. H. Jiang, L. R. Ma, *Analytica Chimica Acta*, 382, (1999), 277.
- [37] H. H. We, and all, *immobilized enzymes*, *Anal chem*, 46, (1974), 602-.
- [38] M. Mascini, G. Palleschi, *Selective Electrode Reviews*, 11, (1989), 191.
- [39] K. Rogers, E. J. D'costa, *Biosensors for the food industry*. IUPAC Congress-Manchester, (1985).
- [40] [40] I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki, E. Watanabe, K. Toyama, *J. Agric. Food Chem*, 32, (1984), 314.
- [41] E. Watanabe, H. Endo, K. Toyama, *Appl. Microb. Biotechnol*, 29, (1988), 341.
- [42] M. J. Dennison, A.P.F. Turner, *Biotechnology Advances*,13, (1995), 1.
- [43] C. Cremisini, S. Di Sario, J. Mela, and al, *Analytica Chimica Acta*, 311, (1995), 273.
- [44] S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, J. M. Chovelon, *Analytica Chimica Acta*, 459,(2002), 33.
- [45] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet, and al, *Sensors and Materials*, 8, (1996),
- [46] L. Pogacnik, M. Franko, *Talanta*, 54, (2001), 631.
- [47] M. A. Gonzalez-Martinez, R. Puchades, A. Maquieira, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, (1999), 204.

Chapitre I : Les Biocapteurs

- [48] D. Frense, A. Muller, D. Beckmann, *Sensors and Actuators B*, 51, (1998), 256.
- [49] C. Védrine, J. C. Leclerc, C. Durrieu, and al, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, (2003)
- [50] D. Schubnell, M. Lehmann, W. Baumann, and al, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, (1999), 465.
- [51] L. Campanella, F. Cubadda, M. P. Sammartino, and al, *Water Resources*, 35, (2000), 69.
- [52] P. Pandard, P. Vasseur, D. M. Rawson, *Water Resources*, 27, (1993), 427.
- [53] G. A. Zhylyak, S. V. Dzyadevych, Y. I. Korpan, and al, *Sensors and Actuators B*, 24-25, (1995), 145.
- [54] C. H. Tsai, R. A. Doong, H. C. Chiang, and al, *Analytica Chimica Acta*, 481, (2003), 75.
- [55] J. Marcos, A. Townshend, *Analytica Chimica Acta*, 299, (1994), 129.
- [56] S. Kamtekar, R. Pande, M. S. Ayyagari, and al, *Materials Science and Engineering*, 3, (1995).
- [57] C. Durrieu, C. Tran Minh, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, (2002), 206.
- [58] T. Mai-Anh, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, and al, *Talanta*, 56, (2002), 627.
- [59] S. Cosnier, J. J. Fombon, P. Labbé, and al, *Sensors and Actuators B*, 59, (1999), 134.
- [60] « Fiche technique de la Glucose Oxydase » (Archive • Wikiwix • Archive.is • Google • Que faire ?), consulté le 2013-04-09, Interchim
- [61] en) Julio Raba and Horacio A. Mottola, « Glucose Oxydase as an Analytical Reagent », *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 25, no 1, 1995, p. 1–42 (lire en ligne)
- [62]] (en) Coulthard CE, Michaelis R, Short WF, Sykes G, « Notatin : an anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling and *Penicillium resticulosum* sp. Nov », *Biochem. J.*, vol. 39, no 1, 1945, p. 24–36 (PMID 16747849, PMID 1258144)
- [63] (en) Coulthard CE, Michaelis R, Short WF, Sykes G, « Notatin : an anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling and *Penicillium resticulosum* sp. Nov », *Biochem. J.*, vol. 39, no 1, 1945, p. 24–36 (PMID 16747849, PMID 1258144)
- [64] (en) KEILIN D, HARTREE EF, « Specificity of glucose oxidase (notatin) », *Biochem. J.*, vol. 50, no 3, janvier 1952, p. 331–41 (PMID 14915954, PMID 1197657)

Chapitre II
Les Liquides ioniques

I. Introduction

Au début des années quatre-vingt-dix, pour la grande majorité des chimistes, le terme liquide ionique était obscur et peu connu. Depuis 2000, le nombre de publications et de brevets traitant de ce domaine de recherche a augmenté de manière exponentielle (Figure .I.1). Cependant, on peut se demander pourquoi les liquides ioniques suscitent un tel engouement au sein de la communauté scientifique. La réponse se trouve dans la structure même de ces sels organiques. En effet, leurs propriétés physico-chimiques sont très intéressantes et variées, et les multiples applications possibles dans la chimie organique font de ces entités des composés de choix comme solvants de substitution pour la catalyse et la synthèse supportée.

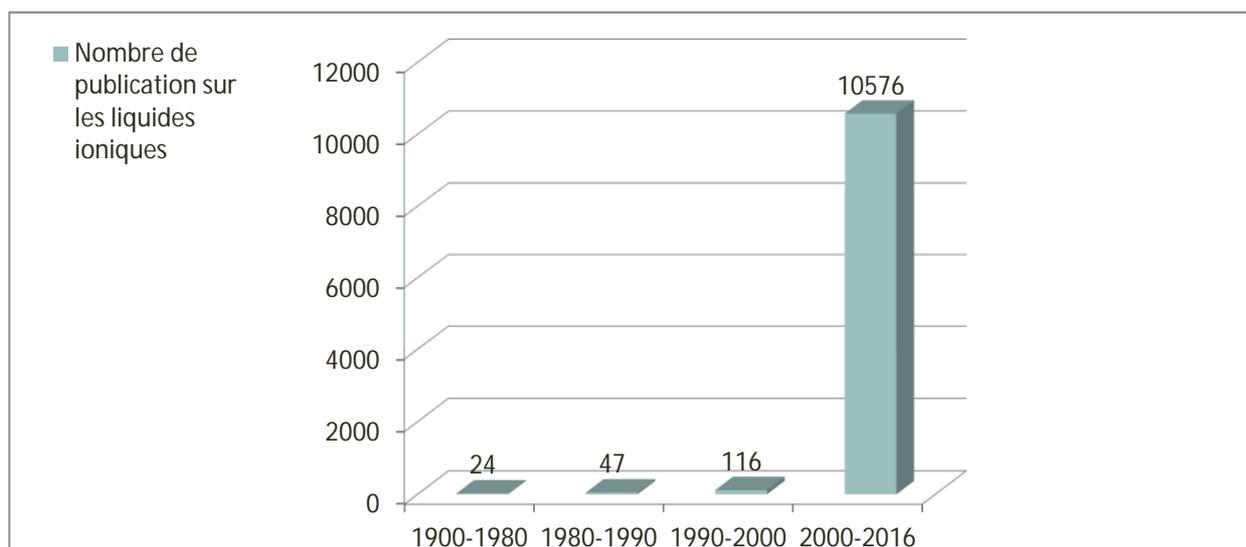


Figure. II .1. Nombre de publications sur les liquides ioniques.

Les solvants usuels de la chimie organique sont parfois toxiques et peu compatibles avec l'environnement. En raison de leur faible tension de vapeur, les liquides ioniques se révèlent être une nouvelle alternative à leur utilisation. Les nouvelles normes en matière de protection de l'environnement incitent les industries chimiques et pharmaceutiques à mettre en œuvre des procédés permettant la minimisation ou l'élimination de tout rejet toxique. En conséquence les liquides ioniques commencent à intéresser activement ces industries [1]. La société Solvant Innovation [2], créée par le chercheur académique Peter Wasserscheid, la compagnie Merck [3] et le groupe BASF [4] commercialisent depuis peu une grande variété de liquide ionique.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Nous étudierons dans ce chapitre l'histoire des liquides ioniques, leurs propriétés physico-chimiques et leurs applications dans la chimie organique et la synthèse sur support.

II. Historique

Historiquement, le premier liquide ionique a été découvert en 1914 par Walden [5] : c'était le nitrate d'ammonium d'éthyle $[\text{EtNH}_3] [\text{NO}_3]$ et ce sel liquide à 12°C n'avait pas attiré l'attention des chimistes du début du siècle. Ce n'est qu'après la Deuxième Guerre mondiale qu'une application de ces sels a été rapportée. Hurley a ainsi décrit l'utilisation de chloroaluminates de pyridinium comme électrolytes dans l'électrodéposition de l'aluminium. Ces travaux ont ensuite été repris durant les années quatre-vingt par Hussey [6] et Osteryoug [7]

Les liquides ioniques se sont progressivement immiscés dans la chimie organique «classique» notamment grâce aux sels de dialkylimidazolium associés à leurs anions chloroaluminates qui sont utilisés comme catalyseurs dans les réactions de Friedel-Crafts [8].

Néanmoins ces sels ont un inconvénient majeur : ils sont peu stables à l'air ambiant, très hygroscopiques et ce qui limite leurs applications industrielles, en particulier pour les réactions de substitution électrophile aromatique.

Le premier liquide ionique stable à l'air et à l'eau, le tétrafluoroborate d'éthyle et de méthyle imidazolium, a été décrit par Wilkes [9] en 1992. Il a été utilisé avec succès en catalyse homogène. Cette découverte peut être considérée comme le point de départ le plus significatif de l'utilisation des liquides ioniques en chimie organique.

III. Définition

Liquides ioniques sont des substances avec des points de fusion en-dessous de 100°C , ce composé seulement par des ions et le classique des sels fondus à hautes températures ne sont pas inclus dans cette définition.

La première génération Ils basée sur des chlorures a fait ne pas exécuter en raison bon de leur sensibilité d'humidité et d'oxygène. [10].

IV. Structure des liquides ioniques

IV.1 Cations

Les cations sont en général volumineux et ont une faible symétrie. Les plus utilisés ont une structure de type : ammonium [11], sulfonium [12], phosphonium [13], pyridinium [14], imidazolium [15], pyrrolidinium [16], thiazolium [17], triazolium [18], oxazolium [19], pyrazolium [20] et le 2,3-triméthylèneimidazolium [21] (Figure.I. 2).

L'imidazolium est le cation le plus fréquemment représenté dans les publications.

Les cations N, N' dialkylimidazolium, de par leur asymétrie, possèdent des propriétés physico-chimiques intéressantes, notamment un faible point de fusion. Il est à noter que les hexafluorophosphates d'imidazolium substitués par des groupements alkyles de manière symétrique restent liquides à température ambiante [22].

De nombreux liquides ioniques comportant un cation imidazolium ont été modifiés pour des applications en tant que solvant de réaction ou pour des tâches spécifiques. Ainsi, certains de ces cations ont été fonctionnalisés par des fonctions éther [23], amine [24], urée [25], ou par des chaînes perforées. [26]

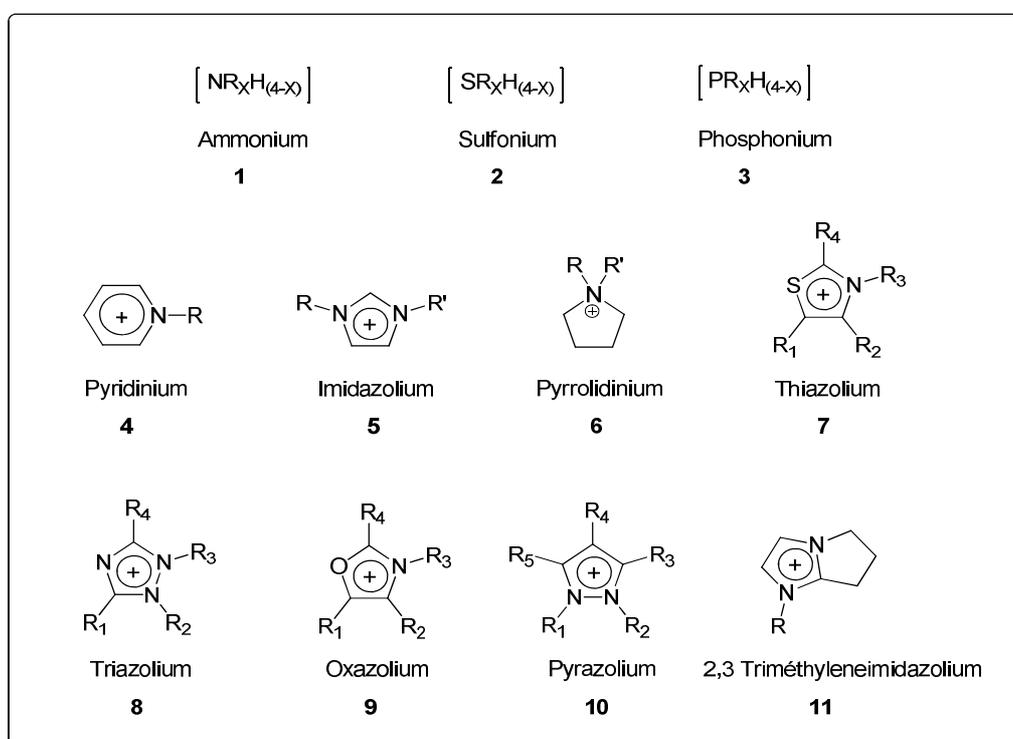


Figure. II.2. Structures des cations les plus utilisés.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Des polycations [27] de type d'imidazolium, diammonium et N-alkylisoquinolinium ont été décrits récemment. Le choix du cation est important. Il peut dans certains cas orienter une sélectivité et influencer le rendement de la réaction.

Ainsi, Lancaster et coll. [28] ont effectué une étude sur l'influence du cation dans le cas d'une réaction de nitration aromatique en milieu liquide ionique. Comme le montre le tableau 1, des différences de réactivité et de sélectivité sont constatées en fonction du cation utilisé. Le substrat est le toluène et les différentes réactions sont effectuées dans des conditions similaires, à 25 °C. Les cations étudiés sont le butylméthyl imidazolium ([bmim]) **12**, le 1-butyl-2,3-diméthylimidazolium ([bm₂mim]) **13** et le 1-butyl-1-méthylpyrrolidinium ([bmpy]) **14**, associés avec l'anion le bis ((trifluorométhyl) sulfoniez) imide ([NTf₂]) (Figure .I.3).

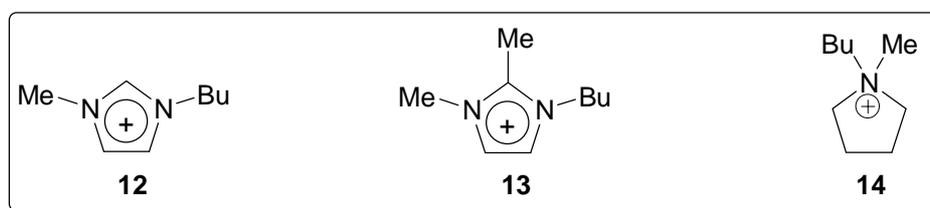


Figure. II.3. Influence du cation dans le cas d'une réaction de nitration aromatique.

Liquide ionique	Conditions de réactions	Rendement (%)	Temps (en heure)	Ratioo-/p-
[bmim][NTf ₂] 12	HNO ₃ -Ac ₂ O	42	24	1.5
[bm ₂ mim][NTf ₂] 13	HNO ₃ -Ac ₂ O	63	1	1.4
[bmpy][NTf ₂] 14	HNO ₃ -Ac ₂ O	93	1	1.3

Tableau.II.1. Réactivité et sélectivité du cation utilisé.

Même si le cation semble jouer un rôle prépondérant dans certains facteurs réactionnels, c'est avant tout l'association cation-anion qui est à l'origine des différences physicochimiques des liquides ioniques. Le choix de l'anion est en conséquence aussi primordial.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

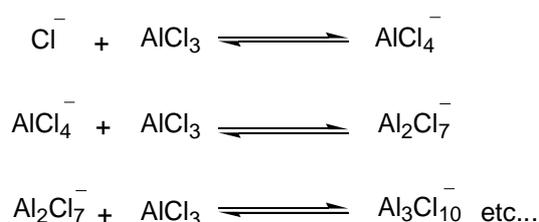
IV.2 Anions

Les anions sont communément classés en deux catégories :

Les anions polynucléaires à caractère « acide de Lewis » : Al_2Cl_7^- , $\text{Al}_3\text{Cl}_{10}^-$, Au_2Cl_7^- , Fe_2Cl_7^-

Ces anions sont formés par réaction de l'acide de Lewis et de l'ion Cl^- . Ainsi selon l'équation 1, l'acide de Lewis AlCl_3 réagit avec l'ion chlorure pour former un mélange d'anions suivant un équilibre acido-basique classique. Ces anions ont surtout été utilisés dans des réactions d'alkylation [29], d'acylation [30] et de sulfonation [31] de systèmes aromatiques.

Cependant les liquides ioniques ayant ce type d'anion induisent certaines limitations : ils sont très sensibles à l'eau et sont peu stables à l'air ambiant. Les chloroaluminates sont considérés comme la première génération de liquide ionique.



Équation 1

L'autre catégorie concerne les anions inertes. Les plus représentatifs sont décrits dans la figure.II.4.

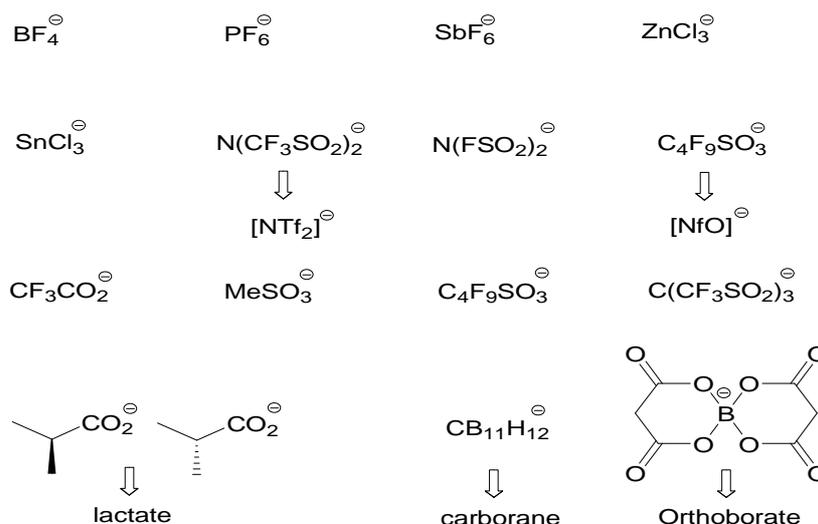


Figure.II.4. Structures des anions les plus utilisés.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Il existe de grandes différences de stabilité et de propriétés physicochimiques entre tous ces anions. Les anions qui conduisent aux plus faibles viscosités et aux points de fusion les plus bas sont les anions fluorés bis ((trifluorométhyl)sulfonyl) imide $[\text{NTf}_2]$, bis(méthylsulfonyl)imide $[\text{Ms}_2\text{N}]$ et le dicyanamide[32] $[\text{N}(\text{CN})_2]$.

Ces caractéristiques peuvent s'expliquer par la délocalisation de la charge négative qui minimise l'interaction cation-anion. Notons que l'anion $[\text{NTf}_2]$ est stable à très haute température ($>400^\circ\text{C}$) [33]. Les carboranes[34] et les orthoborates[35] sont considérés comme étant les anions les plus stables thermiquement et chimiquement les plus inertes.

V. Synthèse des liquides ioniques

Les liquides ioniques possèdent des propriétés inhabituelles et leur synthèse se révèle être très simple. La synthèse de ces sels est généralement effectuée en deux étapes (figure.I.5).

L'étape initiale est une réaction de quaternisation de l'atome d'azote (de phosphore ou de soufre) par un halogénure d'alkyle. Typiquement cette réaction s'effectue au reflux de l'agent alkylant pendant plusieurs heures ou plusieurs jours [36]. L'utilisation des micro-ondes permet de réduire considérablement ce temps de réaction [37]. Cette quaternisation peut aussi s'effectuer grâce aux ultrasons sans solvant [38].

Les halogénures d'imidazolium sont peu utilisés en tant que tel en chimie organique car ils sont très hygroscopiques. L'halogène ayant un caractère très coordonné, il peut induire des réactions parasites. Ces sels sont ensuite modifiés lors de la deuxième étape par la métathèse anionique.

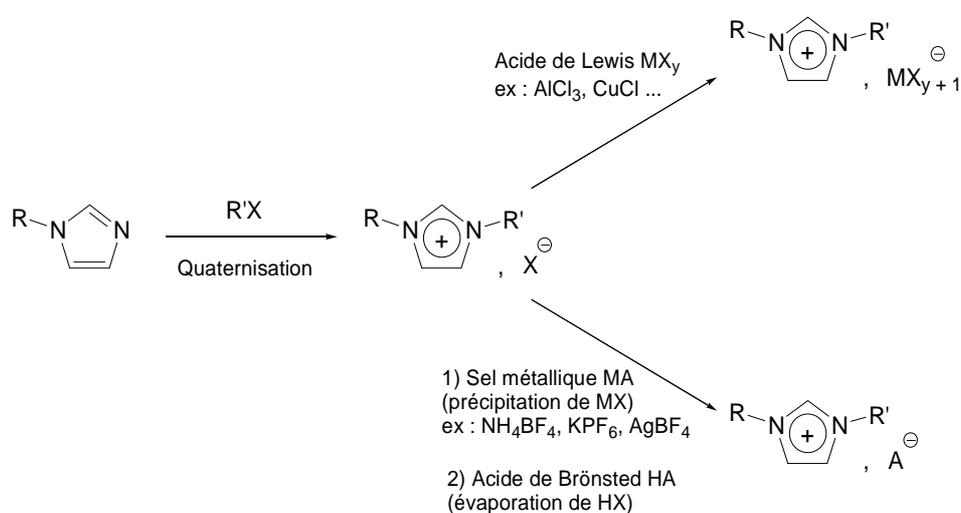


Figure.II.5. Synthèse des liquides ioniques

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Il existe deux méthodes différentes pour cette deuxième étape :

La première méthode est la métathèse anionique : c'est l'échange d'anion d'un halogénure avec soit un sel d'argent, soit un sel d'un métal du groupe I : Li, Na, K, soit un sel d'ammonium de l'anion choisi (ex : NH_4BF_4).

La métathèse est une réaction simple à mettre en œuvre. Sa force motrice réside dans la précipitation des sels MX généralement insolubles dans le solvant de réaction. Cette réaction s'effectue principalement dans les solvants classiques (acétonitrile, acétone) ou dans l'eau (ex : pour LiNTf_2 [39]). Cette réaction a aussi été décrite sous irradiation micro-onde [40].

Historiquement, Wilkes est le premier à avoir décrit en 1992, la synthèse du tétrafluoroborate d'éthylméthylimidazomium ($[\text{emim}] [\text{BF}_4]$), par métathèse anionique de $[\text{emim}][\text{I}]$ avec un sel d'argent (AgBF_4). La métathèse s'effectue dans le méthanol. Elle peut également se faire dans l'acétone avec le NH_4BF_4 .

Il existe à ce jour de nombreux exemples de métathèses anioniques effectuées avec des anions très variés [41]

La deuxième méthode est la neutralisation acide :

La métathèse par voie acido-basique consiste en un échange d'anion du sel de départ avec un acide fort tel que l'acide nitrique, l'acide sulfurique ou l'acide hexafluorophosphorique[42]. Les liquides ioniques obtenus sont lavés plusieurs fois à l'eau afin d'éliminer toute trace d'acide. Il convient de souligner que l'amélioration de la qualité du liquide ionique par des lavages successifs à l'eau entraîne parfois une chute notable du rendement.

Les sels d'halogénoaluminates [43], et chlorocuprates[44] sont préparés à partir de l'halogénométal correspondant. Ces liquides ioniques sont connus pour leur très grande sensibilité à l'eau, à l'air et à la lumière. Ces réactions de métathèse doivent par conséquent être effectuées sous atmosphère inerte.

VI. Propriétés générales des liquides ioniques

Le nombre croissant de publications sur les liquides ioniques montre l'intérêt des chimistes vis-à-vis de ces composés en raison de leurs propriétés peu communes. Les principaux avantages de ces sels organiques sont les suivants :

Ce sont des sels organiques liquides à température ambiante ou ayant une température de fusion inférieure à 100° C.

Leur tension de vapeur est négligeable, ce qui est un avantage pour éliminer les composés volatils présents dans des liquides ioniques.

Ce sont de bons solvants vis-à-vis d'un grand nombre de composés organiques et inorganiques, permettant d'effectuer des réactions catalytiques en milieu homogène.

Ils ne sont pas solubles dans la plupart des solvants organiques usuels, d'où la possibilité de réaliser des réactions catalytiques en milieu biphasique.

Ils peuvent être utilisés comme solvant et catalyseur.

Ils sont généralement composés de cations et d'anions peu coordinats, ce qui est un avantage important pour les industries qui utilisent des catalyseurs dérivés de métaux de transition.

Leur synthèse est généralement peu coûteuse et facile à mettre en œuvre.

Il est possible de les recycler en utilisant un solvant adéquat.

Un simple changement de leur structure, de l'association anion-cation permet de moduler toutes ces propriétés.

VI.1 Propriétés physicochimiques

Précédemment, nous avons montré que la structure des liquides ioniques, l'interaction cations-anions, induisent des variations de propriétés physicochimiques. La viscosité, le point de fusion, la coordination, la conductivité ou la solubilité sont également des facteurs essentiels à prendre en considération pour la mise au point d'une réaction. Même si l'empirisme reste le seul moyen de choisir au mieux le liquide ionique adéquat, de nombreuses études ont été réalisées afin de rationaliser les propriétés générales des liquides ioniques en fonction de la combinaison des cations et des anions mis en jeu.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

VI.2 Viscosité, Densité et Température de fusion

Les liquides ioniques sont des composés très intéressants en raison de leur grande stabilité thermique. Comme les liquides ioniques n'ont pas de tension de vapeur, il en résulte que l'élévation de température entraîne leur dégradation. Généralement elle se produit à des températures égales ou supérieures à 400°C [45]

La température de fusion des liquides ioniques est directement liée à l'interaction du cation et de l'anion. Ces sels sont très peu coordinants, ceci explique leur faible point de fusion. Le cation organique étant volumineux, sa charge n'est pas localisée ce qui minimise les possibles interactions électroniques. Les points de fusion de différents liquides ioniques [Rmim] [X] sont représentés dans le tableau.I. 2 ci-dessous [46].

R	X	Point de fusion/°C
Me	Cl	125
Et	Cl	87
<i>n</i> -Bu	Cl	65
Et	NO ₃	38
Et	CF ₃ SO ₃	-9
Et	BF ₄	6
Et	(CF ₃ SO ₃) ₂ N	-3
Et	CF ₃ CO ₂	-14
<i>n</i> -Bu	CF ₃ SO ₃	16

Tableau.II.2. Les points de fusion de différents liquides ioniques [Rmim] [X]

La viscosité des liquides ioniques provient de leur tendance à former des liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals [47] Ainsi, les chloroaluminates d'imidazolium possèdent des viscosités importantes dues aux liaisons hydrogènes formées entre les atomes d'hydrogène du cation imidazolium avec l'ion chlorure.

La viscosité des liquides ioniques semble être également reliée au choix de l'anion [48].

Ainsi pour un même cation la viscosité diminue selon l'ordre décroissant suivant : Cl⁻ > PF₆⁻ > BF₄⁻ > NTf₂⁻, le cation correspondant est le butylméthylimidazolium [bmim]⁺ (Tableau .I.3).

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Anions	Densité (g.cm ³)	Viscosité à 20°C (cp)
PF ₆ ⁻	1,37 (30°C)	330
BF ₄ ⁻	1,24 (30°C)	330
TfO ⁻	1,29 (20°C)	90
NTf ₂ ⁻	1,43 (20°C)	52
Eau	0,99 (20°C)	1

Tableau.II.3. Densité et viscosité de [bmim]⁺

VI.3 Polarité

Les liquides ioniques sont des sels organiques à caractère très polaire. De nombreuses études sur la polarité des liquides ioniques ont été effectuées [49]. A titre d'exemple, le [bmim] [PF₆] possède une polarité voisine du 1-butanol [50], et celle du [bmim] [BF₄] est proche du méthanol [51].

Leurs propriétés de solvations sont à relier à la propension qu'ont ces sels à agir en tant que donneur et accepteur de liaison hydrogène [52]. En faisant varier la longueur des chaînes des groupements alkyles, on peut augmenter la lipophilie de ces liquides ioniques [53]

Et ainsi moduler les propriétés de ces composés.

VI.4 Solubilité

La variation de la solubilité des liquides ioniques vis-à-vis des solvants est un facteur très important en synthèse monophasique ou biphasique. Dans un système catalytique multiphasique, la maîtrise de ce paramètre se révèle primordiale pour l'application des liquides ioniques en tant qu'équivalent synthétique de la chimie combinatoire.

Olivier-Bourbigou et coll. [54] ont étudié l'influence de la longueur de chaîne du cation et de la nature de l'anion pour la solubilité de l'hexène dans divers liquides ioniques.

Il apparaît alors que pour un même anion, l'allongement de la chaîne alkyle de l'imidazolium augmente la solubilité dans l'hexène. Pour un même cation, la solubilité dans l'hexène augmente selon l'ordre suivant : NTf₂⁻>CF₃CO₂⁻>TfO⁻>PF₆⁻>BF₄⁻.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'hydrophobicité et l'hydrophilie des liquides ioniques. [55] Les anions qui présentent la plus grande hydrophobicité [56]

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Sont les anions PF_6^- et NTf_2^- . La figure.I.6 [57] résume les propriétés hydrophobes et hydrophiles des anions et cations les plus utilisés.

Il y a en revanche peu d'études faites sur l'hydrophobicité des cations. Selon un brevet de Vestergaard *et coll* [58], les cations aromatiques de types imidazolium et pyridinium se sont révélés être des composés de choix en tant qu'électrolytes hydrophobes non aqueux. Très récemment, la société Merck [59] a commencé à commercialiser des liquides ioniques hydrophobes. Ces sels sont composés de cations soit d'imidazolium soit de pyrrolidinium avec comme contre anion $[\text{PF}_6^-]$, $[\text{NTf}_2^-]$ ou $[(\text{C}_2\text{F}_5)_3\text{PF}_3]$. Sanjay *et coll* [60] ont synthétisés un nouveau liquide ionique qui a fourni une solubilité et une sélectivité élevées dans la benzoylation du nucleosides.

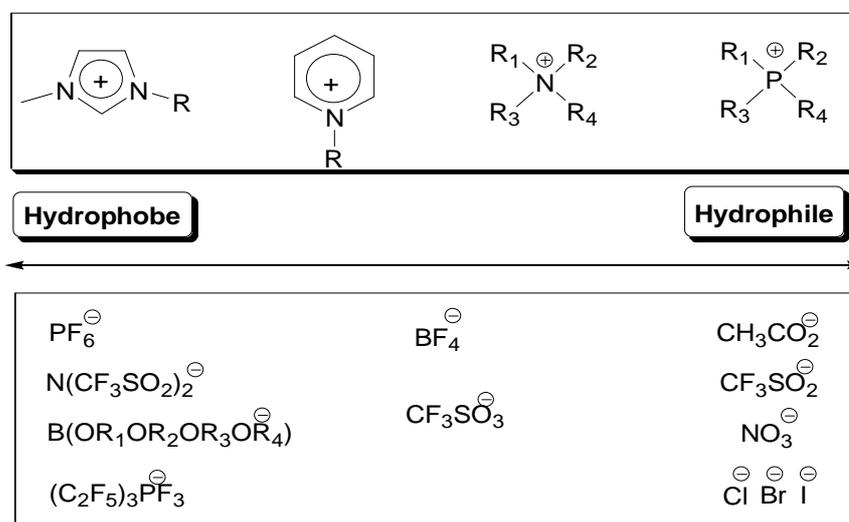


Figure.II.6. Hydrophobicité des cations et des anions

VI.5 Toxicité des liquides ioniques

Long temps les liquides ioniques ont été décrits comme solvants alternatifs respectueux de l'environnement par rapport aux solvants classiques. Un grand nombre de chimistes les classaient même dans la catégorie des solvants de la « chimie verte ». Certes, ces composés possèdent des tensions de vapeur négligeables, ils ne s'évaporent donc pas dans l'atmosphère, mais certains de ces sels sont solubles dans l'eau. Or d'après le concept de la « chimie verte » aucune substance toxique ne doit subsister dans l'environnement. Le terme de « solvant vert » est donc à proscrire.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

A ce jour peu d'études relatent la toxicité de ces produits. Ce n'est qu'au début des années 2000, soit 10 ans après l'apparition des premiers liquides ioniques de deuxième génération, que des chimistes et des biologistes ont commencé à s'intéresser à la toxicité de ces sels organiques.

Ainsi en 2001, Pernak *et coll* [61]. Ont publié une étude toxicologique de divers sels de pyridinium ayant une forte activité antimicrobactérienne. Les auteurs ont montré que le changement d'anion a une réelle incidence sur la toxicité. Ces liquides ioniques possèdent en revanche une très faible toxicité vis-à-vis de l'homme et des mammifères.

Maginn *et coll* [62] ont décrit un modèle de relation-structure-propriété (QSPR = Quantitative Structure Property Relationship) permettant d'évaluer la toxicité de divers liquides ioniques vis-à-vis de la bactérie *Vibrio fischeri* et de la daphnie *Daphnia magna*.

Dans cette étude, il a été montré que l'anion a peu d'incidence sur la toxicité. En revanche cette dernière semble être dictée par le choix du cation et de la longueur des chaînes. Ainsi la toxicité des cations augmente dans l'ordre suivant pour une chaîne analogue : Imidazolium > Pyridinium > Ammonium. Ces liquides ioniques ont une toxicité supérieure au méthanol et à l'acétonitrile. D'autres études du modèle (QSPR) d'un nouveau cation guanidinium ont été faites [63].

Même si ces études peuvent paraître alarmistes, il faut néanmoins rester critique face à ces résultats. En effet contrairement aux solvants classiques, les liquides ioniques ont une faible tension de vapeur et ne peuvent s'évaporer. Avec de simples précautions, tel que le port de gants, le risque d'intoxication reste donc faible.

De plus, le nombre de données concernant la toxicologie des liquides ioniques et les études QSPR ne cessent d'augmenter. Il reste de nombreuses études à effectuer sur la transformation et la métabolisation de ces sels organiques, ceci afin d'obtenir dans un avenir proche un liquide ionique respectant les principes de la « chimie verte ».

VII. Applications en synthèse organique

Depuis quelques années, les liquides ioniques ont beaucoup été utilisés dans la chimie organique dite classique (réaction nucléophile, électrophile...) et la chimie catalysée par les métaux de transition. Les liquides ioniques possèdent, comme nous l'avons vu précédemment, d'intéressantes propriétés qui peuvent être un réel avantage dans le domaine de la catalyse.

En effet, ces sels peuvent dissoudre aisément les réactifs et les catalyseurs, permettant ainsi d'effectuer les réactions en milieu homogène. Les propriétés des liquides ioniques permettent dans certains cas de séparer aisément par décantation les produits de la réaction et le catalyseur soluble dans ces sels organiques. Cela permet de recycler le catalyseur et d'éviter toute purification fastidieuse. Si les produits sont miscibles avec le milieu ionique, alors il est possible, soit de faire une distillation de ces produits, soit de faire une extraction avec un solvant non miscible avec le liquide ionique.

VII.1 Les réactions nucléophiles

Les liquides ioniques sont des milieux très polaires qui permettent de stabiliser les espèces ioniques présentes dans le milieu. L'utilisation de ces sels paraît donc convenir parfaitement aux réactions faisant intervenir des intermédiaires cationiques ou anioniques. Seddon *et coll* [64] ont décrit en 1998, l'alkylation régiosélective d'indole et de 2-naphtol dans le [bmim] [PF₆]. Les produits obtenus avec une très bonne régiosélectivité et d'excellents rendements sont séparés du milieu ionique par extraction à l'éther diéthylique.

Zheng *et coll* [65] ont publié la synthèse d' α -aroyloxyacétone 17 par réaction de substitution nucléophile du carboxylate de potassium 16 sur l' α -tosyloxyacétone 15 (figure.II.7).

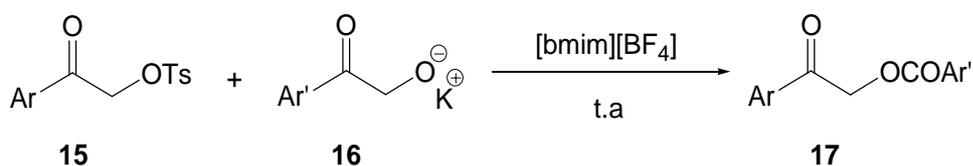


Figure.II.7. la réaction de substitution nucléophile du carboxylate de potassium 16 sur l' α -tosyloxyacétone 15

VII.2 Les réactions de condensation

Santos *et coll* [66] ont montré en 2001 que la réaction de Baylis-Hillman dans le [bmim] [PF₆] se révèle être 33 fois plus rapide que dans l'acétonitrile. Puis en 2004 d'autres auteurs [67] ont décrit cette même synthèse dans l'hexafluorophosphate de butyl diméthyl imidazolium

Chapitre II : Les Liquides ioniques

[bdmim] [PF₆] au lieu du [bmim] [PF₆]. En milieu basique, le [bdmim] [PF₆] réagit avec l'aldéhyde **18** et conduit à un produit secondaire, comme l'avait précédemment décrit Agrawal [68] en 2002. L'utilisation du [bdmim] [PF₆] augmente considérablement le rendement de la réaction vis-à-vis de l'acétonitrile et il peut être recyclé plusieurs fois (figure.I.8).

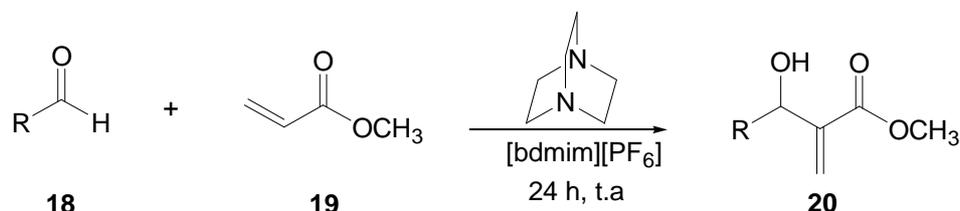


Figure.II.8. la réaction de condensation

Récemment, Morrison [69] a décrit la réaction de Knoevenagel dans l'hexafluorophosphate d'hexylméthyl imidazolium [hmim] [PF₆]. La réaction d'un aldéhyde aromatique **21** avec le dimalonitrile **22** conduit, avec la glycine comme catalyseur, au benzylidène **23** avec de bons rendements (figure.I. 9).

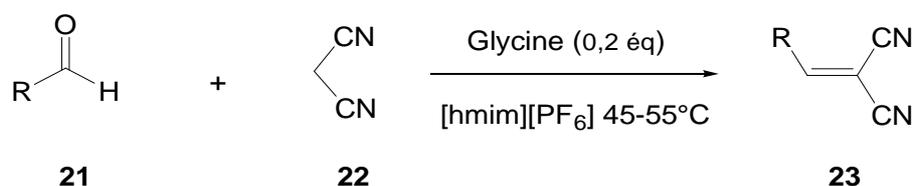


Figure.II.9. la réaction de condensation comme la glycine catalyseur

VII.3 Les réactions électrophiles

Les réactions d'alkylation [70], de sulfonation et d'acylation [71] ont été beaucoup étudiées dans les liquides ioniques. Les anions utilisés sont généralement des chloroaluminates (AlCl₄⁻, Al₂Cl₇⁻ etc...) qui sont obtenus par addition d'AlCl₃ dans le milieu.

Ainsi, Yang et coll. [72] ont décrit l'acylation de l'indole **24** en position 3 par un chlorure d'acide **25** dans le chlorure d'éthylméthylimidazolium [emim] [Cl] en présence d'AlCl₃ (figure.I.10). Les réactions s'effectuent avec de bons rendements pour les cycles in doliques pauvres en électron. Cette synthèse permet d'obtenir une grande variété de cycles in doliques acylés en position 3 et ceci avec divers groupements fonctionnels.

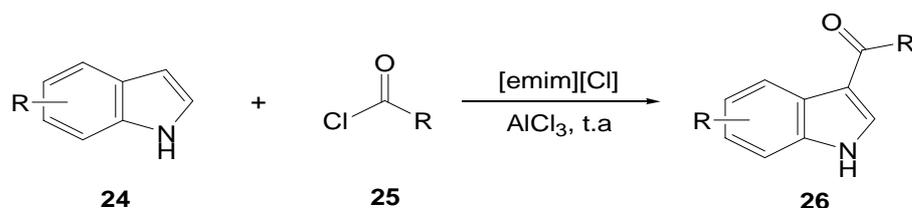


Figure.II.10. la réaction électrophiles

VII.4 Les réactions catalysées par les métaux de transition

Le recyclage du catalyseur et du ligand sont, bien souvent, dans les réactions utilisant les métaux de transition, un facteur difficile à maîtriser mais primordial, car ces espèces sont généralement coûteuses.

Il apparaît donc intéressant de trouver une méthode qui permette d'isoler le catalyseur des produits de réaction. Les liquides ioniques permettent de répondre à cette exigence. En effet, ils peuvent se comporter comme des ligands et ainsi chélate l'espèce métallique. Le système liquide ionique–catalyseur peut alors être recyclé.

Ainsi, Wang et coll. [73] ont récemment rapporté une étude du couplage de Suzuki dans le [bmim] [PF₆] (figure.I.11). Cette réaction s'effectue sans utilisation de phosphine en présence de Pd(OAc)₂. Les sous-produits de la réaction de Suzuki sont éliminés par lavage à l'eau. Les sels d'imidazolium [74] sont connus pour former des espèces carboniques pouvant se lier au métal. Les auteurs affirment que plusieurs cycles catalytiques peuvent être effectués sans perte d'activité.

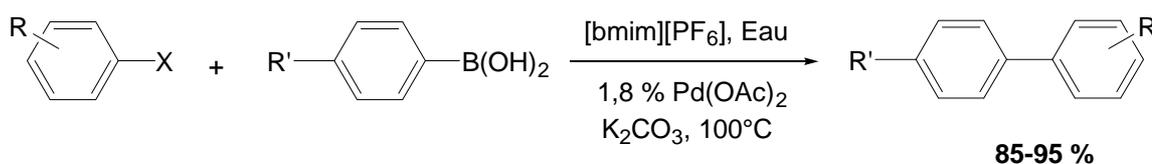


Figure.II.11. Le rapporté une étude du couplage de Suzuki dans le [bmim] [PF₆]

D'autres études des couplages de Suzuki et Heck ont été réalisées dans les liquides ioniques en l'absence de ligand [75]. De nombreuses synthèses, utilisant divers métaux de transition telle que le fer [76] et le ruthénium [77], ont été étudiées en milieu diphasique dont une des phases contient un liquide ionique. Grâce à ce dernier, le catalyseur peut être recyclé, ce qui permet d'effectuer plusieurs cycles catalytiques sans perte d'activité. La réactivité des liquides ioniques en tant qu'acide ou base de Bronsted, réactifs, catalyseurs, ... etc. [78]

I.7.5. Applications en synthèse enzymatique

L'utilisation des liquides ioniques en synthèse enzymatique est très récente. Le premier exemple a été publié en 2000 par Erbeldinger et coll. [79].

Cet auteur décrit l'utilisation de [bmim] [PF₆] comme alternative à l'acétoacétate dans la synthèse du dipeptide Z-aspartame avec des thermolysines. Les rendements sont similaires, mais la stabilité de l'enzyme semble supérieure en milieu liquide ionique. Seddon et coll [80]. ont publié l'utilisation de [bmim] [PF₆] et [bmim][BF₄] comme milieu réactionnel dans diverses réactions catalysées par une lipase (*Candida Antartica*). Le rendement des réactions de transestérification se révèlent être légèrement supérieur dans les liquides ioniques vis-à-vis du t-BuOH. L'emploi d'un tel type de solvant polaire est donc compatible avec un système enzymatique. De nos jours, de nombreuses synthèses enzymatiques ont été décrites dans les liquides ioniques. [81].

Chapitre II : Les Liquides ioniques

Références

- [1] Olivier-Bourbigou, H.; Magna, L. *J. Mol. Cat. A : Chemical* **2002**, *182*, 419-137.
Seddon, K.R. *J. Chem. Biotechnol.* **1997**, *68*, 351.
- [2] <http://www.solvent-innovation.com>
- [3] http://www.come2merck.com/servlet/PB/show/142150/IL-Brosch%FCre_Merck_08.2005pdf
- [4] http://www2.basf.de/en/intermed/nbd/products/ionic_liquids/
- [5] Walden, P. *Bull. Acad. Imper. Sci.* **1914**, 1800; cité dans S. Sugden, S.; Wilkins, H. *J. Chem. Soc.* **1929**, 1291
- [6] Hurley, F.H.; US2446331, **1948**
- [7] Hussey, C.L. *Adv. Molten Salt Chem.* **1983**, *5*, 185. b) Wilkes, J.S.; Levinsky, J.A.; Wilson, R.A.; Hussey, C.L. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 1263.
- [8] Chum, H.L.; Kock, V.R.; Miller, L.L.; Osteryoung, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3264. b) Robinson, J.; Osteryoung, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 323.
- [9] Boon, J.A.; Levinsky, J.A.; Pflug, J.L.; Wilkes, J.S. *J. Org. Chem.* **1986**, *88*, 2614
- [10] Kalaivani Subramaniam a, AmitDas a,†, DagmarSteinhauser b, Manfred Klüppel b, Gert Heinrich ,*European Polymer Journal* *47* (2011) 2234–2243
- [11] Bond, D.R. ; Jackson, G.E.; Joao, H.C.; Hofmeyr, M.N.; Modro, T.A.; Nassimbeni, L.R. *Chem. Commun.* **1989**, 1910. b) Hill, M.G.; Lamanna, W.M.; Mann, K.R. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4690. c) Sun, J.; Forsyth, M.; Mac Farlane, D.R. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8858.
- [12] Miyatake, K.; Yamamoto, K.; Endo, K.; Tsuchida, E. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7522
- [13] King, J.A. General Electric Company, US Patent 5705696, **1998**
- [14] Hurley, F.H.; Weir, T.P. *J. Electrochem. Soc.* **1951**, *98*, 203. b) Gale, R.J.; Osteryoung, R.A. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2240. c) Tait, S.; Osteryoung, R.A. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4352.
- [15] Wilkes, J.S.; Levisky, J.A.; Wilson, R.A.; Hussey, C.L. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 1263. b) Fannin Jr, A.A.; King, L.A.; Levisky, J.A.; Wilkes, J.S. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 2609. c) Fannin Jr, A.A.; Floreani, D.A.; King, L.A.; Landers, J.S.; Piersma, B.J.; Stech, D.J.; Vaughn, R.L.; Wilkes, J.S.; John, L.W. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 2614. d)

Chapitre II : Les Liquides ioniques

- Bonhôte, P.; Dias, A.P.; Papageorgiou, K.; Kalyanasundaram, K.; Gratzel, M. *Inorg. Chem.* **1996**, *103*, 4164.
- [16] Mac Farlane, D.R.; Meakin, P.; Amini, N.; Forsyth, M. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4164
- [17] Davis Jr, J.H.; Forrester, K.J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1621
- [18] Vestergaard, B.B.; Petrushina, N.J.I.; Hjuler, H.A.; Berg, R.W.; Begtrup, M. *J. Electrochem. Soc.* **1993**, *140*, 3108
- [19] Koch, V.; Nanjundiah, C. Covalent Associates Inc. US9611097
- [20] Mamantov, G.J.C.; Dunstan, T.D.J. Electrochemical Systems, Inc. US5552241, **1996**
- [21] Chen, Y.; Chu, Y.H. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1575
- [22] Dzyuba, S.G.; Bartsch, R.A. *Chem. Commun.* **2001**, 1466
- [23] Kimizuka, N.; Nakashima, T.; *Langmuir* **2001**, *17*, 6759. b) Davis Jr, J.H.; Forrester, K.J.; Merrigan, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8955.
- [24] Bates, E. D.; Mayton, R.D.; Ntai, I.; Davis Jr, J.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 926.
- [25] Visser, A.E.; Swatloski, R.P.; Reichert, W.M.; Davis Jr., J.H.; Rogers, R.D. ; Mayton, R.; Sheff, S.; Wierzbicki, A. *Chem. Commun.* **2001**, 135.
- [26] Merrigan, T.L.; Bates, E.D.; Dorman, S.C.; Davis Jr., J.H. *Chem. Commun.* **2000**, 2051.
- [27] Varma, R.S.; Namboodiri, V.V. *Chem. Commun.* **2001**, 643. b) Lall, S.I.; Mancheno, D.; Castro, S.; Behaj, V.; Cohen, J.I.; Engel, R. *Chem. Commun.* **2000**, 2413. c) Visser, A.E.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D.; *Chem. Commun.* **2001**, 2484.
- [28] Lancaster, N.L.; Llopis-Mestre, V. *Chem. Commun.* **2003**, 2812
- [29] Koch, V.R.; Miller, L.L.; Osteryoung, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5277.
- [30] Valkenberg, M.H.; Castro, C.; Hölderich, W.F. *Applied Cat.A : General* **2001**, *215*, 185.
- [31] Nara, S.J.; Harjani, J.R.; Salunkhe, M.M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8616.
- [32] Mac Farlane, D.R.; Golding, J.; Forsyth, S.; Forsyth, M.; Deacon, G.B. *Chem. Commun.* **2001**, 1430.
- [33] Matsumoto, H.; Kageyama, H.; Miyazaki, Y.; *Chem. Lett.* **2001**, 182

Chapitre II : Les Liquides ioniques

- [34] Larsen, A.S.; Holbrey, J.D.; Tham, F.S.; Reed, C.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7264
- [35] Xu, W.; Wang, L.M.; Nieman, R.A.; Angell, A. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11749
- [36] Wei, G.T.; Yang, Z.; Chen, C.J. *Anal Chim. Acta.* **2003**, *488*, 183
- [37] Fraga-Dubreuil, J.; Famelart, M.H.; Bazureau, J.P. *Org. Process. Res. Dev.* **2002**, *6*, 374
- [38] Namboodiri, V.V.; Varma, R.J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3161
- [39] Gao, Y.; Shreeve, M. *Synthesis* **2004**, *7*, 1072
- [40] Namboodiri, V.V.; Varma, R.S. *Tetrahedron. Lett.* **2002**, *43*, 5381
- [41] a) Fuller, J.; Carlin, R.T.; De Long, H.C.; Haworth, D. *Chem. Commun* **1994**, 299. b) Cammarata, L.; Kazarian, S.G.; Salter, P.A.; Welton, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 5192.
- [42] Huddleston, J.G.; Willaueur, H.D.; Swatloski, R.P.; Visser, A.E.; Rogers, R. *Chem. Commun.* **1998**, 1765
- [43] Kemperman, G.J.; Roeters, T.A.; Hilberink, P.W. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1681. b) Crofts, D.; Dyson, P.J.; Sanderson, K.M.; Srinivasan, N.; Welton, T. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *573*, 292.
- [44] Bolkan, S.; Yoke, J.T. *J. Chem. Eng. Data.* **1988**, *31*, 194
- [45] Chiappe, C.; Pieraccini, D. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 275
- [46] Sheldon, R. *Chem. Commun.* **2001**, 2399
- [47] Bonhôte, P.; Dias, A.P.; Papageorgious, N.; Kalyanasundaram, K.; Gratzel, M. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1168
- [48] Gordon, C.M. *Applied Catalysis A : General* **2001**, *222*, 101
- [49] Aki, S.N.V.K.; Brennecke, J.F.; Samanta, A. *Chem. Commun.* **2001**, 413
- [50] Carmichael, A.J.; Seddon, K.R. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 591
- [51] Van den Broeke, J.; Stam, M.; Lutz, M.; Kooijman, H.; Spek, A.L.; Deelman, B.J.; Van Koten, G.V. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 2798
- [52] Crowhurst, L.; Mawdsley, P.R.; Perez-Arlandis, J.M.; Salter, P.A.; Welton, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 2790
- [53] Hagiwara, R.; Ito, Y. *J. Fluorine Chem.* **2000**, *105*, 221
- [54] Favre, F.; Olivier-Bourbigou, H.; Commereuc, D.; Saussisse, L. *Chem. Commun.* **2001**, 1360.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

- [55] Huddleston, J.G.; Visser, A.E.; Reichert, W.M.; Willauer, H.D.; Broker, G.A.; Rogers, R.D. *Green Chem.* **2001**, *3*, 156. b) Branco, L.C.; Rosa, J.N.; Ramos, J.J.M.; Afonso, C.A.M. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3671. c) Swatloski, R.P.; Visser, A.E.; Reichert, W.M.; Broker, G.A.; Farina, L.M.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. *Chem. Commun.* **2001**, 2070.
- [56] Rivera-Rubero, S.; Baldelli, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11788. b) Chaumont, A.; Schurhammer, R.; Wipff, G. *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 18964.
- [57] Seddon, R.; Stark, A.; Torres, M.J. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 2275
- [58] Erbedinger, M.; Mesiano, A.J.; Russel, A.J. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 1129
- [59] <http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1302610/index.html>
- [60] Vineet Kumar; Virinder, S.; Parmar; Sanjay, V. Malhotra. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *5*, 809
- [61] Pernak, J.; Kalewska, J.; Ksycińska, H.; Cybulski, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 899
- [62] Couling, D.J.; Bernot, R.J.; Docherty, K.M.; Dixon, J.K.; Maginn, E.J. *Green Chem.* **2006**, *8*, 82
- [63] Gonçalo, V.S.M.; Carrera; Luis, C.; Branco; Joao Aires-de-Sousa; Carlos, A.M. Alfonso. *Tetrahedron.* **2008**, *64*, 2216
- [64] Seddon, K.R.; McCormac, P.B.; Earle, M.J. *Chem. Commun.* **1998**, 2245
- [65] Zheng, Q.G.; Chen, Z.C.; Liu, Z. *Synthesis* **2004**, *1*, 33
- [66] Santos, A.G.; Rosa, J.N.; Afonso, A.M. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4189
- [67] Hsu, J.C.; Yen, Y.H.; Chu, Y.H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4673
- [68] Aggarwal, V.K.; Emme, I.; Mereu, A. *Chem. Commun.* **2002**, 1612
- [69] Forbes, D.C.; Law, A.M.; Morrison, D.W. *Tetrahedron* **2006**, *47*, 1699
- [70] Cheng, L.B.; Wang, G.R.; Li, Z.S.; Qiao, W.H.; Zhao, Z.K. *J. Mol. Catal. A.* **2004**, *222*, 207. b) Xiao, Y.; Malhotra, S.V. *J. Mol. Catal. A.* **2005**, *230*, 129.
- [71] Yang, Z.; Qiu, Z.; Farkas, M.E.; Yeung, K.S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5793
- [72]
- [73] Xin, B.; Zhang, Y.; Liu, L.; Wang, Y. *Synlett* **2005**, *20*, 3083
- [74] Hermann, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1290. b) Altava, B.; Burguete, M.I.; García-Verdugo, E.; Karbass, N.; Luis, S.V.; Puzary, A.; Sans, V. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2311.
- [75] Zou, G.; Wang, Z.; Zhu, J.; Tang, J.; He, M.Y. *J. Mol. Catal. A* **2003**, *206*, 193
- [76] Ligabue, R.A.; Dupont, J.; De Souza, R.F. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2001**, *169*, 11.

Chapitre II : Les Liquides ioniques

- [77] Geldbach, T.J.; Laurency, G.; Scopelliti, R.; Dyson, P.J. *Organometallics* **2006**, *25*, 733
- [78] Shahana Chowdhry ; Ram, S. Mohan ; Janet, L. Scott. *Tetrahedron*. **2007**, *63*, 2363
- [79] Erbedinger, M.; Mesiano, A.J.; Russel, A.J. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 1129
- [80] Madeira, R.; Van Rantwijk, F; Seddon, K.R.; Sheldon, R.A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4189
- [81] Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 565

Chapitre III

Partie expérimentale

❖ Appareillage

Au cours de ce travail, l'appareillage suivant a été utilisé :

1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

1.1. Principe de la méthode:

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Tous les noyaux atomiques possèdent une charge en rotation, décrite par son terme de spin nucléaire. Certains noyaux ne sont pas observables en RMN car ils n'ont pas de propriétés magnétiques. Lorsqu'on soumet une molécule à un champ magnétique externe, ce champ agit non seulement sur les spins nucléaires, mais en même temps il induit dans un plan perpendiculaire à sa direction, une circulation des électrons autour du noyau. D'où l'existence d'un champ magnétique interne. Ce dernier peut s'ajouter au champ extérieur: c'est le phénomène de déblindage ou s'opposer au champ extérieur: c'est le phénomène de blindage ou d'écran. Plus le blindage est intense, plus le noyau doit être soumis à un champ extérieur fort pour que se produise la résonance. Ceci se traduit par un déplacement des pics de résonance vers la droite du spectre. L'inverse dans le cas du déblindage. L'intensité du blindage ou du déblindage dépend donc de l'environnement du noyau. Si les protons ont le même environnement chimique ils résonnent à la même valeur du champ : ils sont dits équivalents. Et il y a résonance si la fréquence appliquée correspond à la fréquence propre du noyau. Le signal (énergie absorbée en fonction de la fréquence) se traduit sous forme d'un pic. Certains noyaux ne sont pas observables en RMN car ils n'ont pas de propriétés magnétiques.

Cette méthode nous renseigne sur le squelette de la molécule en atome de carbone C et en atome d'hydrogène H, c à d obtenir les vraies structures des produits de réaction.

Nous avons utilisé la RMN ^1H et la RMN ^{13}C pour la caractérisation de nos échantillons.

Les spectres RMN ^1H , ^{13}C ont été enregistrés à 300 MHz, à l'aide d'un appareil à transformée de Fourier BRUKER ARX 300 (Université d'ORAN). Le solvant utilisé pour l'enregistrement des spectres de RMN ^1H et ^{13}C est indiqué pour chaque spectre. Toutes les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en partie par million (ppm) pour la RMN du proton H^1 et du carbone C^{13} . Les constantes de couplages sont exprimées en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes ont été adoptées quant à la multiplicité des signaux : **s** singulet, **sl** singulet large, **d** doublet, **t** triplet, **q** quadruplet, **m** multiplet.

1.2 Spectrométrie de masse à Impact électronique (EI) :

Principe de la méthode

Son principe réside dans le bombardement des molécules par impact électronique obtenant un ion moléculaire M^+ qui sera fragmenter par la suite donnant la naissance des fragments fils en mode positif avec des valeurs m/z différents. Le spectre de masse moléculaire contient un ensemble de pics de fragments qui nous renseigne sur la structure moléculaire et un pic important « pic parent » qui nous précise la masse moléculaire de l'échantillon analysé.

La Spectrométrie de masse Haute Résolution à double focalisation est réalisée avec un VARIAN MAT 311 (géométrie **BE** de NIER-JOHNSON inversée) du Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest. L'énergie du faisceau électronique est de 70 eV, l'intensité du courant d'émission de 300 μA et la tension d'accélération de 3 kV. Les composés sont généralement introduits à l'aide d'une canne d'introduction directe, la température du creuset est indiquée dans chaque cas. La précision obtenue sur la mesure de la masse précise des ions est de 5 chiffres significatifs.

- **Source LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) :**

Le Spectromètre de Masse Haute Résolution MS/MS ZAB Spec TOF Micro mass, du Centre Régional de Mesures Physiques de (l'Ouest université de Rennes 1), possède une géométrie **EBE TOF** (secteurs magnétiques et électriques avec Temps de Vol orthogonal).

- **Précision de la matrice et du mode positif ou négatif :**

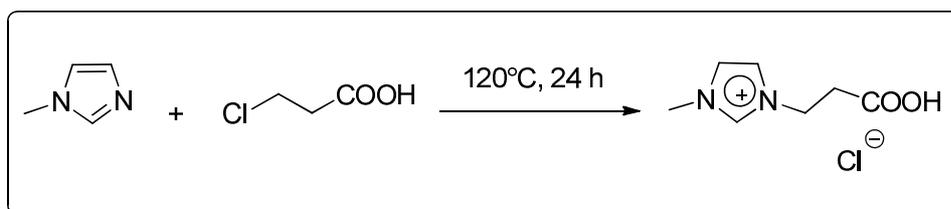
Les spectres de masse haute et basse résolution ont été réalisés en ionisation LSIMS (Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires en phase Liquide) en mode positif à l'aide d'un canon césium Cs^+ . L'alcool méthanitrobenzylique (mNBA) a été employé comme matrice, les ions sont accélérés avec une tension de 8 kV et la température de la source est de 40°C.

❖ Synthèse de la phase liquide ionique :

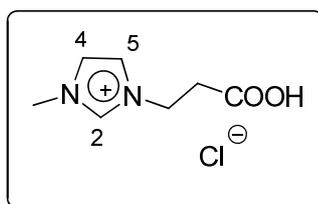
1. Synthèse de chlorure de 3-(2-carboxyethyl)-1-méthylimidazol-3-ium

La synthèse du liquide ionique a été réalisée en respectant le protocole suivant :

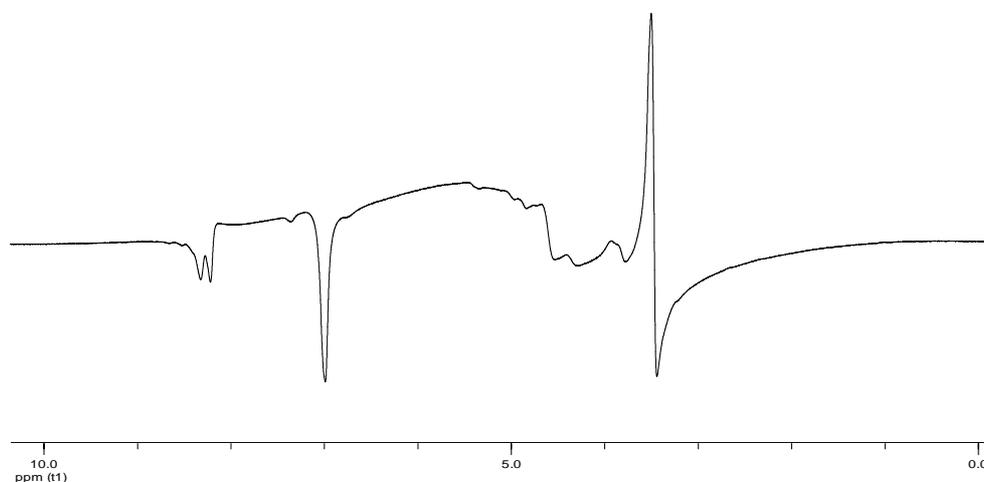
• Réaction de quaternisation d'amine :



Un mélange équimolaire de 3-chloropropanoïque acide (10 mmol, 1,08 g) et de 1-méthylimidazole (10 mmol, 0,97ml) est porté à 120°C pendant 24 h sous vive agitation magnétique. Une fois la réaction terminée, le brut réactionnel est lavé avec de l'éther diéthylique (3 x 25 ml), puis séché à pression réduite pour éliminer toute trace de solvant.



La caractérisation par **RMN ¹H (300 MHz, DMSO)** n'a pas donnée la structure du produit déséré.



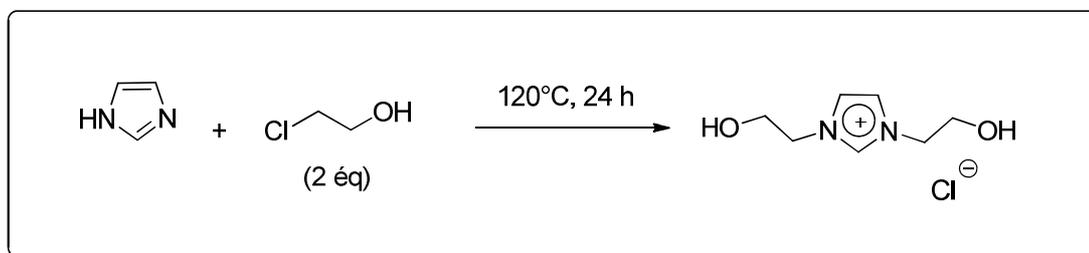
Spectre: RMN ¹H de chlorure de 3-(2-carboxyethyl)-1-méthylimidazol-3-ium

Chapitre III : Partie expérimentale

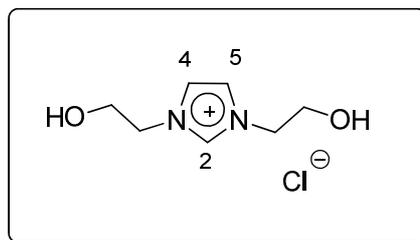
Nous nous sommes orientés vers une synthèse d'un autre liquide ionique.

2. Synthèse de chlorure de 1,3-bis (2-hydroxyethyl) imidazol-3-ium

- Réaction de quaternisation d'amine :



Un mélange de 2-chloroéthanol (50,4 mmol, 3,4 ml) et de l'imidazole (25,2 mmol, 2 ml) est porté à 120° pendant 24 heures sous vive agitation magnétique. Après refroidissement à l'ambiante, le produit obtenu (cristallin à température ambiante) est finement broyé, lavé avec de l'éther diéthylique (3 x 80 ml) puis filtré sur verre fritté de porosité N°4. Le produit est finalement séché sous pression réduite pendant 10 heures afin d'éliminer les traces de solvant.



Chlorure de 1,3-bis (2-hydroxyethyl) imidazol-3-ium

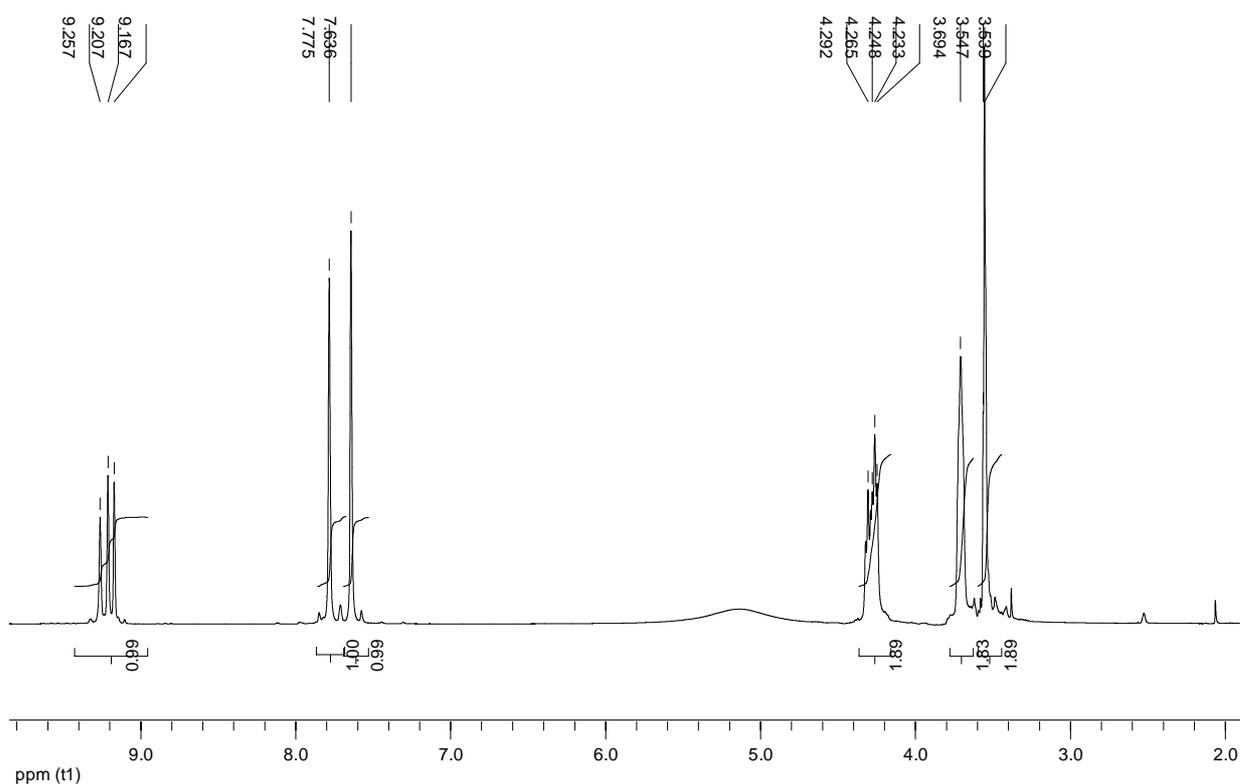
La caractérisation par RMN ¹H (300 MHz, DMSO) et RMN ¹³C (300 MHz, DMSO) n'a pas donné la structure du produit désiré.

Le pic qui est à 9.20 ppm est triplet, et on doit avoir un singulet pour le proton H2 de l'imidazolium.

La même chose la RMN ¹³C puisque le nombre de 'C' dans la molécule est 07 carbone, qui ne colle pas avec le spectre.

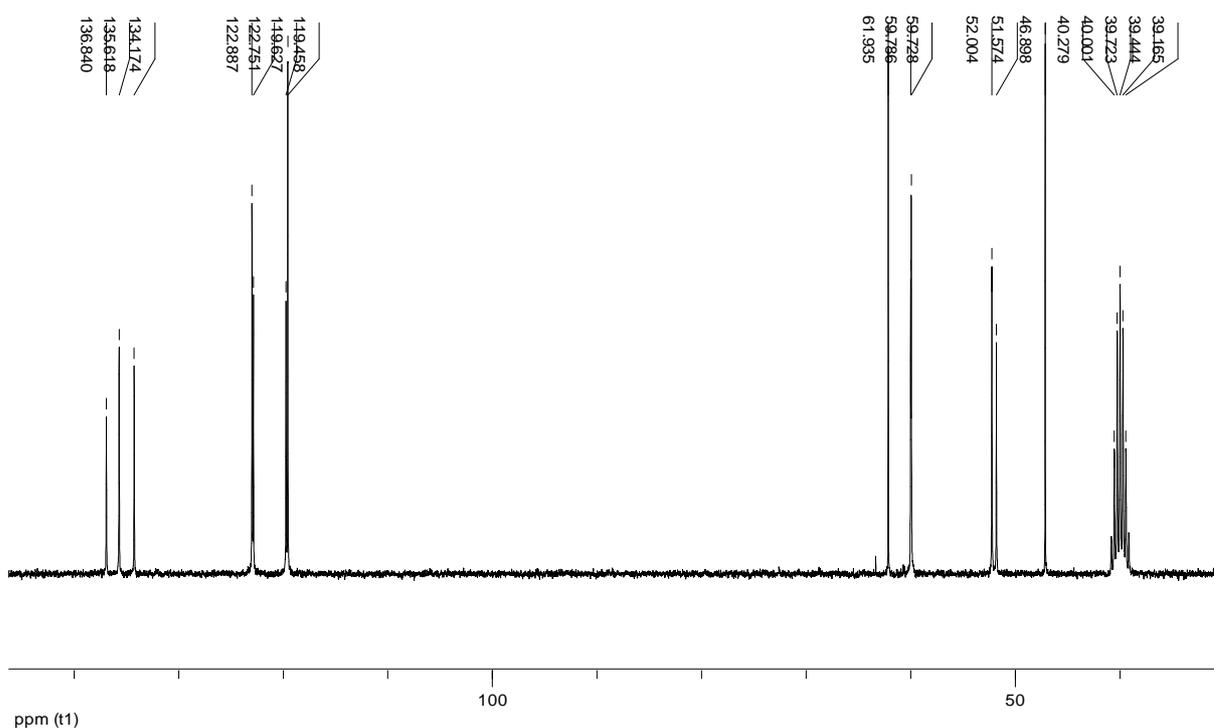
Chapitre III : Partie expérimentale

di OH



Spectre: RMN ^1H de chlorure de 1,3-bis(2-hydroxyethyl)imidazol-3-ium

di OH

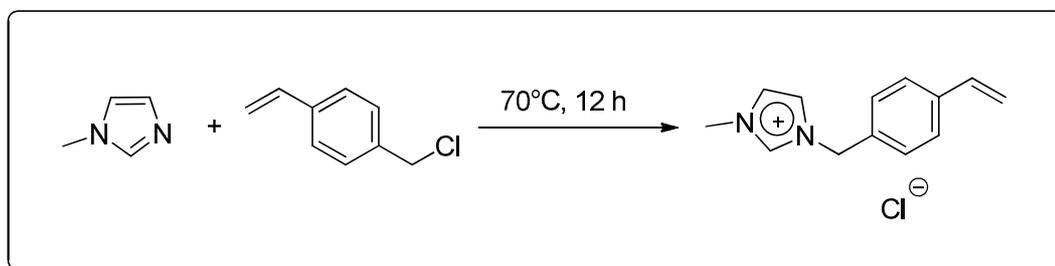


Spectre: RMN ^{13}C de chlorure de 1,3-bis(2-hydroxyethyl)imidazol-3-ium

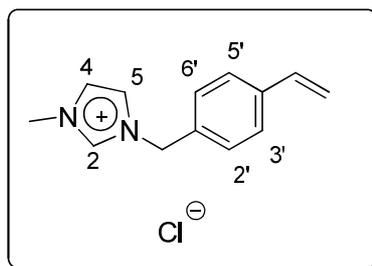
Une autre synthèse d'un liquide ionique a été réalisée par la suite.

3. Synthèse de chlorure de 1-méthyl-3-(4-vinylbenzyl)imidazol-3-ium

- Réaction de quaternisation d'amine :



Un mélange équimolaire de chlorométhylstyrène (10 mmol, 1,42 ml) et de 1-méthylimidazole (10 mmol, 0,97 ml) est porté à 70°C pendant 12 h sous vive agitation magnétique. Une fois la réaction terminée, le brut réactionnel est lavé avec de l'éther diéthylique (3 x 25 ml), puis séché à pression réduite pour éliminer toute trace de solvant.



Chlorure de 1-méthyl-3-(4-vinylbenzyl) imidazol-3-ium

Pour chaque molécule on doit présenter les protons ou carbones, multiplicité des signaux, les valeurs de déplacement chimique (ppm).

Rdt (%): 98

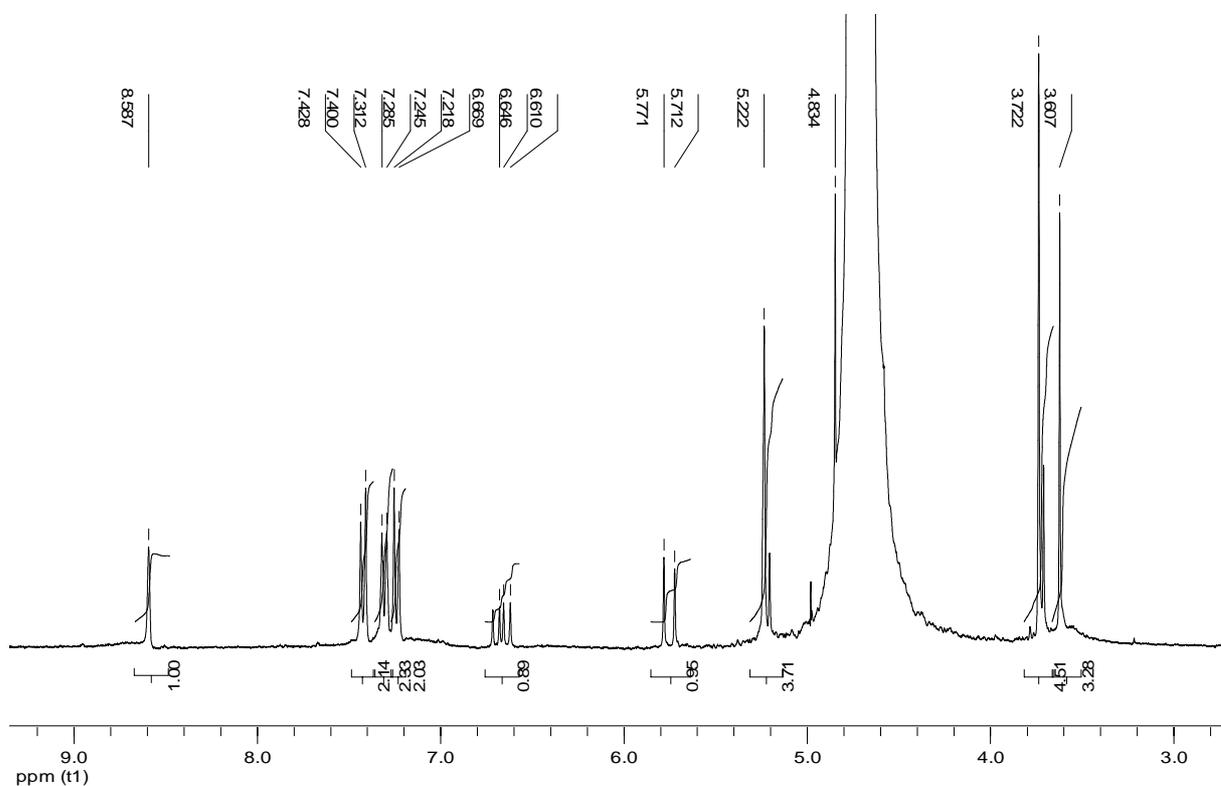
Aspect physique : Solide beige

T_f (°C): 175

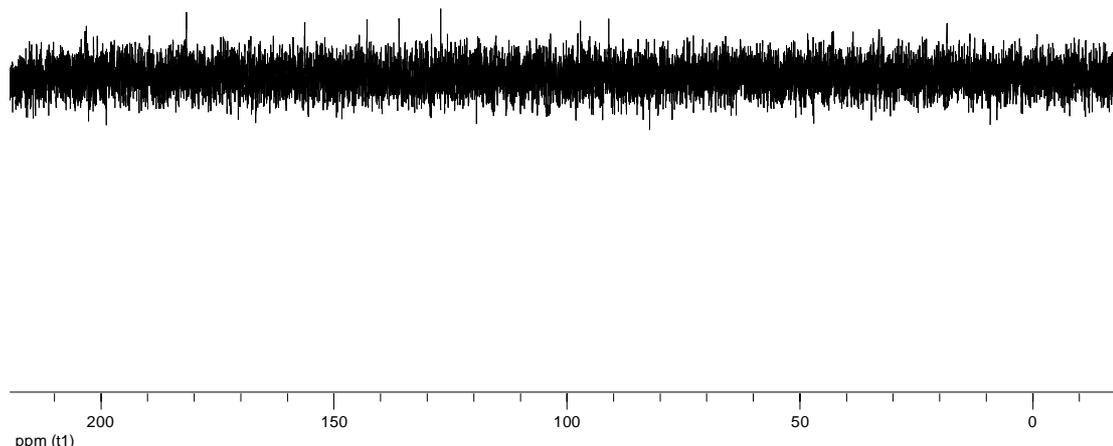
RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ = 8.58 (s, 1H, H-2); 7.42 (s, 1H, H-4 ou H-5); 7.40 (s, 1H, H-4 ou H-5); 7.31; 7.28; 7.24; 7.21 (s, 1H, H-2', H-3', H-5', H-6'); 6.61 (t, 1H, CH=CH₂); 5.77 (d, 1H, CH=CH₂); 5.22 (d, 1H, CH=CH₂); 5.22 (s, 2H, NCH₂); 3.72 (s, 3H, NCH₃).

Chapitre III : Partie expérimentale

Type de proton	Multiplicité des signaux (m)	Déplacement chimique (ppm) (δ)
(1H, H-2)	Singulet	8.58
(1H, H-4 ou H-5)	Singulet	7.42
(1H, H-4 ou H-5)	Singulet	7.40
(1H, H-2', H-3', H-5', H-6')	Singulet	7.31; 7.28; 7.24; 7.21
(1H, CH=CH ₂)	Triplet	6.61
(1H, CH=CH ₂)	Doublet	5.77
(1H, CH=CH ₂)	Doublet	5.22
(2H, NCH ₂)	Singulet	5.22
(3H, NCH ₃)	Singulet	3.72



Spectre : RMN ¹H de chlorure de 1-méthyl-3-(4-vinylbenzyl)imidazol-3-ium



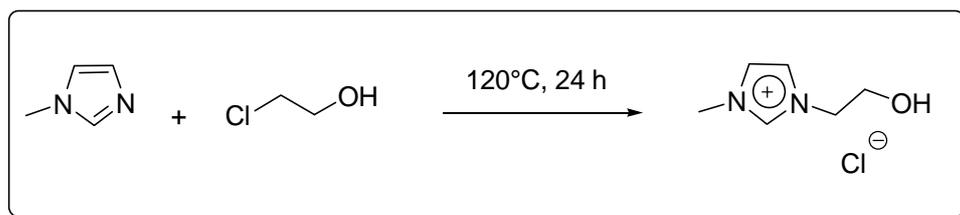
Spectre: RMN ^{13}C de chlorure de 1-méthyl-3-(4-vinylbenzyl) imidazol-3-ium

Le spectre **RMN ^{13}C** ne donne pas les pics du produit, celui-là est expliqué par la petite quantité qui a été utilisée pour la caractérisation de l'échantillon

Compte tenu de la difficulté de bien purifier le produit, nous avons réalisé une autre synthèse d'un liquide ionique.

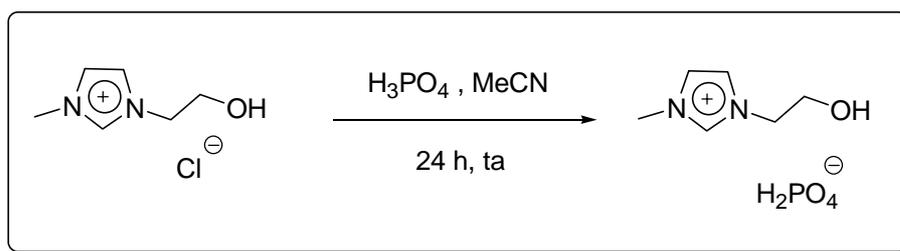
4. Synthèse de chlorure de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium

a) Réaction de quaternisation d'amine :

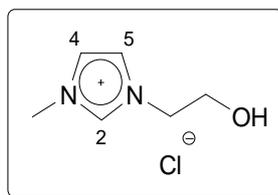


Un mélange équimolaire de 2-chloroéthanol (0.0252 mol, 1,7 ml) et de 1-méthylimidazole (0.0252 mol, 2 ml) est porté à 120°C (milieu homogène liquide) pendant 24 heures sous vive agitation magnétique. Après refroidissement à l'ambiante, le produit obtenu (cristallin à température ambiante) est finement broyé, lavé avec de l'éther diéthylique (3 x 80 ml) puis filtré sur verre fritté de porosité N°4. Le produit est finalement séché sous pression réduite pendant 10 heures afin d'éliminer les traces de solvant.

b) Réaction de métathèse anionique :



Un mélange de chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)-3-méthylimidazolium (5 g, 0.0252 mol) et de l'acide ortho_ phosphorique (08 ml, 0.062 mol) dans 20 ml d'acétonitrile est agité pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de l'air. Le brut est concentré à l'évaporateur rotatif sous pression réduite, puis le résidu d'évaporation est séché sous pression réduite pendant 3 heures à 25°C puis stocké sous atmosphère inerte.



Chlorure de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium

Rdt (%) : 98

Aspect physique : Solide beige

Tf (°C) : 57-59

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : δ = 9.14 (s, 1H, H-2); 7.73 (s, 1H, H-4 ou H-5); 7.70 (s, 1H, H-4 ou H-5); 5.28 (t, 1H, J = 5 Hz, OH); 4.21 (t, 2H, J = 5 Hz, NCH₂); 3.86 (s, 3H, NCH₃); 3.72 (q, 2H, J = 5 Hz, CH₂OH).

Chapitre III : Partie expérimentale

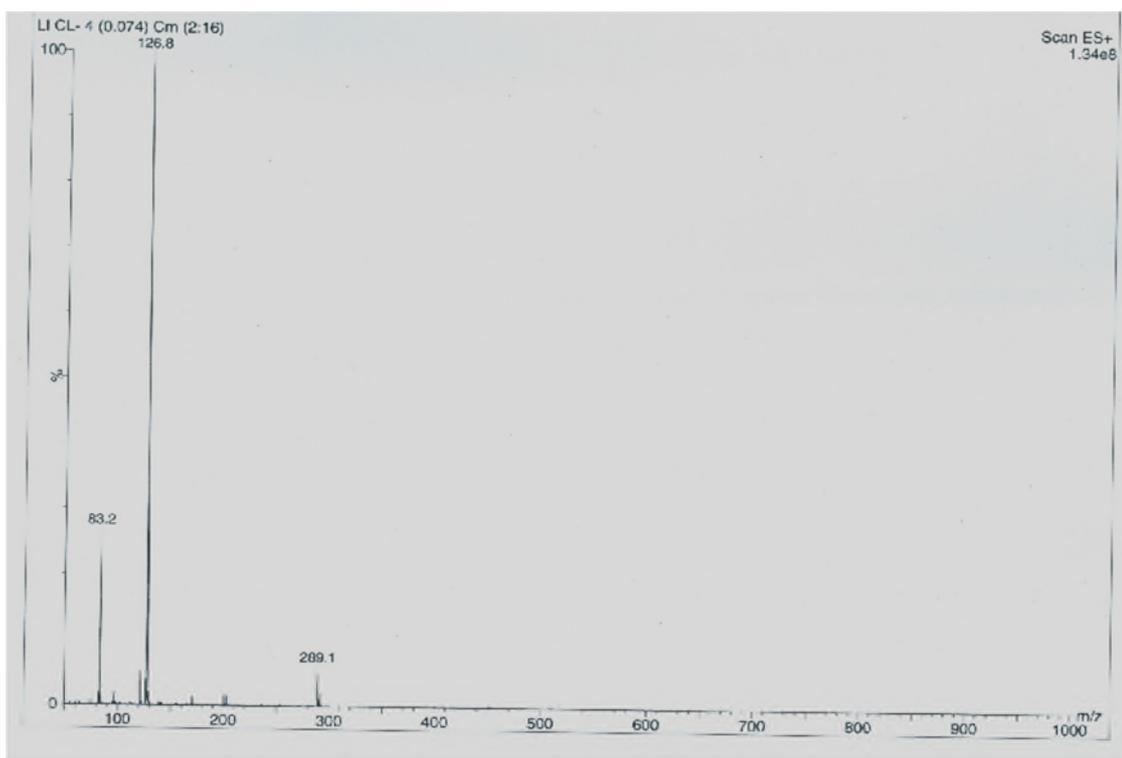
Type de proton	Multiplicité des signaux (m)	Déplacement chimique (ppm) (δ)
(1H, H-2)	Singulet	9.14
(1H, H-4 ou H-5)	Singulet	7.73
(1H, H-4 ou H-5)	Singulet	7.70
(1H, J = 5 Hz, OH)	Triplet	5.28
(2H, J = 5 Hz, NCH ₂)	Triplet	4.21
(3H, NCH ₃)	Singulet	3.86
(2H, J = 5 Hz, CH ₂ OH)	Quadruplet	3.72

RMN ¹³C (300 MHz, DMSO) : δ = 137.0 (C-2); 123.3 (C-4); 122.7 (C-5); 59.3 (NCH₂); 51.5 (CH₂O); 35.7 (NCH₃).

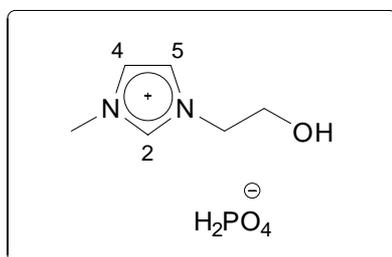
Types de carbone	Déplacement chimique (ppm) (δ)
(C-2)	137.0
(C-4)	123.3
(C-5)	122.7
(NCH ₂)	59.3
(CH ₂ O)	51.5
(NCH ₃)	35.7

Chapitre III : Partie expérimentale

SMHR, m/z: 126.8 trouvé (calculé pour $C_6H_{11}N_2O$, C^+ , 127.0871).



Spectre de spectrométrie de masse de chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)-3-méthylimidazolium



Dihydrogénophosphate de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium

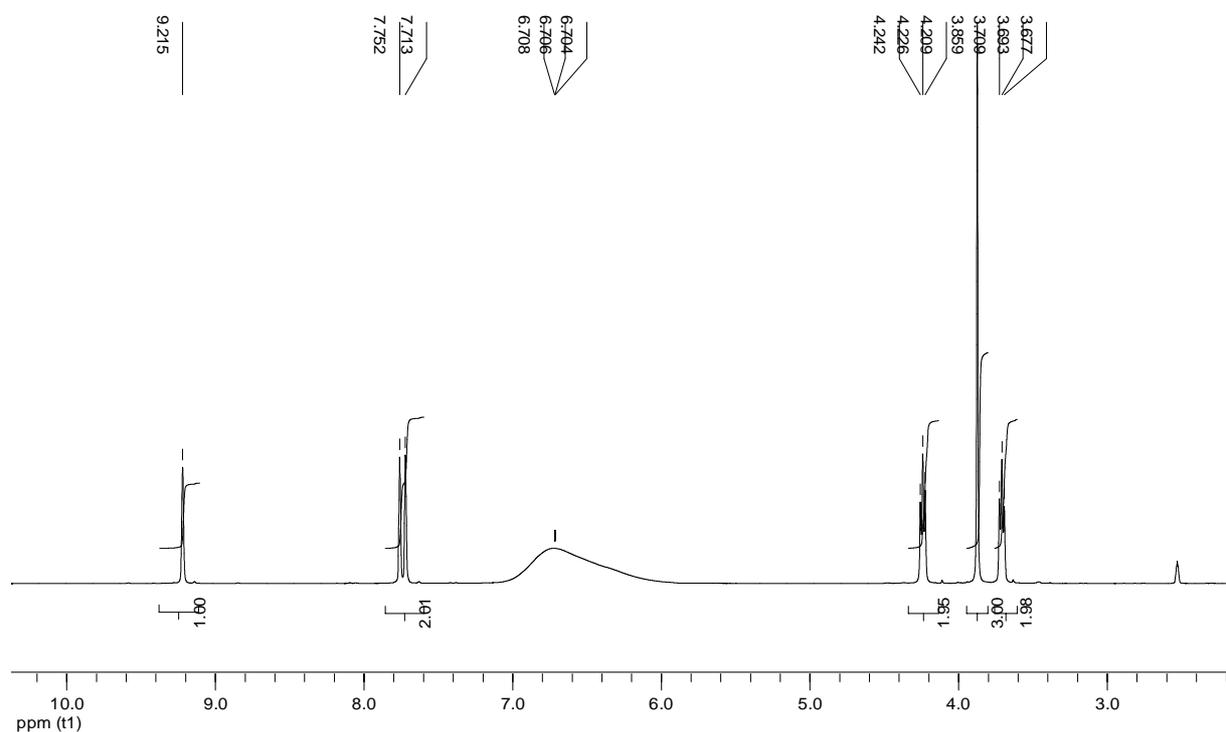
Rdt (%): 98.

Aspect physique : Liquide jaune.

RMN 1H (300 MHz, DMSO) : δ = 9.21 (s, 1H, H-2); 7.75 (s, 1H, H-4 ou H-5); 7.71 (s, 1H, H-4 ou H-5); 6.70 (sl, 1H, OH); 4.22 (t, 2H, NCH_2); 3.85 (s, 3H, NCH_3); 3.69 (q, 2H, CH_2OH).

Chapitre III : Partie expérimentale

Type de proton	Multiplicité des signaux (m)	Déplacement chimique (ppm) (δ)
(1H, H-2)	singulet	9.21
(1H, H-4 ou H-5)	singulet	7.75
(1H, H-4 ou H-5)	singulet	7.71
(1H, OH)	singulet large	6.70
(2H, NCH ₂)	triplet	4.22
(3H, NCH ₃)	singulet	3.85
(2H, CH ₂ OH)	quadruplet	3.69

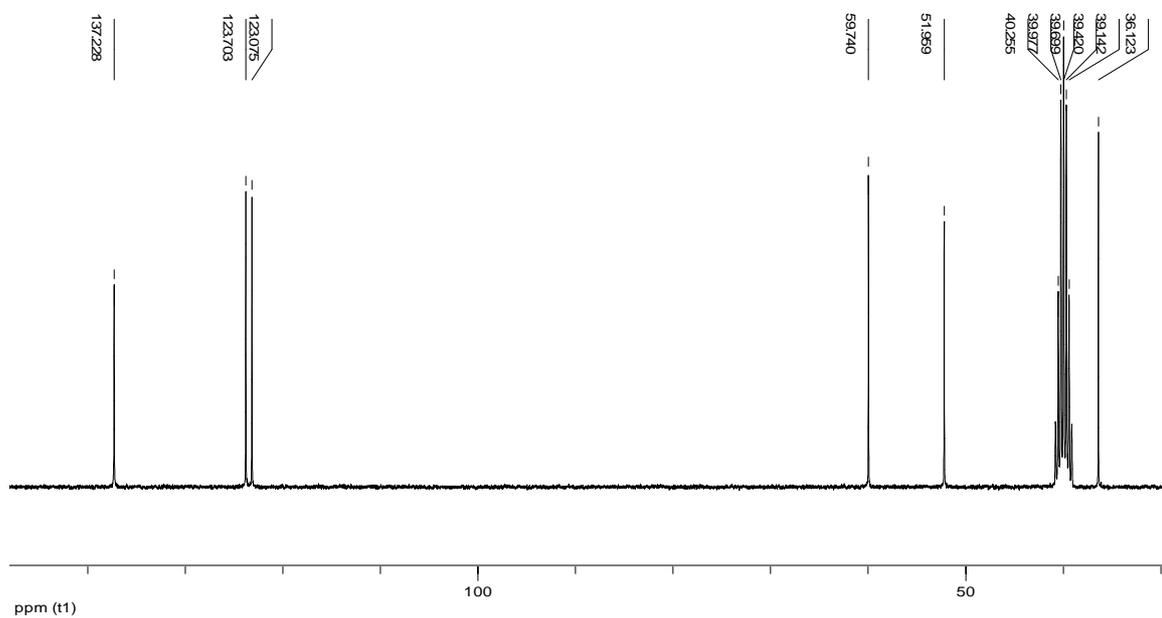


Spectre: RMN ¹H de Dihydrogénophosphate de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium

Chapitre III : Partie expérimentale

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO) : δ = 137.2 (C-2); 123.7 (C-4); 123.0 (C-5); 59.7 (NCH₂); 51.9 (CH₂O); 35.9 (NCH₃).

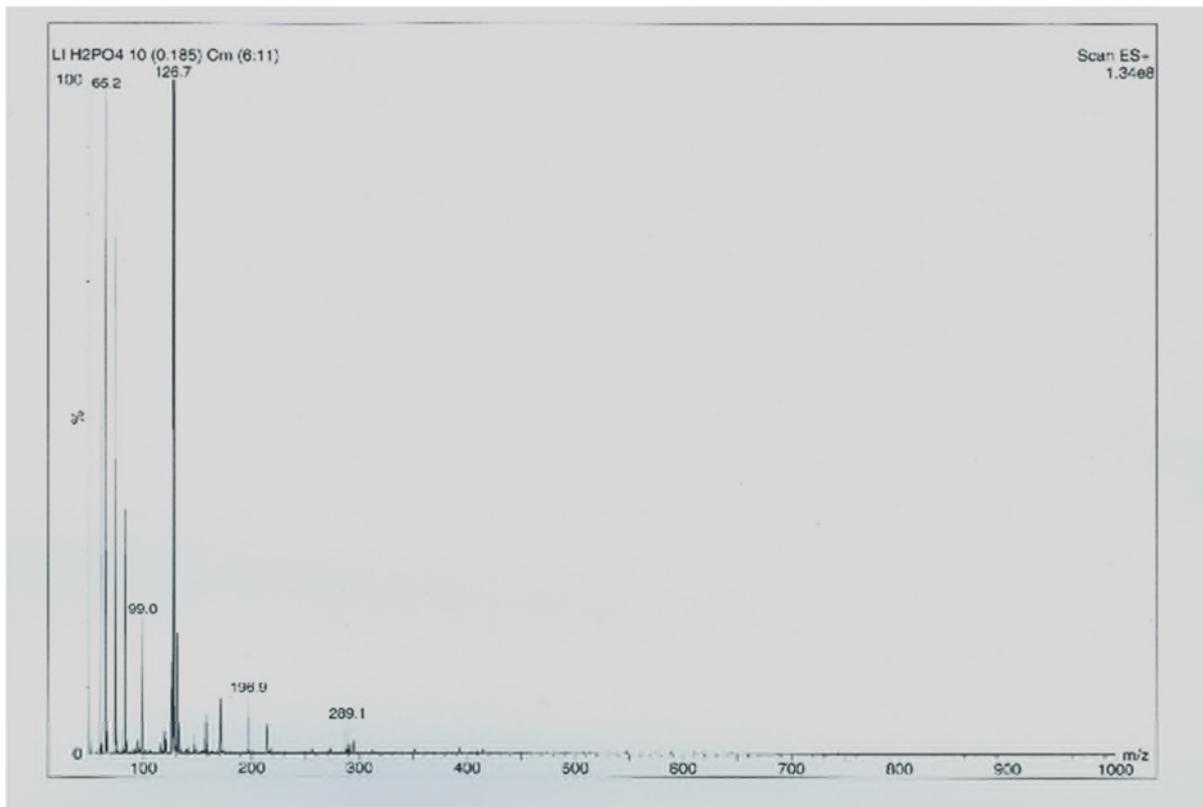
Type de carbone	Déplacement chimique (ppm) (δ)
(C-2)	137.2
(C-4)	123.7
(C-5)	123.0
(NCH ₂)	59.7
(CH ₂ O)	51.9
(NCH ₃)	35.9



Spectre: RMN ^{13}C de Dihydrogénophosphate de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium

Chapitre III : Partie expérimentale

SMHR, m/z : 126.7 trouvé (calculé pour $C_6H_{11}N_2O$, C^+ , 127.0871).



Spectre de spectrométrie de masse de Dihydrogénophosphate de 3-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazol-3-ium

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce travail de recherche nous avons réalisé une grande partie de la recherche bibliographique concernant l'objectif de ce travail. Nous avons également synthétisé des liquides ioniques à base d'imidazolium qui ont été caractérisés par la suite avec des techniques de caractérisations telles que la RMN¹H, RMN¹³C et la spectrométrie de masse. Ces techniques nous ont permis de vérifier la structure des liquides ioniques synthésés et ainsi leurs puretés

En effet, la structure des liquides ioniques choisis et leurs puretés sont indispensables pour les introduire comme biocapteurs.

Pour cela, des études ont montrés que l'association des liquides ioniques à des enzymes pourra améliorer les propriétés d'un biocapteur (perspective).

ملخص :

تطبيق الانزيمات المرتبطة بالسوائل الأيونية يمكن أن يحسن أداء جهاز الاستشعار البيولوجي.

السوائل الأيونية الناتجة عن التفاعل ستشخص بشكل فردي.

تقنيات التشخيص RMN^1H , $RMN^{13}C$ وقياس الطيف الكتلي ستستخدم لتشخيص المنتجات.

الكلمات المفتاحية : السوائل الأيونية - الجلوكوز أوكسيديز - جهاز الاستشعار البيولوجي.

Résumé :

L'application des enzymes associées aux liquides ioniques pourra améliorer les performances d'un biocapteur.

Les liquides ioniques synthétisés seront caractérisés individuellement.

Les techniques de caractérisation la RMN^1H , $RMN^{13}C$ et la spectrométrie de masse seront utilisées pour la caractérisation des produits.

Mots clé : Liquide ionique-glucose oxydase-biocapteur.

Abstract :

The application of enzymes associated with ionic liquids can improve the performance of a biosensor.

The synthesized ionic liquids will be characterized individually.

characterization techniques the RMN^1H , $RMN^{13}C$ and mass spectrometry to be used for the characterization of the products.

Keywords: ionic liquid - glucose oxidase - biosensor.

Mazouz el-hadj - Berkane Zineb

Master II : Chimie physique des matériaux (CPM).

Département de chimie- Faculté des Sciences de la Matière -Université Ibn Khaldoun – TIARET