

L'électrochimie analytique au service de l'environnement

Microcapteurs électrochimiques pour le suivi *in situ* des contaminants

Nicole Jaffrezic-Renault

Résumé Cet article présente les microcapteurs électrochimiques permettant le suivi *in situ* des contaminants dans les eaux : métaux lourds, ammonium, carbone organique total, pesticides organophosphorés. Ces microcapteurs sont fabriqués par les technologies de fabrication collective issues de la microélectronique. Leurs sélectivités sont données par la formulation de membranes sensibles incluant des molécules de reconnaissance synthétiques ou d'origine biologique (enzymes). Comme ils permettent la mesure sur site, ils donnent une image en temps réel de l'état des contaminants (biodisponibilité de certains métaux lourds, toxicité du milieu aquatique).

Mots-clés **Microcapteurs ampérométriques, microcapteurs à transistor, microcapteurs conductimétriques, microcapteurs enzymatiques, inhibition enzymatique.**

Abstract **Analytical electrochemistry for environment: electrochemical microsensors for the *in situ* monitoring of pollutants**

This paper presents electrochemical microsensors allowing *in situ* monitoring of pollutants in water: heavy metals, ammonium, total organic carbon and organophosphorus pesticides. These microsensors are fabricated through microelectronics batch technologies. Their selectivity is obtained through the formulation of sensitive membrane including synthetic or biological molecules (enzymes). These microsensors allowing *in situ* measurements give an image in real time of the nature of the pollutants (biodisponibility of some heavy metals, toxicity of the aquatic medium).

Keywords **Amperometric microsensors, transistor microsensors, conductimetric microsensors, enzymatic microsensors, enzymatic inhibition.**

La détection d'une espèce chimique ou biochimique ainsi que l'évaluation de sa quantité – ou de sa concentration – peuvent être réalisées soit à l'aide d'instruments d'analyse tels que les chromatographes ou les divers spectromètres, soit à l'aide de capteurs. Le capteur chimique est, en principe, un dispositif simple généralement constitué d'une partie chimio-sélective (membrane sensible) permettant la reconnaissance chimique et d'un système transducteur transformant l'interaction chimique en signal électrique.

On peut dire des capteurs chimiques que l'on recherche pour eux de la compacité, des conceptions technologiques simples et si possible un faible coût. Leur petite taille et leur faible consommation d'énergie permettent leur utilisation sur site, même quand celui-ci est difficile d'accès. Ils sont associés à des temps de réponse aussi brefs que possible, qui les rendent aptes à une utilisation en temps réel (surveillance, régulation).

Ces dernières années, le domaine des capteurs a connu un effet de jouvence tout à fait remarquable. Celui-ci est le résultat de trois facteurs principaux qui ont à la fois vivement animé la recherche dans ce secteur et fortement incité le développement de capteurs de type nouveau. Le premier de ces facteurs est le besoin très vif en capteurs fiables qu'entraîne la croissante sévérité des normes dans tous les

domaines touchant à la chimie et à la biochimie (environnement, alimentation, pharmacie, sécurité domestique et industrielle, monitoring médical...). Le second est lié à la généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés. Enfin, le troisième est l'intrusion récente et en force des méthodes de microfabrication de l'électronique dans la technologie de réalisation des capteurs. Ce dernier point est sans doute le plus notable car il donne accès au domaine des fabrications collectives avec les avantages qui lui sont liés de bas coût (les capteurs jetables deviennent envisageables), de gain en fiabilité et d'adaptation aux microsystèmes et aux microcircuits. Tout ceci a naturellement orienté la conception des capteurs vers la miniaturisation à l'échelle micro/millimétrique. La transduction électrochimique est, en général, réalisée sans faire appel à un marquage ; elle n'est pas sensible à la transparence des milieux de mesure et de plus, elle est liée à une instrumentation simple et facile à miniaturiser. L'ensemble de ces éléments explique le fort potentiel des microcapteurs électrochimiques pour l'analyse environnementale *in situ*.

Dans le cadre de cet article seront présentés les microcapteurs électrochimiques permettant le suivi *in situ* des contaminants dans les eaux : les métaux lourds, l'ammonium, le carbone organique total et les pesticides organophosphorés.

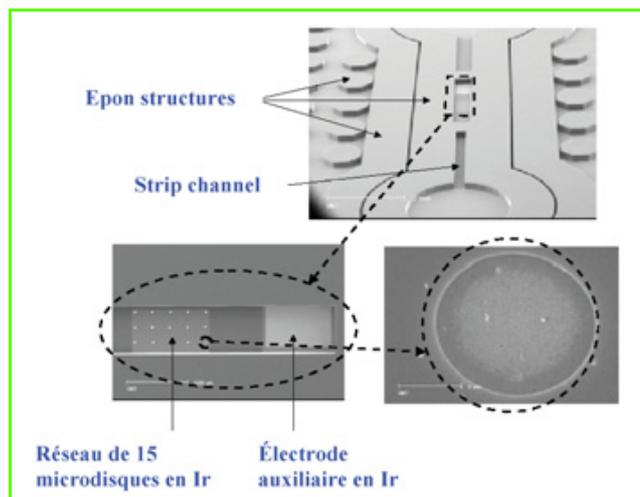


Figure 1 - Microcellule voltampérométrique avec microélectrodes Ir(Hg).

Microcapteurs ampérométriques pour la détection de métaux lourds

Dans les systèmes aquatiques, les métaux lourds sont distribués sous différentes formes physico-chimiques tels que les ions libres, les complexes inorganiques et organiques dissous, les complexes colloïdaux etc. Les capteurs voltampérométriques développés par l'Institut de Microtechnique de Neuchâtel et l'Université de Genève [1], réalisés suivant le schéma présenté sur la *figure 1*, sont constitués d'un réseau de microdisques Ir(Hg) recouvert d'un gel d'agarose antifouling. La microcellule voltampérométrique est réalisée sur un support Si/Si₃N₄ en technologie couche mince. Elle consiste en un réseau de 3 x 5 microdisques Ir (5 µm de diamètre) et une électrode auxiliaire en Ir (0,3 mm²). La méthode électrochimique de mesure est la redissolution anodique, les métaux étant au préalable accumulés à la surface de l'électrode par réduction. Un exemple d'accumulation de Pb(II), Cd(II) et Cu(II) est présenté sur la *figure 2*. Les microcapteurs sont sélectifs pour les fractions mobiles (ions libres et complexes labiles) et non à la concentration totale. Ces espèces libres sont importantes en termes de biodisponibilité. Des mesures *in situ* des fractions mobiles de Cu(II), Pb(II), Cd(II) et Zn(II) au niveau du ppb, ainsi que de Mn(II) et Fe(II) au niveau du ppm, ont été réalisées en intégrant ce réseau de microcapteurs dans une sonde submersible.

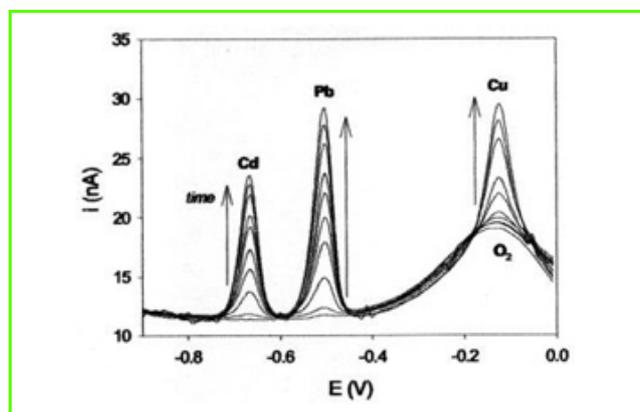


Figure 2 - Exemple de voltampérogramme avec effet d'accumulation.

Récemment, des électrodes à base de films de carbone adiamantin ont été développées. Il s'agit d'un film de carbone, majoritairement hybridé sp³, déposé par les techniques CVD (« chemical vapor deposition ») sur un support inerte tel que le silicium oxydé. La conduction à température ambiante est assurée par un dopage bore (« boron doped diamond », BDD). Ce type d'électrode présente plusieurs avantages : une large gamme d'électroactivité dans l'eau ainsi qu'un faible bruit de fond comparé à l'électrode de carbone vitreux (« glassy carbon », GC). Il a été montré que les limites de détection des métaux lourds sur ce type d'électrode sont comparables à celles obtenues avec le carbone vitreux recouvert de mercure et que la réversibilité est excellente [2-3]. Ce type de matériau évitera l'emploi du mercure qui n'est pas recommandé pour les mesures environnementales *in situ*.

Microcapteurs potentiométriques pour la détection de l'ion ammonium

L'ion ammonium qui provient de la pluie, de la neige (jusqu'à 2 mg/L), de l'industrie textile et des fertilisants chimiques constitue un polluant majeur. Sa présence stimule la croissance du plancton et est toxique pour les poissons. Les concentrations acceptables sont inférieures à 0,2 mg/L, soit 10⁻⁴ M. Des microcapteurs pour la détection de l'ion ammonium dans les eaux naturelles ont été conçus à partir des transducteurs ISFET (« ion sensitive field effect transistor »).

De part leur conception, les ISFET présentent des avantages décisifs pour la détection des ions par rapport aux capteurs chimiques classiques (électrodes spécifiques ISE, « ion selective electrode ») comme le montre le *tableau 1*. Leur principe a été proposé pour la première fois par P. Bergveld en 1970 [4].

Tableau 1 - Caractéristiques comparées de l'électrode spécifique (ISE) et de l'ISFET.

Caractéristiques	ISE	ISFET
Impédance de sortie	élevée > 10 ¹² Ω	faible 10 ⁴ Ω
Traitement du signal	extérieur	intégrable
Dimensions	grandes : env. 15 cm Ø-1,5 cm	très petites : 1,5 par 2,5 mm
Robustesse	fragile	robuste
Conception	liquide interne	tout solide
Coût	élevé	faible (microélectronique grandes séries)

Le procédé de fabrication des ISFET peut être divisé en deux parties. La première concerne la fabrication des composants dans la tranche de silicium (typiquement 50 à 75 mm de diamètre) par la technologie microélectronique. Les principales étapes de fabrication sont les suivantes : réalisation du caisson d'isolement, implantation des zones de source et de drain, formation de l'oxyde de grille, prises de contact drain, source, substrat. La seconde partie du procédé de fabrication concerne les étapes situées après que la tranche de silicium ait été découpée en composants individuels ; il s'agit du dépôt de la membrane sensible, du montage de l'ISFET sur le support, des connexions électriques, de l'encapsulation du capteur. Une mesure en mode différentiel

entre un ISFET de mesure et un ISFET de référence (REFET) permet de remplacer l'électrode de référence par une pseudo-électrode en or, mieux adaptée aux fabrications en couche mince, et de minimiser l'effet de paramètres externes, température, dérive, variation de pH... La *figure 3* montre la photographie d'une structure ISFET/REFET [5].

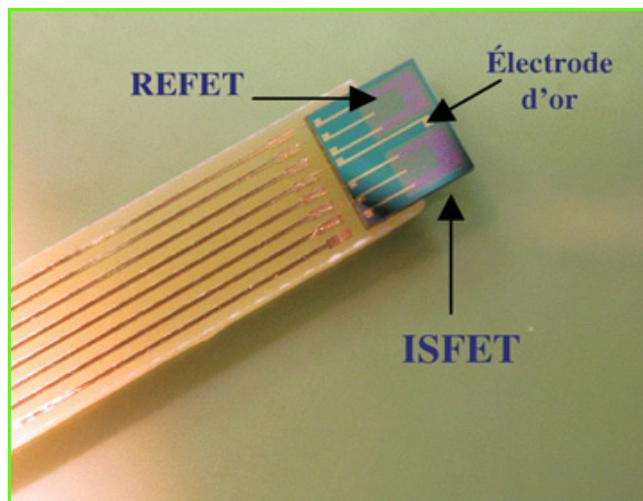


Figure 3 - Photographie d'une structure ISFET/REFET (document LAAS/CNRS).

Les membranes sensibles au pH sont des couches minces d'oxydes SiO_2 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 , ou de nitrures tels que Si_3N_4 . SiO_2 est la première membrane sensible au pH, mais elle a été abandonnée pour sa réponse sous-nernstienne et sa faible durée de vie. Les membranes des ISFET pH commercialisés (principalement Ta_2O_5) ont des réponses nernstiennes et des durées de vie supérieures à un an.

Pour la détection de l'ion ammonium, les ISFET pH ont été recouverts d'une membrane polymérique incluant l'ionophore nonactine. La gamme de sensibilité s'étend de 10^{-5} à 10^{-1} M. La sensibilité est de l'ordre de 50 mV/ pNH_4^+ [6-7].

Microcapteurs conductimétriques pour la détection de la matière organique dans les eaux

Les protéines constituent en fait 30 % de la matière organique dissoute dans les eaux naturelles, provenant de la pollution urbaine ; elles en sont donc un marqueur. Un biocapteur de protéines a été conçu en se basant sur l'hydrolyse enzymatique qui produit des acides aminés. Lors de cette hydrolyse, la conductivité du milieu est modifiée. Le biocapteur est ainsi constitué d'un transducteur conductimétrique (à base de microélectrodes interdigitées telles que présentées sur la *figure 4*) sur lequel est déposée une membrane enzymatique à base de protéinase K [8].

L'enzyme est immobilisée sous forme de film mince, par co-réticulation, sur la surface active du transducteur. Des mesures à haute fréquence (100 kHz) du signal en phase permettent de s'affranchir des effets de diffusion. Une mesure en mode différentiel permet de minimiser l'effet des paramètres externes. Une excellente corrélation linéaire est obtenue entre la concentration en carbone organique total (COT) et la réponse du biocapteur (*figure 5*).



Figure 4 - Détail de microélectrodes d'or interdigitées, permettant la mesure conductimétrique sur une membrane enzymatique.

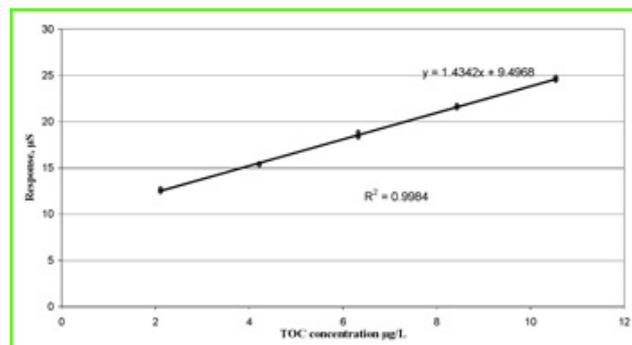


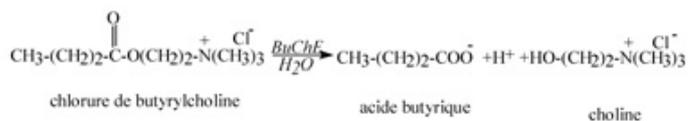
Figure 5 - Relation linéaire entre la réponse du biocapteur et la concentration en carbone organique total (COT) dans des échantillons d'eaux naturelles.

Microcapteurs conductimétriques pour la détection de composés organophosphorés [9]

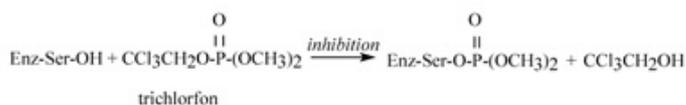
Les composés organophosphorés sont parmi les substances connues les plus toxiques. On les utilise en tant que pesticides, insecticides et agents chimiques de guerre. La forte toxicité des neurotoxiques organophosphorés et leur large utilisation dans l'agriculture moderne préoccupent fortement les pouvoirs publics. Ceux-ci ont incité au développement des technologies pour le traitement des effluents générés par les fabricants et les utilisateurs de ces composés. De plus le *Traité sur les Armes Chimiques* demande que les nations participantes détruisent dans les dix ans tout leur stock d'armes chimiques, incluant les gaz de combat à base de composés organophosphorés. L'utilisation de toute technologie de détoxification par les composés organophosphorés, mise au point en laboratoire, demandera la mise au point d'outils analytiques performants pour contrôler la concentration de ces neurotoxiques.

Les dispositifs biocapteurs sont sensibles et utiles en tant que capteurs jetables pour le contrôle environnemental. Ils sont basés sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (acétylcholinestérase, AcChE, ou butyrylcholinestérase, BuChE) par les composés organophosphorés.

L'enzyme acétylcholinestérase ou butyrylcholinestérase est fixée sur la surface d'un transducteur conductimétrique (co-réticulation ou piégeage). Les produits (espèces chargées) de la réaction enzymatique sont détectés par le transducteur conductimétrique.



Les composés organophosphorés inhibent en partie l'activité biologique de l'enzyme par phosphorylation du groupement sérine, suivant la réaction (cas du composé organophosphoré trichlorfon) :



On réalise l'incubation du biocapteur avec le milieu contenant l'inhibiteur, puis on obtient la réponse électrique du biocapteur en présence de son substrat (le chlorure de butyrylcholine). La figure 6 présente la variation de la réponse du capteur, donc de l'activité de l'enzyme, en fonction du temps d'incubation dans le milieu pollué ; les différentes courbes correspondent à différentes concentrations de diisopropyl fluorophosphate (DFP). La limite de détection du DFP est de 5×10^{-11} M [10].

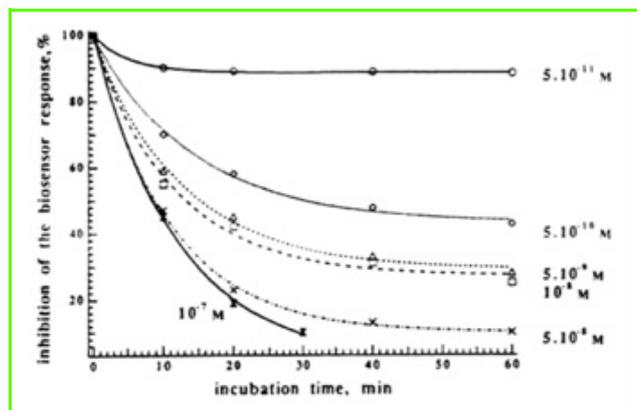
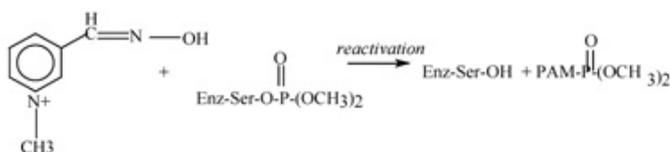


Figure 6 - Cinétique d'inhibition de la BuChE par le diisopropyl fluorophosphate (DFP).

L'inhibition des enzymes acétylcholinestérases est obtenue avec les composés organophosphorés mais aussi avec des pesticides de type carbamates ; ce ne sera pas un biocapteur spécifique mais plutôt un biocapteur de la toxicité globale du milieu.

Une réactivation de l'enzyme peut être réalisée par un traitement à la pyridine-2-aldoxime (PAM-2), suivant la réaction :



Des travaux récents ont porté sur l'estimation de la toxicité d'un effluent à partir de biocapteurs enzymatiques à base d'acétylcholinestérase, par comparaison avec les tests de toxicité Lumistox (bactérie luminescente *Vibrio fischeri*) [11]. L'effluent est constitué des produits de la dégradation photochimique du méthylparathion (composé 1) : le paraoxonméthyl (composé 2) et le 4-nitrophénol (composé 3). Les résultats montrent que le test Lumistox n'est sensible

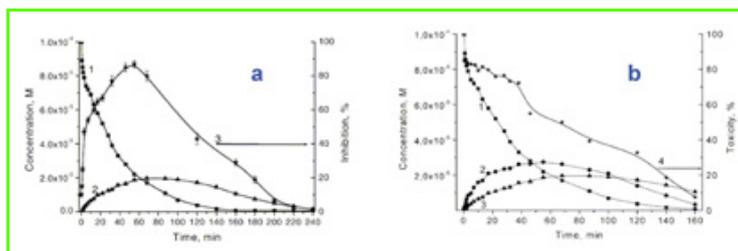


Figure 7 - Suivi de la toxicité des produits obtenus lors de la photodégradation du méthylparathion. (a) biocapteur enzymatique ; (b) test Lumistox.

qu'au parathionméthyl (figure 7b) alors que le biocapteur présente un fort effet d'inhibition avec un mélange équimolaire de méthylparathion et de paraoxonméthyl, produit de photodégradation (figure 7a) dû à un effet synergique entre les deux inhibiteurs de l'enzyme.

Conclusion et perspectives

Cet article montre le fort potentiel des microcapteurs électrochimiques pour le contrôle environnemental *in situ*. Leur compatibilité avec les microtechnologies permet de les intégrer sous forme de réseaux multicapteurs, donc multiespèces. De plus, leur intégration dans des microsystèmes analytiques permet de pallier à certaines limitations de ces microcapteurs en leur associant des étages de filtration et de préconcentration. Au niveau de l'élaboration des microcapteurs, les nanomatériaux ouvrent des perspectives en termes de miniaturisation, de sensibilité et également de stabilisation de biomolécules.

Références

- [1] Tercier M.L., Buffle J., Graziottin F., *Electroanalysis*, **1998**, 10(6), p. 355 ; Guenat O., de Rooij N.F., Koudelka-Hep M., Tercier-Waeber M.L., Salaun P., Buffle J., *Proceedings Eurosensors XVI*, Prague, **2002**, p. 611.
- [2] McGaw E.A., Swain G.M., *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 575, p. 180.
- [3] El Tall O., Jaffrezic-Renault N., Sigaud M., Vittori O., *Electroanalysis*, **2007**, 19, p. 1152.
- [4] Bergveld P., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **1970**, BME-17, p. 70 ; Bergveld P., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **1972**, BME-19, p. 342.
- [5] Sant W., Pourciel M.L., Launay J., Do Conto T., Martinez A., Temple-Boyer P., *Sensors and Actuators B*, **2003**, 95, p. 309.
- [6] Senillou A., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Griffe F., *Materials Science and Engineering C*, **1998**, 6, p. 59.
- [7] Humenyuk I., Torbiéro B., Assié-Souleille S., Colin R., Dollat X., Franc B., Martinez A., Temple-Boyer P., *Microelectronics Journal*, **2006**, 37, p. 475.
- [8] Marrakchi M., Dzyadevych S.V., Namour P., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., *Sensors and Actuators B*, **2005**, 111-112, p. 390.
- [9] Jaffrezic-Renault N., *Sensors*, **2001**, 1, p. 60.
- [10] Dzyadevych S.V., Shul'ga A.P., Soldatkin A.P., Nyamsi A.M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., *Electroanalysis*, **1994**, 6, p. 752.
- [11] Dzyadevych S.V., Chovelon J.M., *Materials Science and Engineering C*, **2002**, 21(1-2), p. 55.



Nicole Jaffrezic-Renault

est directrice de recherche CNRS au Laboratoire des Sciences Analytiques de l'Université Claude Bernard*.

* Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5180, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex. Courriel : nicole.jaffrezic@univ-lyon1.fr