



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE

Faculté des Sciences et Techniques

Béni- Mellal



Centre d'Etudes Doctorales

Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé

THESE

Présentée par

Salah Eddine EL QOUATLI

Pour l'obtention du grade du

Doctorat National

Discipline : Chimie Physique, Spécialité : Electrochimie Analytique

Contribution au développement des électrodes modifiées pour le dosage des : Nitrates, Pesticides, Médicaments est des boissons alimentaires.

Soutenue le 26 Octobre 2013 devant la commission d'examen :

Président	: Pr. M. EL MERAY	Faculté des Sciences Semlalia - Marrakech
Rapporteurs	: Pr. A. Amine	Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia
	: Pr. A. OUSSAMA	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal
Examineurs	: Pr. M. KHOULI	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal
	: Pr. A. HAFID	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal
	: Pr. A. CHTAINI	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal

Remerciements

Cette thèse est effectuée au sein du laboratoire d'Electrochimie Moléculaire et Matériaux Inorganiques (**EMMI**), qui fait partie du département de Chimie et Environnement, de la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal.

C'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes ayant soutenu mon travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance la plus profonde à monsieur le professeur **Abdelilah CHTAINI** pour avoir dirigé mon travail depuis le Master et pendant les trois années de thèse. C'est l'homme qui a su me faire partager son goût et son enthousiasme pour la recherche. Avec lui j'ai appris que l'Electrochimie est une grande école de patience. Je le remercie chaleureusement pour son encadrement, son œil critique dans la correction de mon rapport et pour son soutien constant tout au long de ma thèse.

Mes remerciements vont conjointement à **Mme. Rachida NAJIH** pour sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce travail. Son intérêt, sa disponibilité, son suivi de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer à ma thèse une partie de leur temps. Je cite en particulier monsieur le professeur **A. Amine** et monsieur le professeur **A. OUSSAMA** qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également monsieur le professeur **A. HAFID** et monsieur le professeur **M. KHOULI** pour avoir accepté d'examiner mon rapport en faisant partie de mon jury de thèse.

J'exprime ma vive reconnaissance au professeur **M. EL MERAY** pour avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de thèse, ainsi qu'à monsieur **M. KSIBI** pour m'avoir accueilli au sein de son Institut de Biotechnologie de Sfax tout au long de mon stage en Tunisie, pour sa collaboration et pour sa participation au jury.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également, à toutes les personnes du laboratoire d'EMMI avec qui j'ai partagé un café, un repas, ou une discussion pendant mes années de thèse : **Mr. A. SADIKI LAMARI, Mr. V. Hambate Gombje, Mme R. Ngono Therèse, Mr. A. ZAROUAL, Mr T. EL WAFI**, ainsi qu'à tous les stagiaires du laboratoire,

Liste des abréviations :

VC	: voltamétrie cyclique
SQW	: voltamétrie à onde carrée
VH	: Voltamétrie Hydrodynamique
MEB	: microscopie électronique à balayage
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
CL	: Chromatographie liquide
UV	: Ultra-violet
SM	: Spectroscopie de masse
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
EC	: Electrophorèse Capillaire
AIF	: Analyse par injection dans un flux
IR	: Infrarouge
RPE	: Résonance paramagnétique d'électron
SPR	: Résonance plasmonique de surface
ECL	: Electrochimiluminescence
PQ	: Paraquat
PN	: Phosphate Naturel
K	: Kaolin
LD	: Limite de détection
LQ	: Limite de quantification
CPE	: Electrode à pâte de carbone
Mn-CPE	: Electrode à pate de carbone modifiée par électrodéposition de manganèse
SCE	: Electrode à calomel saturée
WE	: Electrode de travail
AE	: Electrode auxiliaire
ME	: Micro-électrode
Cys	: Cystéine
ATP	: Adénosine triphosphates
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ROS	: Reactive Oxygen Species
OMS	: Organisation mondiale de la santé
DJA	: Dose Journalière Admissible

Introduction générale :

Dans un monde où l'espérance de vie de l'espèce humaine ne cesse d'augmenter (elle est aujourd'hui de 80 ans alors qu'elle était de moins de 20 ans dans la Grèce antique), l'engouement pour des protocoles, thérapies et habitudes alimentaires permettant de ralentir le processus de vieillissement et d'améliorer la qualité de vie ne se dément plus. Un des moyens privilégiés dans cette quête fait appel aux xénobiotiques (polluants, médicaments, molécules antioxydantes, vitamines, polyphénols,...)

La compréhension des mécanismes de déclenchement et de développement de certains pathologies, la mise au point de diagnostics cliniques précoces et l'évaluation de l'efficacité de protocoles thérapeutiques sont des domaines qui nécessitent des outils analytiques fiables et simples d'utilisation. Actuellement, la détection et le dosage des polluants, radicaux libres et des agents antioxydants ainsi de certains médicaments sont le plus souvent réalisés à l'aide d'instruments de mesure complexes, coûteux, volumineux et difficiles à mettre au point, tels que les chromatographes ou les spectromètres. De plus, les phases de préparation des échantillons, avec des protocoles opératoires relativement lourds, et d'exploitation des résultats augmentent souvent la durée totale d'analyse.

Par définition, l'électrochimie est la discipline scientifique qui s'intéresse aux relations entre la chimie et l'électricité. Elle décrit les phénomènes chimiques couplés à des échanges réciproques d'énergie électrique. L'électrochimie comprend toutes technologies et techniques issues de ses travaux scientifiques (électrolyse, corrosion, électrodéposition...).

De plus, l'électrochimie s'intéresse à des systèmes hétérogènes comportant aux deux extrémités des matériaux conducteurs électroniques (métal, carbone...) et, entre ces deux conducteurs, au moins un matériau conducteur ionique (électrolyte liquide ou gélifié,...)

Les réactions électrochimiques sont les phénomènes qui ont lieu à l'interface de deux systèmes conducteurs (électronique et ionique) lors du transfert de charge composé de un ou plusieurs électrons. Ces transferts de charges s'accompagnent de modification des états d'oxydation des matériaux (oxydation ou réduction) et donc de leur nature physico-chimique (dépôt métallique, évolution de gaz, formation d'espèces radicalaires, réactions chimiques couplées...). L'ensemble des réactions élémentaires peut ainsi atteindre un haut niveau de complexité. L'électrochimie permet de mieux appréhender les phénomènes d'oxydoréduction et

Résumé

Le thème principal de notre travail consistait à la mise en exergue de l'efficacité de la mise en œuvre des électrodes modifiées. La recherche sur ces électrodes a connu un essor remarquable durant les dernières décennies si l'on considère le rôle primordial qu'elles jouent dans différents aspects d'application à la fois en analyse et en synthèse. L'actualité de ces études peut s'analyser en examinant les publications majeures qui ont jalonné ces dernières années, ce qui permet d'observer la situation des thèmes récurrents et de détecter les thèmes émergents. La préoccupation commune et relativement nouvelle, qui sous-tend la plupart des travaux qu'ils proviennent des groupes industriels ou des équipes universitaires, est la prise en compte des problèmes écologiques et environnementaux.

Notre champ d'investigation s'est plus spécifiquement focalisé sur des électrodes solides à faibles cout avec une grande activité, il s'agit des électrodes à pâte de carbone modifiées, pour évaluer le pouvoir de détection de ces électrodes nous avons choisi, comme analytes des substances médicamenteuses tels que le paracétamol et la carbocysteine, et des polluants tels que les nitrates et le paraquat. Dans un autre sens, nous avons testé l'efficacité d'autres électrodes par la détection de la capacité antioxydante de denrées alimentaires telles que le thé et le café.

D'après les résultats obtenus et à travers les paramètres de validation, nous avons montré la précision des méthodes électrochimiques utilisées. Au cours de ce travail, nous pouvons dire que les méthodes de dosage sont fiables, efficaces et répétables. Par ailleurs, cela ne nous empêche pas d'améliorer les méthodes utilisées. Il nous semble indispensable de mettre en place des systèmes fiables, efficaces et à notre portée pour assurer la qualité des produits.

Mots clés : Electrodes modifiées, le paracétamol, la carbocysteine, paraquat, capacité antioxydante, méthodes électrochimiques.

Anas, Hind, Najet et Madiha, je les remercie tous d'avoir assuré une ambiance particulièrement favorable pour mener à bien mon travail, pour leur sympathie et pour leur encouragement.

Mes remerciements s'adressent de manière similaire à monsieur **A. ZEGHAL**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal et Directeur de C.E.D et à monsieur **A. ZYAD**, Vice Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques et responsable de la formation doctorale **Ressources Naturelles, Environnement et Santé**.

Je dédie ce travail à mes parents, sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui, à mes frères **Hamid, Mourad** et sa femme **Wafae**, à ma sœur **Fatima Ezzahrae**, et à mes amis pour les encouragements et tous sacrifices qu'ils ont consentis pour moi.

Je remercie enfin toutes les personnes intéressées par mon travail, en espérant qu'elles puissent trouver dans mon rapport des explications utiles pour leurs propres travaux.

Sommaire :

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Recherches bibliographiques.....	5
Introduction.....	6
1- Méthodes expérimentales "in vitro" pour l'étude de la biotransformation de nouvelles molécules à potentialité thérapeutique: état de l'art.	7
1.1 Aspects généraux.....	7
1.2 La famille d'hémoprotéines Cytochrome P450.....	9
1.2.1 Origine, propriétés biochimiques et rôle.....	10
1.2.2 Cycle catalytique.....	12
1.3 Principaux modèles biologiques utilisés "in vitro" pour l'étude de la métabolisation des xénobiotiques.....	15
1.3.1 Organe isolé perfusé.	15
1.3.2 Les coupes de foie.....	15
1.3.3 Les hépatocytes.....	15
1.3.4 Les fractions subcellulaire.....	16
1.3.5 Les enzymes recombinants.....	17
1.3.6 La peroxydase de raifort (HRP).....	19
2. Méthodes instrumentales d'identification des métabolites.....	22
2.1 Couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse.....	22
2.2 Méthodes complémentaires à la CL/SM.....	23
2.3 Essais d'inhibition enzymatique.....	23
2.4 L'électrophorèse capillaire.....	24
3. Apport des méthodes électrochimiques.....	25
3.1 La voltamétrie.	25
3.1.1 La voltamétrie cyclique (VC).....	26
3.1.2 La voltamétrie hydrodynamique.....	29
3.2 Les Capteurs électrochimiques	33
3.2.1 Introduction.....	33
3.2.2 La reconnaissance biologique.....	34
(i) Capteur à composante biocatalytique.	34
(ii) Biocapteurs d'affinité.....	35
3.2.3 Les transducteurs.....	36
3.2.3.1 Les transducteurs électrochimiques.....	36
3.2.4 Techniques d'immobilisation.....	42
3.2.4.1 Méthodes physiques.....	~43
3.2.4.2 Méthodes chimiques.	49
3.2.5 Performances d'un biocapteur.	52
3.2.5.1 Cinétique enzymatique.....	53
3.2.5.2 Interférences.....	57
3.2.6 Biocapteurs et biotransformation de xénobiotiques: tendances et perspectives.....	57
Conclusion.....	64
Références.....	65

de corrosion. L'électrochimie des groupements fonctionnels est une méthode de synthèse, des articles récents enveloppent les réactions les plus importantes, soit pour la réduction cathodique ou l'oxydation anodique.

En générale, la réduction électrochimique de ces composés est influencée par plusieurs facteurs, tels que, le pH, la nature de l'électrode, la nature de l'électrolyte, la concentration du réactant, la température, etc...

La conception, l'élaboration, la mise au point et les applications de nouveaux capteurs électrochimiques, particulièrement ceux à détection ampérométrique, ont fait l'objet d'une intense activité de recherche au cours de ces dernières années. Bien que les réalisations industrielles de tels outils analytiques restent limitées, (seul le biocapteur à glucose a connu un succès commercial indéniable), les travaux de recherche actuels visent toujours à améliorer leurs performances analytiques, notamment en termes de spécificité et de sensibilité, en tirant profit des avantages liés au concept et procédé de modification de surfaces des électrodes. C'est dans ce cadre général que s'inscrivent les travaux de cette thèse, réalisés au sein du laboratoire d'électrochimie moléculaire et matériaux inorganiques (LEMMI), de la faculté des sciences et techniques de Béni Mellal.

L'objectif est de développer des capteurs et des méthodes électrochimiques pour la détection et le dosage de certains polluants tels que les nitrates et des herbicides, ainsi le développement des électrodes modifiées pour le dosage des médicaments et la détermination de la capacité antioxydante des denrées alimentaires. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de précédentes études réalisées au LEMMI. Il s'agit des électrodes à pâte de carbone modifiées, L'activité électrochimique intrinsèque des électrodes, ainsi que l'effet de la cinétique de l'incorporation des composites ont été évalués principalement par voltamétrie cyclique (VC) et voltamétrie à onde carrée (SQW), la structure et la morphologie des couches ont été examinées par microscopie électronique à balayage (MEB) et rayons X.

La recherche sur les électrodes modifiées a connu un essor remarquable durant les dernières décennies si l'on considère le rôle primordial qu'elles jouent dans différents aspects d'application à la fois en analyse et en synthèse. L'actualité de ces études peut s'analyser en examinant les publications majeures qui ont jalonné ces dernières années, ce qui permet d'observer la situation des thèmes récurrents et de détecter les thèmes émergents. La préoccupation commune et relativement nouvelle, qui sous-tend la plupart des travaux qu'ils

Chapitre II : Techniques expérimentales.....	76
I- La voltamétrie.....	77
I.1. Composants et principes des techniques voltamétriques.....	77
I.2. Analyses voltamétriques.....	78
I.2.1. La voltamétrie cyclique	78
I.2.2. La voltamétrie à onde carrée (SWV : square wave voltammetry).....	81
II. Mesure d'impédance électrochimique.....	82
III. Chronoampérométrie.....	85
IV. Chronopotentiométrie.....	86
V. Spectrométrie infrarouge.....	87
VI. Diffraction des rayons X.....	88
VII. Microscopie électronique à balayage.....	88
VIII. Surfaces spécifiques d'échanges (méthode BET).....	89
Références.....	90
Chapitre III : Electrode modifiée pour le dosage du paracétamol et de la carbocysteine.....	91
A- Electro analyse du paracétamol.....	92
I- Généralité sur Le paracétamol.....	92
1- Synthèse de paracétamol	94
2- Propriétés physiques de paracétamol.....	95
3- Propriétés chimiques du paracétamol.....	95
4- Electrochimie du paracétamol	95
II- Partie expérimentale.....	96
1- Préparation de Mn-CPE.....	96
2- Procédure.....	96
3- Résultats et discussion.....	96
a- Caractéristiques de la surface.....	96
b- Comportement électrochimique du Mn-CPE.....	97
c- Effet de la vitesse de balayage.....	99
d- Effet de pH.....	100
e- Application analytique.....	102
Conclusion.....	104
Références.....	105
B- Electro analyse de la carbocysteine.....	107
1- La carbocysteine.....	107
2- Partie expérimentale.....	108
3- Résultats et discussion.....	108
Conclusion.....	116
Références.....	117
Chapitre IV : Electrodes modifiées pour la détermination du pouvoir antioxydant des denrées alimentaires.....	118
Introduction.....	119

proviennent des groupes industriels ou des équipes universitaires, est la prise en compte des problèmes écologiques et environnementaux.

Les électrodes modifiées peuvent être des solides (graphite, carbone vitreux, silicium, diamant dopé, etc.), des métaux solides (or, platine, palladium, etc.) ou liquide (mercure, aluminium fondu, etc.).

Dans notre laboratoire on s'intéresse surtout à développer des électrodes solides à faible coût avec une grande activité telles que:

- *Electrode de titane (Ti).*
- *Electrode de titane modifiée par le phosphate naturel.*
- *Electrode de titane modifiée par le phosphate naturel dopé par 5% de nickel (Ti-NP-5%Ni).*
- *Electrode de titane modifiée par le phosphate naturel dopé par 10% de nickel (Ti-NP-10%Ni).*
- *Electrode de graphite modifiée par le manganèse (CG-Mn).*
- *Electrode de titane modifiée par un polymère.*

Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier chapitre présente une recherche bibliographique sur les xénobiotiques (polluants, médicaments...) ainsi que les différentes méthodes d'étude.

Le deuxième est consacré aux principes et méthodes électrochimiques utilisées au cours de ce travail.

Le troisième chapitre décrit d'une part le concept de modification de la surface d'une électrode modifiée par électrodéposition de manganèse sur le graphite pour le dosage du paracétamol, et d'autre part d'évaluer le protocole d'élaboration d'une nouvelle électrode à base de titane modifiée. L'accent est mis sur le processus de modification par électrodépôt d'un polymère conducteur (eugénol). L'interface ainsi modifiée est d'abord appliquée au dosage de la Carbocysteine.

Le quatrième chapitre montre la comparaison de quatre électrodes modifiées pour l'évaluation du pouvoir antioxydant du café.

Recherches bibliographiques.....	120
I- Stress oxydant.....	120
1- Les radicaux libres.....	121
1.1. Définition.....	121
1.2. Nature des radicaux libres.....	121
1.2.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène.....	121
1.2.1.1. Ion superoxyde : $O_2^{\cdot -}$	122
1.2.1.2. Le radical peroxyde d'hydrogène: H_2O_2 :.....	122
1.2.1.3. Radical libre hydroxyle : OH^{\cdot}	122
1.2.1.4. L'oxygène singulet : $1 O_2$.....	122
1.2.2. Les espèces libres non oxygénées.....	123
1.3. Production de radicaux libres.....	123
1.4. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme.....	124
1.4.1. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire.....	124
1.4.2. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres.....	125
1.4.2.1. Les protéines.....	125
1.4.2.2. Les glucides.....	126
1.4.2.3. Les lipides.....	126
1.4.2.4. L'ADN.....	126
2. Les systèmes de défense : antioxydants.....	127
2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	127
2.1.1. Superoxyde dismutase.....	127
2.1.2. Catalase.....	127
2.1.3. Glutathion peroxydase.....	127
2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	127
2.2.1. Oligoéléments.....	128
2.2.2. Glutathion.....	128
2.2.3. Vitamine E et vitamine C.....	128
2.2.4. vitamine A (famille des caroténoïdes).....	129
2.2.5. Polyphénols et flavonoïdes.....	129
II- Le thé et le café.....	131
1. Le thé.....	131
1.1. Généralités sur le thé.....	131
1.2. Les molécules actives du thé.....	131
1.3. L'activité anti-oxydante du thé.....	132
2. Le café.....	132
2.1. Généralités sur le café.....	132
2.2. Les molécules actives du café.....	132
Partie expérimentale.....	133
1. Caractérisation des électrodes élaborées.....	134
2. Etude du pouvoir antioxydant du café.....	136
3. Etude du pouvoir antioxydant du thé.....	139
Conclusion.....	142
Références.....	143

Le cinquième chapitre, est consacré à tester l'efficacité d'un capteur électrochimique élaboré dans notre laboratoire par une application analytique sur le dosage des nitrates et des pesticides contenus dans le lait cru produit dans la région de Tadla-Azilal.

Chapitre V : Capteurs électrochimique pour l'électroanalyse des nitrates et des herbicides dans le lait cru – Région Tadla.....144

Introduction.....145

I.	Description bibliographique du lait.....146
1.	Définition légale du lait146
2.	Différents types de lait.....146
a.	Le lait cru.....147
b.	Le lait traité thermiquement.....147
b.1.	Lait pasteurisé.....147
b.2.	lait Stérilisé.....148
3.	Caractéristiques physiques du lait cru de vache.....148
4.	Compositions chimiques du lait cru de vache.....148
II.	Généralités sur les nitrates.....150
II.1	Sources des nitrates.....150
II.1.1.	Les eaux et les sols.....150
II.1.2.	L'atmosphère.....151
II.2.	Les rejets de nitrates.....152
II.3.	Impact des nitrates sur l'environnement.....152
II.4)	Impact sur la santé humaine.....153
II.4.1)	Risque de méthémoglobinémie.....153
II.4.2)	Risque carcinogène.....154
II.5)	Différentes méthodes d'analyse des nitrates.....155
II.6)	Réglementation actuelle.....156
II.6.1)	L'eau de consommation.....156
II.6.2)	Les aliments.....156
II.7)	Recommandation en vertu des principes de précaution.....157
II.8.	Méthodes d'analyse des nitrates.....158

Références.....161

III.	Généralités sur les pesticides.....164
III.1.	Paraquat.....164
III.1.1.	Propriétés physico-chimiques de paraquat.....165
III.1.2.	Toxicité de paraquat.....165
III.2.	Diquat.....165
III.2.1.	Propriétés physico-chimiques.....166
III.2.2.	Toxicité de diquat.....166
III.3.	Paramètres physicochimiques du paraquat et du diquat.....166
IV.	Electro-analyse des pesticides.....167
IV.1.	Méthodes d'analyse des résidus de pesticides.....167
	Méthodes électrochimiques d'analyse des résidus de pesticides.....167
V.	Généralités sur les argiles et les phosphates naturels.....169
V.1	Les Argiles.....169
V.1.1	Définition de l'argile.....169
V.1.2	Utilisation des argiles.....169
V.2	Les phosphates naturels (PN).....169
VI.2.1	Introduction.....169
V.2.2	Utilisation des phosphates naturels.....170
VI.	Mode de détection et de conversion des substances chimiques par voie électrochimique170

Chapitre I

Recherches bibliographiques

VI.1 Généralités sur les électrodes modifiées.....	170
VI.1.1 Modification de la surface des électrodes solides.....	172
VI.1.1.1. Modification covalente.....	172
VI.1.1.2. Modification par adsorption.....	173
a. Adsorption physique.....	173
b. Adsorption Chimique.....	174
VI.1.1.3 Modification par film polymérique ou modification multicouches.....	174
VI.1.2. Modification directe : les électrodes à pâte de carbone.....	175
VI.1.2.1. Electrodes à pâte de carbone à liant non conducteur.....	176
VI.1.2.2. Electrode à pâte de carbone à liant conducteur.....	177
VI. Capteurs électrochimiques pour l'électro-analyse des nitrates et herbicides dans le lait –Région Tadla Azilal.....	177
1. Capteurs électrochimiques.....	177
1. a. Constitution d'un capteur.....	178
2. Capteur à nitrate.....	179
3. Application analytique du capteur EMMI. Capt.....	180
3.1 Collecte de lait dans la Région Tadla Azilal.....	180
4. Partie expérimentale.....	182
a)- Réactifs.....	182
b)- Préparation de l'électrode.....	182
c)- Appareillages	182
d)- Procédure.....	182
5. Résultats et discussion pour l'électro-analyse des nitrates.....	183
a)- Caractérisation voltamétrique préliminaire.....	183
b)- Influence du temps d'imprégnation.....	190
c)- Courbe d'étalonnage.....	190
d)- Application pratique.....	192
6. Résultats et discussion pour l'électro-analyse des pesticides.....	193
6.1- Courbe d'étalonnage enregistré pour la paraquat dans le lait....	193
6.2- Analyse du paraquat dans le lait collecté dans la région.....	194
Conclusion.....	196
Références.....	197
Conclusion générale.....	203

Un **xénobiotique** est une substance qui est étrangère à l'organisme vivant. En général, un xénobiotique est une molécule chimique polluante et peut être toxique à l'intérieur des organismes, y compris pour de faibles voir très faibles concentrations [1] (par exemple les *pesticides, médicaments*...etc).

Cette toxicité s'explique parfois par l'« inadaptation » d'organismes vivants qui n'ont jamais rencontré cette substance lors de leur évolution, par des phénomènes naturels de rejets liés à l'immunité, par des actions de perturbateur endocrinien du xénobiotique ou pour des raisons toxicologiques (toxicité « intrinsèque » du xénobiotique ou sa capacité à agir en synergie avec un autre polluant [2] ou facteur infectieux).

Chaque jour confrontée aux impératifs requis de sécurité des médicaments à usage humain, l'industrie pharmaceutique tente d'optimiser ce paramètre par une sélection améliorée et précoce des nouvelles entités chimiques synthétisées.

Le succès d'une nouvelle molécule amenée sur le marché dépend essentiellement de ses propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisation, d'excrétion et de toxicité (ADME/Tox). La recherche moderne de nouveaux médicaments donne aujourd'hui une importance plus grande aux études de métabolisation. Cette discipline en pleine expansion était cantonnée dans le passé aux seuls laboratoires universitaires. L'acceptation de la valeur ajoutée de l'approche in vitro de l'étude du métabolisme de xénobiotiques au regard de l'approche in vivo est somme toute assez récente. La définition des profils métaboliques et pharmacocinétiques se réalise aujourd'hui de manière précoce en recherche et développement et non plus lors des dernières étapes du développement.

La grande disponibilité actuelle des technologies in vitro conjuguée à leur simplicité de mise en œuvre ont définitivement permis leur usage intensif au niveau de l'industrie pharmaceutique. De manière non exhaustive, elles sont également d'usage quotidien au sein de compagnies de taille plus restreinte ou dans les laboratoires académiques. Par ce fait, elles constituent un catalyseur non négligeable de collaborations fructueuses entre ces différents acteurs [3]. Chacun d'entre eux aura à jouer un rôle face aux défis engendrés par la foule de nouvelles molécules issues des différentes voies de recherche contemporaines : chimie combinatoire, criblage à haut débit, génomique et protéomique. La pléthore de candidats générés via ces technologies modernes n'a malheureusement pas jusqu'à présent abouti à l'augmentation considérable du nombre de molécules approuvées et d'usage thérapeutique. Généralement, la responsabilité en incombe à une toxicité intrinsèque ou liée aux métabolites. Très récemment encore, les études de toxicité à un stade précoce du processus de recherche

Listes des figures :

Chapitre I :

Figure 1.2 Division structurée des familles du CYP450 humain

Figure 1.3 Distribution tissulaire et subcellulaire de quelques isoformes du CYP450 humain et exemples types de réactions catalysées

Figure 1.4 La protoporphyrine IX garnie d'une cystéine en temps que cinquième ligand

Figure 1.5 Cycle catalytique du CYP450

Figure 1.6 Structure de ferriprotoporphyrine IX de l'HRP

Figure 1.7 Signal potentiel – temps, voltamétrie cyclique à balayage linéaire.

Figure 1.8 Voltampérométrie cyclique d'un couple réversible (Fe^{2+}/Fe^{3+}) en milieu H_2SO_4 1M

Figure 1.9 Voltampérogramme type d'un système irréversible

Figure 1.10 Système CL avec détection parallèle par SM et cellules électrochimiques en série.

Figure 1.11 Voltampérogramme hydrodynamique typique obtenu au moyen de cellules électrochimiques en série

Figure 1.12 Schéma général d'un biocapteur.

Figure 1.13 Illustration des différentes possibilités de transmission de l'information chimique entre le biorécepteur et le transducteur (électrode). S = substrat, P = produit et E = enzyme

Figure 1.14 Génération d'un signal fluorescent par électrochimiluminescence

Figure 1.15 Diagramme des méthodes d'immobilisation.

Figure 1.17 Réseau polymérique après coréticulation entre les éléments constitutifs:

l'enzyme, le glutaraldéhyde et l'albumine sérique bovine

Figure 1.18 Agencement d'enzymes biotinylées sur une électrode d'or garnie de chaîne alkyl-thiol biotinylées.

Figure 1.19 Vue de profil des différentes étapes mécanistiques d'un biocapteur ampérométrique.

Figure 1.20 Schéma général d'une réaction enzymatique

Figure 1.21 Courbe type de Michaelis-Menten. Dépendance entre vitesse de réaction et concentration en substrat. Au point C, la vitesse est quasi équivalente à V_m ; au point B, elle vaut exactement la moitié de V_m et au point C, est proportionnelle à $[S]$

Figure 1.22 Tracé selon Lineweaver-Bur

Chapitre II :

Figure 1 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat.

Figure 2: Fonction imposée

étaient exclues vu la profusion de molécules, forçant les chercheurs à établir la suite de leur stratégie de développement sur des données toxicologiques limitées. Par conséquent, une augmentation importante du nombre de techniques *in vitro* pour l'étude toxicologique des nouveaux composés et de leurs métabolites, et mimant de manière *ad hoc* le métabolisme humain s'avère primordiale. Celles-ci devront être aptes à soutenir le rythme dense du criblage à haut débit [4]. Cet antagonisme entre flux important de candidats thérapeutiques et capacité à fournir des données de qualité à une cadence soutenue représente souvent le point faible de la chaîne de développement et met en exergue le besoin crucial de nouvelles méthodes innovantes pour des études ADME/Tox. Ces essais prédictifs devront se baser essentiellement sur la structure moléculaire et intégrer la complexité biochimique que subit un xénobiotique [5].

Proposer de nouveaux médicaments, meilleurs et plus sûrs, tel reste l'objectif principal des compagnies pharmaceutiques, et ce dans un laps de temps le plus court possible. Une élimination le plus en amont possible du processus de développement des candidats inadéquats permettra d'épargner temps et argent, mais aussi animaux de laboratoire [6].

1- Méthodes expérimentales "in vitro" pour l'étude de la biotransformation de nouvelles molécules à potentialité thérapeutique: état de l'art.

1.1 Aspects généraux.

L'étape préclinique, responsable du rejet de 40% des candidats potentiels, demeure un facteur non négligeable au sein de la chaîne de développement. Cette étape coûteuse et de longue haleine explique les nombreux efforts consacrés à mettre au point des tests prédictifs de criblage précoce sûrs, qui limiteront la probabilité d'insuccès et de rejet d'une molécule candidat médicament [7]. De manière générale, les méthodes *in vitro* d'usage courant apportent leur aide pour: (i) définir la stabilité métabolique, (ii) la génération de métabolites à large échelle, (iii) la génération de métabolites utilisés en développement bioanalytique, (iv) la comparaison de profils métaboliques et (v) l'identification de différentes espèces métaboliques. D'un soutien précieux pour le choix rationnel des espèces animales qui servent de modèles lors des études toxicologiques, elles fournissent des informations au niveau des essais cliniques et plus particulièrement pour la prédiction de la variabilité pharmacocinétique inter-patient et des interactions médicamenteuses. Une interprétation correcte permet l'économie de tests ou l'anticipation de certaines interactions médicament-médicament. Une grande diversité de systèmes enzymatiques sont disponibles sur le marché, et rendent d'autant plus prépondérant le choix du modèle adéquat. Il s'effectue au cas par cas et seul le système *in vitro* idoine, permet d'élucider correctement le métabolisme étudié. Préférence sera

Figure 3: Voltamogramme cyclique enregistré pour une espèce Red seule en solution.

Figure 4: Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps

Figure 5: Voltamogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.

Figure 6: Représentation de la variation de l'impédance d'un système électrochimique en fonction de la pulsation ω . Cas idéal où les pulsations ω_c , ω_a , ω_d sont suffisamment différentes les unes des autres.

Figure 7: Chronoampérogramme typique ; i_{res} le courant résiduel

Figure 8: Chronopotentiogramme typique d'un système électrochimique réversible.

Chapitre III : A- Paracétamol

Figure 1 : Structure de paracétamol (N-acetyl-p-amino phenol)

Figure 2 : Micrographie électronique de Mn-CPE

Figure 3: voltamogrammes cycliques enregistrés par : (a) Mn-CPE et (b) CPE dans 0,1 M de NaCl à 100 mV /s

Figure 4: Voltamogrammes enregistrés par CPE (a) et Mn-CPE (b) en présence de 0,5 mM de paracétamol dans une solution tampon de pH=7,2 et avec une vitesse de balayage de 100 mV/S.

Figure 5: Voltamogrammes enregistrés par Mn-CPE avec 0,5 mM de paracétamol dans une solution tampon à différentes vitesses de balayage de 10 à 500 mV.s⁻¹

Figure 6: CVs pour Mn-CPE en présence de 0,5 mM de paracétamol dans une solution tampon Les valeurs de pH = 4, 6, 7,2 et 9.

Figure 7: Représentation graphique de potentiel des pics de paracétamol (E_p) en fonction de pH.

Figure 8: SWVs pour des additions de 0,132 mM, 0,264 mM, 0,396 mM, 0,528 mM, 0,792 mM et 1,05 mM de paracétamol sur Mn-CPE dans une solution tampon (pH 7,2).

Figure 9: Représentation graphique de l'intensité du courant en fonction de la concentration ajoutée de paracétamol.

Chapitre III : B- Carbocysteine :

Figure 1 : Structure de la carbocysteine

Figure 2: Voltammogrammes de la polymerization électrochimique, 3 premiers cycles, de 0.01 M d'eugénol dans 0.1 M NaOH, sur électrode de titane. La vitesse de balayage est 100 mV/s.

Figure 3: Voltammogrammes de la polymerization électrochimique, 1^{er} et 2^{ème} cycles, de 0.01 M d'eugénol dans 0.1 M NaOH, sur électrode de titane. La vitesse de balayage est 100 mV/s.

Figure 4 – Diagramme de Niquist de l'électrode de titane, en milieu électrolytique et à potentiel ouvert

Figure 5 – Diagramme de Niquist de l'électrode Ti/Polymère, enregistré en milieu électrolytique et à circuit ouvert

accordée à du matériel d'origine humaine. La prudence est également de mise lors de l'emploi de test *in vivo* sur animal ; les informations récoltées divergent occasionnellement de celles obtenues chez l'humain.

D'usage quasi généralisé au niveau de l'industrie pharmaceutique, ces tests *in vitro* permettent d'embrasser le double but d'identifier les enzymes impliqués dans le métabolisme oxydatif d'une nouvelle molécule mais aussi d'établir sa capacité à induire ou activer le métabolisme d'un autre composé ingéré en prise concomitante.

Indéniablement, l'utilisation de ces tests prévisionnels fournit une aide judicieuse lors de la prise de décision de mise sur le marché d'un nouveau médicament, afin d'atteindre des objectifs de sécurité plus grands, et ce pour une population humaine implicitement hétérogène. De nombreuses agences nationales pour la sécurité médicamenteuse encouragent cette pratique en routine, et intègrent ces essais dans des recommandations soumises à de fréquentes mises à jour compte tenu de l'évolution rapide de ces techniques. Le succès de cette nouvelle facette de l'*in vitro*, repose sur l'extrapolation de qualité qui peut être définie entre les prédictions *in vitro* et les paramètres pharmacocinétiques *in vivo* connus [3]. En dépit de ces points positifs, une totale substitution de l'expérimentation animale par ces essais *in vitro* semble irréaliste par leur déficit de validation [6, 8]. Force est de reconnaître que malgré leur mimétisme, les systèmes *in vitro* demeurent un modèle simplifié en comparaison de l'environnement *in vivo*, milieu complexe dans lequel intervient la biotransformation. La réalisation des études *in vivo* et *in vitro* simultanément mettent en exergue les dissemblances entre les deux situations et jettent les bases de modèles expérimentaux et théoriques [9]. L'élaboration de modèles mathématiques ouvre une voie prometteuse afin de définir la nature de l'inhibition et d'estimer des paramètres cinétiques tels K_i et CI_{50} .

L'éclosion des essais *in vitro* est à mettre en parallèle avec l'évolution et l'implication nouvelle de techniques analytiques au sein même de ces tests : plaques multipuits, extraction en phase solide, spectrométrie de masse,... Leur apport n'élimine cependant pas certaines contraintes inhérentes à ces technologies qui limitent parfois leur impact positif : rejets radioactifs, faibles caractéristiques spectrales, toxicité des solvants, lenteur d'analyse...

De nombreuses voies d'exploration méritent encore d'être creusées, afin d'améliorer, de parfaire ces modèles *in vitro* et de rendre leur exactitude plus acérée, comme par exemple la mise au point d'un essai de prédétermination de la concentration nécessaire à l'évaluation du potentiel inhibiteur d'une molécule. De nouvelles avancées relatives aux performances des techniques de détection analytiques et une implication plus profonde de l'automatisation

Figure 6 : Voltammogrammes cycliques enregistrés par l'électrode Ti/Polymère, à différentes concentrations du carbocystéine en milieu tampon pH = 6.

Figure 7 : Diagrammes de Nyquist enregistrés par l'électrode Ti/Polymère, à différentes concentrations du carbocystéine, le temps de préconcentration est de 15 min, à circuit ouvert.

Chapitre IV :

Figure 1 : chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie

Figure 2 : sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire

Figure 3 : schéma de différentes formes d'espèces oxygénées

Figure 4: Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire

Figure 5 : formules développées de la vitamine C (à gauche) et la vitamine E (à droite)

Figure 6 : formule de β -carotène (à gauche) et de la vitamine A (à droite)

Figure 7 : répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule

Figure 8 : Voltammogrammes cycliques enregistrés à 100 mV/s, en milieu tampon phosphate pour les quatre électrodes étudiées.

Figure 9 : Droites de Taffel enregistrées par les électrodes étudiées en milieu tampon.

Figure 10 : Voltammogrammes cycliques de titane en milieu tampon avec et sans café, la vitesse de balayage est 50 mV/s.

Figure 11 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés par l'électrode de Ti en présence et en absence du café, à 100 mV/s.

Figure 12 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés pour les électrodes étudiées, en présence du café.

Figure 13 : Diagrammes d'impédance enregistrés par les électrodes étudiées en présence de 10 μ l de café dans le milieu tampon

Figure 14 : Voltammogrammes à onde carrée enregistré par l'électrode de titane en milieu tampon contenant différentes quantités de thé.

Figure 15 : Diagrammes d'impédance enregistrés par l'électrode de titane en présence de différentes quantités de thé dans le milieu.

Figure 16 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés par l'électrode Ti en milieu tampon contenant 10 μ l de thé et/ou de café.

Chapitre V :

Figure 1. Principe d'un capteur

Figure 2. Structure d'un capteur

Figure 3. Principe de fonctionnement du capteur à nitrate

Figure 4. Différents endroits de collecte du lait. Région Tadla Azilal.

apporteront à nouveau un gain en efficacité de ces outils *in vitro*. Dans un même ordre d'esprit, l'emploi intensif de l'informatique et la création de bases de données rendront possible la gestion efficace de l'ensemble des résultats générés, dans le but de synthétiser et de fournir des conclusions hautement utiles et directement exploitables [3].

1.2 La famille d'hémoprotéines Cytochrome P450.

Machinerie complexe, le métabolisme cellulaire mammifère assure la production d'énergie indispensable à la vie et garantit la fidélité de la réplication du patrimoine génétique des individus [10]. Tout xénobiotique introduit dans le corps humain subit une biotransformation déterminante pour son profil thérapeutique ou toxicologique. Responsable de la détoxification, de l'élimination ou même de la bioactivation, la fonction métabolique, passage clef, se divise traditionnellement en trois phases : Phase I ou biotransformation, elle comporte deux tâches : (i) augmenter l'hydrophilie via des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, (ii) accroître l'excrétion par incorporation d'un groupement fonctionnel polaire dans la structure moléculaire ; Phase II ou conjugaison, nouvelle amplification de la polarité par modification d'une fonction. La Phase III implique un dernier aspect essentiel: les mécanismes de transport intercellulaires [8, 9, 11]. Le tableau 1.1 illustre différents types de réaction et d'enzymes présents au sein de la cascade métabolique du médicament. La stabilité métabolique représente l'un des paramètres les plus déterminants dans l'établissement de la biodisponibilité orale et de l'élimination systémique d'un composé thérapeutique. Après ingestion orale, celui-ci traverse en tout ou en partie, l'épithélium intestinal, atteint le système sanguin et aboutit au foie via la veine porte. Confronté en premier lieu aux enzymes métaboliques de la lumière gastrointestinale, il subit un métabolisme intestinal ou hépatique avant de rejoindre la circulation systémique, ce processus est nommé effet de premier passage. La totalité des processus de métabolisation endurés par le composé déterminera sa concentration systémique finale ainsi que le temps de résidence au sein de l'organisme ($t_{1/2}$). Le métabolisme oxydatif est la biotransformation la plus répandue au niveau métabolisme médicamenteux ; il est régulé en ordre principal par la superfamille d'une hémoprotéine nommée cytochrome P450 [9].

Figure 5. Voltammogramme linéaire enregistré pour l'électrode préparée, en présence des ions nitrates. Effet de la vitesse de balayage.

Figure. 6. Square wave voltammogram in 0.1M HClO₄, containing different concentrations of nitrate at KCPE electrode

Figure 7. Squares waves enregistrés après imprégnation de l'électrode de travail dans différents échantillon du lait. Temps de préconcentration : 10 min, milieu électrolytique HClO₄ 0.1M.

Figure 8. Evolution du pic de réduction de nitrate en fonction du temps de pré-concentration

Figure 9. Courbe de titrage du nitrate

Figure 10. Evolution de la concentration de nitrate en fonction des échantillons étudiés

Figure 11. SQW enregistrés pour différentes concentrations du paraquat dans le lait

Figure 12. Courbe d'étalonnage du paraquat dans le lait

Phase I: enzymes	
Oxydation	Monoxygénase CYP450 Xanthine oxydase Peroxydase Amine oxydase Monoamine oxydase Dioxygénase
Réduction	Monoxygénase CYP450 Cétoréductase Glutathion peroxydase
Hydratation	Epoxyde hydrolase
Hydrolyse d'ester	Carboxyle estérase Amidase
Déshydrogénation	Alcool déshydrogénase Aldéhyde déshydrogénase
Superoxydation	Dismutase
Phase II: enzymes	
Conjugaison	Glucuronosyltransférase Sulfotransférase Glutathion S-transférase Glucosyltransférase Thioltransférase Synthèse des amides
Méthylation	O-méthyltransférase N-méthyltransférase Synthèse des amides
Acétylation	N-acétyltransférase Acyltransférase
Thiosulfatation	Sulfure transférase

Tableau 1 Exemples de type de réactions et d'enzymes de phases I et II impliqués dans le métabolisme des médicaments [12].

1.2.1 Origine, propriétés biochimiques et rôle.

Pierre angulaire de l'un de nos principaux systèmes reconnus de protection, le cytochrome P450 (CYP450), au rôle dominant en phase I, est une hémoprotéine unique. Elle forme une superfamille de plus de 40 membres chez l'humain, chacun d'entre eux est une hémoprotéine réactive à l'oxygène (Figure 1.2)

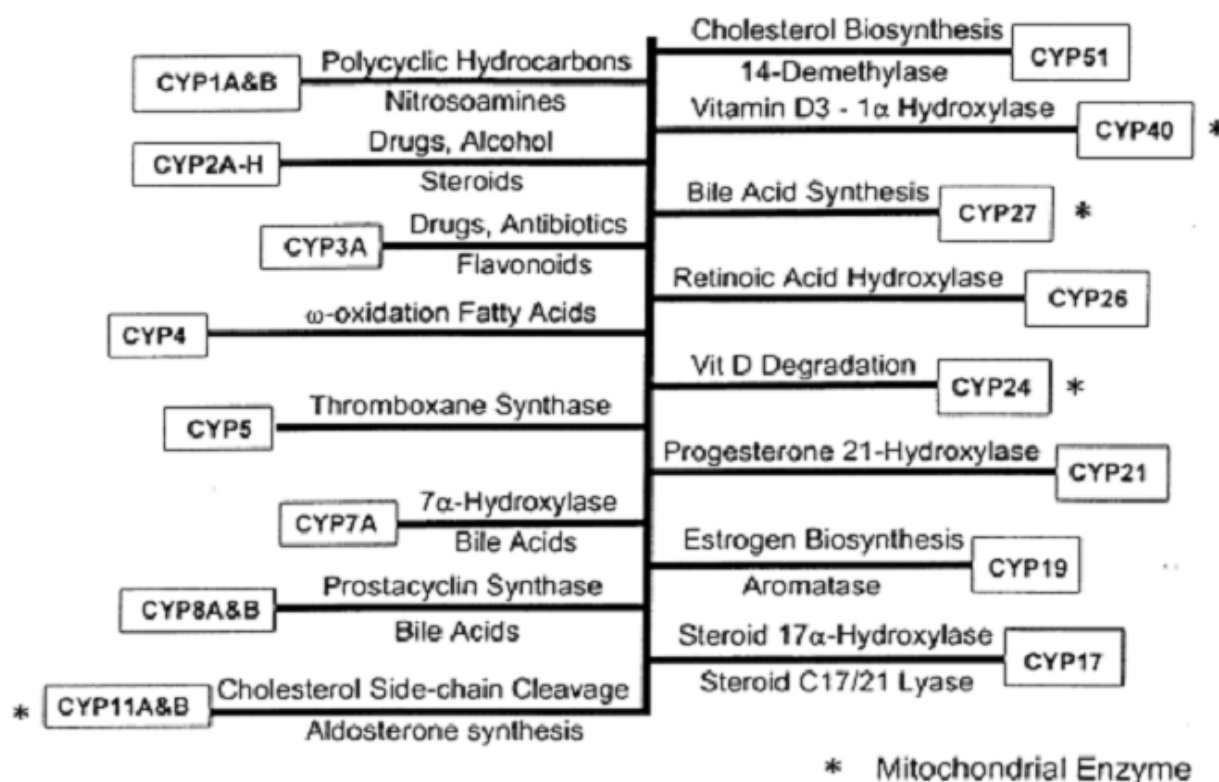


Figure 2 Division structurée des familles du CYP450 humain [10].

Leur rôle, capital et fondamental, régit : (i) le métabolisme des xénobiotiques organiques lipophiles (médicaments, polluants environnementaux, autres), (ii) la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, (iii) l'oxydation des acides gras insaturés en messagers intracellulaires, (iv) le métabolisme stéréo et régio spécifique des vitamines liposolubles, etc.

Constitué de 500 acides aminés, le CYP450 comprend un groupement prosthétique fer-protoporphyrine IX. L'originalité de cette hémoprotéine réside en la présence en son centre actif, d'un résidu cystéine, proche de l'extrémité carboxylique de la protéine. Par corollaire, le groupement thiol dès lors présent, agit tel un ligand axial vis-à-vis de l'hème. Le thiol modifie la densité électronique du noyau porphyrine et de ce fait crée un centre électronique propice à l'activation de l'oxygène moléculaire. Ce rôle de ligand est repris chez les autres hémoprotéines mammifères par un azote de la fonction imidazole d'une histidine. Largement étudié, le CYP450 est impliqué dans une diversité remarquable de réactions (± 40) et métabolise plus de 1000 substances chimiques. L'extrémité amine de la protéine, riche en acides aminés hydrophobes, est soupçonnée de former un site de liaison de la protéine aux membranes. Bien que distribué dans la plupart des organes (reins, poumons, intestin,...) des concentrations élevées de CYP450 sont constatées dans des tissus tels le foie et l'intestin. Localisé majoritairement dans le réticulum endoplasmique lisse du foie ou de tissus extrahépatiques, et confronté à la variabilité infinie des composés lipophiles auxquels

l'organisme humain est exposé, le CYP450 se montre incapable de présenter un système enzymatique comportant un site spécifique, pour chacun d'eux. Le système CYP450 déjoue la difficulté par une offre large de spécificités et de régio-sélectivités aux substrats : la multiplicité des isoformes (ou isoenzymes) garantit cette adaptabilité d'activité. Une relation certaine existe entre le tissu et l'isoforme présent. Disséminés au niveau hépatique et extra hépatique, ils interagissent vis-à-vis de nombreux composés, même un seul de ceux-ci peut subir l'effet de plusieurs isoformes (Figure 1.3).

TISSUE	MITOCHONDRIA	MICROSOMES
Adrenal Placenta Ovary Testis	Cholesterol Side Chain Cleavage 11 β -Hydroxylation of DOC	21-OH of Progesterone 17 α -OH of Pregnenolone Aromatase
Kidney	1 α -OH of Vitamin D	Omega hydroxylations of fatty acids
Liver and Intestine	27-OH of Cholesterol	Bile Acid Formation Polyunsaturated Fatty Acid Epoxidation Xenobiotic Metabolism N- & O- dealkylations Alcohol Oxidation Alkane & Arene Oxygenation Aromatic hydroxylations

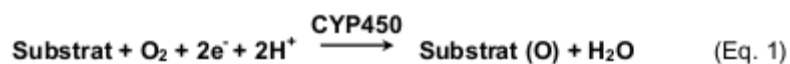
Figure 3 Distribution tissulaire et subcellulaire de quelques isoformes du CYP450 humain et exemples types de réactions catalysées [10].

Responsables au niveau du foie du métabolisme oxydatif majeur catalysé par le système CYP450, les isoformes présentent un polymorphisme génétique important et sont la cause d'une grande variabilité des concentrations plasmatiques pour une même substance thérapeutique entre deux populations ou plus de patients. Un agent chimique pourra lui-même induire l'activité d'un type d'isoforme qui lui est attaché. Au vu de ces caractéristiques, évaluer et prédire le comportement métabolique d'un candidat médicament à l'égard de l'entité CYP450 revêt d'autant plus de pertinence [9, 10].

1.2.2 Cycle catalytique.

De manière générale, le CYP450 est membre d'une classe d'enzymes nommées oxygénases, spécifiquement des monooxygénases ou oxydases multifonctionnelles. Un atome

d'oxygène en provenance du dioxygène s'incorpore au substrat, suivi de la réduction du second atome d'oxygène par deux électrons pour donner de l'eau. L'équation bilan (Eq. 1) décrit cette conversion oxydative d'un composé chimique. Les deux électrons indispensables sont fournis via une flavoprotéine par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Eq. 2).



Comme décrit préalablement, la diversité des isoformes engendre une vaste palette d'oxydations catalysées. Les plus courantes sont des hydroxylations, époxydations, oxydations/déalkylations d'hétéroatome, déhalogénations et oxydations alcooliques. La structure fondamentale commune (Figure 1.4), la fer-protoporphyrine IX liée à une cystéine (5^{ème} ligand) permet un sixième site de coordination, lieu de liaison et d'activation de l'oxygène moléculaire.

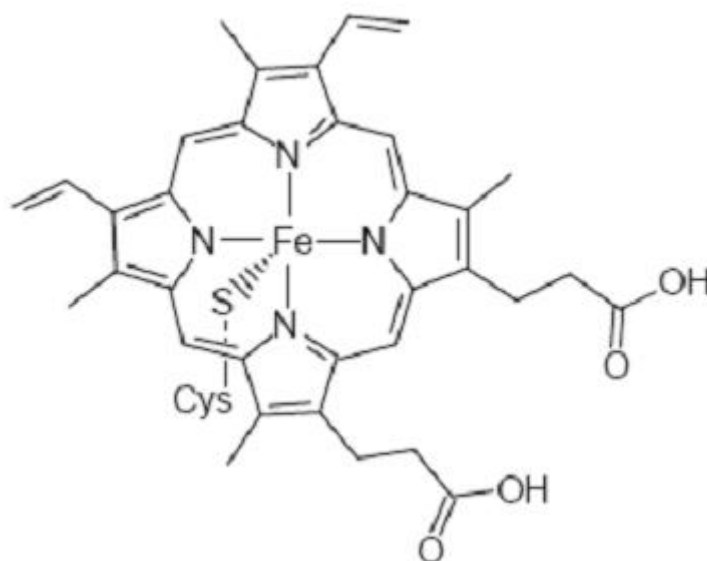


Figure 4 La protoporphyrine IX garnie d'une cystéine en temps que cinquième ligand [13].

Le cycle catalytique du CYP450 est illustré par la Figure 1.5. Au premier stade, l'enzyme s'établit dans une conformation six coordinats à l'état ferrique 1, le sixième ligand est l'eau. Au stade 2 le substrat (R-H) initie le cycle catalytique par son entrée au sein du site actif, déplacement de la molécule d'eau et obtention d'un état ferrique à cinq coordinats. La réduction du fer (III) porte le centre actif à l'état ferreux 3. La réaction entre 3 et le dioxygène donne naissance à un complexe oxyferreux 4a, b. Le second transfert d'un électron

entraîne la formation d'un complexe négativement chargé : le complexe fer (III)-peroxyde 5. Cette étape est considérée comme limitante pour la totalité des catalyses du CYP450. La continuité de celle-ci produit par protonation un complexe hydroperoxyde 6.

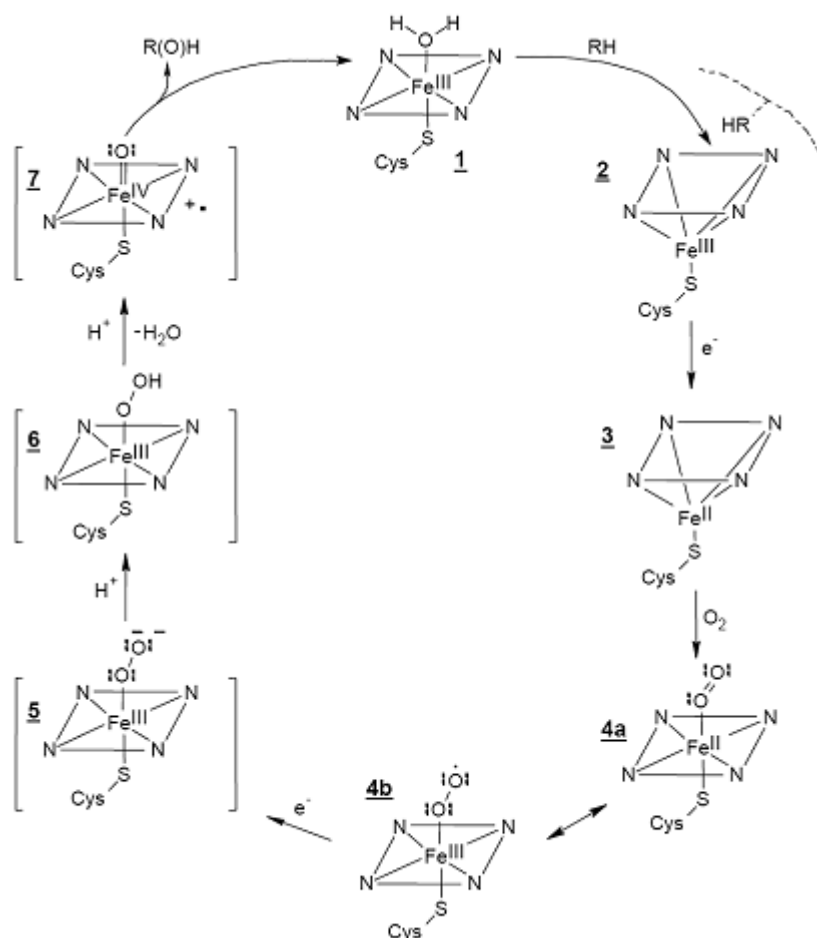


Figure 5 Cycle catalytique du CYP450 [13].

Une seconde protonation et la perte d'une molécule d'eau par clivage de la liaison O-O génèrent une espèce oxygénée électrophile 7 (hautement oxydante probablement responsable de l'activité oxydante du système CYP450) et libération du produit oxydé et de la forme oxydée du cytochrome 1. Enjeu de nombreux débats actuels, ce radical oxo-ferryle 7 stabilisé par un électron fourni par le noyau porphyrine, serait l'intermédiaire actif des multiples mécanismes oxydatifs du CYP450 [13]. Deux étapes clés de ce cycle exigent l'apport de deux électrons (un à un), le premier crée le lien avec l'oxygène, le second clive la molécule de dioxygène. Le transfert d'électrons intervient via des minichaînes transporteuses d'électrons appelées réductases. Différenciées en fonction de leur origine cellulaire, elles permettent l'entrée aux électrons au travers du NADPH (le plus couramment) par action concertée de leurs flavines constitutives [12, 14]

1.3 Principaux modèles biologiques utilisés "in vitro" pour l'étude de la métabolisation des xénobiotiques.

1.3.1 Organe isolé perfusé. [8]

Représentation idéale de la situation *in vivo*, l'organe isolé perfusé n'est jamais mis en œuvre. Extrêmement ardue à mettre en place, cette méthode tombe en désuétude, par une intégrité fonctionnelle courte (3h) et une reproductibilité faible.

1.3.2 Les coupes de foie. [3, 8]

Cette technique dont les prémices datent du début du 20^{ème} siècle, connut voici une quinzaine d'années un vif regain d'intérêt. Les progrès technologiques rendirent possible la production de coupes plus précises, plus fines, plus consistantes et ce avec un trauma cellulaire minimal. L'apparition conjuguée de nouveaux incubateurs de tissus et de meilleurs milieux nourriciers, provoqua son intégration dans l'arsenal des méthodes d'étude du métabolisme médicamenteux. Le monde pharmaceutique dans son entièreté (universités et industries) publia sur ce sujet. D'aucuns constatèrent des différences en terme de prise en charge et d'élimination du substrat entre les coupes de foie et les hépatocytes. La prise en charge ou le métabolisme était généralement moindre dans le cas des coupes de foie. Cette constatation provoqua une diminution de l'intérêt pour l'usage de ce modèle à titre prédictif en pharmacocinétique. Dès le départ lié à la qualité du foie d'origine, les coupes de foie conservent leur activité enzymatique de phase I et II durant 48h, stockées à 4°C. L'affaiblissement de la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le tissu provoque vraisemblablement la diminution de l'activité du CYP450. Quoi qu'il en soit, les coupes de foie demeurent un outil précieux largement usité pour des études de métabolisme de courte durée en vue de l'identification des différents métabolites. La maîtrise concevable des difficultés rencontrées quant aux cultures, stockage et maintien de l'activité enzymatique à plus long terme, offre à cette technique un nouvel essor potentiel par le biais de nouvelles applications actuellement sous évaluation.

1.3.3 Les hépatocytes. [3, 5, 8]

L'utilisation d'hépatocytes (primaires ou de culture) doit sa popularité à leur forte ressemblance avec le foie *in vivo* et à l'élaboration de méthodes de culture cellulaire à haut rendement. Héritiers des coupes de foie, ils possèdent d'identiques caractéristiques en termes de viabilité. L'amélioration de leur conservation par cryogénéisation est sujette à de nombreux travaux et les rend aujourd'hui commercialement disponibles sans perte d'activité enzymatique de phase I et II.

Après décongélation des hépatocytes, les fonctions enzymatiques spécifiquement hépatiques déclinent, l'importance de cet appauvrissement se présente différemment selon l'isoforme envisagé. En vue de contrecarrer cet abaissement, de nombreuses techniques de culture ont été explorées. Par exemple, le maintien en une culture monocouche allonge le temps de vie des hépatocytes à quatre semaines. Le tissu hépatique renferme outre les hépatocytes (80%), des autres cellules (cellules de Kupffer) indispensables au fonctionnement correct des hépatocytes. Leur absence lors de la mise en culture d'hépatocytes seuls provoque une carence en cofacteurs nécessaires et constitue un désavantage majeur de cette méthode. Soumis, à l'instar des coupes de foie, à la qualité du donneur et aux variations interindividuelles, un mélange d'hépatocytes d'origines multiples reproduit une situation médiane.

Parallèlement aux études de métabolisme et des interactions médicament-médicament, de nombreuses publications les citent dans l'étude de l'induction enzymatique hépatique humaine au niveau protéique, mARN et activité enzymatique.

Système <i>in vitro</i>	Exemple de molécules étudiées
Coupes de foie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oméprazole [8] ▪ Chlorzoxazone ▪ Dextrométhorphan [15]
Fractions subcellulaires: microsomes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Métronidazole ▪ Tamoxifène [8] ▪ Naproxène [16]
Fractions subcellulaires: cytosol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Propofol [8] ▪ N-[(2'-diméthylamino)éthyl]acridine-4-carboxamide [17]
Fractions subcellulaires: S9	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rifalazil [8] ▪ Acétaminophène [18]
Hépatocytes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ranitidine ▪ Ketotifène [8]
Enzymes recombinants	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Moclobémide [19] ▪ Erythromycine [20]

Tableau 2 Exemples d'études de métabolisation de molécules menées selon les différents systèmes *in vitro*.

1.3.4 Les fractions subcellulaires. [3, 5, 8]

La notion de fractions cellulaires englobe les microsomes, d'autres organelles cellulaires et homogénat de foie. Les homogénats de foie contiennent l'ensemble des enzymes de phase I et de phase II. Le perfectionnement des techniques de centrifugation autorise la séparation des fractions subcellulaires par centrifugation différentielle.

Les microsomes, vésicules du réticulum endoplasmique hépatique, fournissent une idée réaliste de la métabolisation par le CYP450. Disponibles pour l'étude d'isoformes spécifiques

en présence d'inhibiteurs spécifiques, ils persistent à être d'usage le plus largement répandu dans les études de métabolisme *in vitro*. La dépendance aux variations interindividuelles permet soit des travaux impliquant une activité enzymatique représentative obtenue par l'emploi simultané de microsomes de sources variées, soit l'étude de l'influence de ces variations sur la biotransformation. Leurs principaux avantages sont : (i) facilité de préparation et d'usage, (ii) reproductibilité aisée de leur nature même, (iii) concentration enzymatique et turnover élevés, (iv) stockage et maintenance à long terme sans difficultés et (v) optimisation simple des conditions d'incubation. Une certaine labilité et la nécessité de l'addition de cofacteurs afin d'obtenir une activité optimale se placent dans la colonne des désavantages. Principale conséquence, cet enrichissement de la fraction microsomiale et la non compétition par absence d'autres enzymes, ne rend réalisable aucune détermination quantitative. La fraction cytosolique contient les enzymes solubles de phase II et ne comprend que trois enzymes. Chacune des trois s'exprime séparément en fonction de l'identité du cofacteur exogène ajouté, par ailleurs indispensable.

La fraction S9, réunion des fractions microsomiale et cytosolique, s'utilise de façon principale pour la détection de la mutagénéicité. L'addition de cofacteurs s'avère parfois nécessaire.

1.3.5 Les enzymes recombinants.

Le choix du point de vue le plus réductionniste et l'isolement de l'unité la plus petite possible ouvre une piste pour la compréhension d'un système complexe tel le métabolisme. Les progrès de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui de mettre à disposition du monde scientifique la majorité des isoformes humains. La connaissance sans cesse plus approfondie du cytochrome P450 humain (cfr 2.2) combinée à une grande spécificité obtenue par les enzymes recombinants en font un outil de choix lors des criblages à haut débit, ou lors des études de métabolisme. Cette fonction s'exprime au travers d'applications telles: identifier les interactions substrat/enzyme au niveau du site de liaison (i), déceler l'isoforme responsable du métabolisme pour un composé (ii), synthétiser une quantité accrue de métabolite (iii), caractériser une étape d'un mécanisme métabolique complexe (iv) [5, 9].

D'autres enzymes de phase II tel l'uridine diphosphoglucuronosyl transferase (UGT) sont disponibles et ne peuvent faire l'objet d'aucune omission (et ce pour chacun des systèmes *in vitro* discutés). L'élucidation d'une voie de biotransformation n'est menée à bien qu'au travers de la considération d'une entité globale. Les modèles *in vitro* ne substituent en aucun cas le criblage *in vivo*, ils constituent des tests prédictifs et d'orientation très utiles au chercheur, et contribuent positivement à une meilleure compréhension de la biotransformation des médicaments. Par une sélection plus probante des candidats les plus prometteurs, ils

maximisent l'efficacité des tests *in vivo* [3, 8]. Le tableau 1.3 récapitule les avantages et désavantages des différents modèles *in vitro* couramment utilisés

Système <i>in vitro</i>	Applications	Avantages	Désavantages
Foie isolé et perfusé	<ul style="list-style-type: none"> Etude de sécrétions biliaire Validation 	<ul style="list-style-type: none"> Architecture en trois dimensions 	<ul style="list-style-type: none"> Temps de vie court Reproductibilité faible Disponibilité rare
Coupes de foie	<ul style="list-style-type: none"> Etude d'inhibition 	<ul style="list-style-type: none"> Architecture cellulaire intacte Milieu cellulaire hépatique total 	<ul style="list-style-type: none"> Cellules endommagées sur les faces externes de la tranche Mauvaise pénétration du milieu vers les couches cellulaires internes Temps de vie < 5 jours Besoin d'optimisation de la cryoconservation et de l'équipement coûteux
Fractions subcellulaires: microsomes	<ul style="list-style-type: none"> Etude d'inhibition Identification d'isoenzymes 	<ul style="list-style-type: none"> Usage simple et peu coûteux Très bien caractérisé Situation représentative qualitativement et éventuellement spécifiquement 	<ul style="list-style-type: none"> Aucune évaluation quantitative possible Essentiellement de phase I Nécessité de l'ajout de cofacteurs exogènes
Fractions subcellulaires: cytosol	<ul style="list-style-type: none"> Etude d'inhibition 	<ul style="list-style-type: none"> Concentration élevée des enzymes présents Spécifique en fonction du cofacteur ajouté 	<ul style="list-style-type: none"> Uniquement enzymes de phase II Nécessité de l'ajout de cofacteurs exogènes
Fractions subcellulaires: fraction S8	<ul style="list-style-type: none"> Etude d'inhibition Etude de mutagenécité 	<ul style="list-style-type: none"> Enzymes de phase I et II Possibilité d'étude de spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> Concentrations plus faibles que microsomes et cytosol
Hépatocytes	<ul style="list-style-type: none"> Etude d'inhibition Etude de métabolisme ou d'induction 	<ul style="list-style-type: none"> Très bien caractérisés Cryoconservation Viabilité de quatre semaines Concentrations physiologiques Présence des enzymes de phase III 	<ul style="list-style-type: none"> Isolément difficile et coûteux Isolé du milieu hépatique: manque de cofacteurs Représentative si mélange de donneurs
Enzymes recombinants	<ul style="list-style-type: none"> Etude d'inhibition Identification d'isoenzyme Recherche d'interactions médicament-médicament 	<ul style="list-style-type: none"> Un seul isoenzyme présent Haut degré d'activité 	<ul style="list-style-type: none"> Non représentatif de la situation <i>in vivo</i>

Tableau 3 Comparaison des divers systèmes *in vitro* d'usage courant [8, 12].

1.3.6 La peroxydase de raifort (HRP).

Le système HRP/H₂O₂ est très souvent utilisé comme modèle enzymatique du CYP450 et peroxydases humaines. Une place particulière de notre travail est dévolue à la mise en œuvre de cette enzyme [15-19]. Les peroxydases, mises en évidence au 19^{ème} siècle, s'extraient avec facilité de cellules végétales ou de certains organes ou tissus animaux. Divisées en trois superfamilles, elles comprennent: (i) les peroxydases végétales, (ii) les peroxydases animales et (iii) les catalases, réparties elle-même en classes. La peroxydase de raifort (donneur d'hydrogène, peroxyde oxydoréductase, E.C.1.11.1.7), membre de la classe III ou peroxydases végétales secrétées, s'obtient à l'origine par extraction des racines de la plante de Raifort (*Armoracia rusticana*, Cruciferae), herbe vivace cultivée dans les régions tempérées du globe. Cet enzyme héminique, capable d'oxyder une large gamme de composés organiques ou inorganiques par le truchement du peroxyde d'hydrogène, comporte de nombreux isoenzymes qui tous, catalysent une même réaction biochimique mais se distinguent par leurs particularités physiques, chimiques ou cinétiques. D'un poids moléculaire total d'approximativement 44 kD, l'HRP se compose d'une chaîne polypeptidique de 308 acides aminés, d'un hème ferriprotoporphyrine IX(1) (Figure 1.6), de deux centres métalliques à ion calcium et de structures carbohydratées.

(1) : Porphyrine: entité de nature non polypeptidique, ligand organique cyclique constitué de quatre noyaux pyrrole substitués reliés entre eux et entourant un atome de fer, l'entièreté constitue l'hème. Le fer complexé à quatre azotes peut se coordonner avec deux autres groupes, à placer au-dessus et en dessous du plan du cycle porphyrine. Le système forme un anneau aromatique de dix-huit électrons π délocalisés [20]. Dans le cas de L'HRP, les substituants des pyrroles sont quatre méthyl, deux vinyls et deux propionates [21].

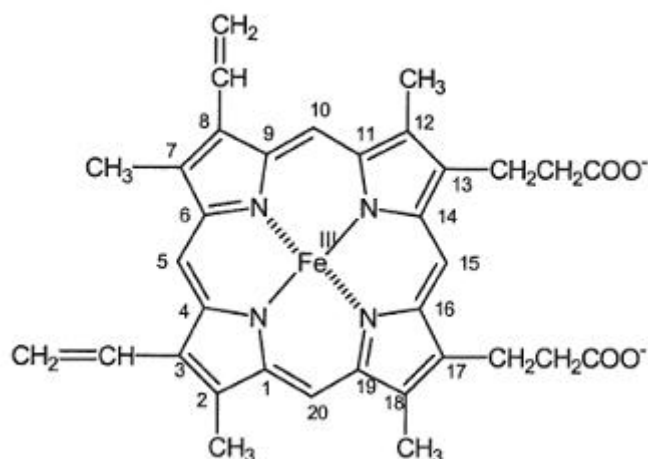


Figure 6 Structure de ferriprotoporphyrine IX de l'HRP [21].

Les deux atomes de calcium, un distal et un proximal, remplissent un rôle essentiel pour la garantie de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la poche héminique. Habituellement, le fer admet six ligands, incorporé dans une structure enzymatique, il forme un complexe à cinq ligands. Les positions 1 à 4 occupées par les quatre azotes des cycles pyrrole établissent un plan. En position 5, située sur l'extrémité proximale de l'hème, se lie le noyau imidazole d'un résidu histidine (His 170). La sixième position, vacante chez l'enzyme natif se localise sur l'extrémité distale.

La poche héminique distale, à l'identique des autres peroxydases, lie de manière covalente l'hème à l' His 170. Formée par les acides aminés Arg 38, Phe 41 et His 42, elle accueille le peroxyde d'hydrogène, et assure le rôle de donneur/accepteur de protons. Un vaste réseau de ponts hydrogène maintient le positionnement correct des résidus clefs.

Un regard plus focalisé sur le site de liaison du substrat nous apprend que les substrats aromatiques, se fixent non pas à l'oxygène ferryl des composés I ou II mais à la face exposée de l'hème (comprise entre les carbones C18 méthylé et C20). Le centre oxo-ferryl caché par l'environnement local peptidique, constitue un bel exemple d'architecture fermée de l'hème. L'organisation de haute adaptabilité des différents acides aminés constitutifs de cette région accomode promptement en vue de l'acceptation d'un substrat. Doté de cette particularité, l'HRP se différencie d'autres enzymes hémiques (ex: CYP450) pour lesquelles des modifications du fer hémique ou des azotes porphyriques se produisent. Par conséquent, l'efficacité de catalyse des réactions de transfert d'oxygène diminue [21, 23, 24]. Proches par une quantité de similarités, les enzymes hémiques se distinguent cependant par de petites différences au voisinage du site actif, sources de dissimilitudes marquées de la réactivité et de la fonction catalytique. Dans chacun des cas, l'intermédiaire actif est le composé I. Ce véritable caméléon biochimique, modifie ses réponses chimiques en fonction de

l'environnement électronique, par le biais d'une variété de groupements, de l'accessibilité du substrat, de son type de liaison... [25]

A l'instar de tous les enzymes, la structure secondaire et tertiaire (2), gardiens de la spécificité et de l'activité de l'HRP peuvent être altérées par des températures et des conditions de pH trop drastiques. Une température supérieure à 45°C entame une partielle déformation de la structure tertiaire. Un pH inférieur à 4,5 ou supérieur à 6,0 affecte la stabilité de la structure secondaire. Ces deux paramètres induisent une dénaturation et la perte des propriétés intrinsèques de l'enzyme; les facteurs du milieu de travail les conditionnent aussi: force ionique, nature et force du tampon, contamination bactérienne, ions métalliques, agents de conservation,... [24, 26]

Sujet d'intensifs et nombreux travaux et/ou applications, la peroxydase de raifort, de la synthèse organique au secteur biomédical, trouve de vastes domaines d'usage. Spécificité de réaction, flexibilité opérationnelle, sensibilité de détection, accès aisé à un coût abordable font de lui, l'enzyme à succès des systèmes analytiques. Son habilité catalytique épouse les profils de nombre modes de détection: spectrophotométrie, fluorescence, chemiluminescence, bioréacteurs... Le fondement même de la réaction (oxydation/réduction) ouvre les portes des procédures analytiques électrochimiques et plus précisément des biocapteurs [21].

(2) : La structure primaire d'une protéine définit la séquence des acides aminés de la chaîne. Les motifs de pliures sous-tendent la structure secondaire, sous forme d'arrangement en feuillets plissés (configuration β) ou en hélice α . Le plissement, l'enroulement, et autres processus d'agrégation aboutissent à la structure tertiaire. La structure quaternaire concerne l'imbriquement de deux protéines en un assemblage plus volumineux [20].

2. Méthodes instrumentales d'identification des métabolites.

2.1 Couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse. [9]

La difficulté majeure réside dans la capacité à identifier diverses espèces chimiques de natures sensiblement différentes, et ce à l'aide d'une méthode générique. Consécutive aux étapes de purification, la chromatographie liquide (CL) figure au nombre des techniques les plus abondamment répandues. Le mode de détection initialement utilisé était l'UV. La complexité des chromatogrammes obtenus couplée à une relativement faible résolution rendait son utilisation ardue. L'avènement de la spectrométrie de masse (SM) couplée à la CL réussit à résoudre ce problème et à fournir des résultats basés sur la masse moléculaire du composé attendu. Lors de tests ultérieurs, suite au passage fructueux des étapes préliminaires d'un composé candidat, elle autorise des évaluations cinétiques et quantitatives des métabolites parents. De nombreuses équipes s'emploient désormais à optimiser le rendement de ces assemblages complexes qui consistent en une série d'étapes successives : incubation enzymatique, injection, séparation, détection, traitement des données, émission du rapport. La mise en œuvre d'échantillonneurs automatiques, la robotisation des procédés d'incubation, et la mise en place de logiciels ultra performants sont des outils d'investigation de plus en plus couramment utilisés dans le secteur pharmaceutique. Des alternatives aux phases d'incubation/séparation sont envisagées, comme par exemple le passage de l'échantillon au travers d'une chambre d'ultrafiltration garnie de microsomes hépatiques et injection en SM. Bien que performante, cette solution reste encore peu adoptée. Les concepteurs de détecteurs SM apportent pas à pas leur contribution à l'essor de l'implication de la SM dans les tests *in vitro* de criblage précoce : la TOF SM fournit en routine et de manière rapide un spectre complet avec plus de sensibilité, de plus les métabolites et les molécules parentes sont détectées simultanément. La mise en place de détecteurs SM capables de gérer parallèlement plusieurs injections accroît le flux d'analyse. Outre la possibilité de placer en tandem deux détecteurs SM, quelques publications relatent l'association chromatographie liquide (CL) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Celle-ci présente l'avantage de définir la structure moléculaire avec plus d'acuité et d'établir la fonction responsable de l'instabilité métabolique. Ce mode de détection se voit limité par des besoins en volume d'échantillons concentrés et purifiés trop inadéquats. Une séparation préparatoire permet de résoudre ces désagréments. Enfin, la commercialisation d'une chaîne CL/RMN/SM concourt à résoudre l'ensemble des préoccupations des chercheurs, mais des interrogations subsistent quant à son implémentation dans une approche de criblage à haut débit.

2.2 Méthodes complémentaires à la CL/SM. [9]

La mise en œuvre des méthodes basée sur la SM dévoile quelques obstacles : (i) inadéquation entre somme des résultats produits et capacité humaine à les interpréter, (ii) coût d'achat, de maintenance et d'entretien élevé. Ces arguments poussent à la recherche d'alternatives. Potentiellement insérables dans une stratégie de criblage à haut débit, celles-ci doivent encore démontrer leur justesse et leur fiabilité. Jusqu'à présent ces nouveautés reposent essentiellement sur la mesure de (i) la consommation d'O₂, ou de H₂O₂, (ii) la diminution de la concentration en cofacteur (NADPH) ou (iii) la production d'espèces oxygénées (tour à tour acteurs clefs ou "coacteurs" de la réaction enzymatique). Ces approches innovatrices suscitent cependant peu d'intérêt pour leur intégration dans un processus à grande échelle.

2.3 Essais d'inhibition enzymatique. [9]

Face à la fréquente co-ingestion de deux composés thérapeutiques et l'exposition subséquente à une interaction croisée, la stabilité métabolique de l'un et de l'autre détermine leur concentration systémique finale respective et par conséquent leur action. Dans la majorité des cas, cette interaction intervient via l'inhibition par l'un des agents pharmaceutiques de l'enzyme responsable de l'élimination de l'autre composé. Parmi le panel de stratégies envisagées en vue d'estimer le potentiel inhibiteur vis-à-vis du CYP450 d'un nouveau candidat médicament, outre la CL/SM évoquée ci-dessus, la fluorescence et le marquage radioisotopique représentent deux démarches supplémentaires. Dans le premier cas, le principe de base repose sur une mesure de l'intensité de la fluorescence du métabolite d'un composé après métabolisation. En présence d'un inhibiteur éventuel, la production moindre de métabolite fluorescent se traduit par une diminution de l'intensité de fluorescence enregistrée, et évalue l'impact de l'inhibition. Consommateur moindre de temps et d'argent en regard des techniques chromatographiques, ce procédé s'adapte particulièrement facilement pour le criblage à haut débit. Quelques sociétés planchent résolument en vue d'apporter sur le marché des produits innovateurs améliorant (i) le rendement de réaction, (ii) la spécificité, (iii) les propriétés intrinsèques de fluorescence (longueur d'onde d'excitation, décroissance de fluorescence), (iv) la solubilité aqueuse et diminuant les interférences causées par le cofacteur (NADPH), les composés testés ou les métabolites. Dans le cas du marquage isotopique, l'évaluation de l'inhibition s'effectue par la détection d'un produit marqué libéré lors de la métabolisation. Ce procédé bénéficie d'une sélectivité et d'un rendement enviables. Toutefois, en raison de l'absolue nécessité de séparer au préalable les métabolites des composés parents (extraction en phase solide), son intérêt pour une éventuelle incorporation

au sein d'un sassement à haut débit est faible. A son instar, la CL/SM rencontre par ses étapes consommatrices de temps (séparation, détection du signal) une difficulté identique.

2.4 L'électrophorèse capillaire.

La prise en compte des remarques ci-avant, justifie le besoin indubitable de techniques analytiques aux performances particulièrement définies en vue d'une intégration en criblage à haut débit: (i) capacité à séparer des mélanges complexes, (ii) temps d'analyse minimal, (iii) exigence en termes de volume d'échantillon réduite et (iv) prédisposition à l'automatisation. Dans cet ordre d'idée, l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), méthode de séparation en plein essor depuis une quinzaine d'années concentre chacun de ces points prépondérants [33]. Son temps d'analyse court, sa souplesse d'adaptation aux conditions opératoires rendent possible pour l'ECZ de séparer conjointement métabolites de phase I et de phase II. La structure moléculaire extrêmement voisine des composés parents des uns et l'état conjugué polaire et thermiquement instable des autres, provoquaient de grosses difficultés de séparation par des méthodes chromatographiques classiques [34]. L'inconvénient majeur de l'ECZ réside en un déficit de sensibilité pour les échantillons de faible concentration, lors de l'usage d'un détecteur spectrophotométrique UV-VIS: la faible longueur du chemin optique parcouru par le rayon lumineux au sein de la cellule de détection (le capillaire lui-même), en est l'origine. Une injection plus conséquente de solution échantillon ne contrecarre que médiocrement la chute de sensibilité et entraîne un élargissement des pics lors de l'élution et une diminution de l'efficacité de séparation [27, 29]. Coupler l'ECZ à d'autres modes de détection (SM, fluorescence, électrochimie) ou l'usage de moyens de préconcentration de l'échantillon (membrane, concentration électrocinétique en tête de zone,...) remédient au manque de sensibilité [27, 29, 30]. Hautement appréciée pour les études de cinématique enzymatique, l'ECZ, outre les qualités déjà énoncées, y apporte un avantage appréciable par la séparation des inhibiteurs (interférents potentiels avec le mode de détection), des réactifs et des produits. Les mélanges d'incubation peuvent comprendre aussi bien des microsomes hépatiques que des enzymes recombinants [31]. Différentes possibilités opératoires s'offrent à l'expérimentateur. Après incubation du mélange substrat/enzyme hors capillaire, l'ensemble subit une préséparation et/ou filtration préalable et ensuite est injecté [31-33]. Il est également envisageable d'introduire le mélange substrat/enzyme directement tel quel dans le capillaire [34]. Ce dernier point ne peut être envisagé en CL [21]. Bien que l'injection et l'incubation "on-line" soient des atouts désirables et indéniables dans l'optique d'un passage vers l'automation et le criblage à haut débit, la présence permanente de l'enzyme durant toute la durée de la séparation, peut altérer la détection du produit de réaction et constituer une dépense inutile d'enzyme vu l'unicité, dans ce cas de figure, de chaque essai. Une solution

séduisante à cet écueil se profile par le placement d'un microréacteur chargé de l'enzyme (ou de micrososome) immobilisé, contigu à l'entrée du capillaire. L'écoulement électroosmotique s'effectue au travers de la matrice. La réaction enzymatique se déroule pendant le passage en son sein du couple coinjecté substrat/coenzyme, suivie par la séparation et l'identification des métabolites. Le dispositif permet cette fois, le réemploi du matériel enzymatique. Les méthodes d'immobilisation, comparables à celles mises en œuvre pour les biocapteurs (point 3.2.4), améliorent la résistance des biomolécules aux pHs faibles, aux solvants organiques, et maintiennent la structure native pendant un délai prolongé, sans perte d'activité protéique. De derniers travaux utilisent la méthode d'immobilisation sol-gel et réduisent, de cette manière, très fortement la consommation d'enzyme et d'échantillon. [34, 35]. D'autres configurations de bioréacteurs existent telles que: membrane chargée d'enzyme (i), cultures d'hépatocytes fixés sur divers supports (ii), micropuces (iii), cellule d'ultra-filtration (iv). Ces systèmes présentent parfois des exigences négatives en terme de volume de solution de travail, un faible rendement productif de métabolites et très souvent sont non couplés en ligne avec la technique de séparation associée. La conception de systèmes réunissant en ligne la génération des métabolites, leur séparation et leur identification, représente actuellement un intense sujet de recherche [33]. Un dernier point fort de l'électrophorèse capillaire réside en sa grande capacité d'adaptation (par rapport à d'autres techniques chromatographiques) en un système multiplexé parallèle. L'usage simultané pour un même échantillon de différents types de tampons de séparation, de capillaires de natures multiples, de conditions expérimentales variées placent l'ECZ en position de choix dans le cadre de travaux d'investigation en criblage précoce à haut débit [36].

3. Apport des méthodes électrochimiques.

3.1 La voltamétrie.

Cette technique regroupe des méthodes électroanalytiques basées sur l'enregistrement du courant en fonction de la tension appliquée dans des conditions favorables à la polarisation de l'électrode de travail. Ce courant est en relation directement proportionnelle avec la concentration de l'espèce étudiée. Distinction est donc faite avec les mesures potentiométriques à courant quasi nul et sans polarisation aucune. La consommation des substances électrochimiquement actives est minime en regard de l'électrogravimétrie ou de la coulométrie. Abondamment usitée afin de fournir des informations de première ligne relatives aux mécanismes des réactions d'oxydation et de réduction, ou aux processus d'adsorption ou aux transferts électroniques, ses potentialités dans le domaine analytique séduisent de nombreux expérimentateurs. Analysé en terme de concentration ou de cinétique, le tracé du courant propose une localisation immédiate des potentiels rédox des espèces en présence, et

une évaluation de l'influence du milieu sur le mécanisme rédox impliqué. Ces aptitudes placent la voltampérométrie parmi les techniques électrochimiques les plus versatiles et les plus largement utilisées [37-39].

3..1.1 La voltamétrie cyclique (VC).

Caractérisée par un balayage linéaire du potentiel de l'électrode stationnaire de travail (balayage triangulaire, Figure 1.7), la voltamétrie cyclique engendre des courants situés entre le nanoampère et le microampère. Selon le type d'informations désiré, un balayage simple ou multiple peut être exécuté. Le tracé du courant en fonction du potentiel appliqué fournit un graphe nommé voltamogramme cyclique. Cette configuration impose à l'expérimentateur de manipuler au sein d'une solution non agitée. Il s'agit à ce moment de distinguer les systèmes réversibles des systèmes dits irréversibles [39, 40].

En présence seule de la forme réduite (Red) à l'initial, les systèmes réversibles (Figure 1.8) répondant à la réaction $\text{Red} \rightleftharpoons \text{Ox} + n e^-$ présentent un maximum caractéristique situé positivement par rapport au E_0 du système (balayage aller). Le potentiostat soumet à tout instant t l'électrode de travail à un potentiel E_t variant linéairement en fonction du temps [Eq. 3].

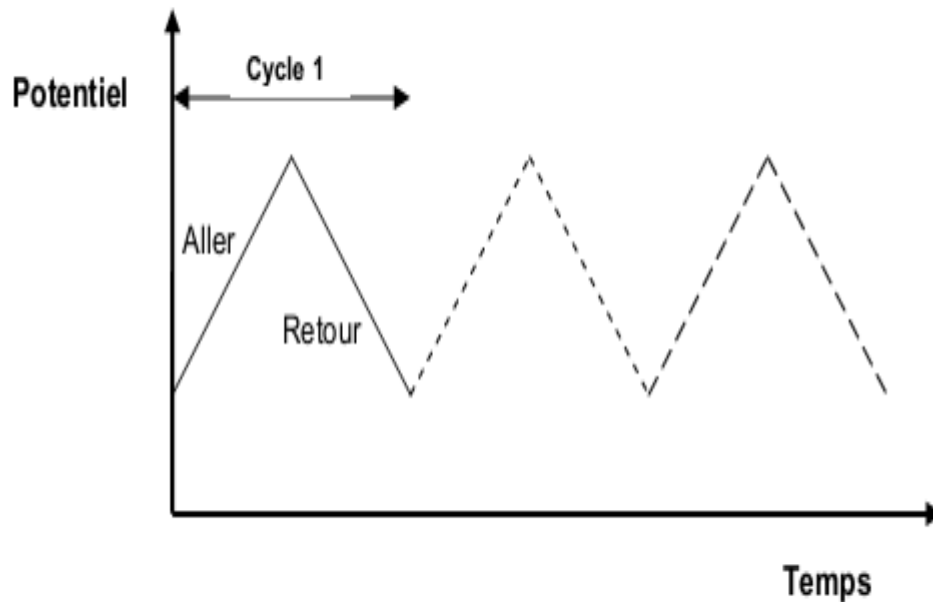


Figure 7 Signal potentiel – temps, voltamétrie cyclique à balayage linéaire.

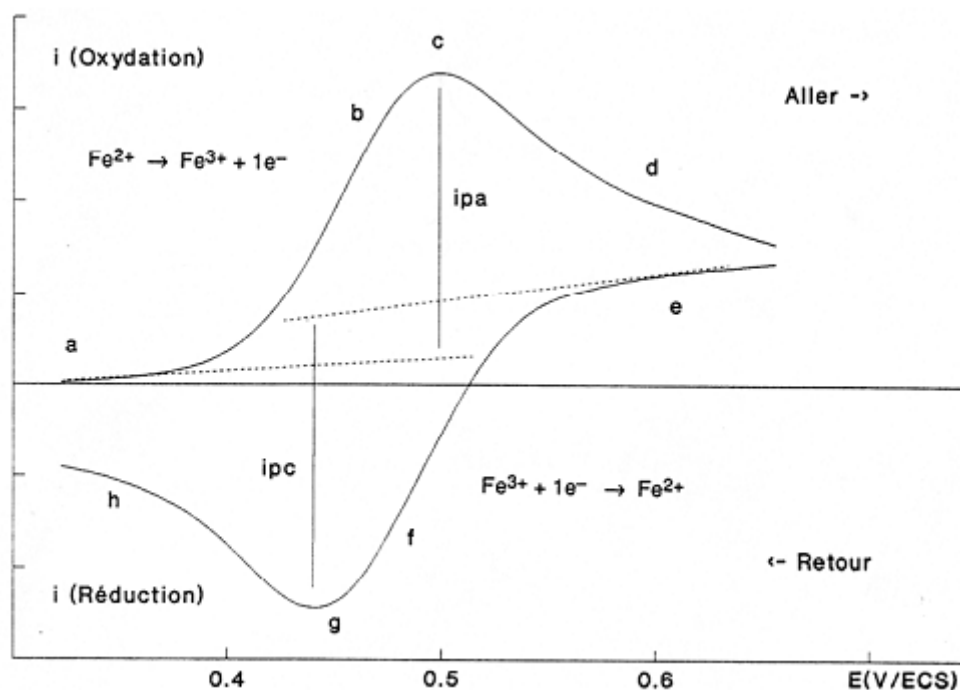


Figure 8 Voltampérométrie cyclique d'un couple réversible (Fe²⁺/Fe³⁺) en milieu H₂SO₄ 1M [40].

$$E_t = E_i + v.t \quad (\text{Eq. 3})$$

E_i : potentiel (V) initial situé dans une zone où aucune réaction d'électrode ne se manifeste (point a).

v : vitesse de balayage (V/s).

Ces systèmes, qualifiés de réversibles, répondent en tout point du voltamogramme à la relation de Nernst (Eq. 4). De ce fait, E_t impose à l'électrode un rapport défini entre les formes réduite et oxydée.

$$E = E_0 - \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_{Red}(0,t)}{C_{Ox}(0,t)} \quad (\text{Eq. 4})$$

E_0 étant le potentiel standard du couple rédox, R la constante des gaz (8.314 JK⁻¹mol⁻¹), T la température exprimée en Kelvin, n le nombre d'électrons échangés, et F la constante de Faraday (96487 coulombs).

Lorsque les coefficients de diffusion (D) des deux formes s'égalisent, les concentrations en réducteur et oxydant sont identiques. A ce moment $E = E_{1/2}$, il est appelé potentiel de demi-vague et correspond au courant égal à la moitié de sa valeur limite (point b). En relation avec le potentiel rédox standard, il est parfois utilisé pour identifier des composés (Eq. 5).

$$E'_0 = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \sqrt{\frac{D_{Red}}{D_{Ox}}} \quad (\text{Eq. 5})$$

L'origine du maximum provient de la diminution de la concentration en réducteur à la surface de l'électrode lorsque l'on se déplace vers les potentiels plus positifs, jusqu'au moment où elle s'annule. Au-delà de ce potentiel, le courant devient indépendant du potentiel

et ne dépend plus que du temps (points a, b, c et d). Le courant est corrélé quantitativement à la vitesse de transport de Red de la frontière externe de la couche de diffusion vers la surface de l'électrode. Seule une fonction tabulée ($\chi\sigma t$) permet de relier le courant i aux paramètres expérimentaux (Eq. 6).

$$i = n.F.A.C_{Red} \cdot \sqrt{\pi.D_{Red} \cdot \sigma \cdot \chi\sigma t} \quad (\text{Eq. 6})$$

i = courant (Ampères), n = nombre d'électrons échangés, A = surface de l'électrode (cm²), C_{Red} = concentration en Red (mol/cm³), D_{Red} = coefficient de diffusion (cm²/s), $\sigma = (nF / RT) \cdot v$, v = vitesse de balayage (V/s), $F / RT = 1/0.0259$ (V⁻¹) à 25°C.

Au potentiel E_{pa} , indépendamment de la vitesse de balayage et dans le cas de l'oxydation, le courant de pic anodique i_{pa} répond à la relation (Eq. 7).

$$i_{pa} = 0,4463.n.A.C_{Red} \cdot \sqrt{\frac{nF}{RT} \cdot D_{Red} \cdot v} \quad (\text{Eq. 7})$$

Il peut aussi s'exprimer selon l'équation de Randles-Sevcik (Eq. 8).

$$i_{pa} = 2,69.10^5 \cdot \sqrt{n^2} \cdot A.C_{Red} \cdot \sqrt{D_{Red} \cdot v} \quad (\text{Eq. 8})$$

Pour v constant, et en l'absence de phénomène d'adsorption, le courant de pic i_{pa} est une fonction linéaire de la concentration et fournit une information analytique quantitative. L'équation 8 souligne la relation linéaire entre le rapport i_{pa} / C_{Red} et la racine carrée de la vitesse de balayage. Dans le cas de systèmes réversibles et contrôlés par la diffusion de l'espèce électroactive.

Durant le balayage retour, et ce à partir d'un potentiel E_{max} préalablement choisi, le potentiel revient à E_i , mu par une vitesse de balayage similaire. Le tracé présentera un second pic issu de la réduction de l'espèce oxydée produite à l'aller et encore présente dans la couche de diffusion. La loi de Nernst préside toujours à l'établissement des valeurs de potentiel (points e, f, g, et h). D'autres paramètres viennent corroborer la réversibilité du système électrochimique.

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 2,303 \cdot \frac{RT}{nF} = \frac{0,059}{n} V \quad \text{à } 25^\circ C.$$

Le nombre d'électrons échangés est déterminé à l'aide de cette valeur.

$$E'_0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

La moyenne des potentiels de pics représente le potentiel rédox E'_0 du couple étudié. Information analytique qualitative.

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1$$

Le rapport des courants anodique et cathodique équivaut à un.

Dans le cas d'une réaction $\text{Red} \rightleftharpoons \text{Ox} + n e^-$ à la surface d'une électrode pour un système irréversible (transfert d'électrons lent), l'équation de Nernst n'est plus applicable. Le courant croît de manière exponentielle en fonction du potentiel et du temps (balayage aller). Par l'accroissement des potentiels, le courant augmente et un processus de diffusion se met en place. De manière comparable au premier cas, la concentration en réducteur s'annule à un moment t , la diffusion contrôle le courant. La courbe courant-potentiel présente un maximum E_{pa} situé plus positivement que E_0 . Le balayage retour, n'enregistre aucune réduction de l'oxydant formé, le voltamogramme ne possède pas de composante dans cette zone (Figure 1.9). A l'aller comme au retour, pour tout potentiel situé au-delà du pic, le courant est contrôlé par la diffusion. Le courant de pic i_{pa} pour v constant est une fonction linéaire de la concentration [39, 40].

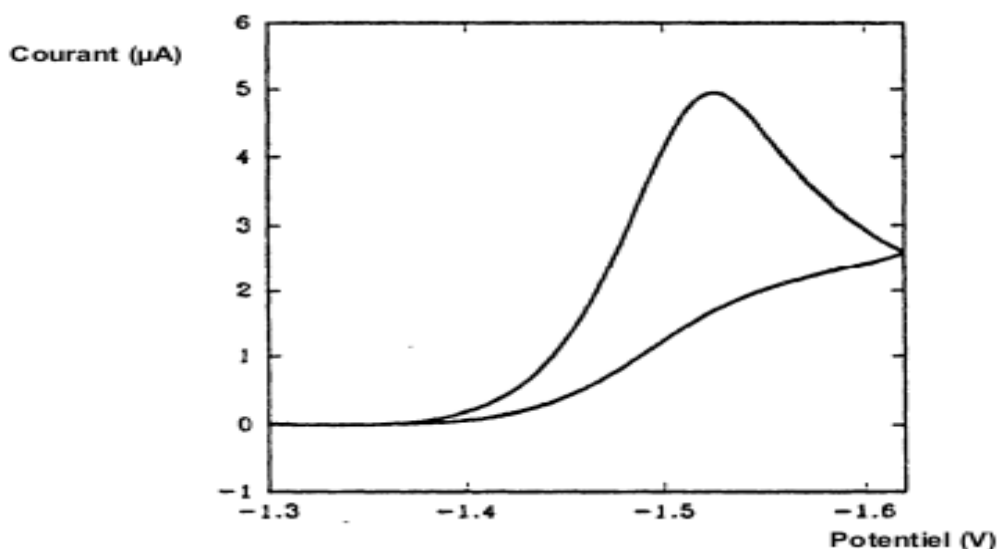


Figure 9 Voltampérogramme type d'un système irréversible [40].

3.1.2 La voltamétrie hydrodynamique.

Deuxième subdivision parmi les voltampérométries, le mode hydrodynamique diffère du fait du maintien de la solution sous une agitation constante. Différentes configurations techniques existent : cellule sous agitation, électrodes tournantes, analyse par injection dans un flux (AIF) ou CL. Le point crucial des phénomènes observés réside en l'apport du réactif à la surface de l'électrode. Celui-ci, comme dans l'ensemble des méthodes voltamétriques, est régi par trois mécanismes :

La migration, la convection et la diffusion. Migration et convection sont minimisées respectivement par l'ajout en excès d'un électrolyte de support et une agitation permanente.

L'apport de l'analyte par convection et le maintien de la couche de diffusion constante procurent des courants limites plus grands que dans le cas de la VC (Eq. 9) [38, 39].

$$i_l = \frac{n.F.A.D_{Ox}.c_{Ox}}{\delta} \quad (\text{Eq. 9})$$

I = courant limite (Ampères), n = nombre de moles d'électrons par mole d'analyte, F = le faraday, A = aire de l'électrode (cm²), D = coefficient de diffusion (cm²/s), c = concentration (mole/ cm³), δ = épaisseur de la couche de diffusion de Nernst (cm).

Proche de la VC, par son approche à la fois quantitative et qualitative, la voltamétrie hydrodynamique (VH) s'utilise aussi, au travers de la mise en place de différentes cellules en série intégrées au sein de systèmes en flux (AIF, CL) (Figure 1.10). Chacune d'elles est maintenue à un potentiel défini. Les courants obtenus, au contraire de la VC, sont indépendants du courant de charge, et par là même, plus représentatifs du processus de transfert d'électron(s) en jeu. D'une bonne reproductibilité et robustesse, les voltamogrammes hydrodynamiques obtenus avec des électrodes en série offrent une source fiable de données thermodynamiques et cinétiques relatives à la réaction de transfert d'électrons (Figure 1.11). Outre l'exploitation de l'aspect quantitatif largement répandu, la VH avec cellules en série, rend compte du potentiel rédox relatif et permet de prédire la stabilité rédox d'un produit donné. D'autres moyens de détection (UV, SM) peuvent être montés en parallèle dans divers dispositifs chromatographiques ou non. En addition des résultats obtenus par d'autres méthodes (résonance magnétique nucléaire (RMN), CL-SM,...) et usage croisé des bases de données, cette technique voit son utilité grandir au niveau des étapes les plus précoces en recherche et développement pharmaceutiques [41-43].

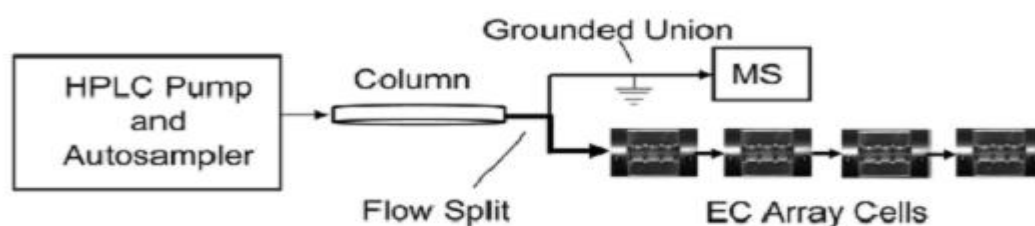


Figure 10 Système CL avec détection parallèle par SM et cellules électrochimiques en série [43].

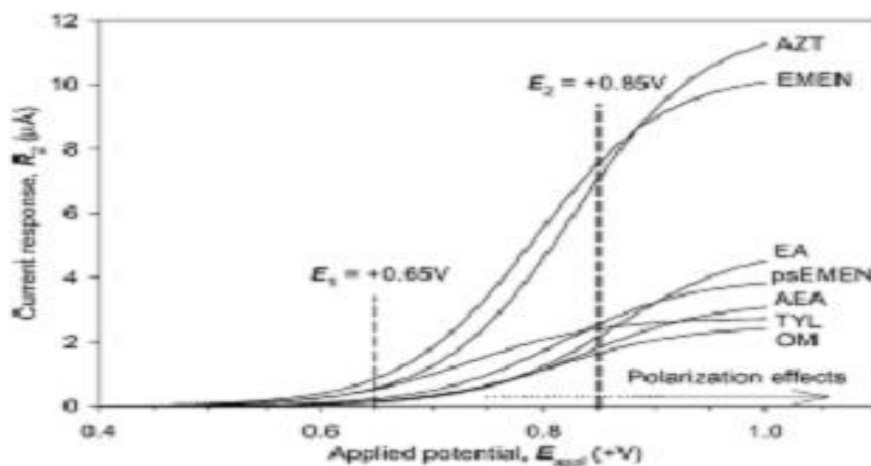


Figure 11 Voltampérogramme hydrodynamique typique obtenu au moyen de cellules électrochimiques en série [44].

Les phénomènes d'oxydation et de réduction profondément impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (cfr CYP450), dans l'apparition de toxicités (génération d'espèces réactives), dans la manifestation physiopathologique de maladies (stress oxydatif), dans l'instabilité chimique (dégradation oxydative) ou plus positivement comme agent thérapeutique (agents anticancéreux par bioréduction), constituent de tout évidence un nœud clef dans la vie de tout être vivant [41, 45]. La voltamétrie cyclique par sa facilité de mise en œuvre, sa rapidité d'exécution et son coût réduit, procure quantité de résultats directement exploitables. Ses atouts éveillent l'attention de la recherche moderne, inlassablement à l'affût de toute stratégie qui puisse aider ou/et faciliter la prise de décision au sujet d'un candidat médicament et ce le plus précocement possible. La VC accepte l'usage d'une vaste gamme de matériaux au niveau de l'électrode de travail, en adéquation avec l'analyte étudié. La surface de ces électrodes indicatrices, généralement petite, peut être renouvelée aisément et de manière reproductible. Les mesures produites (qualitatives et quantitatives) rencontrent par conséquent les souhaits de reproductibilité, justesse et précision. Une sensibilité parfois un peu faible et un domaine d'application restreint aux molécules électroactives lui est toutefois reprochée [46-50].

La voltamétrie cyclique par son exploration fondamentale du comportement rédox d'un système donné, s'ouvre les portes de nombreux domaines d'investigations:

- développement pharmaceutique ;
- industrie agro-alimentaire ;
- analyse clinique ;
- environnement ;

Le nombre d'applications possibles s'en trouve élargi sans cesse :

- Elle peut intervenir à différents stades du développement pharmaceutique : études de stabilité, identification prédictive de métabolites [41, 43], formulation galénique [51, 52]. Le mimétisme d'un point de vue électrochimique entre métabolisme et VC répond avec opportunisme au concept « ressemblance au médicament » en vogue dans les unités de recherche.
- Elle permet l'étude de la capacité antioxydante de divers composés naturels ou non. Les antioxydants, nouvelles molécules de grand intérêt tant du point de vue scientifique que commercial de notre mode de vie moderne, suscitent de nombreuses investigations. Évaluer leur *capacité antioxydante* totale, leur mode d'action, leur implication, leur gain en terme de prophylaxie, constitue nombre de sujets de recherche. Dans le cas par exemple des antioxydants de faible poids moléculaire, groupe majeur du système de défense antioxydante physiologique, quelques équipes utilisent en routine la VC afin d'établir leur présence et de quantifier leur capacité antioxydante. La corrélation établie entre le pouvoir réducteur et l'activité antioxydante permet une approche rationnelle de l'évaluation de ce paramètre par la VC. Par l'analyse de la vague voltamétrique, la VC fournit à l'expérimentateur deux types d'informations: le potentiel du pic d'oxydation et la valeur du courant associé à ce pic. Le potentiel de pic d'oxydation permet l'estimation de la propension du composé à se comporter comme un donneur d'électrons c'est-à-dire comme un agent réducteur. L'intensité du courant évalue sa concentration et le nombre d'électrons échangés par molécule électroactive. Remarquons également à ce stade, la possibilité offerte par la VC d'identifier au sein d'un mélange, via la valeur du potentiel de pic d'oxydation, les divers éléments constitutifs. En outre, il est communément admis pour les composés phénoliques (par exemple), que la valeur du potentiel de pic d'oxydation, de par la similitude entre les réactions de formation de radicaux libres



procure une idée approximative du pouvoir antiradicalaire du composé considéré. La VC fournit aussi des informations thermodynamiques, cinétiques quant au devenir électrochimique du couple rédox étudié [45-47, 49, 53-58].

- Par l'évaluation de la facilité au transfert d'électrons présentée par les molécules, ou la génération et l'identification d'intermédiaires réactionnels, la VC se montre apte à l'élucidation de mécanismes rédox et l'établissement de relations structure-

activité. Elle permet la mise en évidence des sites responsables de l'activité pharmacologique de l'agent thérapeutique et une meilleure compréhension de son comportement *in vivo* [59-62].

- La VC se montre également d'un apport précieux lors de la détermination de paramètres de cinétique enzymatique de biocapteurs enzymatiques en vue d'apprécier les apports bénéfiques de l'utilisation de médiateurs, de modifications structurales du site actif de l'enzyme ou d'un procédé d'immobilisation particulier [63-65].
- Elle fournit indirectement des informations quant à l'état des défenses antioxydantes naturelles ou évalue d'éventuels effets secondaires engendrés par un traitement ou encore estime le niveau de stress cutané causé par l'exposition aux irradiations UV [45, 48, 49, 66].
- Elle peut participer au contrôle analytique de formes pharmaceutiques.
- Enfin elle autorise l'identification et l'élucidation du comportement oxydatif de nombreux composés électroactifs [67-69].

Bien qu'inexorablement cantonnée au domaine des molécules électrochimiquement actives, la VC s'applique tant aux molécules endogènes qu'exogènes. D'un apport limité pour la détermination de structures moléculaires mais constamment en évolution [53], elle possède un rôle complémentaire important parmi la batterie de techniques analytiques habituellement présentes. [43, 49, 70]

3.2 Les Capteurs électrochimiques

3.2.1 Introduction.

De manière générale, un capteur chimique permet la transformation d'une information chimique en un signal analytique exploitable. Fondamentalement, il contient un système de reconnaissance chimique nommé récepteur et un transducteur physico-chimique (Figure 1.12). Dans le cas particulier où le mécanisme de reconnaissance fait intervenir un système biochimique, nous parlerons de biocapteur. Idéalement, le récepteur confère au biocapteur un haut degré de sélectivité vis-à-vis de l'analyte recherché. Selon les recommandations IUPAC, un biocapteur est une entité intégrée, souvent petite, apte à procurer une information analytique qualitative ou semi quantitative sélective à partir d'un élément de reconnaissance biologique (récepteur) en contact spatial direct avec un élément transducteur [71].

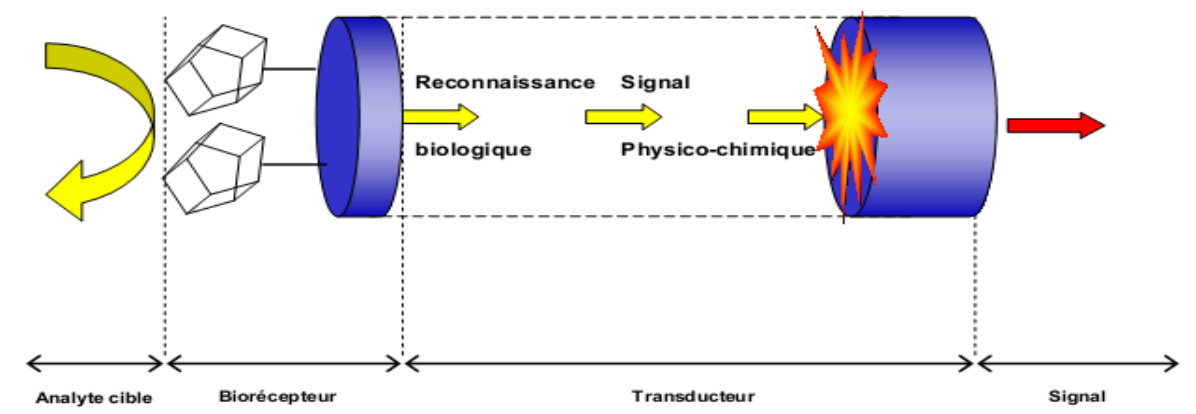


Figure 12 Schéma général d'un biocapteur.

3.2.2 La reconnaissance biologique.

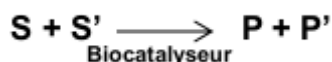
Distinguer les biocapteurs en fonction de la nature du biorécepteur est un mode de classification largement utilisé. On parle essentiellement de deux classes.

(i) Capteur à composante biocatalytique.

Le récepteur est dans ce cas une macromolécule dans son environnement d'origine, ou isolée, ou synthétisée. Elle engendre une consommation continue du substrat. Nous dénombrons trois types de catalyseurs :

- Les enzymes : seul ou multiples, système le plus répandu.
- Les cellules : complètes (microorganismes) ou organites cellulaires.
- Les tissus : coupe de tissu végétal ou animal.

Les plus étudiés et les plus développés, et ce depuis 1962 par Clark et al., ces biocapteurs sont gouvernés par une réaction générale de base du type :



Possibilité existe de suivre le devenir du substrat S selon quatre stratégies (Figure 1.13) :

- Détection de la consommation du cosubstrat S', l'oxygène par exemple. (a)
- Détection d'un des produits de réaction (P), le peroxyde d'hydrogène par exemple. (a)
- Utilisation d'un *médiateur*, sa haute réactivité vis-à-vis du biocatalyseur et sa détection aisée par le transducteur concourent à l'élimination de la dépendance au cosubstrat ou aux interférences d'autres espèces. Cela se traduit par un plus haut taux de réaction atteint. Le médiateur, molécule relativement petite, par ses propriétés électrochimiques intrinsèques, engendre des réactions électrochimiques rapides. En interaction avec le centre rédox de l'enzyme ou avec un produit de réaction, il est régénéré totalement après un cycle complet. (b)

- Transfert direct d'électrons entre le centre actif de l'enzyme et le transducteur. Une faible fraction d'enzymes possède cette caractéristique. (c)

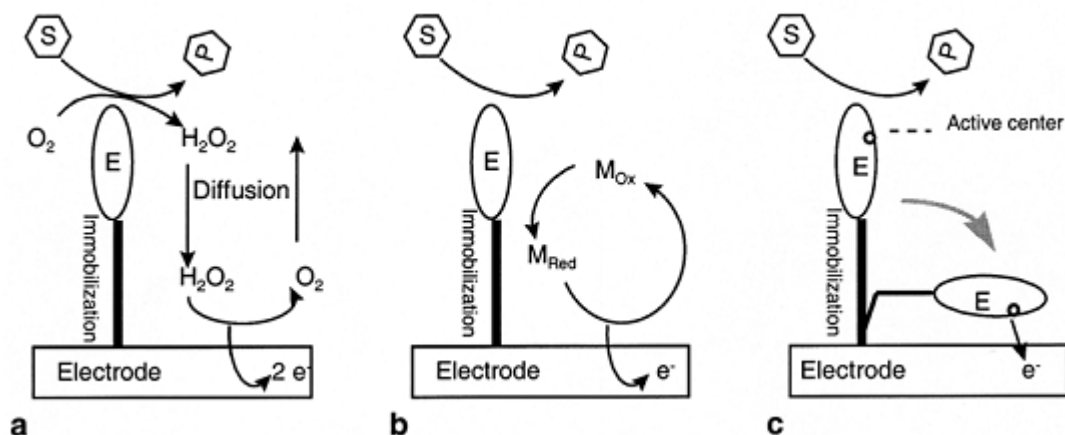


Figure 13 Illustration des différentes possibilités de transmission de l'information chimique entre le biorécepteur et le transducteur (électrode). S = substrat, P = produit et E = enzyme [24]

Les dernières évolutions en vue d'améliorer les performances des biocapteurs proposent l'emploi simultané d'enzymes et ce, selon trois schémas :

- Cascade enzymatique engendrant un produit final électroactif.
- Disposition en série: les enzymes régénèrent le cosubstrat du premier enzyme et atteignent l'amplification du signal par régénération d'un autre cosubstrat du premier enzyme.
- Positionnement des enzymes en parallèle afin d'augmenter la sélectivité par appauvrissement local d'un interférent.

(ii) Biocapteurs d'affinité.

Dans cette situation, la reconnaissance est assurée par un ensemble organisé de macromolécules, isolé ou reconstruit artificiellement. L'interaction réversible entre le biorécepteur et sa cible se déroule sans aucune consommation d'analyte, se caractérise généralement par un état d'équilibre stoechiométrique, et la détection des changements physicochimiques engendrés par un transducteur approprié. Le phénomène de reconnaissance se décline sous trois formes :

- Interaction anticorps/antigène, basé sur une réaction immunochimique. Les biorécepteurs peuvent être couplés avec un enzyme chargé de mesurer la quantité de complexe formé et de là accroître la sensibilité. Par les constantes d'affinité souvent très grandes, ils sont à usage unique.

- Récepteur membranaire/agoniste/antagoniste, repose sur une affinité sélective pour un site de nature protéique. Aucun enzyme adjacent n'est nécessaire pour obtenir la sensibilité désirée.
- Hybridation d'oligonucléotides, elle se détecte soit par intercalation d'une molécule électroactive pendant la formation de l'ADN double brins, soit par exploitation directe des propriétés électrochimiques de la guanine, ou d'éventuelles modifications électriques à l'interface transducteur/solution. Développés dans une moindre mesure en comparaison des biocapteurs basés sur la biocatalyse, les biocapteurs gouvernés par les phénomènes de biocomplexation sont aujourd'hui source d'intenses et nombreux progrès. Les difficultés majeures se situent initialement au niveau des faibles fenêtres de linéarité qu'ils présentent et de leur difficulté à opérer de manière sélective en milieu complexe [24, 71, 72].

3.2.3 Les transducteurs.

Éléments physico-chimiques en charge de la conversion du stimulus biologique en un signal électrique amplifié par un réseau électronique, les transducteurs peuvent être de diverses natures : électrode, fibre optique, cristal piézo-électrique, quartz, thermistor...

3.2.3.1 Les transducteurs électrochimiques.

Les électrodes d'or, de platine, de carbone vitreux, ou de graphite conviennent pour différentes techniques électrochimiques. La plus commune est l'ampérométrie, combinée fréquemment aux biorécepteurs biocatalytiques. Nous évoquerons aussi brièvement la potentiométrie, la conductométrie, la mesure d'impédance et la chronoampérométrie. La nature du transducteur détermine fondamentalement le mode de détection.

Détection ampérométrique.

L'ampérométrie repose classiquement sur la mesure d'un courant résultant de l'oxydation ou de la réduction d'une espèce électroactive. Opérée dans un système conventionnel à trois électrodes (*électrode indicatrice, de référence et auxiliaire*), un potentiel constant est imposé à l'électrode de travail à l'aide d'un potentiostat. Le courant mesuré est en relation directe avec la concentration dans le milieu de l'espèce impliquée ou de sa production ou de sa consommation. Réalisée en mode hydrodynamique (AIF ou batch), l'ampérométrie, associée à une réaction biocatalytique d'ordre un, atteint un état de régime stationnaire et non d'équilibre. Le courant généré, idéalement soumis au transfert de masse est proportionnel à la concentration de l'analyte cible [24, 39, 71].

Détection potentiométrique.

En potentiométrie, l'information quant à la composition de l'échantillon est obtenue par la mesure de la différence de potentiel entre une électrode indicatrice et une électrode de référence et ce à courant nul. La réponse est proportionnelle au logarithme de l'activité de la molécule étudiée (Eq. 10), reflet d'une situation très proche de l'équilibre.

$$E = K + \frac{2,303.R.T}{z_i.F} \cdot \log(a_i + k_{ij} a_j^{\frac{z_i}{z_j}}) \quad (\text{Eq. 10})$$

E est le potentiel, z_i et a_i sont respectivement la charge ionique et l'activité ionique de l'espèce i . La constante K dépend de plusieurs facteurs, influencés par la conception même du biocapteur. Cette équation de Nikolskii-Eisenman aborde le cas pratique où l'électrode ne répond pas exclusivement à une espèce donnée. Elle tient compte des agents interférents via le coefficient de sélectivité (k_{ij}), mesure quantitative de l'habileté de l'électrode à discriminer [24, 39].

Transistors sélectifs à effet de champ.

Application particulière des MOSFETs (metal ion silicon field effect transistor), les ISFETs (ion selective field effect transistor) possèdent les bénéfices suivants :

- Une formidable robustesse et durabilité, les milieux les plus complexes et/ou agressifs peuvent être abordés sans obstacle. Leur nettoyage est simple et ne pose aucune difficulté.
- Une conservation (stockage) indéfinie à sec, et une exigence de maintenance très faible.
- Une applicabilité possible dans une large gamme de températures et par corollaire une stérilisation éventuelle en vue d'applications biologiques, médicales, et pharmaceutiques.
- Une influence minime de l'erreur acide ou alcaline dans les valeurs de pH extrêmes.
- Une réponse très rapide, très sensible, une miniaturisation possible (micro-puces), un volume d'échantillon requis faible, une insertion « on line » ou en mode batch éventuelle, une impédance électrique faible, un coût peu élevé.

Très appréciés pour leur surface en SiO_2 garnie de silanols libres, qui peut accueillir par liaison covalente des molécules organiques ou des polymères, les ISFETs réalisent leurs mesures par mode différentiel. La différence de signal est enregistrée entre un IFSET recouvert du biorécepteur (biocatalytique ou de bioaffinité) et un second IFSET de référence. L'inconvénient majeur réside en la dérive non négligeable du signal au cours du temps [24, 38, 71, 73].

Détection conductimétrique.

Les biocapteurs conductimétriques consistent en deux fils de platine ou d'or entre lesquelles le biorécepteur est immobilisé. Le signal, également différentiel, apparaît lors d'un changement de conductivité entre les électrodes. Très influencés par la conductivité du milieu ionique environnant, leur performance est variable et les résultats imprévisibles [24].

Détection par impédance.

L'impédance du système est mesurée suite à l'application d'une tension sinusoïdale à l'électrode. L'impédance Z en série est la conjonction de la résistance R et de la capacité C comme le décrit l'équation (Eq. 11).

$$Z_s = R_s - \frac{i}{\omega \cdot C_s} \quad (\text{Eq. 11})$$

i est l'unité dans le complexe plan, ω la fréquence du courant appliqué.

Cette mesure se fonde sur l'analogie possible entre une cellule électrochimique et un circuit électrique. Elle sera l'instrument de choix pour l'étude de paramètres cinétiques, aussi bien pour les électrodes nues que dans le cas de biocapteurs multicouches [24]. Récemment, est apparu une nouvelle génération de transducteurs, axés sur la seule mesure de la capacité. Toute modification de l'interface métal/solution mène à un changement de capacité. Dédiés à des besoins spéciaux, ils autorisent : (i) la détermination de l'épaisseur de la membrane, (ii) l'investigation des processus de formation de la membrane, (iii) l'étude de tout type de biorécepteur, (iv) la détection et la quantification de petites molécules à de faibles concentrations [72].

Détection chronoampérométrique.

Une première étape a pour but d'accumuler le produit de réaction, sous agitation. Après arrêt de celle-ci, un potentiel adéquat tel que la réaction faradaïque puisse avoir lieu est imposé. Le courant résultant est enregistré en fonction du temps [24].

3.2.3.2 Autres transducteurs.

Par la focalisation axée sur l'étude de transducteurs électrochimiques de notre travail, nous aborderons de manière très succincte les autres transducteurs utilisés dans les biocapteurs.

Optiques.

En constante évolution, ces biocapteurs sont très amplement associés aux fibres optiques. Nous distinguons deux catégories : les intrinsèques et les extrinsèques. La fibre optique joue deux rôles dans le premier cas: transducteur et conducteur de la lumière transmise. Les

altérations des propriétés de propagation de la lumière provoquées par des modifications (température, pression) correspondent au paramètre observé et mesuré. Dans le second concept, le transducteur est fixé à l'extrémité de la fibre, qui tient uniquement lieu de transporteur d'onde. Les biocapteurs optiques démontrent quelques points positifs : (i) la non nécessité de contact intime entre le biorécepteur et la fibre optique, permet des stratégies non invasives, (ii) analyse possible sur de faibles volumes d'échantillon (μL), (iii) aucune électrode de référence n'est requise, (iv) possibilité de détection simultanée à plusieurs longueurs d'onde, (v) aucune interférence du bruit électrique. Par contre, certaines limitations restreignent leur usage : (i) bruit de fond causé par la lumière ambiante, (ii) domaine de linéarité réduit, (iii) la relation négative entre la taille du volume d'échantillon et l'intensité du signal limite la miniaturisation, qui elle-même affecte le temps de réponse. De nombreuses méthodes spectrales sont combinées aux biocapteurs optiques. Parmi les plus classiques, se trouvent la spectrophotométrie d'absorption, la réflexion, la fluorescence, la chimiluminescence,... Certaines dernières avancées suggèrent l'utilisation de l'infrarouge (IR) ou du proche infrarouge (NIR) ou également de la spectroscopie Raman.

La résonance plasmonique de surface (SPR) jette au début des années nonante les bases de nouveaux biocapteurs optiques. Ce phénomène optique est basé sur la modification de l'angle de réflexion pour une valeur minimale de l'intensité d'un rayonnement lumineux réfléchi à une interface composée d'un film métallique mince, garni de l'élément de biorecognition, au contact de la solution expérimentale cible. Les biocapteurs optiques, surtout associés aux biorécepteurs d'affinité, sont aptes à évaluer une réaction biospécifique au plan qualitatif et quantitatif, et ce en temps réel. Appréciables pour les études cinétiques, ils supportent leur usage dans des échantillons bruts, malgré une détection difficile des concentrations très basses. Vu la valeur très élevée des constantes de liaison des biorécepteurs fixés à leur surface, un usage unique est préconisé. Ces biocapteurs connaissent un important succès commercial dans le secteur pharmaceutique [74-77].

En plein essor dans le champ de la chimie analytique, l'électrochimiluminescence (ECL) apporte de nouvelles perspectives. Son principe, repose sur la mesure de la fluorescence d'un composé généré électrochimiquement (Figure 1.14). L'absence de lumière d'excitation (peu de bruit de fond) la rend extrêmement sensible et ce, dans un domaine de linéarité large et à de faibles concentrations. Offrant un contrôle spatial accru de la détection de la réaction biosélective, accessible à une vaste gamme de composés, l'ECL par sa génération *in situ* rend réalisable la détection instantanée d'espèces instables. Deux molécules sont particulièrement utilisées en tant qu'agent électrochimiluminescent : un complexe de ruthénium (tris(2,2'-bipyridine)ruthéniumII ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) et le luminol. La réactivité intense de ce dernier avec le

peroxyde d'hydrogène consent à un fonctionnement en synergie avec des enzymes. L'ECL en voie de miniaturisation, trouve aujourd'hui des applications sans distinction de type de biocapteurs [24, 78]

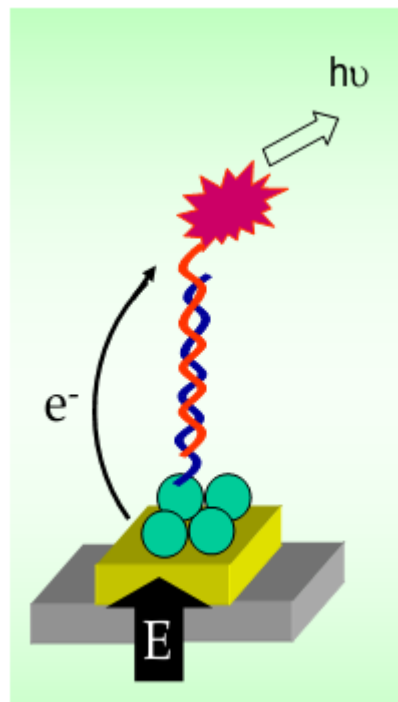


Figure 14 : Génération d'un signal fluorescent par électrochimiluminescence

Piézoélectriques ou acoustiques.

Récemment développée dans le champ spécifique des biocapteurs d'affinité, la détection acoustique combine quelques aspects très attractifs: réponse en temps réel (i), non nécessité de marquage (ii), simplicité (iii), commodité (iv), possibilité de multiplexage (v). Le phénomène piézoélectrique intervient du fait de l'apparition d'un potentiel électrique à la surface d'un cristal si celui-ci subit la moindre déformation mécanique. De même, ce cristal placé dans un champ électrique oscillant, acquiert une fréquence de vibration identique. Tout changement de masse (Δm) intervenu à la surface du cristal entraîne une diminution proportionnelle de sa fréquence de vibration (ΔF). Cette relation linéaire s'exprime quantitativement par l'équation de Sauerbrey (Eq 12).

$$\Delta F = - \frac{2F_0^2}{\sqrt{\mu_Q \cdot \rho_Q}} \cdot \frac{\Delta m}{A} \quad (\text{Eq.12})$$

F_0 représente la fréquence fondamentale, A la surface géométrique, μ_Q et ρ_Q respectivement, le mode de cisaillement et la densité du cristal piézoélectrique.

De nombreux matériaux font montre de propriétés piézoélectriques, le plus communément utilisé en vue d'applications analytiques est le quartz. Hier cantonnés à l'analyse en phase gazeuse où ils atteignent une sensibilité à l'échelle du femtogramme, les biocapteurs acoustiques obtiennent actuellement des performances en solution d'une sensibilité appréciable (ng). Rendue possible par l'amélioration des circuits électriques mis en place et l'usage d'une seule surface du cristal de quartz, cette augmentation de sensibilité intervient de par l'appréciation accrue des variations des propriétés interfaciales (par exemple: densité, viscosité, conductivité, constante diélectrique) biorécepteur/solution conséquentes à la formation du complexe d'affinité ligand/récepteur. La détection moléculaire réalisée par les biocapteurs piézoélectriques, via le simple dépôt d'une couche ou d'une molécule de biorecognition à la surface du cristal, leur ouvre les portes vers de nombreuses opportunités d'application au sein de domaines aussi vastes que l'environnement, l'agroalimentaire et médicopharmaceutique [24, 72, 79, 80].

Thermiques ou calorimétriques.

La réaction enzyme/substrat est classiquement exothermique. Par mesure différentielle d'un couple de thermistors, il est possible d'évaluer les changements de température lors de la réaction enzyme/substrat. Adaptable à quantité de substances, mais sujet à la dissipation rapide de la chaleur et à un bruit de fond thermique gênant, la sensibilité de ce biocapteur reste insatisfaisante [24, 75, 78].

Magnétiques.

Jeune catégorie de la thématique biocapteurs, les transducteurs à propriétés magnétiques pourraient apporter une réponse aux soucis posés en général par la conception de biocapteurs: sensibilité, spécificité, facilité d'emploi, efficacité, coût et intervention humaine minimale. Différents phénomènes magnétiques sous-tendent la détection du signal de biorecognition. La perméabilité magnétique relative (μ_r), constante spécifique d'un matériel, mesure sa capacité à retenir ou à contribuer à un champ magnétique externe imposé. Les matériaux aux valeurs de μ_r très élevées ($\gg \gg 1$), ou les matrices les contenant sont nommés ferromagnétiques. Le passage d'un composé ferromagnétique au sein d'une tubulure en serpentin confère une inductance à la spirale. Tout changement détecté de l'inductance traduit une modification des propriétés ferromagnétiques, due par exemple à la fixation d'un élément. Très peu influencée par la matrice échantillon, et sans risque d'encrassement de la surface du transducteur, la méthode montre une sensibilité unique aux substances ferromagnétiques. Les inconvénients proviennent de la préparation laborieuse des composants ferromagnétiques et des interférences créées par le bruit électronique environnant [81]. La transposition d'effets magnétiques directement tirés de la technologie informatique surmonte les défauts majeurs

des premiers biocapteurs magnétiques: basse sensibilité, taille et surconsommation énergétique. L'un d'eux est l'effet de magnéto-résistivité et équivaut à l'induction d'un changement de la résistivité d'un matériau par un champ magnétique. En pratique, des microbilles marquées de la cible ou de l'espèce passent dans le giron d'un transducteur magnétique garni de biomolécules complémentaires ou non-complémentaires. Les microbilles provoquent un changement de la résistance du transducteur. Un lavage approprié élimine les microbilles non liées, le signal résiduel et/ou persistant témoigne du succès de l'interaction. Les transducteurs magnétiques conviennent idéalement pour des interactions d'affinité et participent activement au développement d'immunocapteurs et de puces à ADN [82, 83].

3.2.4 Techniques d'immobilisation

Par référence à la définition d'un biocapteur, l'élément biologique doit être intimement connecté au transducteur. Pour atteindre ce but, une étape cruciale de la conception d'un biocapteur constitue l'immobilisation de l'élément de reconnaissance biologique en une fine couche à la surface du transducteur [24]. Ce point critique et inévitable doit respecter l'intégrité physique et chimique du biorécepteur choisi. La difficulté de l'immobilisation enzymatique perdure, bien qu'abondamment documentée. Les enzymes, très onéreux quant au coût de leur extraction et de leur purification, montrent parfois une fragilité de leur structure, lorsque isolés de leur environnement naturel. Conserver un enzyme le plus proche de ses spécificités initiales en solution et donc le plus efficient possible, telle est la gageure demandée à l'immobilisation. Par mimétisme de situations *in vivo*, dans lesquelles les enzymes sont amarrés à la membrane cellulaire, l'objectif recherché est de stabiliser leur structure et leur activité. Le concept biocapteur autorise la récupération de l'enzyme, l'usage multiple ou en routine. L'obtention des conditions optimales d'immobilisation passe indubitablement par une étape empirique de mise au point, par tentatives fructueuses ou infructueuses successives. Quoi qu'il en soit, les performances de l'enzyme immobilisé sont altérées, l'activité souvent affaiblie et les paramètres cinétiques modifiés. Un support, judicieusement choisi, amenuise ces effets. Aucun support universel idéal n'est connu; le matériau candidat à l'immobilisation, d'origine organique ou inorganique, naturelle ou synthétique, doit répondre à des caractéristiques souhaitées [84] :

- Haute affinité aux protéines.
- Groupes fonctionnels disponibles pour des réactions directes avec les enzymes ou modifications chimiques.
- Hydrophilie
- Stabilité mécanique et rigidité.
- Aptitude à la régénération.

- Facilité de préparation dans diverses configurations géométriques, perméabilité, disponibilité de la surface pour des biotransformations subséquentes.
- Toxicité et biocompatibilité.
- Biodégradable, économique.

L'ensemble des procédures communément employées est subdivisé en deux sous-groupes : physiques et chimiques (Figure 1.15).

L'innovation dans le domaine des techniques d'immobilisation représente une des conditions "sine qua non" à l'amélioration permanente des performances des biocapteurs, s'ils veulent répondre aux défis posés par les échantillons complexes (environnementaux ou cliniques) [74].

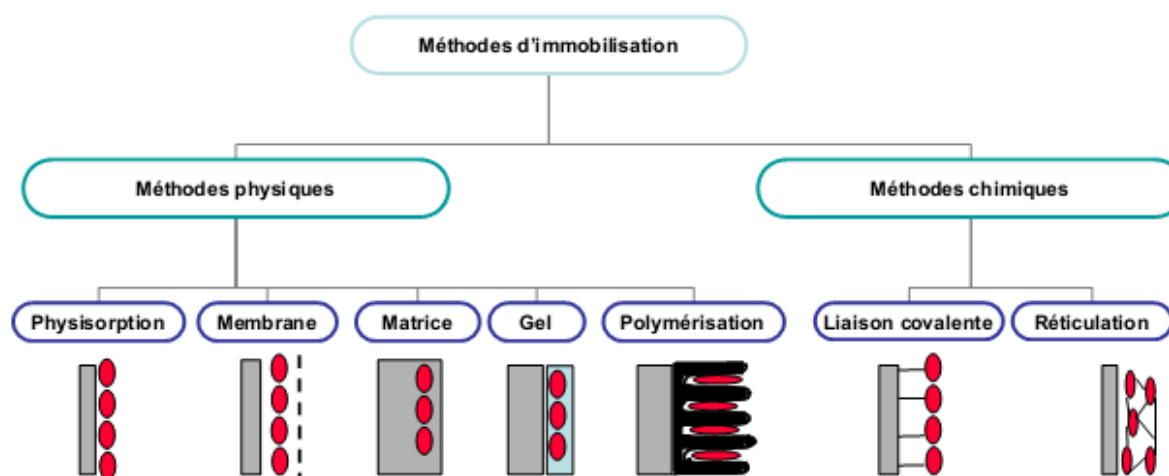


Figure 15 : Diagramme des méthodes d'immobilisation.

3.2.4.1 Méthodes physiques.

L'immobilisation physique laisse le biorécepteur intact, mais la faiblesse de la liaison (forces de Van der Waals) peut entraîner une perte de biorécepteur et une sensibilité élevée aux paramètres physico-chimiques (t° , pH,...).

La physisorption.

L'adsorption a lieu sur un support insoluble par liaisons ioniques, polaires, ponts hydrogènes, hydrophobiques, interactions d'électrons π , forces de Vanderwaals ou une combinaison de ces effets. La nature du support est d'origine variable : inorganique (verre, quartz, graphite,...), macromolécules biologiques (cellulose, amidon, dextran,...), échangeurs d'ions (amberlite, carboxyméthylcellulose,...), polymères synthétiques (collodion, polyacrylamide,...) [24, 78].

Piégeage à l'aide d'une membrane.

Cette technique pionnière, décrite par Clark et al. en 1962 pour la réalisation du premier biocapteur au glucose, consiste à emprisonner à l'aide d'une membrane semi-perméable, une fraction de solution d'enzyme, de suspension de cellules ou de tissu en un film mince à la surface du transducteur. Si le processus de diffusion au travers de la membrane (sécurisée par un O-ring) est dépendant de la concentration, une relation linéaire peut s'instaurer entre la concentration et les courants générés. Cette méthode maintient le matériel enzymatique en solution, source d'instabilité et de perte d'activité. Ceci est son principal inconvénient. Le choix de la nature de la membrane (acétate de cellulose, polycarbonate,...) est prépondérant dans le cas de biocapteurs implantables, en vue d'assurer la biocompatibilité [24, 78, 85].

Inclusion dans une matrice.

Par mélange d'un conducteur électrique (métal, graphite, carbone vitreux) et d'un composé non conducteur insoluble (agent liant), liquide (Nujol, huile de silicone, paraffine liquide) ou solide à température ambiante (époxy, silicone, paraffine solide), une matrice dite hétérogène est obtenue. L'inclusion du matériel biocatalytique se fait à hauteur de 5% (m/m) mais n'excédera jamais les 10% (m/m), afin d'éviter toute altération de la conductivité et de la stabilité de l'électrode. Incorporé sous forme lyophilisée, l'enzyme, si ajouté en trop grande quantité, provoque un gonflement et une érosion de la surface de l'électrode accompagnés de fluctuations du bruit de fond. En opération, ce type de biocapteur fraîchement préparé, voit son signal décroître. La cause réside en une libération des composants hydrophiles (enzyme et médiateur si présent) de la surface vers la solution. Cet inconvénient peut être minimisé par la pose d'une membrane de dialyse [86]. L'agent liant détermine le rythme auquel la stabilisation est obtenue et la valeur du signal résiduel. Les plus connues, à base de graphite, sont nommées pâtes de carbone. Utilisées pour l'inclusion d'enzymes, de cellules ou de tissus, elles interviennent aussi en qualité de transducteur ou de support de physisorption. Extrêmement faciles de préparation, par simple mélange des constituants, une homogénéisation optimale de la pâte assure une bonne reproductibilité. Le renouvellement de la surface, également aisé, par simple grattage et polissage constitue un autre attrait [24]. Des travaux antérieurs de notre laboratoire sur les pâtes de carbone ont démontré l'effet et l'incidence du type d'agent liant sur les caractères des pâtes. Ces résultats ont démontré l'effet bénéfique de l'incorporation de paraffine solide en lieu et place de la paraffine liquide exhibant des caractéristiques électroanalytiques et mécaniques améliorées. Le terme d'électrode à pâte de carbone solide (EPCs) est dès lors usité [87, 88]. Le remplacement de la pâte de carbone par un agent liant type époxy ou téflon résout le problème d'érosion évoqué

plus haut. Cette famille d'électrodes dites composites, plus résistantes à une usure mécanique, augmente la stabilité du courant de base. De même, la présence d'un solvant organique n'affecte pas leurs performances. Aptes à accueillir tout type d'enzyme, elles ont la préférence pour l'incorporation dans un système en flux (CL, AIF). A nouveau, immédiatement après la mise en opération, une diminution du signal apparaît par l'effet de largage partiel de l'enzyme. L'addition de microparticules métalliques (Pt, Pd, Ir, Rh, Ru) dans la matrice (agent liant liquide ou solide) apporte un effet catalytique vis-à-vis du comportement électrochimique du peroxyde d'hydrogène, ces électrodes sont dites composites consolidées [24].

Ces dernières années, un autre agent liant a connu un vif intérêt de la part des électrochimistes, les argiles. De nature inorganique, deux classes majeures d'argiles existent : les cationiques avec des couches d'aluminosilicate chargées négativement et les anioniques, couches hydroxydes chargées positivement. La neutralité du matériau est assurée par des ions (cations, anions) propres au type d'argile et situés dans les espaces intercouches. Particulièrement opportunes pour le développement de biocapteurs enzymatiques, les argiles facilitent le transfert électronique hétérogène de la protéine à la surface de l'électrode. Par interactions électrostatiques, elles positionneraient la protéine dans une orientation spatiale propice à une réaction rédox hétérogène rapide avec l'électrode. Dans le cas d'enzymes héminiques, le groupement électroactif (hème Fe(III)/Fe(II)) n'est pas affecté par l'interaction protéine/argile, celles-ci conservent leur structure d'origine [89].

La chitine, polyaminosaccharide naturel, abondant et renouvelable à la surface du globe, dont le monomère est la N-acétyl-D-glucosamine, forme une longue chaîne polymérique insoluble dans l'eau et les solvants organiques. Associée à des sels minéraux (ex:CaCO₃) et des protéines, elle est l'unité structurelle des coquilles de crustacés, de l'exosquelette des insectes ou des cellules de champignons. Principal dérivé de la chitine, le chitosan, copolymère de N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine, s'obtient par N-déacétylation en présence d'un alcali (NaOH par exemple). Tous deux ont fait l'objet de nombreuses attentions dans un passé récent pour la rétention de biocomposés sous forme de gels. Depuis peu, par l'usage de l'électrodéposition, l'épaisseur du film membranaire de chitosan à la surface du biocapteur jouit d'un meilleur contrôle. Le biorécepteur choisi (enzyme, cellule, antigène, anticorps), par addition des agents appropriés, se voit présenter divers modes d'immobilisation: adsorption, inclusion, réticulation ou liaison covalente. Connu pour ses indications thérapeutiques ou applications médicales et industrielles, le chitosan, nouvel outil d'immobilisation, détient les atouts requis pour cet usage additionnés de biocompatibilité,

biodégradabilité. Il favorise l'élaboration de biocapteurs sophistiqués, et implantables en milieu biologique [84, 90-92].

En constante évolution, les schémas d'immobilisation proposent dernièrement la gélification du chitosan par la technique sol-gel; des gels hybrides chitosan-organosilane sont obtenus par ajout d'agents de silylation ((CH₃O)₃Si-R-NH₂,...), variante supplémentaire de l'exploitation de la technologie sol-gel. Ce processus simple de préparation bâtit à température ambiante une matrice d'inclusion de protéines. L'hydrolyse en milieu acide de précurseurs organiques de faible poids moléculaire (tetraméthoxysilane, tétraéthoxysilane) en présence d'eau et d'un solvant mutuel, provoque la formation de groupements silanols (Si-OH) qui, par condensations successives donnent naissance en premier lieu à des siloxanes (Si-O-Si), en second lieu à des polymères de siloxanes suivis de l'apparition d'une suspension colloïdale (sol) ou éventuellement d'un gel. Une étape finale de séchage (définie "état sec" ou xérogel), débarrasse le réseau poreux des molécules de solvants (Figure 1.16).

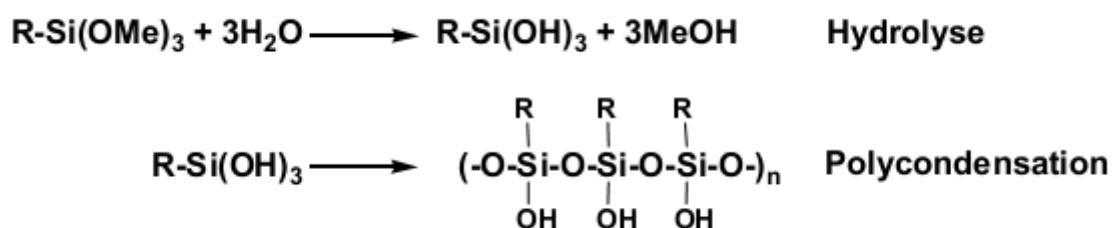


Figure 16 : Etapes de la préparation (1. hydrolyse, 2. polycondensation) d'un sol-gel.

Ces biocéramiques dérivés du verre, incorporent l'élément de biorecognition au mélange durant la croissance du sol ou du gel. Un réseau tridimensionnel de polymères de siloxane poreux emprisonne le biorécepteur. Non dénués d'avantages (simplicité de préparation, à basse température, choix de porosité, inertie chimique, transparence optique, faible gonflement, et stabilité mécanique et thermique), ces matériaux s'appliquent tout d'abord aux biocapteurs optiques. L'intégration de graphite dans la solution initiale de sol-gel ouvre le chemin des biocapteurs électrochimiques. Piégée dans la masse de ce nouveau conducteur, l'activité enzymatique (ou autre) se voit amplifiée par l'usage de médiateurs ou par la dispersion de particules métalliques (Pd, Au) par augmentation de la conductivité [93, 94].

D'autres groupes de travail rapportent l'adjonction d'oxydes métalliques (Nb₂O₅) au sol-gel pour le renforcement des qualités citées ci-dessus [95]. La fonctionnalisation des précurseurs organiques engagés dans la réaction de polymérisation crée une nouvelle catégorie de sol-gel: les ormosils. Modifiés par des groupes amino, glycidoxy, epoxy-hydroxyl, etc, ils

permettent des sites de liaison spécifique à l'enzyme dans le lacis, proposent une réelle conservation de l'activité du biocatalyseur et un contrôle judicieux de la balance hydrophile/lipophile. Le signal électrochimique s'amplifie considérablement par l'insertion d'agents de porosité (PEG, polyvinylalcool) et de conducteurs (graphite, Pd, Ru) [93]. Un film sol-gel/copolymère d'alcool polyvinylique et de 4-vinyl pyridine, hybride organique-inorganique, allie la rigidité des films sol-gel et la biocompatibilité des hydrogels et gomme leurs imperfections respectives: craquellement et gonflement [74]. La gélatine enrichie d'oxydes métalliques (SnO₂) a également été préconisée pour former des matrices sol-gel biocompatibles et moins en proie au craquelures et combinant les qualités des deux matériaux [96].

Souci permanent, le transfert direct d'électrons entre deux centres rédox dépend essentiellement de trois facteurs: (a) la rigidité structurelle du composé rédox dans sa forme oxydée ou réduite d'un point de vue énergétique, (b) la différence de potentiel entre les deux centres rédox, (c) la distance les séparant. Une stratégie d'amointrissement de celle-ci consiste en l'ajout de centres rédox relais, qui mis bout à bout procèdent, telle une cascade, entre les deux potentiels rédox respectifs. La synthèse d'hydrogels à partir de monomères modifiés par un médiateur rédox par liaison covalente propose deux avantages: non modification de la protéine enzymatique elle-même par les médiateurs envisagés et polymérisation réalisée dans les conditions optimales. Ces "hydrogels rédox" greffés par soit des complexes d'osmium ou soit des unités ferrocène, montrent un taux extraordinaire de transfert d'électrons mais demeurent limités par la profondeur d'enfouissement du site actif de l'enzyme et la distance du transfert d'électrons. Bien que quelques applications miniaturisées aient vu le jour, ce type de biocapteur repose sur une procédure de confection principalement manuelle, réel obstacle à une diminution d'échelle plus poussée et à la production de masse [97].

De nombreuses équipes se sont dirigées vers l'immobilisation par *électropolymérisation*. Les films électropolymérisés, à l'inverse des gels ne souffrent pas d'un manque de reproductibilité et d'un dépôt non spatialement contrôlé. La conception de la pellicule polymérique, d'épaisseur contrôlée, s'avère être un modèle de reproductibilité. Cette démarche élégante procède par génération du film organique uniforme à la surface d'une électrode de travail soumise à un potentiel judicieusement choisi et plongée dans une solution aqueuse du monomère et du biorécepteur. Qualifiée "non manuelle", cette méthode piège en une monocouche les biomolécules situées dans le voisinage immédiat de la surface de l'électrode et par conséquent incorporées dans le polymère en croissance. Le tissage d'un véritable réseau polymérique confère une sélectivité aux interférences basées sur un effet d'exclusion par la

taille. Aucune réaction chimique n'affecte le biorécepteur, ni ne modifie son activité ou son accès; remarquons l'accessibilité de la technique à tout type de biorécepteur. Un contrôle étroit de l'épaisseur du film s'effectue par une mesure de la charge électrique délivrée durant la polymérisation. Cette opération, localement précise, n'oppose aucun refus à se dérouler sur des surfaces d'électrode très petites et de géométrie complexe et dans des volumes réduits de solution. Les polymères divisés en deux groupes, comprennent les conducteurs (polyacétylène, polythiophène, polyaniline, polyindole, polythionine et polypyrrole) et les non conducteurs (polyphénols, poly(ortho-phénylènediamine, poly (dichlorophénolindophénol), poly(1,3-diaminobenzène), polypyrrole suroxydé). Les pellicules de polymères conducteurs, sous accroissement surveillé, montrent une épaisseur variable selon les desiderata. A l'inverse, les non conducteurs (isolants) présentent habituellement une couche de polymère mince, moins en proie à l'encrassement mais jointe à un temps de réponse très rapide et une perméabilité sélective [24, 97-100]. Inertes chimiquement, les polymères non conducteurs se génèrent avec une haute reproductibilité et préviennent des interférences anioniques par une porosité sélective [98, 101].

L'étape de transduction se manifeste fréquemment en tant qu'étape limitante de pauvre sélectivité. Dans le but de l'accroître, l'établissement de communications électriques supplémentaires favorise la conductivité par insertion de médiateurs rédox dans la masse polymérique. Cette tentative ponctuée de résultats insatisfaisants, pour cause d'instabilité opérationnelle ouvrit la voie aux monomères fonctionnalisés: une première génération ne donna pas satisfaction, la seconde par greffe de médiateurs (ferrocène, viologène) sur des monomères amphiphiles et exploitation de leurs propriétés constitue une manière idéale "d'électrification" des biocapteurs [97, 98].

Certaines équipes rapportent l'usage avantageux de biocapteurs équipés de couches successives d'un polymère conducteur et d'hydrogel, cumul des atouts de l'un et de l'autre [97, 102].

A peine âgée de dix ans, une nouvelle technique d'immobilisation acquiert une large notoriété. Basée sur l'adsorption alternée de couches de charge opposée, cette innovation, nommée film couche à couche (layer by layer), procure des assemblages entre 5 et 500nm. A l'aide d'instruments simples, selon une séquence préétablie de monocouches de substances variées, la génération de ce film moléculaire organisé se déroule sur divers supports solides. Lames porte objet, tranches fines de silicone, fibres optiques donnent un nanoassemblage deux dimensions; les micro ou nano gabarits en latex, les microcristaux de médicaments, les cellules biologiques ou même les virus produisent des architectures en trois dimensions. Les forces entre nano particules et les couches lieuses, gouvernent l'autoassemblage spontané

couche à couche de ces films ultrafins. Initialement électrostatiques et covalentes, ces forces n'excluent pas l'implication d'interactions de type ponts hydrogènes, hydrophobiques ou autre. Les propriétés finales de l'ensemble autoassemblé dépendent du choix des "blocs" constitutifs et de leur intégration mutuelle et organisation rationnelle le long d'un axe perpendiculaire au support réceptacle.

Ce concept séduisant, sans restriction dans le choix des polyélectrolytes, autorise la construction de films ultrafins avec une précision d'au moins un nanomètre et de compositions parfaitement connue. Economiques, leur adaptation à une production à grande échelle de dispositifs de haute qualité est envisageable [103-105].

La volonté d'assurer à l'élément de biorecognition un espace propice à sa stabilité et son expression, dirige vers l'utilisation de la structure primitivement la plus naturelle: les membranes bilipidiques (BLM). L'inclusion de biomolécules y jouit d'un milieu naturel, en comparaison de toutes les autres matrices d'immobilisation. Ces structures sont assez fragiles et connaissent relativement peu d'applications en routine [106-111].

Cantonnés aux seules solutions aqueuses pour éviter toute dénaturation protéique, la mise en œuvre de biocapteurs enzymatiques en phase organique se développe depuis une dizaine d'années. Basée sur la polyhydroxy-cellulose, la production de matrices cryohydrogel, organohydrogel autorise le fonctionnement de biocapteurs en phase organique strictement anhydre. Les cryohydrogels retiennent dans leur réseau des molécules d'eau qui assurent à l'enzyme son activité par le microenvironnement aqueux procuré [74, 98]. L'inclusion d'enzymes par microencapsulation appartient également à l'arsenal des techniques d'immobilisation, soit par coacervation d'un polymère soit par l'électropolymérisation de microcapsules. L'enzyme emprisonné ne diffuse pas au travers de la paroi, à l'inverse des substrats et des produits de réaction [24, 98].

3.2.4.2 Méthodes chimiques.

Ce type d'immobilisation implique la formation d'une liaison irréversible entre une fonction organique d'un acide aminé affleurant à la surface de la coque externe des protéines (non impliqué dans l'activité catalytique) et un groupe réactif d'un agent d'immobilisation ou du support. Les liaisons covalentes, le plus fréquemment, se tiennent avec les groupes α - et ε -amino, le cycle phénol de la tyrosine, les groupes β - et γ - carboxyle, les groupes sulfhydryle de la cystéine, le groupe hydroxyle de la sérine et le noyau imidazole de l'histidine.

La réticulation.

L'intervention d'agents bifonctionnels provoque l'insolubilisation des protéines par la formation de liens intermoléculaires. Les agents bifonctionnels sont répartis en deux groupes: les homobifonctionnels (glutaraldéhyde, acide bisdiazobenzidine-2,2'-disulfonique, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrodiphényl sulfone, chlorure de phénol-2,4-disulfonyle, 3-méthoxydiphénylméthane-4,4'-diisocyanate, etc) et les hétérobifonctionnels (trichloro-o-triazine, 3-méthoxydiphényl méthane-4,4' -diisocyanate,etc). Par réaction simple avec les amines libres de l'enveloppe extérieure, ils créent un réseau quasi-cristallin, de haute masse relative, de propriétés physiques connues. Le problème majeur réside en la sensibilité des protéines à ces agents de couplage, et en la perte partielle ou totale de leur activité qui s'ensuit. Le mélange concomitant et la coréticulation avec d'autres protéines inertes (ex: albumine sérique bovine) tendent à amoindrir les phénomènes de dénaturation par dilution et contribue à la stabilisation de l'ensemble (Figure 1.17). Le coréticulat s'intègre par mélange intime à une matrice inerte (ex: ***pâte de carbone solide***) ou se dépose directement à surface solide du transducteur. Cette dernière solution rencontre plus avantageusement les contraintes de stabilité et de reproductibilité lorsque la taille du biocapteur impose le dépôt immédiat sur le transducteur [24, 71, 78, 112].

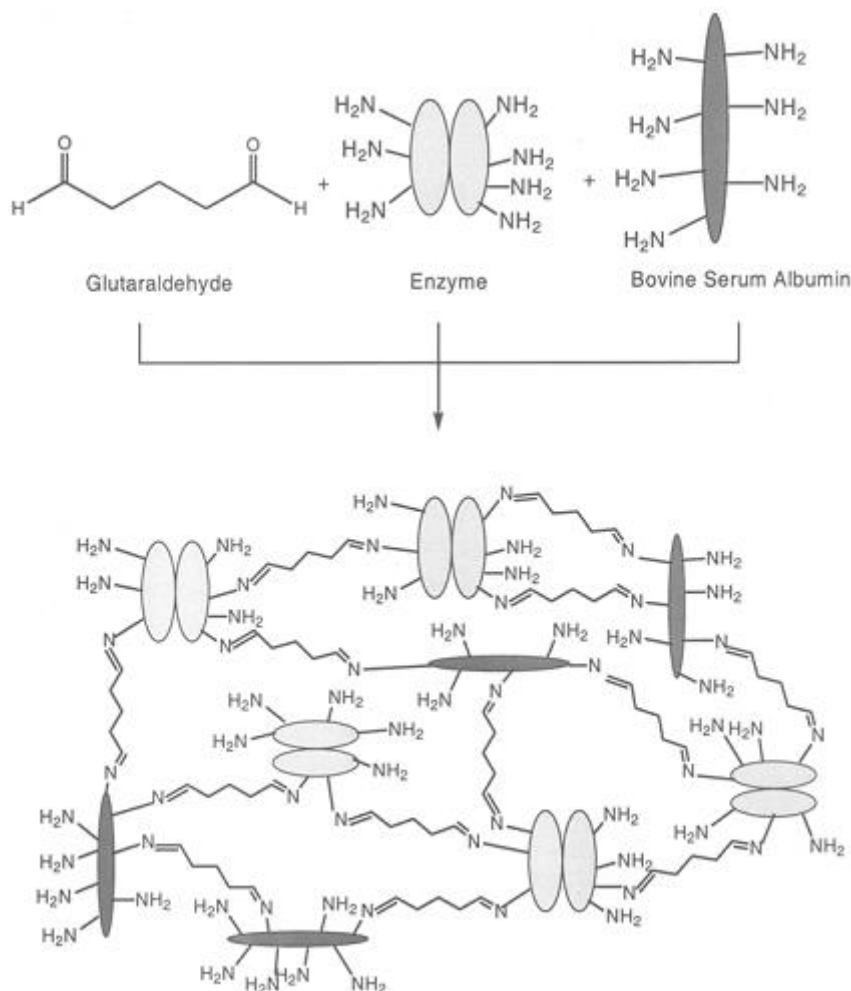


Figure 17 : Réseau polymérique après coréticulation entre les éléments constitutifs: l'enzyme, le glutaraldéhyde et l'albumine sérique bovine [24].

Immobilisation par liaisons covalentes au support.

La liaison, localisée en surface du support préalablement activé, laisse le biorécepteur entrer facilement en contact avec son substrat.

De nombreuses surfaces nues de transducteurs de tout type (Pt, Au, graphite, verre, quartz, etc) conviennent à l'immobilisation. L'activation de la surface consiste en la création de groupements fonctionnels par oxydation chimique ou chauffage en présence d'oxygène. La protéine vient s'arrimer aux éventuelles fonctions hydroxyle, carboxy, etc par réaction chimique [24].

Les thiols, amplement connus pour leur réactivité vis-à-vis des métaux nobles, forment spontanément une monocouche autoassemblée (SAM) sur une surface d'or. Les SAM, par une liaison forte de chimisorption avec l'or constituent un ensemble très bien organisé résistant au lavage. Un réarrangement des chaînes alkyles "de queue" suit l'adsorption initiale des unités sulfure sur l'or, afin de maximiser les interactions de Van der Waals. La stabilité

et la minceur de ces monocouches autoassemblées, rehaussée de leur versatilité attractive, les destinent à de nombreuses applications [97, 113, 114].

Depuis peu, l'exploitation de l'interaction forte biotine – avidine dénote d'un vif intérêt pour l'attachement de biomolécules à la surface des biocapteurs. Dans le cadre des SAM, la chaîne alkyl-thiol acquiert, lors d'une étape d'activation, une extrémité biotine (Figure 1.18). Les immersions successives dans une solution d'avidine et de biomolécule biotinylée mettent en place un agencement multicouche à discrétion.

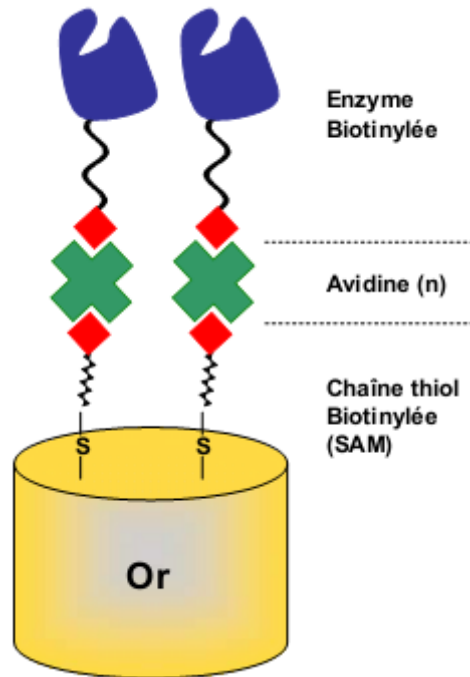


Figure 18 : Agencement d'enzymes biotinylées sur une électrode d'or garnie de chaîne alkyl-thiol biotinylées.

3.2.5 Performances d'un biocapteur.

La création d'un biocapteur "optimal" induit une connaissance adéquate d'un large nombre de paramètres propres au biocapteur considéré: épaisseur des couches constitutives, coefficient de partage et de diffusion des espèces impliquées, distribution et grandeur de l'activité de biorecognition de chacune des strates, propriétés opérationnelles du transducteur, conditions de préparation, composition de l'échantillon (pH, température,...), stockage (durée, conditions),... De la globalité de ces éléments se définit une liste de critères de performance dont une meilleure compréhension et optimisation s'obtient par l'identification de l'étape limitante: domaine de linéarité, sensibilité, temps de réponse, sélectivité, reproductibilité, fiabilité, stabilité et temps de vie.

Dans le cas des biocapteurs électrochimiques à élément de biorecognition biocatalytique vers lesquels ce travail est plus spécifiquement focalisé, l'amplitude de la réponse enregistrée traduit la conjonction de cinq phases (Figure 1.19) [71]:

- Transport du substrat à la surface du biocapteur (a)
- Diffusion vers la couche réactive (b)
- Réaction analyte/biorécepteur (c)
- Diffusion des produits de réaction vers le transducteur et la solution (d)
- Détection électrochimique (e)

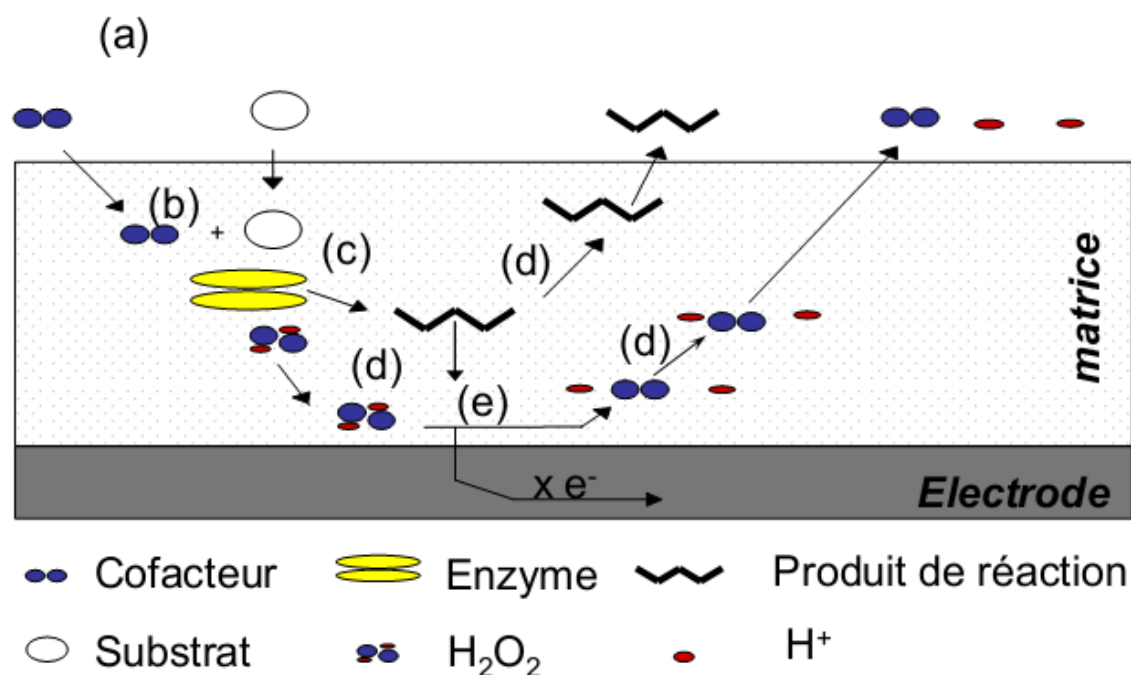


Figure 19 : Vue de profil des différentes étapes mécanistiques d'un biocapteur ampérométrique, d'après [24].

De fait, elle se trouve dépendante de trois facteurs majeurs:

- Cinétique de transport de masse
- Cinétique enzymatique
- Cinétique de la réaction électrochimique

Sous la gouverne de trois mécanismes (diffusion, migration et convection), le transport de matière vers la surface du biocapteur (discuté au point 3.1.2.) régent l'information électrochimique transmise selon une des modalités exposées au point 3.2.

3.2.5.1 Cinétique enzymatique. [12, 115-117]

Au cours du paragraphe consacré à l'immobilisation, nous avons fréquemment évoqué les effets (positifs ou négatifs) du fait de cette immobilisation sur le comportement d'un enzyme versus son comportement en solution aqueuse homogène. La composante enzymatique de la

somme des termes d'influence sur la réponse du biocapteur se pose sous la forme générale de la réaction enzymatique sise à la Figure 1.20.

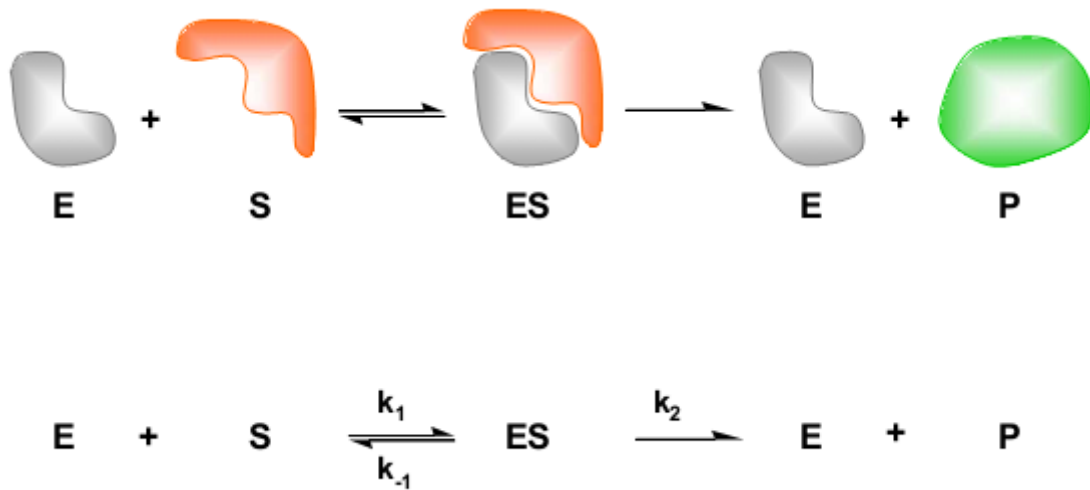


Figure 20 : Schéma général d'une réaction enzymatique.

Dans ce modèle général, le substrat S (unique) se combine en premier lieu réversiblement à l'enzyme E, ils forment un complexe intermédiaire ES, qui libère lors d'une étape plus lente et irréversible, l'enzyme E et le produit de réaction P. Sous la condition que le substrat soit en concentration plus élevée que l'enzyme et si la concentration du complexe est constante durant la réaction enzymatique (équilibre entre les constantes de vitesse d'association (k_1) et de dissociation (k_{-1}) et la constante de vitesse catalytique (k_2)), l'équation classique de Michaelis-Menten (Eq. 13) rend compte de la relation quantitative entre la vitesse de réaction (v) et la concentration en substrat.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 13})$$

La constante de Michaelis-Menten (K_m), définie et constante pour des conditions expérimentales précises et un enzyme donné, évalue son affinité pour un substrat donné. Dans la relation (12), K_m équivaut à la concentration en substrat qui occasionne une réponse égale à la moitié de V_m . L'expression de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat correspond à l'équation type d'une hyperbole. A concentration fixe en enzyme, pour une faible concentration en substrat, la vitesse de réaction fluctue rapidement et de manière quasi proportionnelle. Vers les hautes valeurs de concentration, la vitesse s'infléchit, l'enzyme est saturé en son substrat, la concentration en substrat perd son effet sur la vitesse qui tend vers une valeur maximale V_m (Figure 1.21).

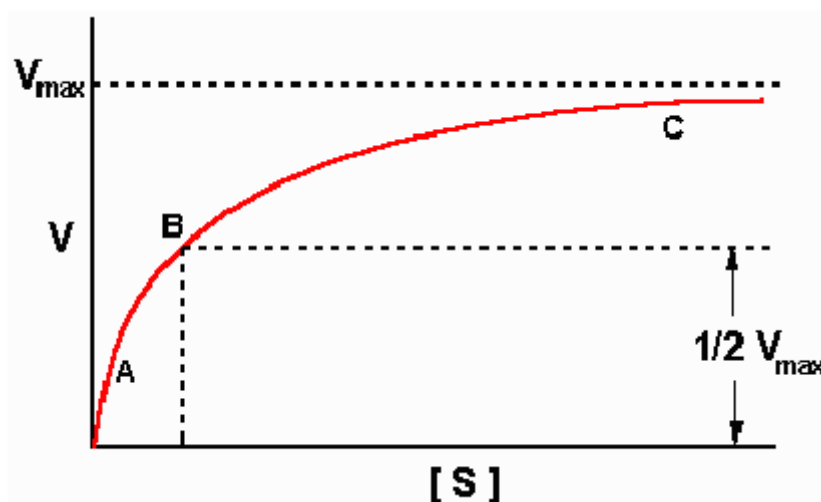


Figure 21 : Courbe type de Michaelis-Menten. Dépendance entre vitesse de réaction et concentration en substrat. Au point C, la vitesse est quasi équivalente à V_m ; au point B, elle vaut exactement la moitié de V_m et au point C, est proportionnelle à $[S]$ [116].

En ampérométrie, l'équation 13 se représente par :

$$I = \frac{I_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 14})$$

- Cette équation se simplifie pour de faibles concentrations en substrat, $[S] \ll K_m$, $\rightarrow K_m + [S] \approx K_m$ et prend la forme:

$$I = \frac{I_{\max} \cdot [S]}{K_m} \quad (\text{Eq. 15})$$

L'intensité (ici assimilée à la vitesse de réaction initiale), par sa relation directement proportionnelle à la concentration en substrat, consiste en l'approche généralement exploitée en analyse quantitative électrochimique.

- Pour de hautes concentrations en substrat, $[S] \gg K_m$,

$$\frac{[S]}{K_m + [S]} \approx 1, \rightarrow I = I_{\max}$$

et se décrit par:

$$I = I_{\max} = k_2 \cdot [E_T] \quad (\text{Eq. 16})$$

L'équation (16) met en relation directe $[ET]$, concentration totale en enzyme ($[E] + [ES]$) et l'activité catalytique.

Le paramètre K_m , combinaison des constantes d'équilibre de formation et de dissociation du complexe ES, se définit mathématiquement par:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (\text{Eq. 17})$$

Usuellement déterminé par la concentration en substrat au point $I_{m/2}$, la conception d'un biocapteur enzymatique privilégie les plus petits K_m , associés aux I_{max} les plus grands.

Le nombre de molécules de substrat converties en produit par seconde pour un système à un enzyme saturé en substrat se donne par la constante d'ordre 1 k_2 ou k_{cat} .

K_m et k_{cat} caractérisent un enzyme et servent de point de comparaison. Leur rapport K_m/k_{cat} définit une constante de spécificité et l'efficacité des substrats entre eux [12, 39, 118].

Dans le cas des biocapteurs à enzyme immobilisé, il convient d'utiliser la notion de K_m apparent. Un K_m app plus grand que le K_m en solution témoigne par exemple de la présence d'une barrière de diffusion entre l'échantillon et la couche réactive [71]. La quantification de K_m et I_{max} s'effectue plus aisément par la transformation de Lineweaver-Burk (Eq. 18). La linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten par le tracé de l'inverse de I en fonction de l'inverse de $[S]$, extrait les valeurs de K_m et V_m par les interceptes avec les axes x et y (Figure 1.22).

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m}{I_{max} \cdot [S]} \quad (\text{Eq. 18})$$

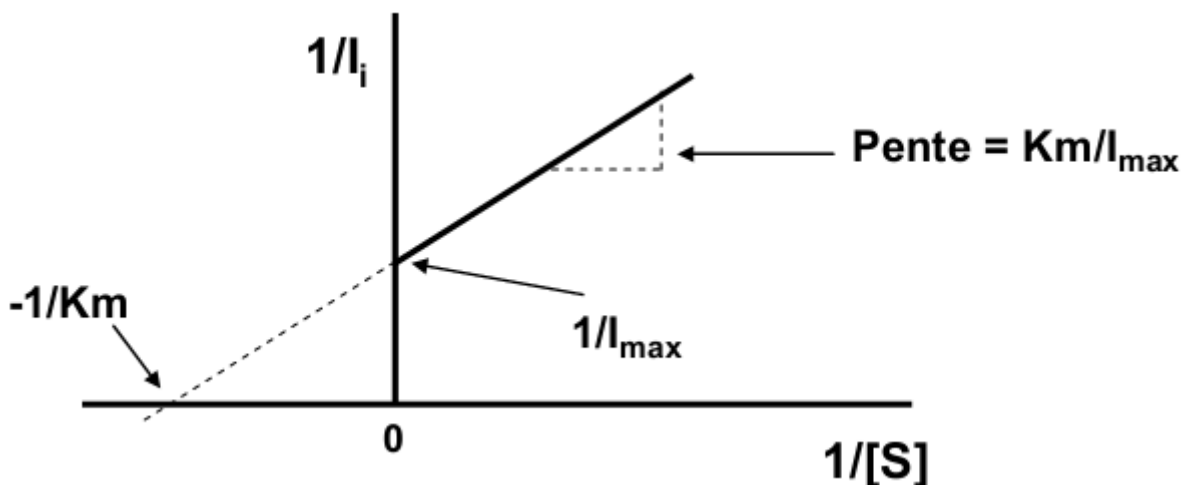


Figure 22 : Tracé selon Lineweaver-Burk [116].

La nature double réciproque elle-même du tracé de Lineweaver-Burk surpondère les points de faible concentration et crée une insatisfaction en terme de précision et justesse. Le modèle graphique de Eadie-Hofstee (Eq. 19) comble ce vide par la mise en relation de I en fonction de $I/[S]$, et évite les erreurs par considération identique de chaque point indépendamment du niveau de concentration.

$$I = I_{max} - \frac{K_m \cdot I}{[S]} \quad (\text{Eq. 19})$$

Malheureusement, tant les ordonnées que les abscisses ne sont indépendantes de la vitesse de réaction, et toute erreur expérimentale se reflète dans chacune d'elles [124].

3.2.5.2 Interférences.

Particulièrement d'intérêt pour les dispositifs destinés à un usage continu et insérés en milieu très complexe, la recherche des interférents lors de l'analyse des performances d'un biocapteur concerne l'intégralité des espèces présentes et non pas les seules susceptibles d'interactions supposées. Parmi elles, trois se rencontrent fréquemment:

1. **L'acide ascorbique**: il forme avec son produit d'oxydation l'acide déhydroascorbique (deux électrons échangés) un couple électrochimique rédox quasi réversible. En solution aqueuse, il libère deux protons pour des pKa de 4,17 (pKa1) et 11,57 (pKa2), et montre une oxydation aisée à des potentiels positifs proches de 0,0 V. Interfèrent classique, il se présente dans de nombreux fluides biologiques, jus de fruits, produits d'alimentation, formulations pharmaceutiques... L'emploi de membranes à perméabilité sélective ou garnies de charges négatives répulsives, ou l'application d'un prépotentiel d'oxydation dans les systèmes en flux prévient de son effet.

2. **L'acide urique**: produit de dégradation des protéines, et préférentiellement présent dans les urines, mais aussi dans le sang et les tissus, il s'oxyde aussi pour des potentiels positifs de faible valeur; la préservation du biocapteur s'effectue via des stratégies identiques à l'acide ascorbique.

3. **Le paracétamol (acétaminophène)**: analgésique d'usage courant, présent dans les fluides biologiques, son oxydation réversible en une quinoneimine a lieu à des potentiels légèrement supérieurs à l'acide ascorbique et à l'acide urique, mais possède une plus grande capacité de pénétration au travers des membranes [24].

3.2.6 Biocapteurs et biotransformation de xénobiotiques: tendances et perspectives

Face à la demande croissante en techniques modernes à fort potentiel de développement, les biocapteurs par leur capacité à surmonter certains désavantages des méthodes conventionnelles constituent une intense veine de recherche [119]. Fusion de la sensibilité et de la spécificité des systèmes vivants et de la puissance de traitement de la microélectronique, ils fournissent en temps réel des informations de haute pertinence [120].

Les progrès réalisés à chaque instant dans l'amélioration de la couche de perception du signal et des modes de transduction pavent la voie d'une miniaturisation plus poussée encore [74]. Monolithiques par définition, leur petitesse embrasse la volonté sans cesse accentuée de la réalisation de mesures bioanalytiques aisées à mettre en oeuvre. Sortir du confinement du

laboratoire, réduire l'espace temps entre le prélèvement de l'échantillon et l'action, constituent les soucis majeurs des multiples domaines qui exploitent déjà en routine cet outil peu coûteux, propre et peu exigeant en prétraitement de l'échantillon: diagnostic clinique, analyse environnementale, contrôle de qualité et sécurité de la nourriture, contrôle des procédés de fermentations et défense militaire. Aucunement confiné au rang d'unité isolée, les biocapteurs peuvent s'intégrer dans un ensemble instrumental plus important ou un concept d'analyse plus vaste. En effet, ils s'immiscent depuis quelques années dans le criblage pharmaceutique. Le besoin vital et accru de moyens performants (cfr point 2.) d'évaluation de qualité de l'interaction médicament-récepteur et des données ADME/tox met en lumière les biocapteurs, petits dispositifs au matériel d'origine biologique incorporé. Confrontés à des molécules de tout horizon (chimique, naturel, bases de données combinatoires), et à la superposition de plusieurs disciplines scientifiques (médecine, pharmacie, biologie, chimie) les biocapteurs destinés au criblage de composés d'intérêt pharmaceutique présentent une conception plus complexe au regard de ceux utilisés en routine et adressés à une substance dans une matrice spécifique [77, 120-122].

Les premiers biocapteurs mis en œuvre dans ce but, de nature enzymatique, exploitent l'ampérométrie. Ils permettent la détermination de composés spécifiques ou de molécules membre d'une famille plus large tels des dérivés de la pénicilline, des dérivés cyanogénés, des polyphénols...[77] Deux autres formes récentes de transductions démontrent un impact considérable en pharmacologie et exploitent des phénomènes optiques et acoustiques. L'intérêt premier de ces deux méthodologies intervient par le fait de ne requérir aucun marquage tant du substrat que du récepteur cible. La première approche repose souvent sur l'exploitation de l'effet de résonance plasmonique de surface (SPR) tandis que la seconde utilise les propriétés piézoélectriques d'un quartz vibrant. L'une et l'autre suivent l'interaction entre les composés en temps réel. Une large gamme d'espèces (bactéries, virus, ADN,...) de tout poids moléculaire, peut être analysée pour des valeurs d'affinités d'interaction très basses et ce, sur des faibles volumes d'échantillons. Ils procurent également des données relatives quant aux caractéristiques de la liaison au récepteur (pourcentage, force), à la proportion active de l'échantillon, et quant à la description de la voie de métabolisation. Utilisés en confirmation des essais préliminaires classiques, ils accélèrent parallèlement le développement *in vitro* par une aide précieuse dans l'élucidation du mode d'action. Leur rayon d'action les conduit à l'identification d'unités pharmacophores, domaine plus général mais tout aussi important en recherche de nouveaux médicaments. Les barrières physiologiques (tractus gastro-intestinal/sang, hémato encéphalique), hauts lieux de l'adsorption passive ou active d'un composé, représentent des paramètres à apprécier.

L'immobilisation de vésicules lipidiques ou de membranes cellulaires à la surface de biocapteurs optiques ou acoustiques permet l'évaluation de la fraction absorbée passivement de manière comparable aux méthodes traditionnelles. Tout aussi fiables sont les résultats obtenus du calcul du taux de fixation aux protéines plasmatiques. Cette variable clef pour la détermination des profils pharmacocinétiques et d'activité s'obtient de façon rapide (automatisation) et peu consommatrice d'échantillon. Via ces données, l'expérimentateur détermine le temps de demi vie de la liaison protéine sérique/médicament et de là une idée de son taux d'élimination. Les profils ADME/Tox, facteurs critiques pour la biodisponibilité et l'efficacité, provoquent fréquemment l'échec de nombreux candidats médicaments. Les biocapteurs connaissent un impact grandissant dans l'estimation de ces paramètres. Bien que peu de travaux associent biocapteurs optiques/acoustiques et enzymes de métabolisation, les biocapteurs à quartz piézo-électrique s'adaptent particulièrement bien aux criblages prédictifs de cytotoxicité [122].

La volonté d'élaborer des biocapteurs propres aux études de métabolisation contient par essence même l'incorporation d'enzymes de métabolisation au rôle d'élément de biorecognition. Dès ce moment, vient à l'esprit l'intégration au rang de biorécepteur, des enzymes de la famille CYP450, hémoprotéine aux nombreux isoenzymes et responsable majeur de la métabolisation d'un nombre immense de xénobiotiques et de bioactivation. Le placement d'un isoenzyme CYP450 sur un biocapteur ampérométrique affronte deux difficultés techniques: (i) la complexité de la mesure de l'activité enzymatique, (ii) la stabilité de l'enzyme très labile. Durant son cycle catalytique le CYP450 nécessite la présence d'un donneur d'électron (NADPH ou NADH), éventuellement d'un régénérateur de ces cofacteurs et d'O₂. La première génération de biocapteurs CYP450 remplit cette condition et mesure la consommation de l'un des cofacteurs [123]. Les interférents présents ou les concentrations faibles rendent ardues ces quantifications [124, 125]. Une alternative consiste à apporter directement les électrons à la partie terminale oxydase par des médiateurs réduits (type viologène). Leur potentiel rédox négatif les prédispose à réduire le groupement prosthétique. L'approche ultime propose l'électrode elle-même comme source immédiate d'électrons vers le centre rédox. Cet apport, libre de médiateurs ou de partenaires rédox naturels permet de suivre le courant catalytique engendré [125]. Le transfert direct d'électrons rencontre cependant divers obstacles:

(i) immersion d'une protéine à groupement prosthétique et par conséquent dépendance du transfert d'électrons à l'orientation de la protéine sur la surface de l'électrode, (ii) dénaturation des protéines sur les surfaces métalliques et formation d'une protéine isolante opposée à tout échange d'électrons [126]. Modifier chimiquement la molécule protéique permet de toucher

aux propriétés isolantes de la couche externe et de rendre accessibles les centres rédox très souvent profondément enfouis. Nombre de techniques d'immobilisation reprises au paragraphe 2.2.4, sont utilisées pour l'immobilisation d'isoenzymes du CYP450 et décrites abondamment par Bistolas et al. et Shumyantseva et al. [123-126]. Les phénomènes de transfert d'électrons au travers de ces diverses matrices demeurent peu clairs et encore un domaine à investiguer. De même, le besoin impératif d'oxygène durant la réaction catalytique et sa propre réduction en parallèle à l'électrode rend les mécanismes de réaction complexes à interpréter. L'ajout de catalase (qui élimine H₂O₂, sous-produit de réaction) et/ou d'inhibiteurs dégrossit cette complexité et favorise la compréhension [125]. D'une haute adaptabilité, les biocapteurs ampérométriques CYP450 fonctionnent au sein de plusieurs dispositifs électrochimiques: voltampérométrie cyclique, ampérométrie, potentiométrie et électrolyse suivie d'un examen des produits générés par CL/SM [124, 125].

Aujourd'hui totalement fondues dans le paysage des biocapteurs, les électrodes sérigraphiées(3), attractives par leur faible bruit de fond, leur large gamme de potentiels opérationnels et leur haute commodité aux modifications chimiques, constituent l'étape suivante à franchir pour les biocapteurs CYP450 [126, 128] et leur intégration in extenso dans l'arsenal analytique en sciences pharmaceutiques. Leur spécificité, non directement dirigée vers un substrat, mais très large, se met avantageusement à profit pour la production de capteurs multi-canaux via la technologie de sérigraphie. Les réponses fournies par chacun des canaux adressés un à un par un isoenzyme autorisera par compilation, la détection simultanée d'un éventail ample de composés [123].

(3) *Electrodes sérigraphiées: véritables miniaturisations d'un biocapteur, elles autorisent la production de masse rapide, simple et reproductible de biocapteurs électrochimiques. Cette technique consiste en la déposition d'encre électrochimiquement actives modifiées sur un support inerte en un film mince de motif, de taille et d'épaisseur contrôlés. Appelées à un usage unique, ces biocapteurs manifestent plusieurs avantages: aucun risque de contamination, élimination des problèmes de perte de réponse liés à un encrassement de l'électrode ou une dénaturation de l'enzyme et prix de revient faible. Par ces particularités et la foule d'applications concevables, ces électrodes sérigraphiées rencontrent les défis du criblage haut débit. La réduction d'échelle qu'elles proposent associée à une réponse en temps réel élargit leur niche d'exploitation au test hors laboratoire, sur site [89, 127]*

Dès maintenant estimés pour leurs qualités analytiques (temps de réponse, fenêtre de calibration, limite de détection, sensibilité, stabilité opérationnelle, temps de vie), les biocapteurs ampérométriques CYP450 demandent encore des travaux d'optimisation de la stabilité. L'instabilité propre aux enzymes s'exprime plus vigoureusement dans le cas du CYP450 et en fonction de son origine (membranaire microsomial, mitochondrial, bactérien). Malgré l'intervention d'agents de stabilisation (par ex. le glycérol) ces biocapteurs appartiennent au type de biocapteurs dits à usage unique, jetables à l'inverse des biocapteurs dits "réutilisables" [123, 126]

Les biocapteurs moléculaires (enzyme, anticorps, ADN,...) axés sur une molécule cible peuvent dans certaines situations ne pas déceler des composés voisins. Les biocapteurs à base de cellules vivantes, surmontent ces limitations. Capables d'informer à la fois qualitativement et quantitativement de la présence d'un composé x, l'attrait principal des biocapteurs à base de cellules réside en leur faculté à procurer une réponse fonctionnelle, et analytique.

L'aptitude à transmettre la réaction induite par un stimulus sur un système vivant trouve de nombreuses zones d'intérêt (pharmaceutique, cosmétique, agro-alimentaire, environnement) et permet de répondre à des questions requérant une connaissance de l'effet physiologique provoqué. Quel est l'effet de tel agent pharmaceutique sur un système physiologique ? Est-il agoniste ou antagoniste ? Est-il toxique ? La réponse en temps réel d'un biocapteur à base de cellules tient compte avantagement de la fraction dissoute du composé cible mais aussi de la partie insoluble et donc conséquemment de sa biodisponibilité.

Le taux d'activité du métabolisme énergétique, véritable caisse de résonance de toute action sur les cellules, constitue fréquemment l'objet même de la mesure au travers de divers paramètres tels: pH, consommation d'O₂ et production de CO₂, potentiel rédox, production de lactate, microcalorimétrie. Alternative, l'évaluation d'une caractéristique intrinsèque de certains types de cellules se tient par mesure du potentiel électrique dans le cas de cellules nerveuses, ou d'une bioluminescence naturelle ou induite pour des cellules bactériennes par exemple.

Les biocapteurs à base de cellules se soumettent facilement à une miniaturisation (et à l'automation par usinage de plaques multipuits et de dispositifs multicanaux) et consomment moins d'échantillon et/ou de cellules pour une sensibilité plus grande et un meilleur temps de résolution [129, 130]. Le dépôt unique [131] ou en très petite quantité de cellules (bactériennes, champignons, animales, végétales) sur la surface du transducteur exige de leur part une grande pureté [132]. Les difficultés et défauts initiaux (maintenance et temps de vie) disparaissent peu à peu par l'effet des progrès réalisés en techniques de cultures cellulaires. Compromis entre système purement *in vitro* et organisme intégral, la (les) cellule(s)

représente(nt) une approche plus fidèle de la complexité de l'environnement *in vivo* [131]. Les avantages à l'usage de cellules complètes en lieu et place d'enzymes isolés incluent: (i) apport interne large de biocatalyseur, (ii) usage d'une voie métabolique complète dans les conditions naturelles optimales, (iii) stabilité enzymatique accrue, (iv) possibilité d'utiliser des systèmes enzymatiques non disponibles de manière isolée [133].

Une famille de transducteurs convient particulièrement bien au dépôt d'un système monocellulaire; les FET (transistor à effet de champ). L'entité cellulaire(4) se place sur la surface du FET, qui accepte dès lors le déroulement de processus biochimiques complexes (transfert d'électrons, réaction rédox) ou détecte de faibles variations de pH à l'interface électrode/cellule. Les variations enregistrées sont à mettre en rapport avec l'activité métabolique des cellules immobilisées [134-136].

L'expérience démontre la possible divergence de comportement entre une monocouche de cellules cultivées sur la surface d'une électrode et une coupe d'un même organe. Les cultures tissulaires en trois dimensions connaissent un certain succès depuis peu, par leur contexte quasi équivalent des conditions physiologiques (protéines, enzymes, cofacteurs), elles reflètent de manière optimale l'activité métabolique. Ces tissus autoorganisés, autoactivés, et autonomes fournissent une réponse directe et voisine de la situation *in vivo*. Leurs désagréments majeurs proviennent des difficultés rencontrées à positionner de manière adéquate la culture 3D sur le support, à obtenir un temps de vie satisfaisant et en la possession suffisante de stocks d'animaux. Un modèle tissulaire multicellulaire sphérique en trois dimensions, mis au point par Thielecke et al., élimine ces inconvénients et offre des conditions de simulation de la situation *in vivo* propice à l'étude tant de mécanismes biologiques (prolifération, différenciation...) que de nouveaux agents thérapeutiques. La géométrie précisément définie de ces sphères s'insère de façon appropriée dans un montage capillaire aux bornes duquel l'impédance mesurée témoigne de l'effet observé. Installé en mode multicanaux, ce dispositif laisse envisager des travaux de criblage par mise en place de différents tissus (hépatiques par exemple) ou de substrats [137].

(4) *Les cellules nerveuses par leur richesse en récepteurs et en canaux ioniques sont du plus grand intérêt à des fins de criblage médicamenteux via stimulation ou blocage. Des cellules épithéliales, des fibroblastes, des lymphocytes T ou B s'emploient également [77].*

Les métabolites de xénobiotiques (médicaments, polluants lipophiles...) générés par le cytochrome P450 dans les foies de mammifères provoquent des dommages au matériel génétique [138]. Les réactions entre ces métabolites et l'ADN conduit à des changements structuraux, marqueurs potentiels de maladies génétiques ou de la toxicité d'un xénobiotique nouvellement développé. Adénine et guanine, bases impliquées dans la réaction d'oxydation, fournissent un signal électrochimique amplifié dans le cas d'un ADN simple brin ou ADN chimiquement endommagé (perte de la protection de l'ADN double brin). Récemment, Rusling et al. ont mis en œuvre des biocapteurs multicouches qui génèrent en premier lieu, au sein de la couche enzymatique (CYP450), le métabolite toxique, suivi de l'interaction avec la couche chargée en ADN et détection des dommages éventuels à celui-ci. Dans la majorité des cas, les détériorations à l'ADN proviennent du métabolite et non de la molécule parent. Forts de cette caractéristique, les biocapteurs couche à couche ADN/CYP450 sous réserve de nombreuses optimisations (application à des échantillons biologiques, meilleure sensibilité, validation), s'apparentent aux biocapteurs toxicologiques du futur [139, 140].

Conclusion

Les polluants, les médicaments et les molécules antioxydantes hydrophiles les plus impliquées dans le système de défense antiradicalaire. Leur dosage dans le cadre de l'évaluation et le suivi d'importance pour le diagnostic et l'aide aux protocoles thérapeutiques. Même si elles offrent des sensibilités et des sélectivités de mesures satisfaisantes, les méthodes analytiques généralement utilisées, telles que la chromatographie et la spectrométrie, nécessitent toutes l'utilisation de matériels coûteux et impliquent des protocoles opératoires compliqués avec des phases de prétraitement longues, rendant la mesure différée dans le temps. Ce point est très important en raison de la nature des phénomènes étudiés. Le principe de détection de la majorité de ces techniques reposant sur les propriétés oxydoréductrices des espèces, l'électrochimie est la méthode la plus adaptée à l'étude de ce type de réactions. En outre, les techniques électrochimiques sont peu coûteuses, simples à mettre en œuvre, rapides et sensibles. Elles présentent enfin des seuils de détection compatibles avec les concentrations de ces espèces. Ceci est d'autant plus vrai avec l'emploi des électrodes et des méthodes impulsionnelles. C'est dans ce cadre que s'effectuent les travaux décrits par la suite.

References:

- [1] Définitions lexicographiques et étymologiques de « xénobiotique » du TLFi, sur le site du CNRTL.
- [2] Viarengo A, Bettella E, Fabbri R, Burlando B, Lafaurie M (1997) Heavy metal inhibition of EROD activation in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Mar Environ Res* 44:1-11
- [3] S. Ekins, B. J. Ring, J. Grace, D. J. McRobie-Belle and S. A. Wrighton, Present and future in vitro approaches for drug metabolism, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 44 (2000) 313-324.
- [4] M.-Y. Lee, C. B. Park, J. S. Dordick and D. S. Clark, From the Cover: Metabolizing enzyme toxicology assay chip (MetaChip) for high-throughput microscale toxicity analyses, *PNAS*, 102 (2005) 983-987.
- [5] S. Ekins, Y. Nikolsky and T. Nikolskaya, Techniques: Application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity, *Trends Pharmacol. Sci.*, 26 (2005) 202-209.
- [6] P. Vanparys, ECVAM and pharmaceuticals, *Altern. Lab. Anim.*, 30 (2002) 221-223.
- [7] R. E. Armer and I. D. Morris, Trends in early drug safety, *Drug News Perspect.*, 17 (2004) 143-148.
- [8] E. F. A. Brandon, C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 189 (2003) 233-246.
- [9] J. H. Ansele and D. R. Thakker, High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism, *J. Pharm. Sci.*, 93 (2004) 239-255.
- [10] J. A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, I. Pikuleva, M. Waterman, J. Capdevila, V. Holla, C. Helvig, J. R. Falck, G. Farrell, L. S. Kaminsky, S. D. Spivack, E. Boitier and P. Beaune, Human cytochromes P450, *Mol. Aspects Med.*, 20 (1999) 1-137.
- [11] U. Jurva, H. V. Wikström and A. P. Bruins, In vitro mimicry of metabolic oxidation reactions by electrochemistry/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14 (2000) 529-533.
- [12] M. Baltes, Etudes in vitro des interactions médicamenteuses entre aliments et médicaments substrats du cytochrome P450 3A4. Thèse, Université Libre de Bruxelles, Brussels, 2002.

- [13] U. Jurva, *Electrochemistry on-line with mass-spectrometry*.Thèse, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, 2004.
- [14] S. Bidouil, *Contribution au développement d'un modèle de métabolisation in vitro. Applications à l'étude d'interactions médicamenteuses impliquant l'isoforme 3A4 du cytochrome P450*.Thèse, Université Libre de Bruxelles, Brussels, 2001.
- [15] Z. Mazerska, K. Gorlewska, A. Kraciuk and J. Konopa, The relevance of enzymatic oxidation by horseradish peroxidase to antitumor potency of imisazoacridinone derivatives, *Chem. Biol. Interact.*, 115 (1998) 1-22.
- [16] L. F. Olsen, A. Lunding and U. Kummer, Mechanism of melatonin-induced oscillations in the peroxidase-oxidase reaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, 410 (2003) 287-295.
- [17] V. F. Ximenes, A. Campa and L. H. Catalani, The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent, *Arch. Biochem. Biophys.*, 387 (2001) 173-179.
- [18] V. Fischer, J. A. Haar, L. Greinier, R. V. LLoyd and R. P. Mason, Possible role of free radical formation in clozapine (clozaril)-induced agranulocytosis, *Mol. Pharmacol.*, 40 (1991) 846-853.
- [19] J. L. Maggs, D. Williams, M. Pirmohamed and B. K. Park, The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man, *J. Phamacol. Exp. Ther.*, 275 (1995) 1463-1475.
- [20] K. P. Vollhardt, *Traité de chimie organique. française*, Deboeck-Université, Brussels, 1990.
- [21] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. F. Prazeres, V. Vojinovic, J. M. S. Cabral and L. P. Fonseca, Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 9 (2003) 199-247.
- [22] M. Shyamal, *Bioinorganic Chemistry: Redox Metalloenzymes and Biomimetic Chemistry*. www.tifr.res.in/~shyamal/research.html, Mumbai, 2005
- [23] N. C. Veitch, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65 (2004) 249-259.
- [24] S. Seradilla Razola, *Contribution to study and development of electrochemical biosensors*.Thèse, Université Libre de Bruxelles, Brussels, 2001.
- [25] S. de Visser, P., S. Shaik, P. Sharma, K., D. Kumar and W. Thiel, Active species of Horseradish peroxidase (HRP) and cytochrome P450: two electronic chameleons, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 15779-15788.
- [26] K. Chattopadhyay and S. Mazumdar, Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH, *Biochemistry*, 39 (2000) 263-270.

- [27] S. Bhoopathy, M. Sarkar and T. H. Karnes, A direct injection capillary electrophoretic technique for miniaturized high-throughput metabolic screening of the CYP 3A4 enzyme using quinidine as a probe, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 721-729.
- [28] S. Naylor, L. M. Benson and A. J. Tomlinson, Application of capillary electrophoresis and related techniques to drug metabolism studies, *J. Chromatogr. A*, 735 (1996) 415-438.
- [29] Y.-W. Chou, W.-S. Huang, C.-C. Chen, S.-J. Lin, H.-L. Wu and S.-H. Chen, Trace analysis of zotepine and its active metabolite in plasma by capillary electrophoresis with solid phase extraction and head-column field-amplified sample stacking, *J. Chromatogr. A*, 1087 (2005) 189-196.
- [30] A. S. Ptolemy and P. Britz-McKibbin, Sample preconcentration with chemical derivatization in capillary electrophoresis Capillary as preconcentrator, microreactor and chiral selector for high-throughput metabolite screening, *J. Chromatogr. A*, in press (2005)
- [31] J. Zhang, P. T. T. Ha, Y. Lou, J. Hoogmartens and A. Van Schepdael, Kinetic study of CYP3A4 activity on verapamil by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39 (2005) 612-617.
- [32] J. Zhang, P. T. T. Ha, Y. Lou, J. Hoogmartens and A. Van Schepdael, Kinetic study of cytochrome P450 3A4 activity on warfarin by capillary electrophoresis with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 1082 (2005) 235-239.
- [33] S. M. van Liempd, J. Kool, J. Reinen, T. Schenk, J. H. N. Meerman, H. Irth and N. P. E. Vermeulen, Development and validation of a microsomal online cytochrome P450 bioreactor coupled to solid-phase extraction and reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1075 (2005) 205-212.
- [34] K. Sakai-Kato, M. Kato and T. Toyo'oka, Screening of inhibitors of uridine diphosphate glucuronosyltransferase with a miniaturized on-line drug-metabolism system, *J. Chromatogr. A*, 1051 (2004) 261-266.
- [35] K. Sakai-Kato, M. Kato and T. Toyo'oka, On-line drug-metabolism system using microsomes encapsulated in a capillary by the sol-gel method and integrated into capillary electrophoresis, *Anal. Biochem.*, 308 (2002) 278-284.
- [36] H.-M. Pang, J. Kenseth and S. Coldiron, High-throughput multiplexed capillary electrophoresis in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 9 (2004) 1072-1080.
- [37] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and applications*. second edn., John Wiley & Sons, New York, 2001.
- [38] D. A. Skoog, D. M. West and J. F. Holler, *Chimie Analytique*. edn. française, De Boeck-Université, Paris/Bruxelles, 1997.
- [39] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. VCH Publishers, New-York, 1994.

- [40] G. Quarin, Techniques voltampérométriques de balayage linéaire en tension. Notes de cours, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 1998.
- [41] P. Gamache, R. McCarthy, J. Waraska and I. Acworth, Pharmaceutical oxidative stability profiling with high- throughput voltammetry, *American Laboratory*, 35 (2003) 21-25.
- [42] P. Gamache, R. Smith, R. McCarthy, J. Waraska and I. Acworth, ADME/TOx Profiling using coulometric electrochemistry and electrospray ionization mass spectrometry, *Spectroscopy*, 18 (2003) 14-21.
- [43] P. Gamache, D. Meyer, M. Granger and I. Acworth, Metabolomic Applications of Electrochemistry/Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15 (2004) 1717-1726.
- [44] Y.-H. Kim, J. V. Pothuluri and C. E. Cerniglia, Voltammetric investigation of macrolides by an HPLC-coulometric assay, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 390-396.
- [45] S. Chevion, M. A. Roberts and M. Chevion, The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity, *Free Radic. Biol. Med.*, 28 (2000) 860-870.
- [46] L. Campanella, A. Bonanni, D. Bellantoni and M. Tomassetti, Biosensors for determination of total antioxidant capacity of phytotherapeutic integrators: comparison with other spectrophotometric, fluorimetric and voltammetric methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35 (2004) 303-320.
- [47] L. Campanella, A. Bonanni, D. Bellantoni, G. Favero and M. Tomassetti, Comparison of fluorimetric, voltammetric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 91-99.
- [48] S. Chevion, E. M. Berry, N. Kitrossky and R. Kohen, Evaluation of Plasma Low Molecular Weight Antioxidant Capacity by Cyclic Voltammetry, *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (1997) 411-421.
- [49] R. L. Prior and G. Cao, In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods¹, *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (1999) 1173-1181.
- [50] N. Abo El-Maali, Voltammetric analysis of drugs, *Bioelectrochem.*, 64 (2004) 99-107.
- [51] T. Huang, P. Gao and M. J. Hageman, Rapid Screening of Antioxydants in Pharmaceutical Formulation Development Using Cyclic Voltametric - Potential and Limitations, *Curr. Drug Disc. Technol.*, 1 (2004) 173-179.
- [52] I. Tapsoba, J.-E. Belgaied and K. Boujlel, Voltammetric assay of Guaifenesin in pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 162-165.
- [53] E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov and A. V. Shevchuk, Study of antioxidant properties by voltammetry, *J. Electroanal. Chem.*, 518 (2002) 56-60.

- [54] R. Kohen, E. Vellaichamy, J. Hrbac, I. Gati and O. Tirosh, Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues, *Free Radic. Biol. Med.*, 28 (2000) 871-879.
- [55] S. Martinez, L. Valek, J. Resetic and D. F. Ruzic, Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity - Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods, *J. Electroanal. Chem.*, 588 (2006) 68-73.
- [56] A. Urios, M. Largeron, M.-B. Fleury and M. Blanco, A convenient approach for evaluating the toxicity profiles of in vitro neuroprotective alkylaminophenol derivatives, *Free Radic. Biol. Med.*, in press (2005)
- [57] O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu and L. Saso, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry, *Biochim. Biophys. Acta*, 1721 (2005) 174-184.
- [58] R. Kohen and I. Gati, Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress, *Toxicology*, 148 (2000) 149-157.
- [59] A. K. Bhattacharjee, D. J. Skanchy, B. Jennings, T. H. Hudson, J. J. Brendle and K. A. Werbovetz, Analysis of stereoelectronic properties, mechanism of action and pharmacophore of synthetic indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione derivatives in relation to antileishmanial activity using quantum chemical, cyclic voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST procedures, *Bioorg. Med. Chem.*, 10 (2002) 1979-1989.
- [60] J.-M. Kauffmann, J.-C. Vire and G. J. Patriarche, Tentative correlation between the electrochemical oxidation of neuroleptics and their pharmacological properties, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 12 (1984) 413-420.
- [61] T. Fryatt, H. I. Petterson, W. T. Gardipee, K. C. Bray, S. J. Green, A. M. Z. Slawin, H. D. Beall and C. J. Moody, Novel quinolinequinone antitumor agents: structure-metabolism studies with NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1), *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004) 1667-1687.
- [62] B. Dakova, J.-M. Kauffmann, M. Evers, L. Lamberts and G. J. Patriarche, Electrochemical behaviour of pharmacologically interesting seleno-organic compounds I. N-alkyl- and N-aryl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, *Electrochim. Acta*, 35 (1990) 1133-1138.
- [63] S. Seradilla Razola, B. Blankert, G. Quarin and J.-M. Kauffmann, Phenothiazines drugs as redox mediators in horseradish peroxidase bioelectrocatalysis, *Anal. Lett.*, 36 (2003) 1819-1833.
- [64] S. J. Sadeghi, G. Gilardi and A. E. G. Cass, Mediated electrochemistry of peroxidases-effects of variations in protein and mediator structures, *Biosens. Bioelectron.*, 12 (1997) 1191-1198.

- [65] E. I. Iwuoha, S. Joseph, Z. Zhang, M. R. Smyth, U. Fuhr and P. R. Ortiz de Montellano, Drug metabolism biosensors: electrochemical reactivities of cytochrome P450cam immobilised in synthetic vesicular systems, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998) 1101-1110.
- [66] A. Ruffien-Ciszak, P. Gros, M. Comtat, A.-M. Schmitt, E. Questel, C. Casas and D. Redoules, Exploration of the global antioxidant capacity of the stratum corneum by cyclic voltammetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 162-167.
- [67] N. S. Lawrence, E. L. Beckett, J. Davis and R. G. Compton, Advances in the Voltammetric Analysis of Small Biologically Relevant Compounds, *Anal. Biochem.*, 303 (2002) 1-16.
- [68] H. Hotta, H. Sakamoto, S. Nagano, T. Osakai and Y. Tsujino, Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1526 (2001) 159-167.
- [69] B. Blankert, O. Vosters, J.-M. Kauffmann and J. Nève, Evaluation du potentiel rédox de divers composés à groupement THIOL par voltampérométrie cyclique., *Journées d'Electrochimie. 2005, St Malo*, 152.
- [70] O. Vosters, Contributions à l'étude du pouvoir antioxydant et des propriétés immunomodulatrices d'un composé à groupement thiol, le nacystelyn., *Thèse, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles*, 2003.
- [71] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst and G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 121-131.
- [72] S. Tombelli, M. Minunni and M. Mascini, Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices, *Methods*, 37 (2005) 48-56.
- [73] M. Yuqing, G. Jianguo and C. Jianrong, Ion sensitive field effect transducer-based biosensors, *Biotechnol. Adv.*, 21 (2003) 527-534.
- [73] S. Dong and X. Chen, Some new aspects in biosensors, *Rev. Mol. Biotech.*, 82 (2002) 303-323.
- [74] D. Meadows, Recent developments with biosensing technology and applications in the pharmaceutical industry, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 21 (1996) 179-189.
- [75] D. Yu, B. Blankert, J.-C. Viré and J.-M. Kauffmann, Biosensors in drug discovery and drug analysis, *Anal. Lett.*, 38 (2005) 1687-1701.
- [76] M. Keusgen, Biosensors: new approaches in drug discovery, *Naturwissenschaften*, 89 (2002) 433-444.
- [78] C. Petit, Contribution à l'étude et au développement d'électrodes à pâte de carbone modifiée. Application à l'analyse de composés d'intérêt pharmaceutique., *Thèse, Université Libre de Bruxelles, Brussels*, 1999.

- [79] A. Zhou and J. Muthuswamy, Acoustic biosensor for monitoring antibody immobilization and neurotransmitter GABA in real-time, *Sens. Actuators, B*, 101 (2004) 8-19.
- [80] S. Tombelli, M. Minunni, A. Santucci, M. M. Spiriti and M. Mascini, A DNA-based piezoelectric biosensor: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices, *Talanta*, in press (2005)
- [81] C. Berggren Kriz, k. Radevik and D. Kriz, Magnetic permeability measurements in bioanalysis and biosensors, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1966-1970.
- [82] M. Megens and M. Prins, Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics, *J. Magn. Magn. Mater.*, 293 (2005) 702-708.
- [83] D. L. Graham, H. A. Ferreira and P. P. Freitas, Magneto-resistive-based biosensors and biochips, *Trends Biotech.*, 22 (2004) 455-462.
- [84] B. Krajewska, Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.*, 35 (2004) 126-139.
- [85] G. W. J. Harwood and C. W. Pouton, Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 18 (1996) 163-191.
- [86] B. Blankert, O. Dominguez, W. El Ayyas, J. Arcos and J.-M. Kauffmann, Horseradish peroxidase electrode for the analysis of clozapine, *Anal. Lett.*, 37 (2004) 917-928.
- [87] C. Petit, A. Gonzalez-Cortes and J.-M. Kauffmann, Preparation and characterization of a new enzyme electrode based on solid paraffin and activated graphite particles, *Talanta*, 42 (1995) 1783-1789.
- [88] C. Petit and J.-M. Kauffmann, New carbon paste electrode for the development of biosensors, *Anal. Proc.*, 32 (1995) 11-.
- [89] C. Mousty, Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes - new trends, *Appl. Clay Sci.*, 27 (2004) 159-177.
- [90] X.-L. Luo, J.-J. Xu, Q. Zhang, G.-J. Yang and H.-Y. Chen, Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005) 190-196.
- [91] S.-Q. H. C.-X. Lei, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide, *Talanta*, 59 (2003) 981-988.
- [92] I. R. Zwirtes de Oliveira and I. Cruz Vieira, Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*solanum gilo*), *Enzyme Microb. Technol.*, (2005)

- [93] V. S. Tripathy, V. B. Kandimalla and H. Ju, Preparation of ormosil and its application in the immobilizing biomolecules, *Sensors Actuators B*, in press (2005)
- [94] J. Wang, sol-gel materials for electrochemical biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 399 (1999) 21-27.
- [95] S. S. Rosatto, P. T. Sotomayor, L. T. Kubota and Y. Gushikem, SiO₂/Nb₂O₅ sol-gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection, *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 4451-4458.
- [96] N. Jia, Q. Zhou, L. Liu, M. Yan and Z. Jiang, Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in sol-gel-derived tin oxide/gelatin composite films, *J. Electroanal. Chem.*, 580 (2005) 213-221.
- [97] W. Schuhmann, Amperometric enzyme biosensors based on optimised electron-transfer pathways and non-manual immobilisation procedures, *Rev. Mol. Biotech.*, 82 (2002) 425-441.
- [98] S. Cosnier, Biomolecule immobilization on electrode surface by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review, *Biosens. Bioelectron.*, 14 (1999) 443-456.
- [99] M.-C. Shin and H.-S. Kim, Electrochemical characterization of polypyrrole/glucose oxidase biosensor: Part I. Influence of enzyme concentration on the growth and properties of the film, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 161-169.
- [100] M.-C. Shin and H.-S. Kim, Electrochemical characterization of polypyrrole/glucose oxidase biosensor: Part II. Optimal preparation conditions for the biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 171-178.
- [101] M. Yuqing, C. Jianrong and W. Xiaohua, Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors, *Trends Biotech.*, 22 (2004) 227-231.
- [102] S. Brahim, D. Narinesingh and A. Guiseppi-Elie, Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 53-59.
- [103] Y. M. Lvov, Nanofabrication of ordered multilayers by alternate adsorption of polyions, nanoparticles and proteins: from planar films to microtemplates. <http://www2.latech.edu/~ylvov/research.html>, Ruston, 2005
- [104] Z. Li and N. Hu, Direct electrochemistry of heme proteins in their layer-by-layer films with clay nanoparticles, *J. Electroanal. Chem.*, 558 (2003) 155-165.
- [105] C. Sun, W. Li, Y. Sun, X. Zhang and J. Shen, Fabrication of multilayer films containing horseradish peroxidase based on electrostatic interaction and their application as a hydrogen peroxide sensor, *Electrochim. Acta*, 44 (1999) 3401-3407.

- [106] H. T. Tien and A. L. Ottova, From self-assembled bilayer lipid membranes (BLMs) to supported BLMs on metal and gel substrates to practical applications, *Colloids Surf., A*, 149 (1999) 217-233.
- [107] K. Asaka, A. Ottova and H. T. Tien, Mediated electron transfer across supported bilayer lipid membrane (s-BLM), *Thin Solid Films*, 354 (1999) 201-207.
- [108] K. Asaka, H. T. Tien and A. Ottova, Voltammetric study of charge transfer across supported bilayer lipid membranes (s-BLMs), *J. Biochem. Biophys. Methods*, 40 (1999) 27-37.
- [109] H. T. Tien and A. L. Ottova, Supported planar lipid bilayers (s-BLMs) as electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta*, 43 (1998) 3587-3610.
- [110] V. Tvarozek, T. Hianik, I. Novotny, V. Rehacek, W. Ziegler, R. Ivanic and M. Andel, Thin films in biosensors, *Vacuum*, 50 (1998) 251-262.
- [111] A.L.Ottova and H. T. Tien, self-assembled bilayer lipid membranes: from mimicking biomembranesto practical applications, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 42 (1997) 141-152.
- [112] G. Guilbault, G., Analytical uses of immobilized enzymes. Marcel Dekker, New-York, 1984.
- [113] A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral and L. P. Fonseca, Ethanol biosensors based on alcohol oxidase, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005) 235-247.
- [114] F. Davis and S. P. J. Higson, Structured thin films as functional components within biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005) 1-20.
- [115] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzymes Kinetics*. Butterworths, London, 1979.
- [116] P. Birch, *Enzymes kinetics*. <http://www.indstate.edu/thcme/mwking/enzyme-kinetics.html>, 2005
- [117] O. Moe and R. Comelius, *Enzymes kinetics*, *J. Chem. Educ.*, 65 (1988) 137-141.
- [118] D. Yu, *Development of biosensors based on magnetic particles*. Mémoire de DEA, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 2005.
- [119] B. D. Malhotra, R. Singhal, A. Chaubey, S. K. Sharma and A. Kumar, Recent trends in biosensors, *Curr. Appl. Phys.*, 5 (2005) 92-97.
- [120] A. P. F. Turner, Biosensors: Sense and sensitivity, *Science*, 290 (2000) 1315-1317.
- [121] J. Pearson, A. Gill and P. Vadgama, Analytical aspects of biosensors, *Ann. Clin. Biochem.*, 37 (2000) 119-145.
- [122] M. A. Cooper, Biosensor profiling of molecular interactions in pharmacology, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 3 (2003) 557-562.
- [123] M. Hara, Application of P450s for biosensing: combination of biotechnology and electrochemistry, *Mater. Sci. Eng., C*, 12 (2000) 103-109.

- [124] S. Joseph, J. F. Rusling, Y. M. Lvov, T. Friedberg and U. Fuhr, An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool, *Biochem. Pharmacol.*, 65 (2003) 1817-1826.
- [125] N. Bistolas, U. Wollenberger, C. Jung and F. W. Scheller, Cytochrome P450 biosensors--a review, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 2408-2423.
- [126] V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko and A. I. Archakov, Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors, *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 1051-1063.
- [127] M. Mascini, Screen printed electrodes. <http://srv.chim.unifi.it/ana/>, 2005
- [128] J. P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K. C. Honeychurch and R. M. Pemberton, Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses, *Ann. Lett.*, 37 (2004) 1-42.
- [129] P. Wang, G. Xu, L. Qin, Y. Xu, Y. Li and R. Li, Cell-based biosensors and its application in biomedicine, *Sens. Actuators, B*, 108 (2005) 576-584.
- [130] L. Bousse, Whole cell biosensors, *Sens. Actuators, B*, 34 (1996) 270-275.
- [131] K. Durick and P. Negulescu, Cellular biosensors for drug discovery, *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 587-592.
- [132] S. K. Sharma, N. Sehgal and A. Kumar, Biomolecules for development of biosensors and their applications, *Curr. Appl. Phys.*, 3 (2003) 307-316.
- [133] D. C. Wijesuriya and G. A. Rechnitz, Biosensors based on plant and animal tissues, *Biosens. Bioelectron.*, 8 (1993) 155-160.
- [134] A. O. Y. Fang, ADMET Biosensors: Up-to-date issues and strategies, *Med. Sci. Monit.*, 10 (2004) 127-132.
- [135] W. H. Baumann, M. Lehmann, A. Schwinde, R. Ehret, M. Brischwein and B. Wolf, Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells, *Sens. Actuators, B*, 55 (1999) 77-89.
- [136] A. Offenhausser and W. Knoll, Cell-transistor hybrid systems and their potential applications, *Trends Biotech.*, 19 (2001) 62-66.
- [137] A. Reininger-Mack, H. Thielecke and A. A. Robitzki, 3D-biohybrid systems: applications in drug screening, *Trends Biotech.*, 20 (2002) 56-61.
- [138] J. Mbindyo, L. Zhou, Z. Zhang, J. D. Stuart and J. F. Rusling, Detection of chemically induced DNA damage by derivative square wave voltammetry, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2059-2065.
- [139] J. F. Rusling, Applications of polyanions films containing biomolecules to sensing toxicity, *Faraday Discuss.*, 116 (2000) 77-87.

[140] L. Zhou, J. Yang, C. Estavillo, J. D. Stuart, J. B. Schenkman and J. F. Rusling, Toxicity screening by electrochemical detection of DNA damage by metabolites generated in situ in ultrathin DNA-enzyme films, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 1431-1436.

Chapitre II

Techniques expérimentales

Dans le présent chapitre nous décrivons les fondements théoriques et pratiques sur lesquels s'appuient les techniques expérimentales utilisées pour la réalisation de ce travail.

I. La voltamétrie

La voltamétrie est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés, présents dans la solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel appliquée entre deux électrodes spécifiques. Elle permet d'une part d'identifier un grand nombre de composés (cations, certains anions, composés organiques) et d'autre part de déterminer leurs concentrations, sans oublier son rôle dans l'étude cinétique des réactions mises en jeu.

I.1. Composants et principes des techniques voltamétriques.

Les unités de base d'un analyseur voltamétrique sont illustrées par la [figure 1](#). Elles sont composées par :

- Une cellule électrochimique de mesure comportant trois électrodes immergées dans la solution à analyser. Les trois électrodes sont:
 - i) une électrode de travail (parfois appelée électrode indicatrice), constituée par l'électrode modifiée utilisée ;
 - ii) une électrode de référence (calomel saturée) reliée à un capillaire de Luggin ;
 - iii) une contre électrode constituée par une plaque de platine.
- Un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant.

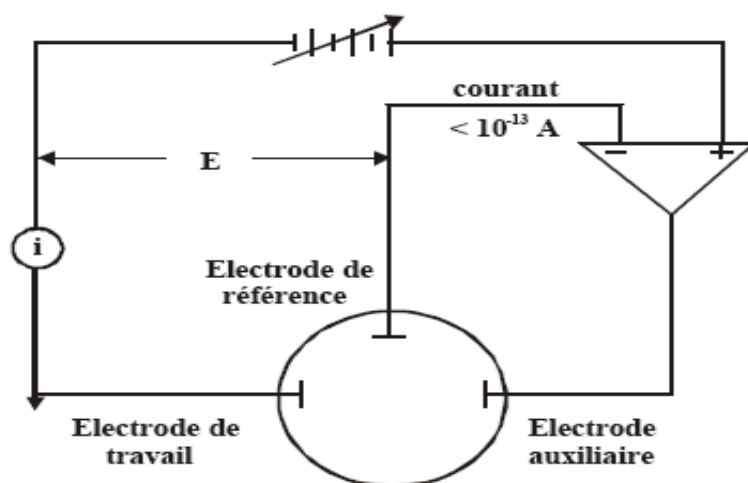


Figure 1 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat.

I.2. Analyses voltamétriques [1]

Les techniques voltamétriques sont basées sur l'enregistrement du courant i , qui passe entre une électrode de travail (WE) et une électrode auxiliaire (AE), dû à la réduction ou à l'oxydation de l'élément à analyser.

Les différentes techniques voltamétriques découlent des innovations portant sur la façon dont le signal $E=f(t)$ est imposé et le signal $i=f(E)$ mesuré, qui ont été développées dans le but d'obtenir un rapport $i(\text{Faradique})/i(\text{capacitif})$ maximal afin d'augmenter la sensibilité.

En voltamétrie, le potentiel E appliqué à l'électrode de travail varie en fonction du temps selon la relation :

$$E = E_i \pm vt$$

où v est la vitesse de variation de potentiel, $v = dE/dt$, t est le temps et E_i le potentiel de départ. Le courant i est mesuré en fonction du potentiel E . Les courbes $i=f(E)$ obtenues sont appelées des voltammogrammes.

La variation du potentiel E peut être linéaire ou modulée, donnant lieu à des techniques possédant des caractéristiques différentes. Le courant i dans le circuit est principalement la somme de deux courants : le courant faradique, i_f , et le courant capacitif, i_c .

Les techniques voltamétriques utilisées dans ce travail sont :

- La voltamétrie cyclique,
- La voltamétrie à onde carré.

I.2.1. La voltamétrie cyclique

Le principe de la voltamétrie cyclique est comparable à la voltamétrie linéaire, mais le balayage des potentiels s'effectue de façon cyclique. Par exemple, après avoir balayé vers les potentiels anodiques et réalisé une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel effectue pour une exploration vers les potentiels cathodiques. On enregistre donc sur le voltammogramme les courbes de polarisations anodiques et cathodiques du système. Cette méthode consiste à analyser le comportement électrochimique d'un système en appliquant à une électrode un balayage de potentiel variant avec le temps et enregistré $I(E)$, ceci revient à construire une surface tridimensionnelle $[I, E, t(E(t))]$ (figure 2).

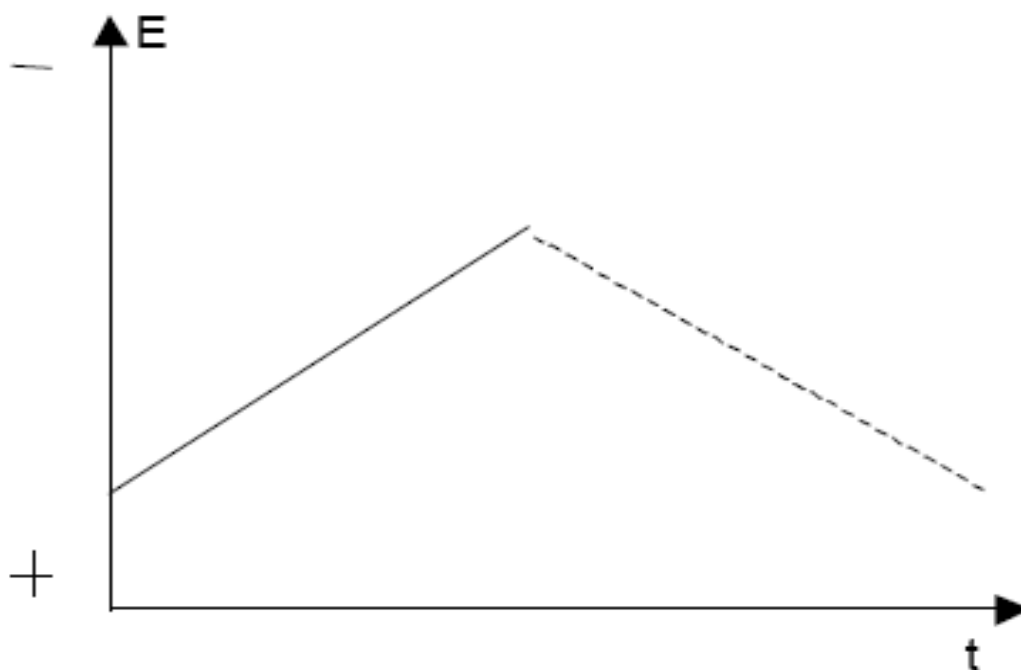


Figure 2: Fonction imposée

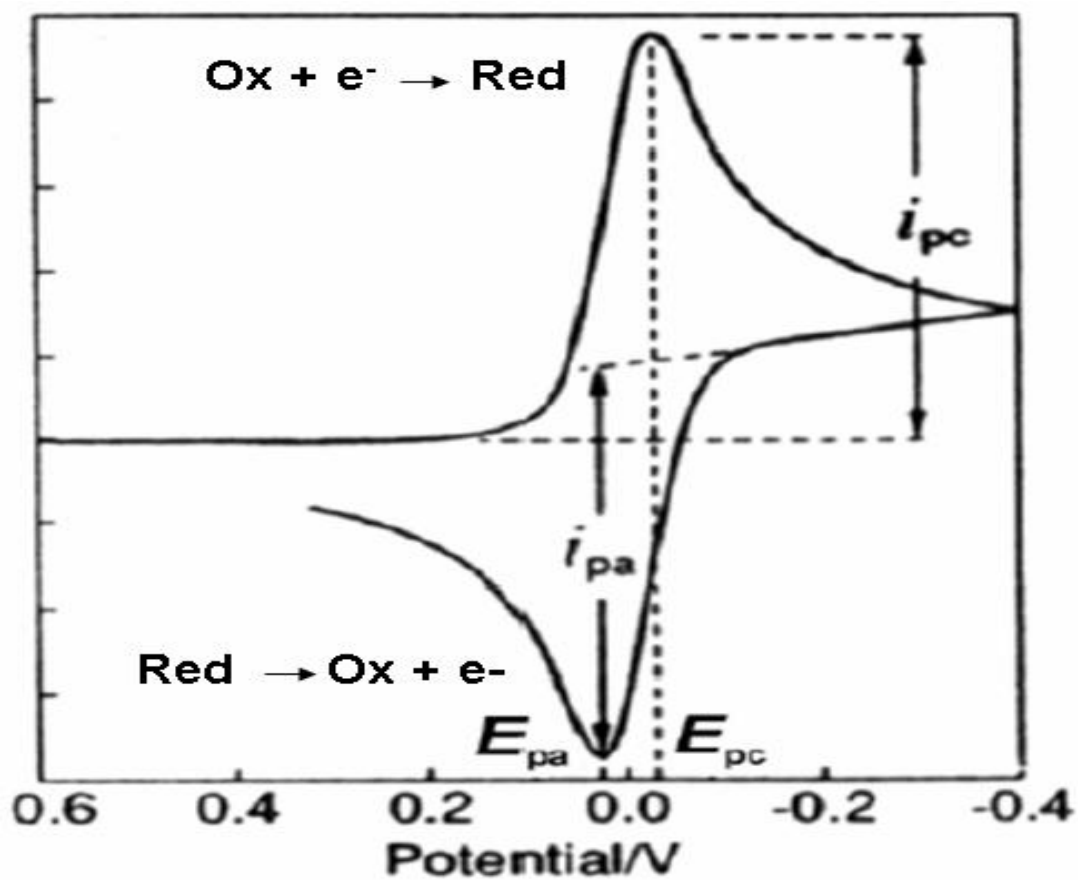


Figure 3: Voltammogramme cyclique enregistré pour une espèce Red seule en solution.

Le signal électrique est fourni par un générateur qui délivre une tension en « dents de scie », les balayages anodiques et cathodiques sont alors réalisés à la même vitesse. Mais il est également possible d'effectuer un balayage aller lent et revenir rapidement (ou l'inverse).

La voltamétrie est largement utilisée sur le plan fondamental par des chimistes inorganiciens, des physico-chimistes et des biochimistes qui étudient le mécanisme et la cinétique des réactions d'oxydation et de réduction dans divers milieux, et celui du processus d'adsorption et de transfert électronique sur des surfaces chimiquement modifiées.

Au milieu des années 1960, divers développements nouveaux ont amélioré significativement la sensibilité et la sélectivité des méthodes voltamétriques, c'est à cette époque que sont apparus les amplificateurs opérationnels, dispositifs peu coûteux, qui ont permis l'essor commercial d'une nouvelle génération d'appareils très performants qui ont attiré l'attention de plusieurs auteurs [2-6].

La voltamétrie cyclique, s'est surtout développée en tant que moyen d'étude des mécanismes des réactions d'oxydo-réduction. Ses applications en analyse quantitative étant limitées.

La principale fonction d'un potentiostat est de contrôler le potentiel et de mesurer le courant. Le potentiostat à trois électrodes est relié aux électrodes de travail, de référence, et contre électrode, ces électrodes sont immergées dans la solution à étudier.

La voltamétrie cyclique est la méthode de choix pour l'étude de la réversibilité d'un transfert électronique puisque l'on trace, sur le même voltammogramme, les courbes d'oxydation et de réduction.

En électrochimie, on utilise souvent l'équation de Nernst (1):

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (1)$$

Avec E° : le potentiel standard du couple Ox/Red,

R : la constante des gaz parfaits,

T : la température en Kelvin

n : le nombre d'électrons mis en jeu

F : la constante de Faraday.

Cette loi relie le potentiel E de l'électrode à la concentration des espèces qui participent à la réaction électrochimique :



Si le potentiel de l'électrode peut être calculé à l'aide de la relation de Nernst ou d'une équation qui en dérive, la réaction d'électrode est appelée réversible. On dit aussi que l'électrode a un comportement nernstien.

Les deux caractéristiques d'un voltammogramme sont le courant de pic (i_p) et le potentiel de pic (E_p). Le courant de pic est donné par l'équation de Sevcik-Randles [7]:

$$i_p = K A n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} C \quad (3)$$

avec K : coefficient numérique,
A : surface de l'électrode (cm^2),
D : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),
v: vitesse de balayage ($\text{v} \cdot \text{s}^{-1}$),
C : concentration de l'espèce étudiée ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Le courant i_p étant proportionnel à la concentration de C de l'espèce analysée, remarquons que la grandeur $i_p/Cv^{1/2}$ est constante. Ce critère est souvent utilisé (à C variable) pour vérifier qu'il n'y a pas de réaction chimique couplée à la réaction électrochimique.

Pour ce système, l'écart entre les potentiels de pics d'oxydation et de réduction est indépendant de la vitesse de balayage :

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = 0.06/n \quad (4)$$

avec n nombres d'électron mis en jeu.

Le potentiel standard pour un système réversible est donné par :

$$E^\circ = (E_{p,a} + E_{p,c})/2 \quad (5)$$

Dans le cas d'un système irréversible, la loi de Nernst ne s'applique plus à l'électrode et ΔE_p est plus grand et varie avec la vitesse de balayage.

I.2.2. La voltamétrie à onde carrée (SWV : square wave voltammetry)

La voltamétrie à onde carrée est basée sur la combinaison d'une modulation d'onde carrée d'amplitude $\Delta E = 50 \text{ mV}$ et de période $1/f$ (typiquement la fréquence $f = 50$ à 200 Hz)

avec une rampe en escalier (figure 4). Le signal mesuré est la différence Δi entre les courants mesurés, à la fin de chaque pulse montant et descendant de l'onde carrée, (figure 5). Le pas de potentiel ΔE_p , la durée et l'amplitude sont des paramètres susceptibles d'influencer la largeur et la hauteur de pic, c'est-à-dire, le pouvoir de résolution et la sensibilité de la méthode. Le principal avantage de la SWV, est qu'elle permet de varier le potentiel à des vitesses beaucoup plus élevées, typiquement $v = 400$ à 1600 mV s^{-1} , et ainsi permettent d'augmenter le rapport i_f/i_c et par la sensibilité, en prenant avantage des réponses temporelles différentes du i_f et i_c . En effet, après un changement instantané de potentiel, la décroissance du courant capacitif a lieu plus rapidement que la décroissance du courant faradique. En voltamétrie à onde carré, deux courants sont mesurés : celui mesuré à la fin de pulse haut et celui mesuré à la fin du pulse bas. Ces deux courants sont ensuite automatiquement soustraits pour donner le courant (visualisé). Le signal est sous forme de pics et la variation de potentiel peut être rapide. Cette méthode autorise des vitesses de balayage de plus de 1 V s^{-1} .

II. Mesure d'impédance électrochimique

L'application des mesures d'impédance électrique aux systèmes électrochimiques a introduit une méthodologie d'analyse différente pour étudier le comportement d'un système électrochimique à une électrode indicatrice donnée, faisant appel à une excitation de type alternatif (sinusoïdale) et de faible amplitude [$E(t)=E_0+\Delta E(t)= \Delta E_0 \sin(\omega t)$], cette différence de potentiel étant imposée entre l'électrode de travail et une électrode de référence (potentiel supposé fixe), la contrainte revient à surimposer une variation sinusoïdale $\Delta E(t)$ du potentiel de l'électrode de travail à une valeur fixe E^0 (généralement E^0 est choisie de façon à avoir un courant nul dans la cellule électrochimique, (le potentiel d'abandon)).

L'obtention des caractéristiques des systèmes étant basée sur l'analyse de la réponse (courant alternatif de faible amplitude) [$I=I^0+\Delta I(t)=\Delta I^0 \sin(\omega t+\phi)$], non plus en fonction du potentiel d'électrode, mais en fonction de la fréquence du signal alternatif d'excitation ce qui a conduit à désigner la méthode par le terme de spectroscopie d'impédance.

La réponse du système est un courant d'intensité $I(t)$, composante continue I^0 (le courant correspondant au potentiel E^0 , courant évidemment nul dans le cas où E^0 est le potentiel d'abandon) et une composante alternative $\Delta I(t)$. Si I^0 n'est pas nul, on opère dans les conditions où ce courant est stationnaire ($I^0=\text{constante}$).

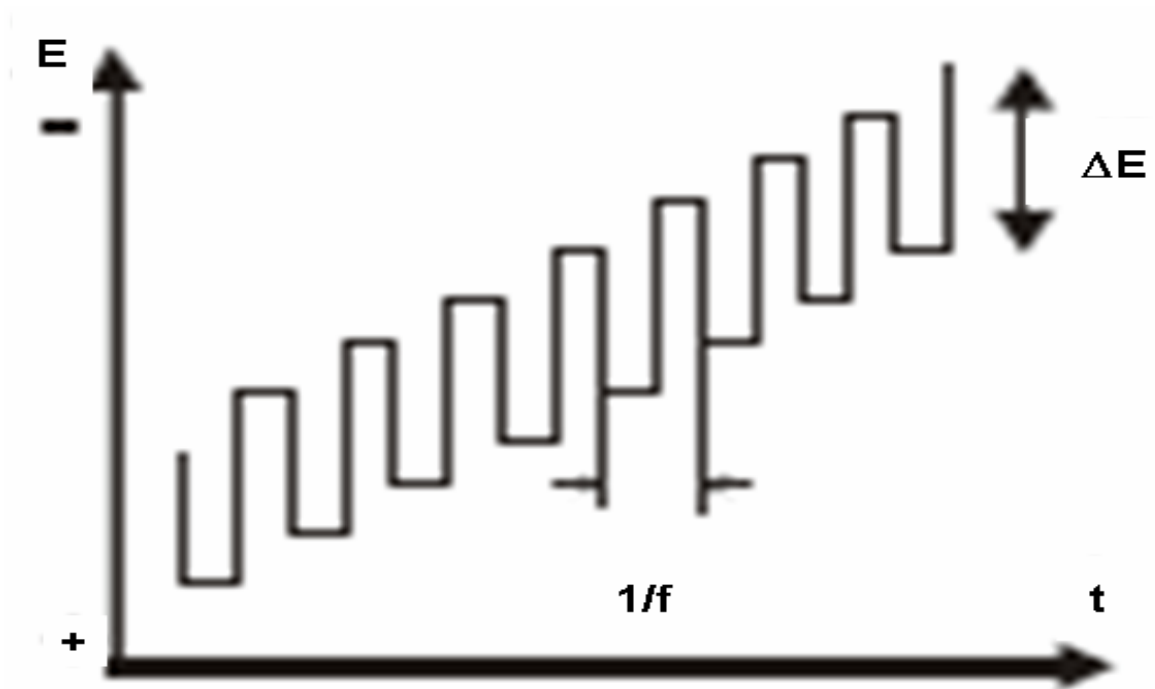


Figure 4: Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps.

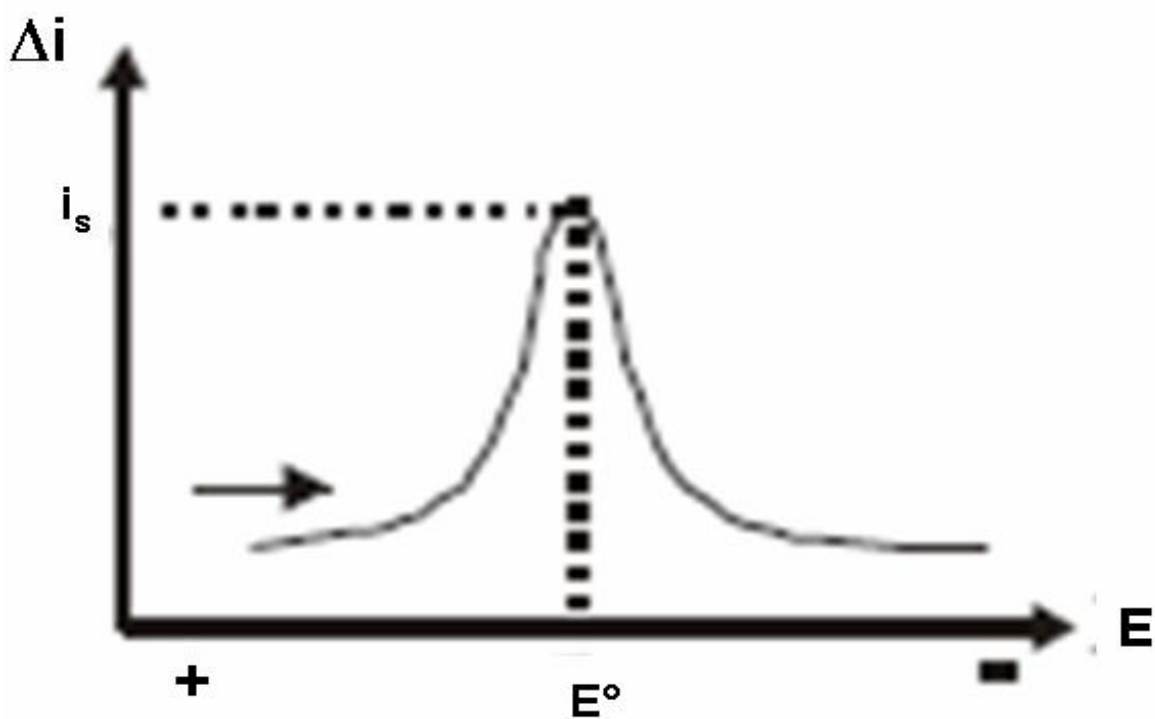


Figure 5: Voltamogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.

L'impédance électrochimique autorise souvent l'accès aux mécanismes mis en jeu. En effet, par un balayage en fréquences du signal sinusoïdal perturbateur, les mécanismes sont découplés et apparaissent séparément en fonction de leur constante de temps.

Lors de l'étude des systèmes électrochimiques par impédance, les diagrammes sont souvent plus complexes.

Ils font apparaître de la sortie, d'une manière générale, deux types de boucles de variations d'impédance (figure 6) :

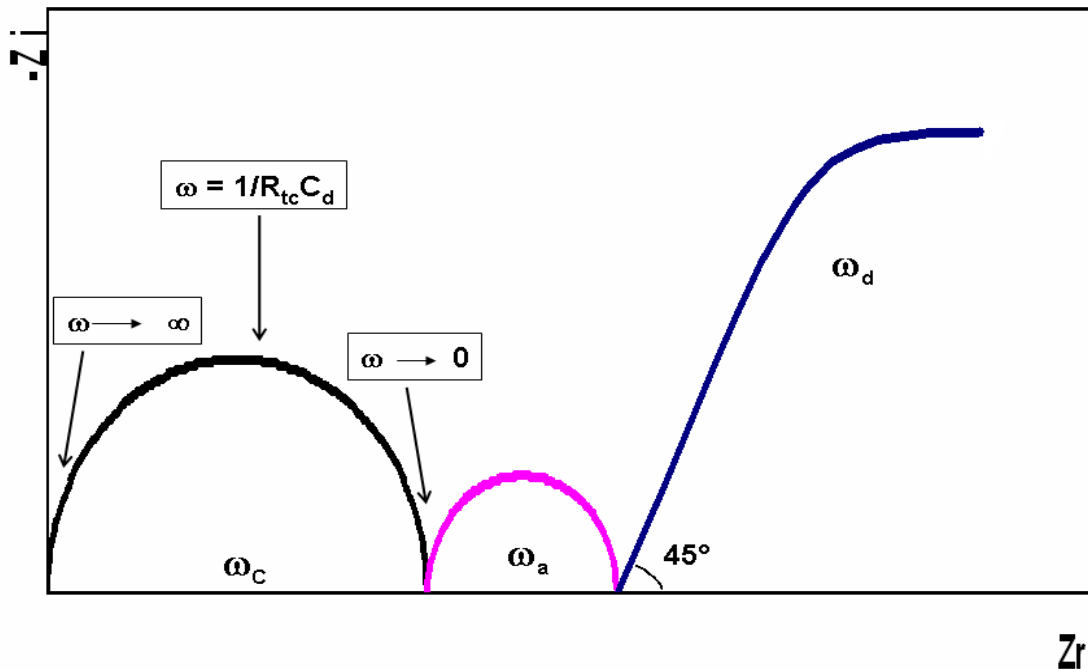


Figure 6: Représentation de la variation de l'impédance d'un système électrochimique en fonction de la pulsation ω . Cas idéal où les pulsations ω_c , ω_a , ω_d sont suffisamment différentes les unes des autres.

Une boucle (circulaire) à haute fréquence, correspondant au couplage capacité interfaciale-résistance de transfert de charge (au potentiel E° imposé), caractérisée par la fréquence f_c (fréquence du sommet de la boucle) : cette boucle est désignée par le terme de « boucle capacitive » ; elle permet (en principe) d'atteindre les valeurs de la résistance de transfert de charge (R_{tc}) (détermination du rayon de l'arc de cercle), de la capacité de la double couche (C_d) (à partir des valeurs de f_c et de R_{tc}) et de la résistance de cellule R_c (par extrapolation de l'arc de cercle jusqu'à l'axe des réels, à fréquence infinie),

Des boucles à basse fréquence, attribuées aux phénomènes de surface, adsorption d'intermédiaires réactionnels ou processus de diffusion de surface. Cette dernière correspondant à l'intervention prédominante du processus faradique (transfert de charge à l'interface d'électrode et processus diffusionnel), le passage de courant alternatif par le processus capacitif interfacial se trouvant alors bloqué. Cette boucle que l'on désigne par le

terme de « boucle de diffusion », peut être caractérisée par la fréquence de diffusion (f_d). Son amplitude mesurée sur l'axe des réels est fonction à la fois de R_{tc} et des caractéristiques du processus diffusionnel mis en jeu, notamment de l'épaisseur de la couche de diffusion.

III. Chronoampérométrie

La Chronoampérométrie consiste à mesurer la variation de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à trois électrodes en imposant un potentiel qui permet le transfert électrochimique d'une espèce donnée.

La Figure 7 montre une courbe chronoampérométrique typique caractérisée par la diminution de courant avec le temps. On définit le temps t_s , comme l'intersection de la tangente de cette courbe et l'axe du temps. Le courant résiduel est en rapport avec la morphologie du dépôt.

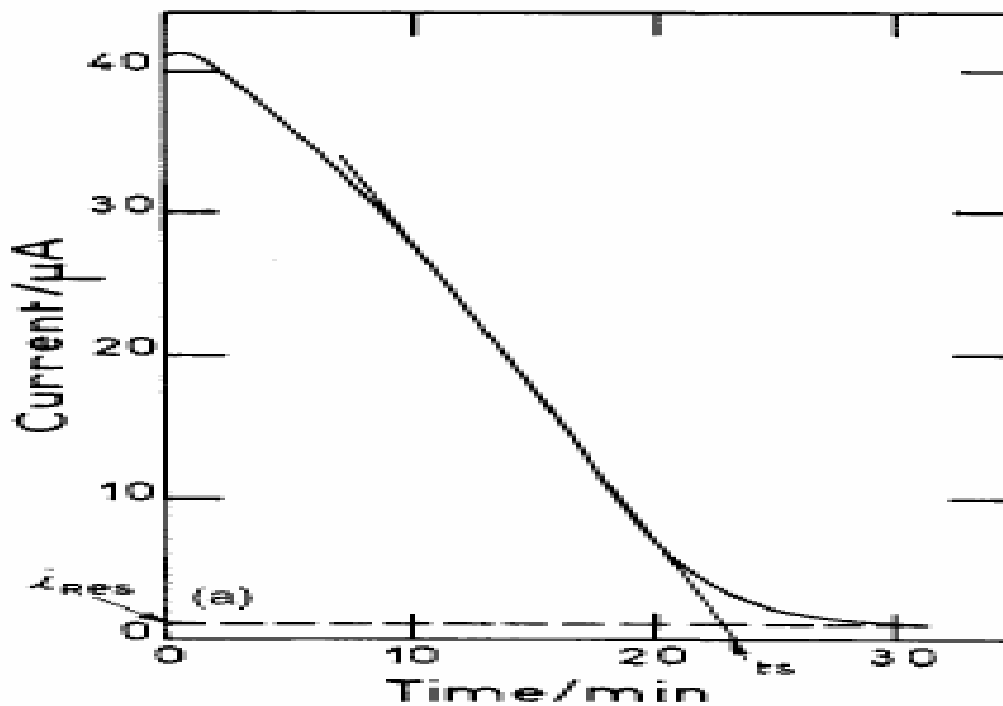


Figure 7: Chronoampérogramme typique ; i_{res} le courant résiduel [8].

Les analyses ampérométriques se réfèrent à une droite d'étalonnage, en vérifiant expérimentalement le coefficient de proportionnalité entre le courant limite de diffusion et la concentration de l'analyte électroactive :

$$i = K C (D/t)^{1/2} \quad (6)$$

avec K : coefficient numérique,

D : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

C : concentration de l'espèce étudiée ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$).

La sensibilité de l'analyse est influencée par la présence des impuretés électro-actives dans l'électrolyte, ceci donne un courant appelé résiduel, ce dernier dépend également de la nature de l'électrode et des traitements chimiques et électrochimiques qui lui ont été imposés [9,10]. La mise sous tension d'électrode de travail crée un courant capacitif qui s'annule rapidement.

IV. Chronopotentiométrie

Les techniques électroanalytiques font intervenir essentiellement trois grandeurs (ou une fonction qui en dérive, par exemple l'impédance électrochimique) qui sont le courant i , le potentiel E et le temps t . Etymologiquement, la chronopotentiométrie est une mesure du potentiel E en fonction du temps t . En pratique, on impose à l'aide d'un ampérostatis (générateur à courant contrôlé) l'intensité de courant qui circule entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire, et on mesure la différence de potentiel existant entre l'électrode indicatrice et une électrode de référence. L'électrochimie à courant imposé peut revêtir diverses formes selon le signal d'excitation imposé i , constant ou variable avec le temps. Généralement on se limite au signal non nul (ce qui implique au moins une réaction électrochimique) et constant (figure 8).

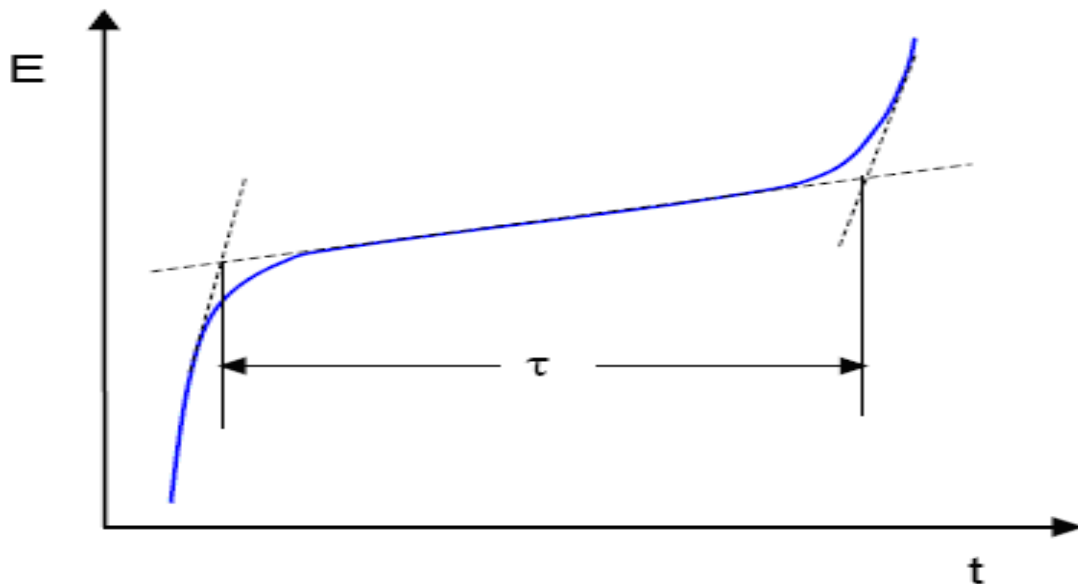


Figure 8: Chronopotentiogramme typique d'un système électrochimique réversible.

Dans le cas considéré, c'est-à-dire dans celui de l'existence d'une réaction électrochimique en régime de diffusion pure, la modification transitoire des espèces électro-

actives qui en résultent entraîne une variation temporelle de la réponse à toute excitation électrique appliquée à l'électrode indicatrice. Le potentiel de l'électrode change alors rapidement de telle sorte que la réaction électrochimique d'une seconde espèce électroactive puisse produire. Le temps qui s'écoule entre l'instant où l'on impose le courant i et celui où le potentiel varie brusquement, est noté τ , on l'appelle temps de transition. Le temps τ est relié à la concentration et au coefficient de diffusion de l'espèce électroactive considérée par l'équation de Sand [11] :

$$i \tau^{1/2} = 85500 n D^{1/2} A C \quad (7)$$

avec A : surface de l'électrode (cm^2),
 D : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),
 C : concentration de l'espèce étudiée ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$).

La forme de la courbe $E=f(t)$ dépend de la réversibilité de la réaction électrochimique.

V. Spectrométrie infrarouge

La spectroscopie infrarouge constitue une méthode puissante d'étude des apatites. Elle fournit souvent des données structurales qui ne peuvent pas être atteintes par d'autres techniques.

Le rayonnement électromagnétique interagit avec la matière en donnant des effets différents selon l'énergie ou la fréquence qui lui est caractéristique. Les radiations infrarouges ont des nombres d'ondes comprises entre 15400 cm^{-1} et 10 cm^{-1} . Les absorptions dans le domaine de l'infrarouge sont utilisées pour l'analyse d'échantillons divers.

Le domaine infrarouge peut être divisé en trois régions :

- l'infrarouge lointain de 10 à 400 cm^{-1}
- l'infrarouge moyen de 400 à 5000 cm^{-1}
- le proche infrarouge de 5000 à 12500 cm^{-1}

L'infrarouge moyen est le plus utilisé car la plupart des fréquences caractéristiques des groupements fonctionnels y sont situées. L'énergie de vibration des liaisons interatomiques correspond à l'énergie de rayonnements infrarouge.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé un appareil PERKIN-ELMER FTIR à transformée de Fourier (4000-400 cm^{-1}).

Des pastilles sont préparées par ajout du bromure de potassium à la poudre du produit (environ 2mg de poudre pour 300mg de KBr) et le mélange est homogénéisé par broyage puis comprimé.

VI. Diffraction des rayons X

Les phases que nous avons obtenues sont identifiées par leurs diffractogrammes de poudre de diffraction des rayons X. Les enregistrements sont effectués à température ambiante, sur un diffractomètre Philips PW 1710, utilisant la radiation $K\alpha$ du cuivre ($\lambda_{\text{Cu}} = 1.5418 \text{ \AA}$).

Les enregistrements des diffractogrammes de poudre sont effectués de manière systématique, pour chaque produit synthétisé, sur l'intervalle de valeurs d'angle 2θ variant de 10 à 70 degrés, par pas de 0.02 degré, avec un temps de comptage de 1 seconde par pas.

L'identification des raies obtenues se fait par comparaison avec celles des fichiers de référence établis par Joint Committee for Powder Diffraction File (J.C.P.D.F).

En diffraction, seule la diffusion cohérente est exploitée. Un échantillon cristallin réfléchit les rayons X mais seulement pour les angles qui vérifient la relation de Bragg :

$$2d \cdot \sin\theta = k\lambda \quad (8)$$

Connaissant la longueur d'onde du rayonnement X incident, la mesure de l'angle de réflexion permet de déterminer les distances interréticulaires caractéristiques du ou des composés cristallins.

VII. Microscopie électronique à balayage

Les poudres ont été examinées par microscopie électronique à balayage. Les poudres dispersées et collées sur le porte échantillon sont métallisées sous vide afin de les rendre conductrices.

L'examen des micrographies renseigne sur la forme des cristallites, la distribution des formes et des tailles, l'état d'agglomération, et sur la porosité.

VIII. Surfaces spécifiques d'échanges (méthode BET)

La méthode de la mesure de surfaces spécifiques présente l'avantage de fournir deux paramètres concernant la connaissance de la structure du solide : l'étendue de l'interface solide gaz et une estimation de l'énergie d'adsorption. Nous pouvons obtenir également une estimation de la microporosité et de la mésoporosité. La surface spécifique se détermine à partir de la mesure de la pression relative qui permet de calculer le nombre de molécules de gaz adsorbées. L'étude du graphique permet de déterminer le nombre de molécules de gaz adsorbées lorsque celles-ci forment une couche mono moléculaire, en connaissant l'aire d'encombrement d'une molécule de ce gaz, il est possible de déterminer la surface spécifique de la poudre du solide. Une calibration est toutefois nécessaire pour mesurer le volume de gaz adsorbé, car la surface spécifique dépend de la masse du solide considéré.

La surface totale de l'échantillon est donnée par l'équation :

$$St = 3.98 [1-P/P0] [A_{des}/A_{cal}] V_{cal} \quad (9)$$

$P/P0 = 0,3$ pression partielle d'azote

A_{des} : aire du pic de désorption

A_{cal} : aire du pic de calibration

V_{cal} : volume de la cellule de calibration

La surface spécifique est donnée par la formule :

$$S = St/M \quad (10)$$

M : masse de l'échantillon

Pour quelques échantillons obtenus par de nouvelles synthèses, nous avons fait une mesure BET sur un Micromeritics ASAP 2010 (Micromeritics, France).

Références

- [1] H.H. Girault, Electrochimie : physique et analytique, Presses polytechnique et universitaires romandes, 2001.
- [2] W. Kemula, Z. Kublik, Nature, 182 (1958) 793.
- [3] R.S. Nicholson, Anal. Chem. 37 (1965) 667.
- [4] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochimie, principes, methods et applications, Masson, Paris, 1983.
- [5] R.N. Adams, Electrochemistry at solid electrodes, M. Dekker, New York, 1969.
- [6] R.S. Nicholson, I. Shain, Anal. Chem., 36 (1964) 706.
- [7] P. Skladal, Electroanalysis, 9 (1997) 745.
- [8] C. Gabrielli, M. Keddou, H. Perrot, A. Khalil, R. Rosset, M. Zidoune, J. Appl. Electrochem., 26 (1996) 1125-1132.
- [9] B.D. Epstein, E. Dalle-Molle, J.S. Mattson, Carbon, 9 (1971) 609.
- [10] V.L. Snoeyink, W.J. Weber, Progr. Surface Membrane Sci., 5 (1972) 63.
- [11] H.J.S. Sand, Phil. Mag., 1 (1901) 45.

**Chapitre III : Electrode modifiée pour
le dosage du paracétamol et de la
carbocysteine.**

A- Electroanalyse du paracétamol :

I- Généralité sur Le paracétamol :

Le Paracétamol, appelé aussi acétaminophène, est un amide aromatique acétylé, introduit en médecine comme un composé analgésique - antipyrétique ayant des actions analogues à celle de l'aspirine [1]. Le paracétamol est la substance active de nombreuses spécialités médicamenteuses de la classe des antalgiques antipyrétiques non salicylés. Il est indiqué dans le traitement symptomatique de la fièvre et des douleurs d'intensité faible à modérée, seul ou en association avec d'autres analgésiques, Contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens et notamment l'aspirine, il est dépourvu de propriétés anti-inflammatoires et n'agit pas sur l'agrégation plaquettaire [1,2]

Le paracétamol est un dérivé phénolique, sa structure comporte un cycle benzénique substitué par un groupement hydroxyle et un groupement acétamide en position para (Figure 1).

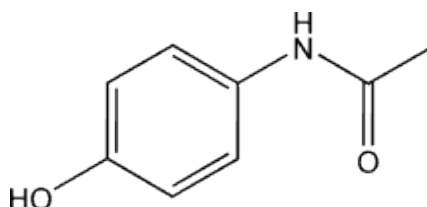


Figure 1 : Structure de paracétamol (N-acetyl-p-amino phenol)

Le paracétamol (l'acétaminophène), est un analgésique qui est le plus prescrit dans le monde entier, Il a l'avantage d'avoir peu de contre-indications, de pouvoir être prescrit à tout âge et d'être dénué d'effets indésirables sérieux lorsqu'il est utilisé à la posologie non recommandée. En cas de surdosage, le paracétamol est très toxique pour le foie et chaque année responsable de décès par hépatite fulminante [3].

L'utilisation d'antipyrétiques remonte à l'Antiquité, Les antipyrétiques utilisés à cette époque étaient des préparations à partir de composés naturels d'écorces de cinchona [4] dont dérive la quinine, ou à partir de salicylate contenu dans l'écorce de saule. L'écorce de cinchona devint rare et chère et le besoin de trouver des substituts apparut. Harmon Northrop Morse synthétisa dès 1878 une substance baptisée acétylaminophénol grâce à la réduction du p-nitro phénol avec de l'étain dans l'acide acétique glacial [5,6], sans toutefois lui attribuer une quelconque propriété médicale : c'est seulement cinquante ans plus tard qu'elle fut commercialisée comme médicament sous le nom de paracétamol. À cette époque, d'autres produits sont utilisés comme remède contre la douleur et la fièvre : en 1882, Hoechst commercialise le Kairin découvert par Otto Fisher [7], en 1897, l'aspirine est synthétisée par Felix Hoffmann et connaît un grand succès. BASF ne pousse guère son antipyrétique Thallin,

mis au point vers 1885. L'acétanilide (1886) et la phénacétine (1887) sont aussi utilisés jusqu'à se révéler être des produits dotés d'effets secondaires graves et que les inconvénients de l'aspirine commencent à être connus. Le paracétamol réapparaît alors et les premières études sur les propriétés antipyrétique et antalgique du paracétamol sont conduites à la fin du XIXe siècle.

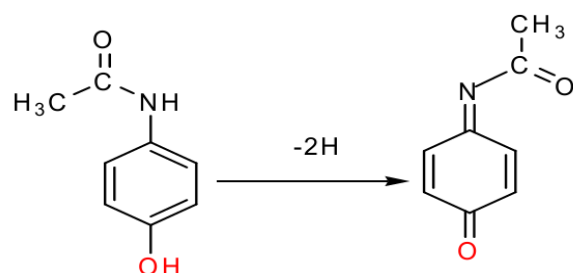
Cependant, l'acétanilide est très toxique et de nombreuses recherches se consacrent à l'élaboration de dérivés mieux tolérés tout en conservant les propriétés analgésiques [8]. Le paracétamol fut trouvé dans les urines des personnes ayant consommé de la phénacétine. En 1889, le scientifique allemand Karl Morner découvre qu'un fragment de la phénacétine, l'acétaminophène, est un produit efficace contre la douleur et la fièvre. Une étude métabolique de ce médicament montre qu'il s'agit d'un métabolite déséthylé de la phénacétine. Cette hypothèse fut formulée dès 1894, mais fut largement ignorée à l'époque [9]. En 1893, un médecin allemand, Joseph von Mering, compare les propriétés antalgiques et antipyrétiques du paracétamol et de la phénacétine ainsi que leurs toxicités respectives. Il tire de cette étude la conclusion, erronée, que le paracétamol est plus néphrotoxique que la phénacétine : la notoriété de Von Mering fera que ce jugement ne sera pas contesté si bien que le paracétamol sera délaissé pendant un demi-siècle. La phénacétine sera largement employée dans les névralgies sous le nom de Veganine [10]. La toxicité de la phénacétine pour le rein sera démontrée par la suite, entraînant son retrait du marché.

Le paracétamol a attiré peu d'attention clinique au cours du 19ème siècle. Cependant, et après avoir été reconnu comme le chef métabolite de l'acétanilide et la phénacétine, le paracétamol a connu un regain d'intérêt. En tant que dérivé de la p-amino phénol, le paracétamol correspond au principe métabolite actif de la phénacétine. Il a été communément admis à l'époque que leur conversion rapide par l'organisme en paracétamol était en fait le responsable de l'effet thérapeutique des deux médicaments. Il a finalement été établi que la phénacétine avait sa propre action pharmacologique. Mais une forte proportion de la phénacétine est transformée en paracétamol dans le foie [11].

Le paracétamol agit comme un faible inhibiteur de la prostaglandine. Il réalise ceci en bloquant la production de prostaglandines, qui sont impliqués dans la transmission du message de la douleur au cerveau. À cet égard, le paracétamol bloque le message douloureux au cerveau et non pas à la source de douleurs [11].

De nos jours, l'intoxication par le surdosage du paracétamol représente le moyen le plus couramment utilisé lors des tentatives de suicide, parce que le surdosage du paracétamol est souvent cause d'insuffisance hépatique, les raisons de cette intoxication sont à voir avec le

moyen par lequel le paracétamol est éliminé du corps, Il est métabolisé en premier en quinone imine [12].



La Quinone-imine est extrêmement toxique, et comme d'autres composés qui sont éliminés dans le foie par réaction avec un tripeptide, et le glutathion. Si une quantité insuffisante de glutathion est présente, la quinone toxique ne sera pas éliminé et commence à réagir avec des protéines cellulaires et les acides nucléiques dans le foie, causant des dommages irréparables [12,13].

1- Synthèse de paracétamol :

Le paracétamol est l'une des drogues les plus répandues dans le monde, et fabriqué en grandes quantités. La matière première pour la fabrication industrielle de paracétamol est le phénol, qui est nitré pour donner un mélange de l'ortho-et para-nitro phénol. L'isomère ortho est éliminé par distillation à la vapeur, et le groupe nitro est réduit par du phénol en para aminophénol. Puis ce composé est acétylé pour donner du paracétamol [13].

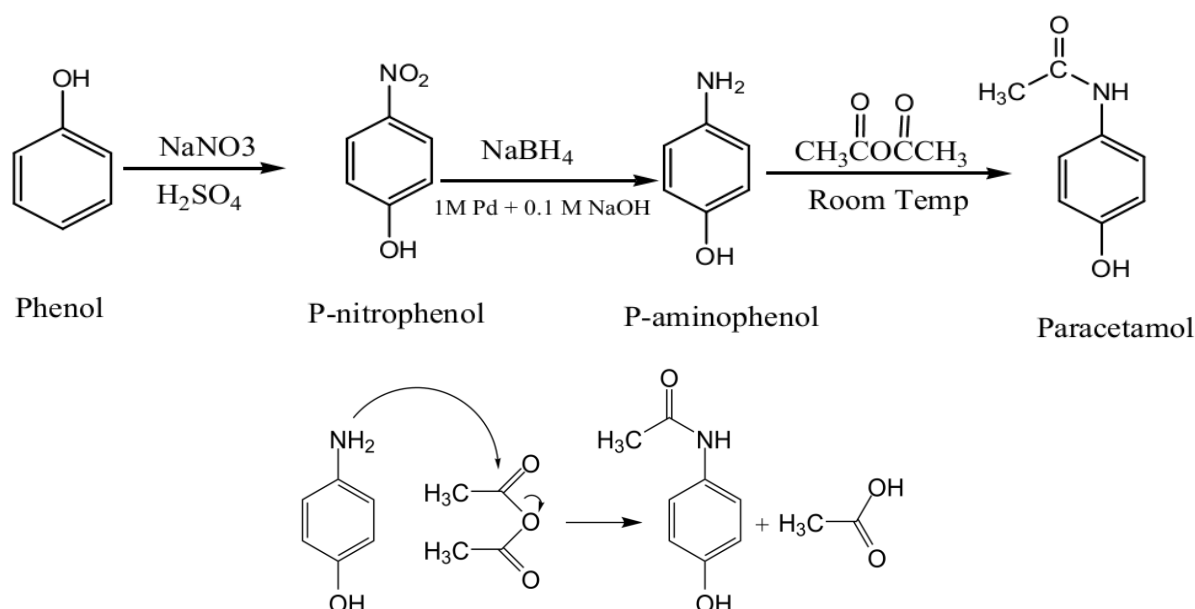


Schéma.1. Synthèse de paracétamol à partir du phénol.

2- Propriétés physiques du paracétamol :

Dans les conditions ordinaires le paracétamol est une poudre blanche, cristalline et inodore avec un goût amer. Il est soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, le chloroforme et l'alcool méthylique. Il est également soluble dans l'hydroxyde alcalin, mais insoluble dans le benzène et l'éther. Le point de fusion de ce composé est compris entre 169-170°C. [13].

3- Propriétés chimiques du paracétamol :

Le paracétamol est plus stable à des solutions aqueuses saturées. Son pKa est de 9,5 en solution aqueuse. La stabilité décroît dans des conditions acides ou alcalines. Il est lentement décomposé en acide acétique et p-aminophénol [13].

4- Electrochimie du paracétamol :

Une gamme de méthodes pour la détermination analytique de paracétamol a été rapportée dans la littérature comme titrimétrie [14], la spectrophotométrie [15], spectrofluorométrie [16], la voltamétrie [17], HPLC [18], CCM [19], la colorimétrie [20]. Spectrométrie infrarouge à transformées de Fourier [21], et de nombreuses autres méthodes sont proposées pour la détermination de paracétamol. Cependant, ces méthodes souffrent de certains inconvénients tels que des coûts élevés, des temps d'analyse et de longues obligation de prétraitement et, dans certains cas, une faible sensibilité et la sélectivité qui les rend impropres à l'analyse de routine.

Le paracétamol a été étudié par voltammétrie cyclique en utilisant le phosphate et l'acide sulfurique 0,1 M à la fois comme solvant et électrolyte support. Pour cette raison, dans un phosphate tampon 0,1 M l'apparition du meilleur pic est donnée à pH= 7 et à un potentiel anodique de 450 mV en utilisant l'électrode du carbone vitreux par rapport à l'électrode au calomel saturé. En plus de cela, dans l'acide sulfurique le pic est apparu à un potentiel anodique de 618 mV lorsque on utilise l'électrode de carbone vitreux par rapport à Ag / AgCl [22,23,24].

Le présent travail a pour objectif de développer un moyen moins couteux pour l'étude de l'oxydation du paracétamol largement utilisé au Maroc, spécifiquement de:

- ❖ Elaborer un capteur électrochimique à base de carbone graphite modifié par l'électrodéposition du manganèse.
- ❖ Trouver une méthode analytique pour analyser le paracétamol.

II – Partie expérimentale :

Ce travail a été réalisé en utilisant un système à trois électrodes constituant la cellule de mesure, une électrode saturée au calomel (SCE) comme électrode de référence et le platine comme électrode auxiliaire. L'électrode de travail est l'électrode de carbone graphite modifiée par l'électrodéposition du manganèse (Mn-CPE).

1- Préparation de Mn-CPE :

L'électrode à pâte de carbone modifiée a été obtenue par électrodéposition du manganèse sur une pâte de carbone selon le procédé [25];

La cathode était la pâte de carbone graphite, et immergée dans une solution de H₂SO₄ pendant 5 minutes pour dissoudre l'oxyde de l'air formée sur la surface, et l'électrode d'anode est une plaque de platine.

Le courant est maintenu par un générateur de fonction. Ensuite, les électrodes sont immergées dans l'électrolyte de manganèse, et soumis à une oxydation anodique en courant continu à température ambiante. Le dépôt de Mn sur la surface de carbone a été traité à 10,0V.

2- Procédure :

La procédure de travail consistait dans un premier temps à mesurer la réponse électrochimique au Mn-CPE à une concentration fixe de paracétamol. La solution de paracétamol a été ajoutée dans la pile électrochimique contenant 50 ml d'électrolyte support. Le mélange a été maintenu pendant 20 s à circuit ouvert et désoxygéné par barbotage de l'azote gazeux pur avant chaque mesure électrochimique. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante.

3- Résultats et discussion :

a- Caractéristiques de la surface :

La structure de la surface de l'électrode modifiée a été observée à l'aide de la microscopie électronique à balayage (Fig. 2). Sur la surface de la Mn-CPE, on peut observer des dendrites correspondant aux micro-cristaux de manganèse. Cette morphologie dendritique est un classique de la croissance cristalline du manganèse [27].

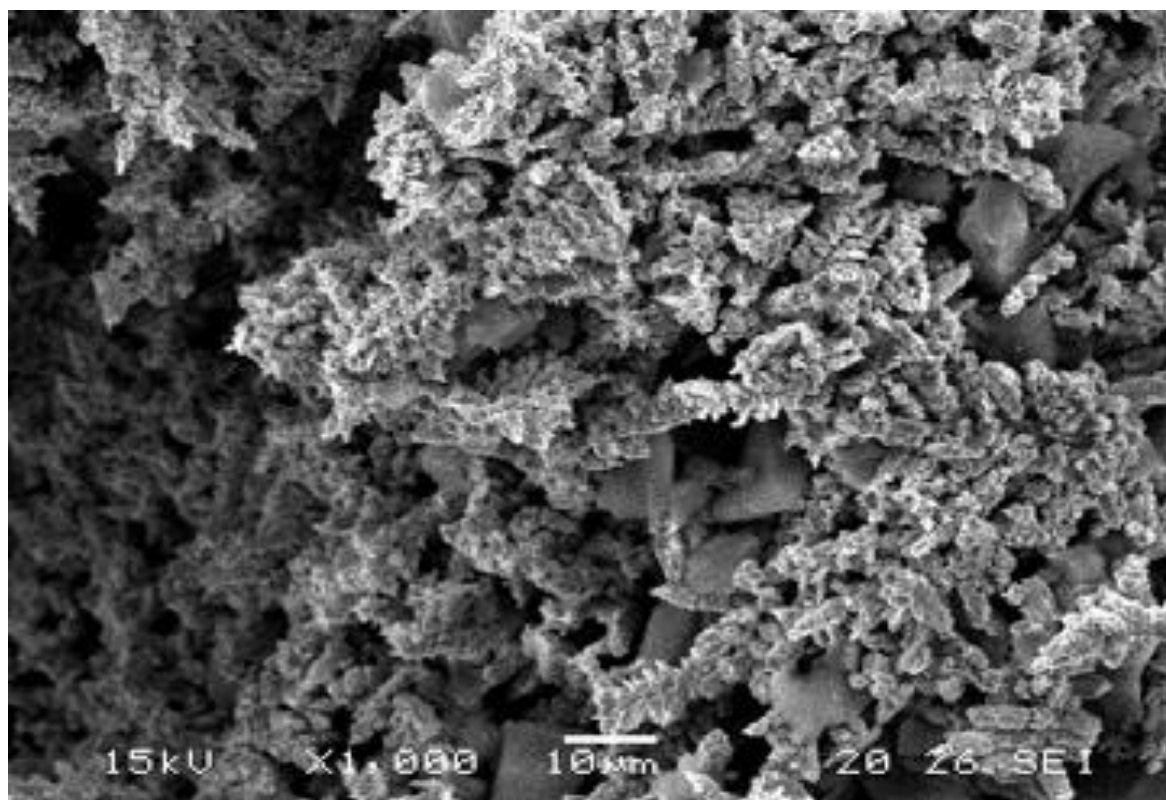


Figure 2 : Micrographie électronique de Mn-CPE

b- Comportement électrochimique du Mn-CPE :

La figure 3 représente les voltammogrammes (CV) enregistrées, en milieu électrolytique (NaCl, 0,1 M) dans la gamme de potentiel comprise entre -1 V et 2 V, respectivement, a) par l'électrode Mn-CPE, et b) pâte de carbone à 100 mV.s⁻¹.

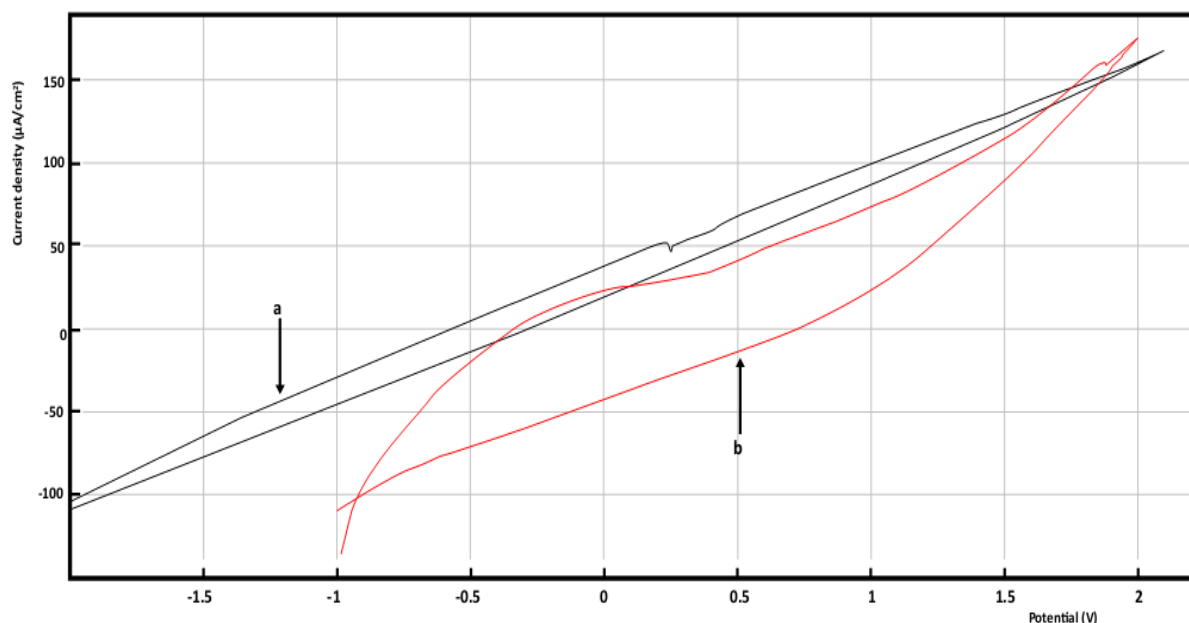


Figure 3: voltammogrammes cycliques enregistrés par : (a) Mn-CPE et (b) CPE dans 0,1 M de NaCl à 100 mV/s.

Les voltammogrammes enregistrés pour les deux électrodes, en milieu électrolytique, présentent des allures différentes, ce qui suggère que la pâte de carbone est bien modifiée par la manganèse.

Le voltammogramme de l'électrode à pâte de carbone ne présente aucun pic dans le domaine de potentiel considéré, c'est une caractéristique du carbone graphite qui ne manifeste aucune activité, vis à vis, du potentiel. En revanche, nous pouvons constater l'apparition de deux pics, le premier anodique à environ 0.5 V et le second au cours du balayage cathodique vers -0.2 V, sur le voltammogramme enregistré par l'électrode Mn-CPE.

Le comportement électrochimique du paracétamol sur la Mn-CPE, ainsi sur l'électrode à pâte de carbone, a été étudié par voltamétrie cyclique dans une solution tampon à pH =7,2 et avec une vitesse de balayage égale à 100 mV.S^{-1} ,

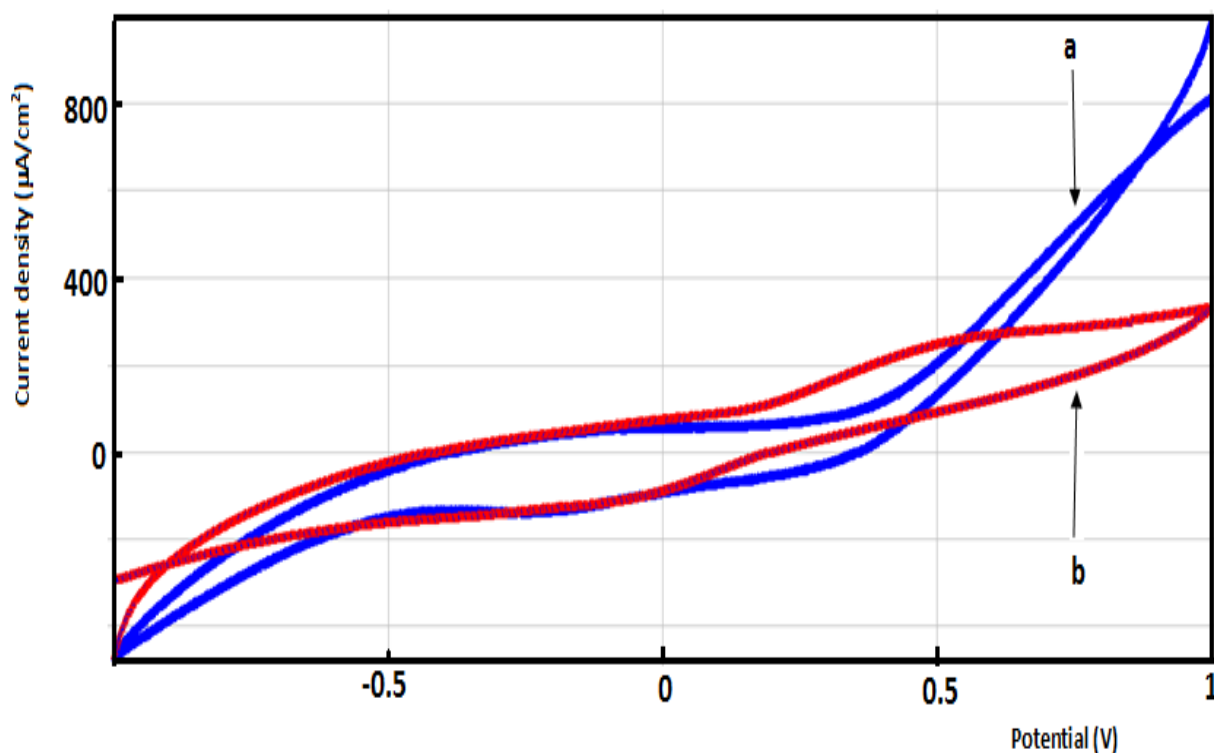


Figure 4: Voltammogrammes enregistrés par CPE (a) et Mn-CPE (b) en présence de 0,5 mM de paracétamol dans une solution tampon de pH=7,2 et avec une vitesse de balayage de 100 mV/S.

Nous constatons que l'électrode CPE présente un comportement irréversible, vis-à-vis, du paracétamol (Fig. 4-a). Le carbone graphite ne présente aucune activité catalytique envers la molécule étudiée. La présence du manganèse dans la matrice du graphite, entraîne l'apparition de deux pics redox sur le voltammogramme enregistré à 100 mV/s, respectivement, à 0.4 v au cours du balayage anodique, et à environ -0.1 V dans la région cathodique.

C- Effet de la vitesse de balayage :

Au cours des expériences suivantes, nous avons fait varier la vitesse de balayage en potentiel et analysé l'effet de cette variation sur le potentiel de pic ainsi que sur le courant de pic.

Sur la figure 5, nous présentons les voltammogrammes cycliques, enregistrés par l'électrode de carbone graphite modifiée par le manganèse, à différentes vitesse de balayage, en milieu électrolytique contenant le paracétamol.

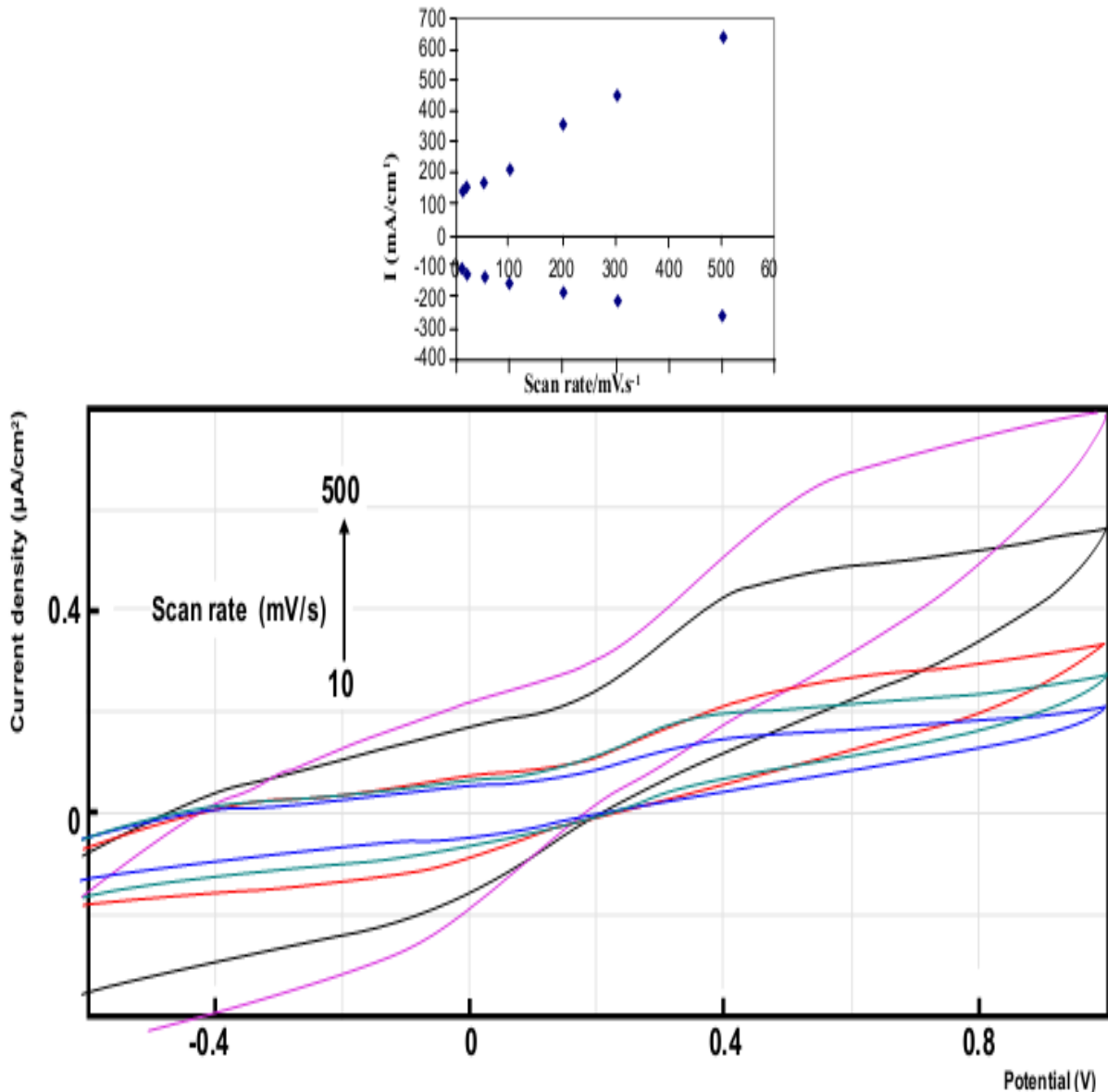


Figure 5: Voltammogrammes enregistrés par Mn-CPE avec 0,5 mM de paracétamol dans une solution tampon à différentes vitesses de balayage de 10 à 500 mV.s⁻¹.

Les intensités des pics anodique et cathodique varient linéairement avec la vitesse de balayage, dans la gamme comprise entre 10 et 500 mV/S, ce qui indique que la vitesse de la réaction est limitée par la diffusion [26].

Les équations de régression linéaire:

➤ $I_{pa} = 1.0431 v + 129.39$ $R=0.9943$

➤ $I_{pc} = -0.3026 v - 119.87$ $R=0.9912$

d- Effet de pH :

L'effet du pH sur la réponse voltamétrique de paracétamol a été étudiée dans la gamme de pH comprise entre 4.0 et 9.0. La figure 6 montre les voltammogrammes enregistrés, pour l'électrode Mn-CPE, à différentes valeurs de pH, en milieu électrolytique contenant 0,5 mM de paracétamol.

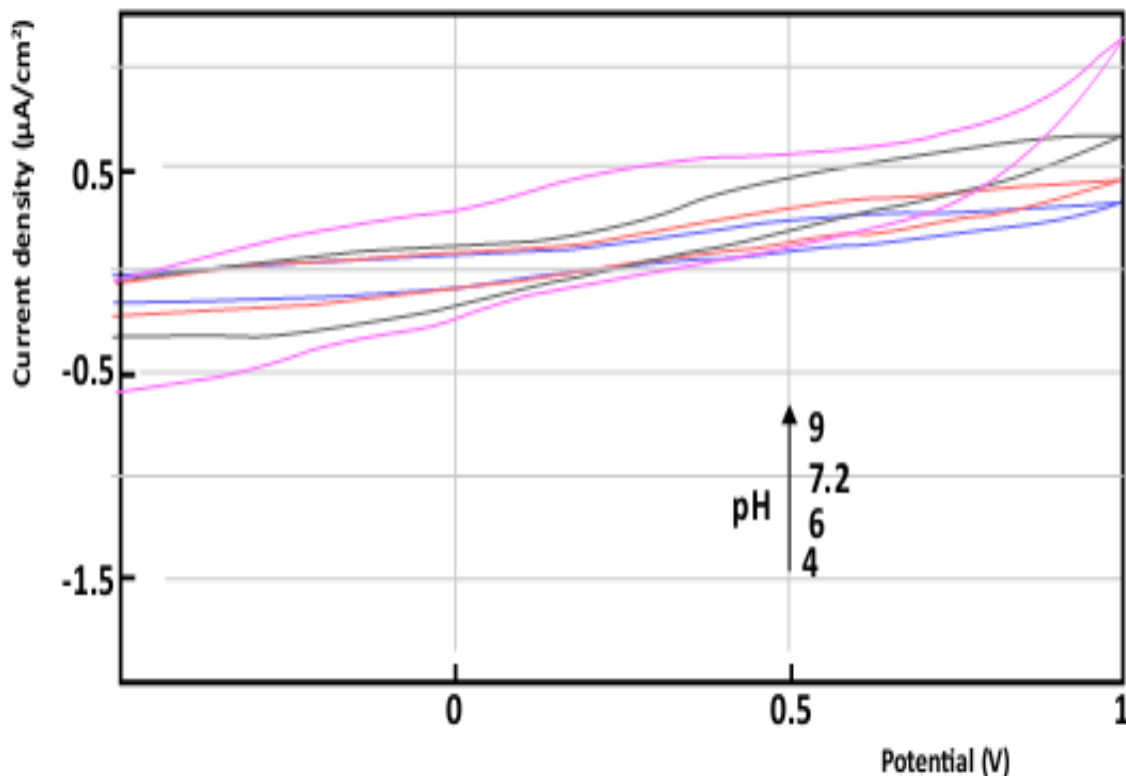


Figure 6: CVs pour Mn-CPE en présence de 0,5 mM de paracétamol dans une solution tampon Les valeurs de pH = 4, 6, 7,2 et 9.

Nous constatons que le pH de la solution a une influence significative sur l'intensité du pic de l'oxydation catalytique de paracétamol (E_p). Une augmentation du pH entraîne le déplacement du potentiel du pic anodique vers les valeurs de potentiels négatifs (Fig. 7).

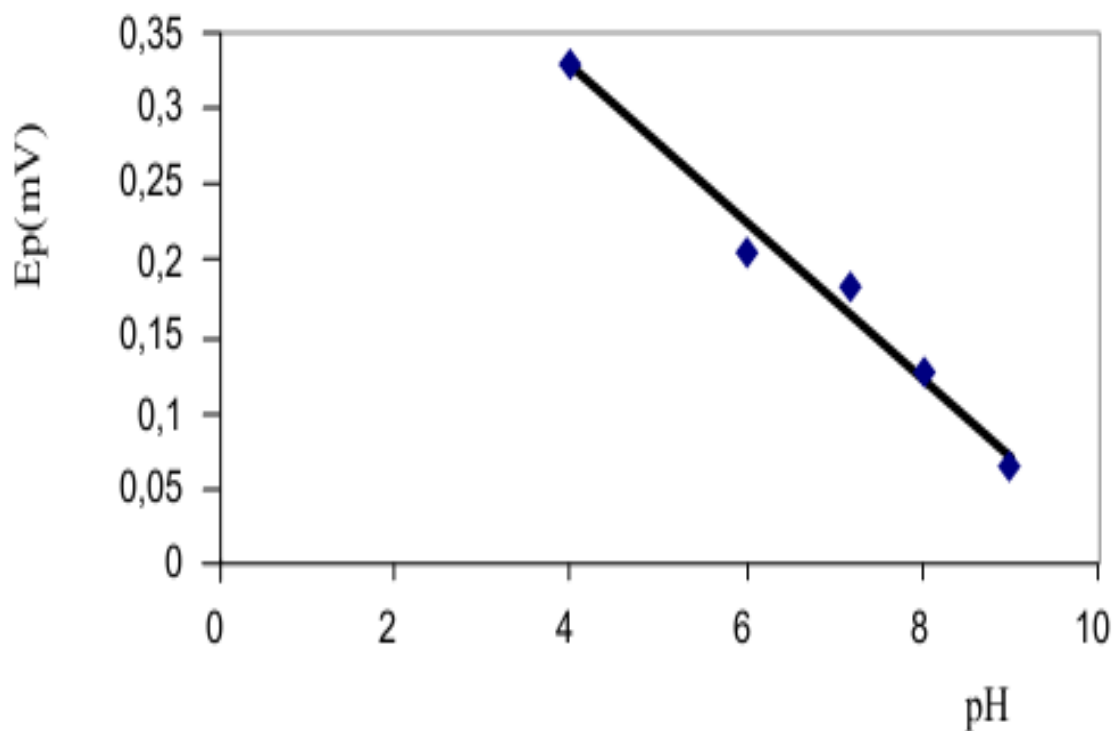


Figure 7: Représentation graphique de potentiel des pics de paracétamol (E_p) en fonction de pH.

L'influence de pH sur E_p peut être exprimée par la relation :

$$\text{➤ } E_p = -0.0509\text{pH} + 0.5298 \quad R^2 = 0.983$$

Le mécanisme proposé pour l'oxydo-réduction du paracétamol [26], est représenté dans le schéma 2 :

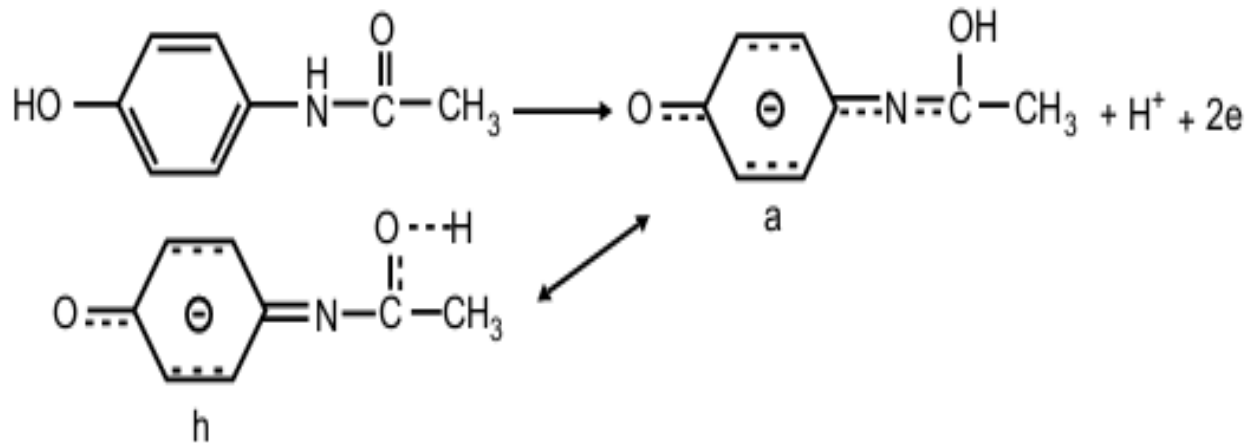


Schéma.2 : Mécanisme d'oxydo-réduction du paracétamol

e- Application analytique :

Afin d'évaluer la performance de la méthode d'analyse décrite ci-dessus, nous avons analysé le paracétamol contenu dans un échantillon commercial. La figure 8 donne les voltammogrammes à onde carrée enregistrés par l'électrode Mn-CPE, en milieu électrolytique contenant différentes concentration de l'échantillon commercial.

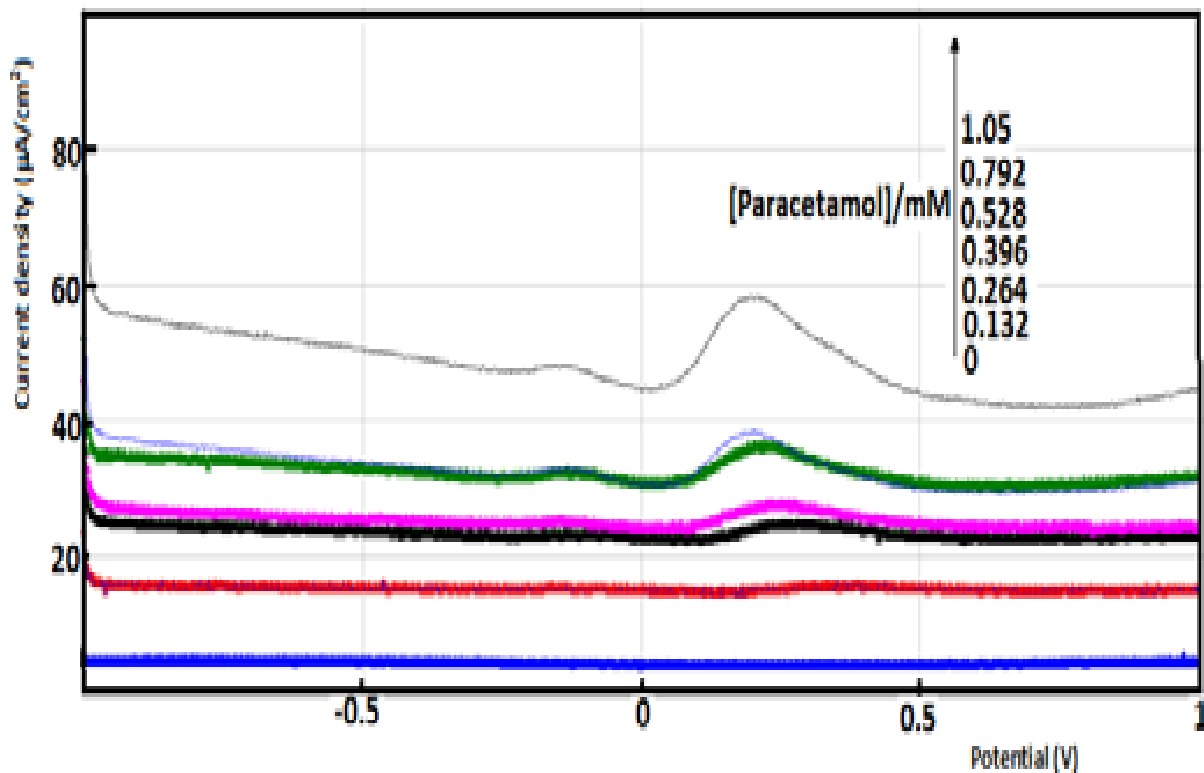


Figure 8: SWVs pour des additions de 0,132 mM, 0,264 mm, 0,396 mM, 0,528 mM, 0,792 mM et 1,05 mM de paracétamol sur Mn-CPE dans une solution tampon (pH 7,2).

La voltamétrie à ondes carrées (SWV) a montré que l'intensité du pic anodique, augmentent de façon linéaire en avec la concentration du paracétamol commercial, ajouté d'une façon progressive dans La solution tampon (Fig. 9).

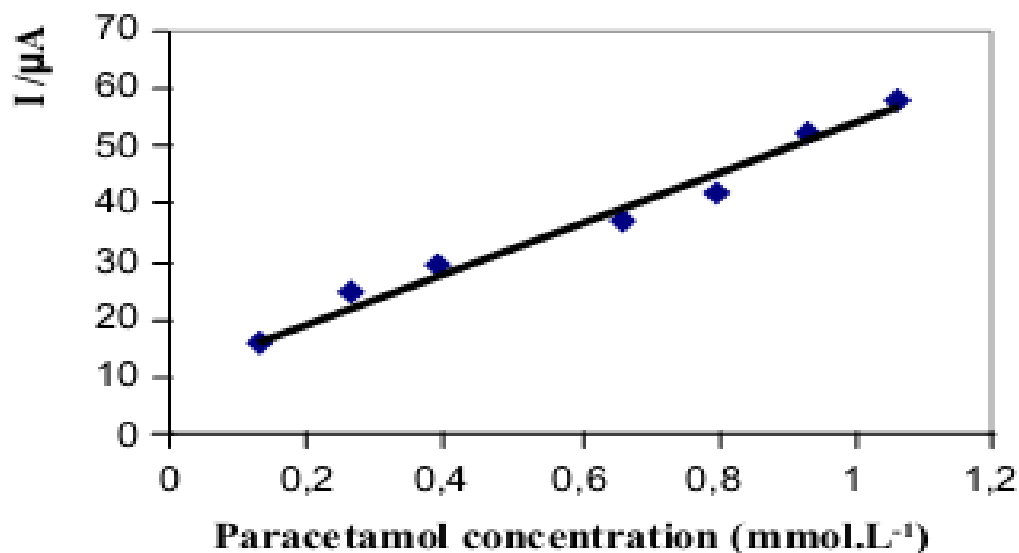


Figure 9: Représentation graphique de l'intensité du courant en fonction de la concentration ajoutée de paracétamol.

A partir de la courbe ci-dessus nous avons déduit les paramètres inclus dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les résultats obtenus à partir des courbes de régression linéaire $I = f([\text{paracétamol}])$ pour la détermination du paracétamol par Mn-CPE.

Parameters	Value
R^2	0.9895
Slope ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	43.45
Standard Deviation ($\times 10^{-1} \text{ A}$)	36.15
Relative Standard Deviation	1.97

Selon Kachoosangi et al. [26], l'écart type du courant moyen (SD) est mesurée au potentiel de réduction du paracétamol pour sept voltammogrammes en électrolytes purs et n'était calculée qu'à partir de :

$$SD = \frac{1}{(n-2)} \sum_{j=0}^n (i_j - I_j)^2$$

Avec i_j c'est la valeur expérimentale, j est le nombre d'expérience et I_j est la valeur recalculé correspondant à la même concentration en utilisant l'équation de la droite de régression. Le calcul S.D. a été utilisé dans la détermination de la limite de détection tel que : (DL=3×SD/pente) et la limite de quantification (QL= 10 × S.D. / pente).

A partir de ces valeurs, les limites de détection et de quantification sont respectivement de l'ordre de $1,87 \times 10^{-8}$ mol / L et $0,57 \times 10^{-7}$.

Conclusion :

Dans ce travail, le comportement électrochimique du paracétamol a été évalué en utilisant les mesures voltamétriques. C'est une nouvelle méthode décrite pour la dosage du paracétamol qui est simple, rapide et sensible avec un faible coût de l'analyse. C'est une technique électroanalytique qui ne nécessite que très peu d'échantillons souvent dans la gamme de microlitre.

Les résultats obtenus montrent que la méthode proposée (SWV) rapide et meilleure que les méthodes conventionnelles, telles que la spectrophotométrie ou la chromatographie, pour caractériser des variations rapides de la concentration des solutions aqueuses diluées de paracétamol.

La reproductibilité observée de la méthodologie proposée était inférieur à 2,0%, ces valeurs sont considérées comme très satisfaisantes, ce qui confirme la faisabilité de la méthode proposée.

Références :

- [1]- Deland, J. A., Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 4th Edition, Academic Press, New York, 2003,134..
- [2]- Smith, J. M., Robert, W.O., Hall, S. M., White, T. A., and Gibertson, A. A., Br. Med. J., 1978, 1, 331.
- [3]- Katrin Faber, « Intoxication aiguë au paracétamol », Forum Médical Suisse, no 38, 2010, p. 647-651.
- [4]- James J. Gormley, White willow bark is a gentle, effective pain-reliever, Better Nutrition, mars 1996.
- [5]- Brodie, B.B., and Axelrod, J., J. Pharm. Exp. Ther., 1948, 94, 29.
- [6]- Merck index 11e édition (1989), ISBN 0-911910-28-X. Morse, H. N. (1878). "Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole". Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 11 (1): 232–233. doi:10.1002/cber.18780110151.
- [7]- Walter Sneader, Drug discovery: a history
- [8]- Pina, L.A., Sandrini, M., Vital, G., Euro. J. Pharm., 1996, 308, 31.
- [9]- François Chast, Histoire contemporaine des médicaments, édition La Découverte.
- [10]- Philippe Albou, Histoire du traitement de la fièvre avant l'aspirine.
- [11]- Gilmartin, M. A. T., Hart, J. P., and Birch, B. J., Analyst, 1992, 117, 1299.
- [12]- Navarro, I., Gonzalez-Arjona, D., Roldan, E., and Rueda, M., J. Pharm. Biomed. Anal., 1988, 6, 969.
- [13]- Fairebrother, J. E., Analytical Profiles of Drug Substances, Vol.3, Academic Press, New York, 1974, 10.
- [14]- Srivastava MK, Ahmed S, Singh D, Shukla IC (1985) Titrimetric determination of dipyron and paracetamol with potassium hexacyanoferrate(III) in an acidic medium. Analyst 110: 735-737.
- [15]- Ayaora Canada MJ, Pascual Reguera MI, Ruiz Medina A, Fernandez de Cordova ML, Molina Diaz A (2000) Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device. J Pharm Biomed Anal 22: 59-66
- [16]- Vilchez JL, Blanc R, Avidad R, Navalon A (1995) Spectrofluorimetric determination of paracetamol in pharmaceuticals and biological fluids. J Pharm Biomed Anal 13: 1119-1125.
- [17]- Lau OW, Luk SF, Cheung YM (1989) Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode. Analyst 114: 1047-1051.

- [18]- Ravisankar S, Vasudevan M, Gandhimathi M, Suresh B (1998) Reversed-phase HPLC method for the estimation of acetaminophen, ibuprofen and chlorzoxazone in formulations. *Talanta* 46: 1577-1581.
- [19]- Roy J, Saha P, Sultana S, Kenyon AS (1997) Rapid screening of marketed paracetamol tablets: use of thin-layer chromatography and a semiquantitative spot test. *Bull World Health Organ* 75: 19-22
- [20]- Knochen M, Giglio J, Reis BF (2003) Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions. *J Pharm Biomed Anal* 33: 191-197.
- [21]- Ramos ML, Tyson JF, Curran DJ (1998) Determination of acetaminophen by flow injection with on-line chemical derivatization: Investigations using visible and FTIR spectrophotometry. *Anal Chim Acta* 364: 107-116.
- [22]- Gilmartin, M. A. T, and Hart, J. P., *Analyst*, 1994, 119, 2431.
- [23]- Miner, D. J., Rice, J. R., Riggin, R. M., and Kissinger, P.T., *Analyst*, 1981, 53, 2258.
- [24]- Kanita, T., Nipon, T., and Duncan, T. B., *J. Pharm. Sci.*, 2005, 5, 547.
- [25]- Christie I, Leeds S, Baker M, Keedy F, Vadgama P (1993) Direct electrochemical determination of paracetamol in plasma. *Anal Chim Acta* 272: 145-150
- [26]- Kachoosangi RT, Wildgoose GG, Compton RG (2008) Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode. *Anal Chim Acta* 618: 54-60.

B- Electroanalyse de la carbocysteine :

1- La carbocysteine :

La **carbocystéine** ou bien l'acide (*R*)-2-amino-3-(carboxyméthylthio) propanoïque est un agent mucolytique (une substance, un agent chimique, un médicament qui fluidifie le mucus), En médecine les mucolytiques sont principalement utilisés afin de fluidifier le mucus des voies respiratoires, facilitant ainsi l'expectoration et la respiration, On les utilise également lors de certains examens comme le lavage broncho-alvéolaire, il est prescrit en cas d'hypersécrétion bronchique.

La carbocysteine diminue la viscosité des sécrétions bronchiques et facilite ainsi leur évacuation. Par ce biais, elle diminue le nombre de décompensation chez le patient porteur d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive.

La carbocysteine est un dérivé d'acide aminé soufré (cystéine), la cystéine (Cys) est un acide- α -aminé naturel qui possède un groupement sulfhydrile ou thiol et qui est présent dans la plupart des protéines sa présence dans les protéines est très importante, notamment parce qu'elle permet la formation des ponts disulfures. Le groupement thiol est très fragile, il s'oxyde très facilement et cette oxydation conduit à la cystine. Voir la formule de la carbocysteine ci-dessous (figure 1) :

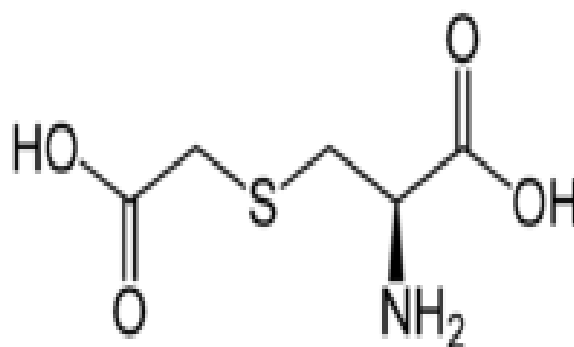


Figure 1 : Structure de la carbocysteine

La cystéine intervient dans la synthèse de la mélanine, le pigment naturel de la peau et des cheveux. Elle intervient aussi dans la synthèse de la coenzyme A, qui joue un rôle très important dans le métabolisme humain et dans plusieurs processus biologiques [1]; la cystéine et ses dérivés, tels que la carbocysteine, sont couramment utilisés dans la recherche clinique et dans l'industrie pharmaceutique.

Parmi les nombreuses méthodes préconisées pour la détermination de la Cys ou de ces dérivés, [2,3], on trouve les méthodes chromatographiques qui sont largement utilisées, et en dépit de la HPLC comme un outil puissant [4-7]. Par contre ces méthodes ont plusieurs inconvénients : l'échantillon doit passer par dérivatisation et extraction avant son injection

dans la colonne, elles utilisent des réactifs et des matériels onéreux ainsi que du temps assez important de la manipulation.

Le présent travail décrit l'utilisation d'une électrode en titane modifiée par polymérisation avec l'eugénol pour la détermination de la Cys par voie électrochimique. L'utilisation du polymère a un intérêt considérable pour un certain nombre d'applications importantes [8-11]. Une attention particulière est actuellement accordée à la préparation de nouvelles électrodes conductrices en fonction de polymères composites [12,13].

Il est prévu que cette stratégie permettra d'améliorer le comportement des polymères conducteurs et se traduira par la conception pour une application spécifique. Depaoli et ses collègues [14,15] décrivent la préparation du polychlorure de vinyle (PVC) / polypyrrole (PP) membranes composites par électropolymérisation de (PP) à l'intérieur d'un film de PVC sur la surface de l'électrode. Özata et les groupes Hirai [16, 17] ont préparé le poly (aniline) (PA) / Nafion composites par électro-polymérisation au sein des couches Nafion préfabriqués, tandis que Penner et Martin [18] illustrent l'avantage du Nafion imprégné de membranes. Gorotex. El Mhammedi et al. [19] décrivent la préparation du titane / Polypyrrole composite, par électro-polymérisation de pyrrole dans la surface de l'électrode.

Dans ce travail, nous décrivons une nouvelle préparation de polyeugénol, composite par électropolymérisation d'eugénol sur la surface de titane pour la détermination de Cys et leurs dérivés.

2- Partie expérimentale :

Dans ce travail, les expériences électrochimiques ont été effectuées à l'aide d'un potentiostat VoltaLab (modèle 100 PGSTAT, Eco Chemie B.V., Utrecht, Pays-Bas), muni d'un logiciel de type Volta Master card 4, le système est lié à un ordinateur, la cellule est composée de trois électrodes, électrode de titane modifiée par polymérisation avec l'eugénol c'est l'électrode de travail, le platine contre électrode, et SCE comme électrode de référence.

L'eugénol a été extrait à partir du clou de girofle, et tous les autres réactifs utilisés sont de qualité analytique, l'eau bi-distillée a été utilisé tout au long du travail, la L-cystéine a été acheté à Pékin chimique Réactif Co. (Chine).

3- Résultats et discussion :

La polymérisation de l'eugénol a été effectuée par voie électrochimique [20], dans un milieu basique, l'eugénol est utilisé comme un monomère typique.

La technique de polymérisation sur balayage successif nous permet d'obtenir des films stables, le dépôt peut être contrôlé en suivant l'augmentation des pics d'oxydation et de réduction.

Les figures 2 et 3 représentent les voltammogrammes de l'électropolymérisation de 10 mM d'eugénoï dans 0.1 M NaOH. A partir de ces voltammogramme on peut tirer les remarques suivantes :

Pour le premier cycle un pic large bien défini à -0.2 V a été observé. Ce pic disparaît à partir du 2ème cycle, ce comportement indique la déposition rapide d'un polymère non conducteur à la surface de l'électrode. Cependant lorsque le balayage de potentiel est étendu vers des valeurs positives un deuxième pic est observé à environ 1.0 V, Aleksander Ciszewski et al [20] lors d'une étude de la même molécule sur une électrode de verre, ont attribué le premier pic à la déposition d'un polymère à la surface de l'électrode indiquant un recouvrement partiel des zones actives de l'électrode, le deuxième pic est due probablement, au phénomène dégradation/restriction de ce polymère.

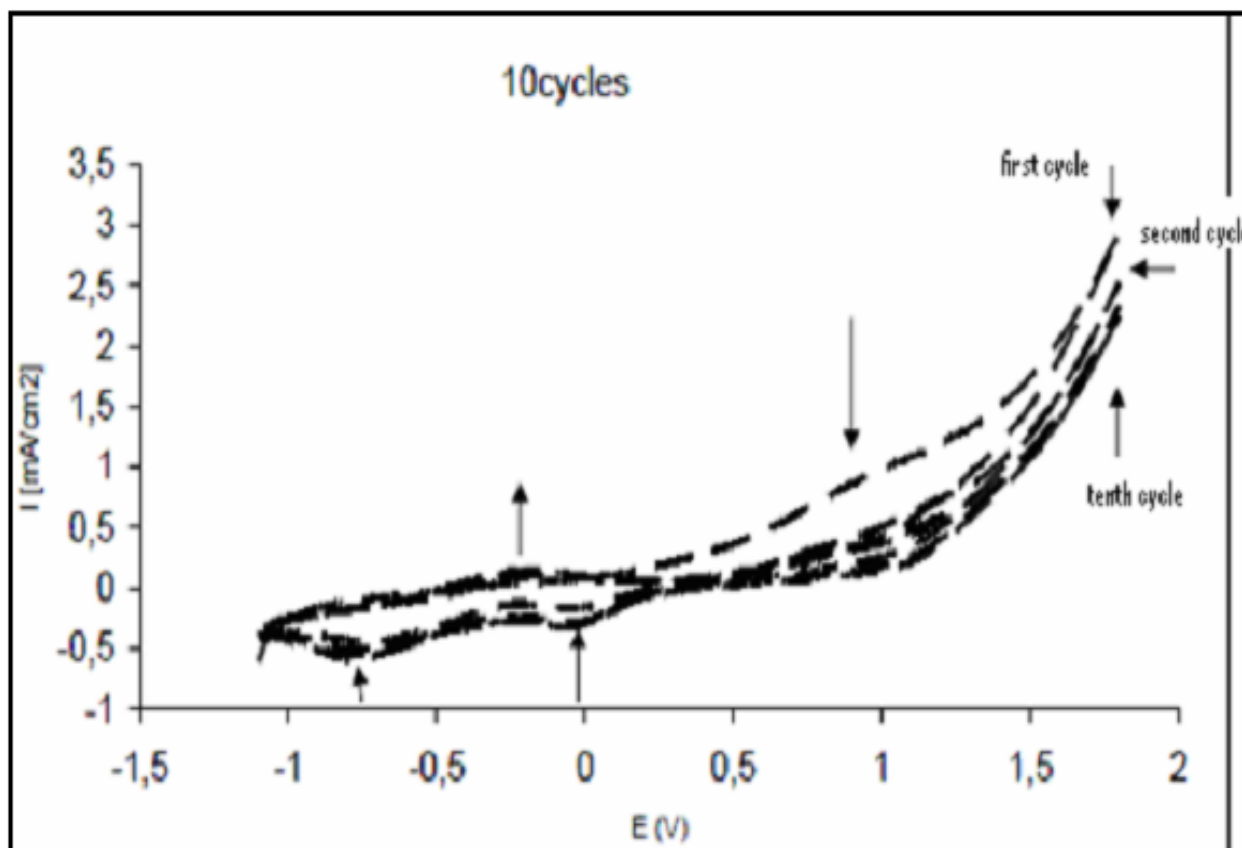


Figure 2: Voltammogrammes de la polymérisation électrochimique, 3 premiers cycles, de 0.01 M d'eugénoï dans 0.1 M NaOH, sur électrode de titane. La vitesse de balayage est 100 mV/s.

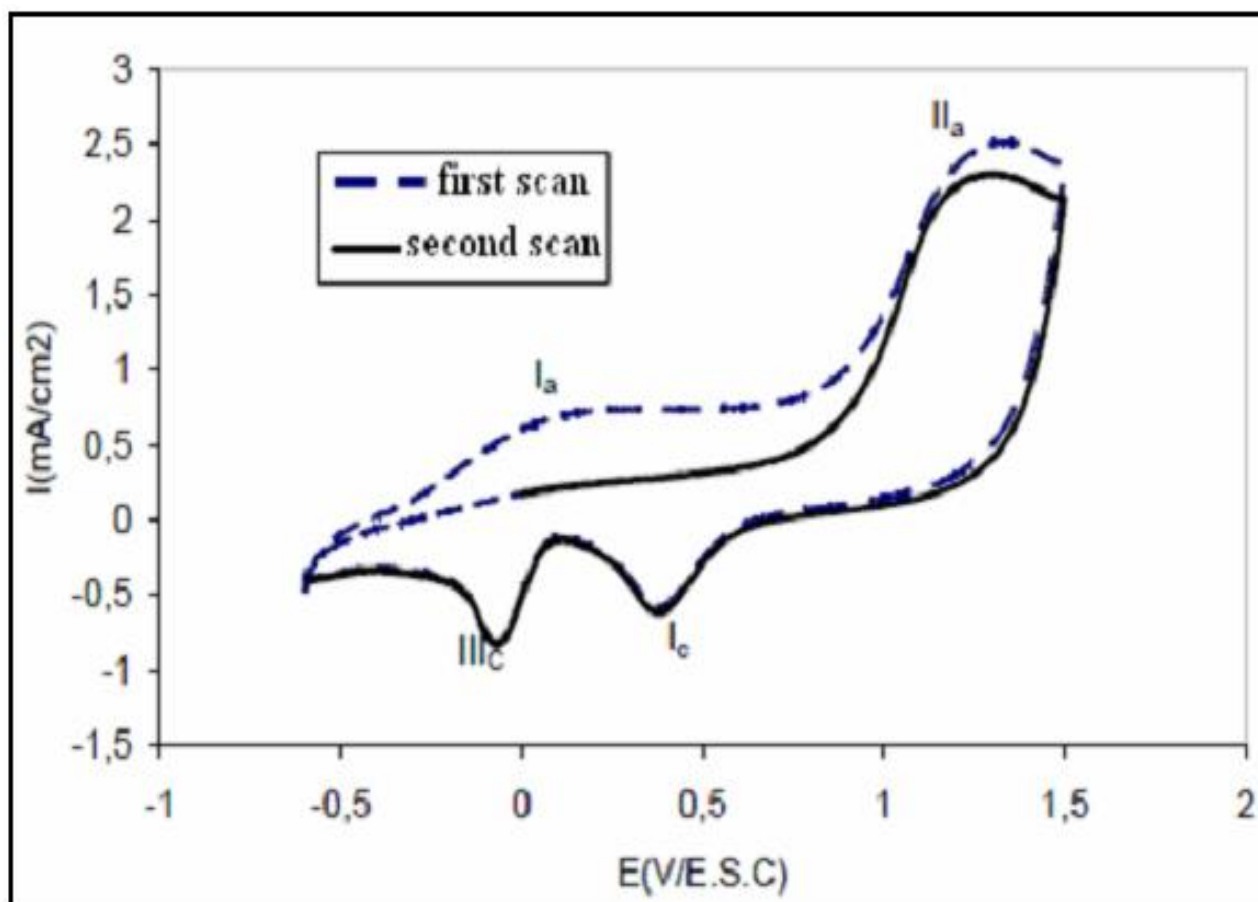
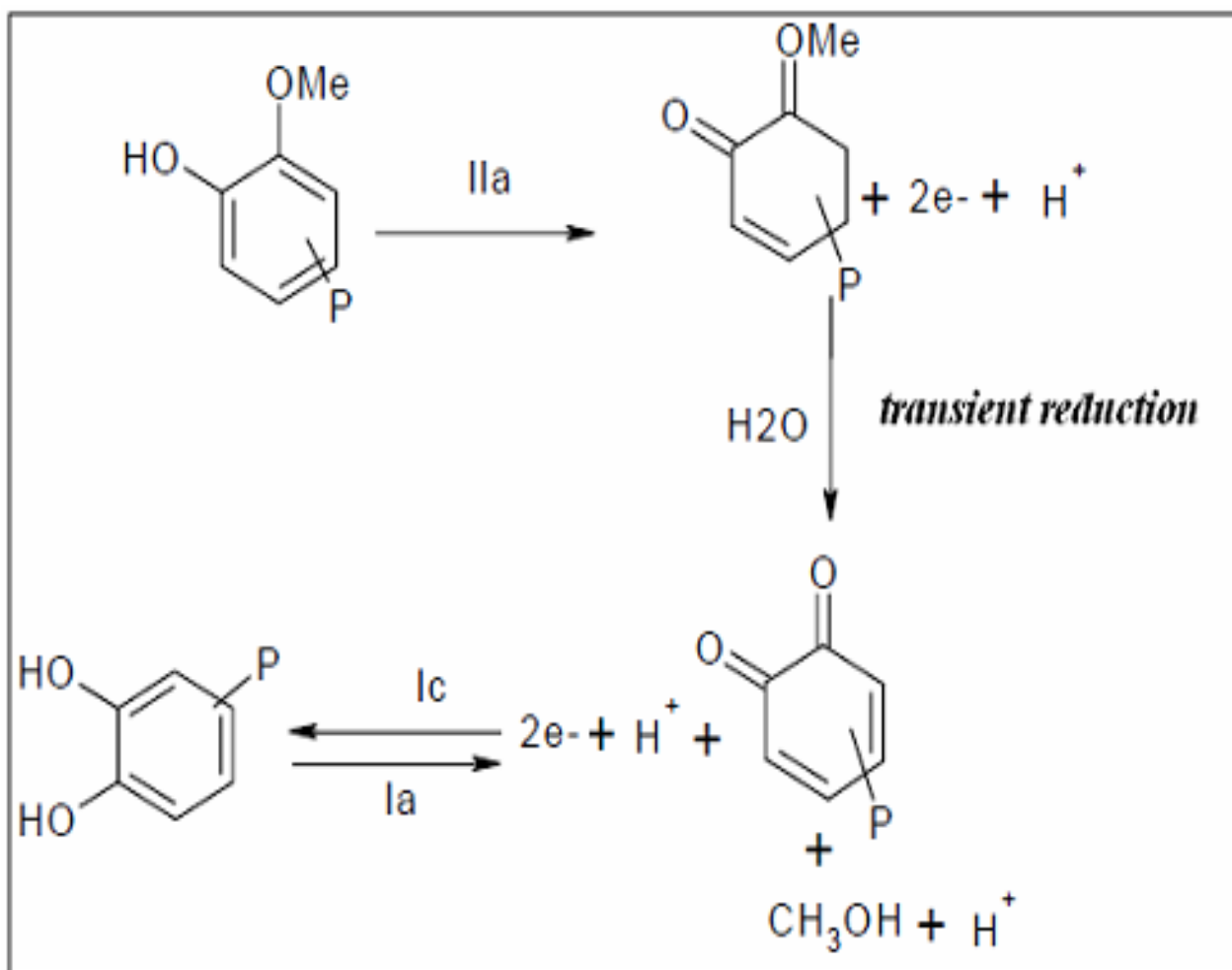
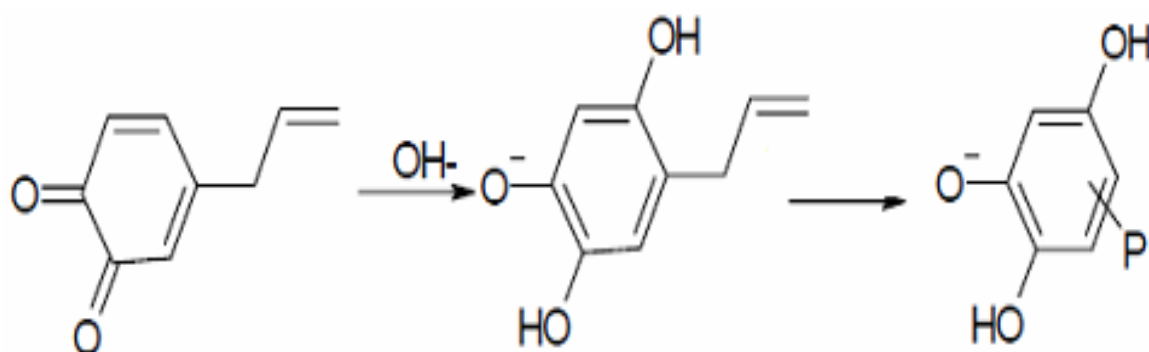


Figure 3: Voltammogrammes de la polymérisation électrochimique, 1^{er} et 2^{ème} cycles, de 0.01 M d'eugénoI dans 0.1 M NaOH, sur électrode de titane. La vitesse de balayage est 100 mV/s.

Pour le balayage retour on note deux pics de réduction à -0.07 V et 0.37 V, en se basant sur les résultats de Peter et al [21], le couple réversible majeur (I_a/I_c) (Fig. 3), suivi par un pic (II_a) irréversible peut résulter des réactions ci-dessous :



Où P indique la structure polymérique dont les groupes 2-méthoxy-phénol sont immobiles. Le deuxième pic IIIc est probablement, associé à la transition du dérivé trihydroxybenzène formé durant la polymérisation à partir du 4-allyl-1-2-quinone selon la réaction :



Pour plusieurs balayages (10 cycles), les courbes d'oxydation et de réduction se superposent, on peut déduire une stabilité du polymère.

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par voltamétrie cyclique, on a réalisé une étude de l'impédance.

Les figures 4 et 5 montrent les diagrammes d'impédance enregistrés pour l'électrode de titane, respectivement, en absence et en présence du polymère. Dans les deux échantillons, les courbes d'impédance réalisées ont la forme de demi-cercles, qui peuvent être attribuées à l'étape de transfert d'électrons. Le diamètre du cercle augmente considérablement en présence de l'électrode de titane modifiée par le polymère. Le polymère formé subit des oxydations à potentiels positifs, ce qui le rend inactif, ce qui entraîne l'augmentation de la résistance de transfert d'électrons [19].

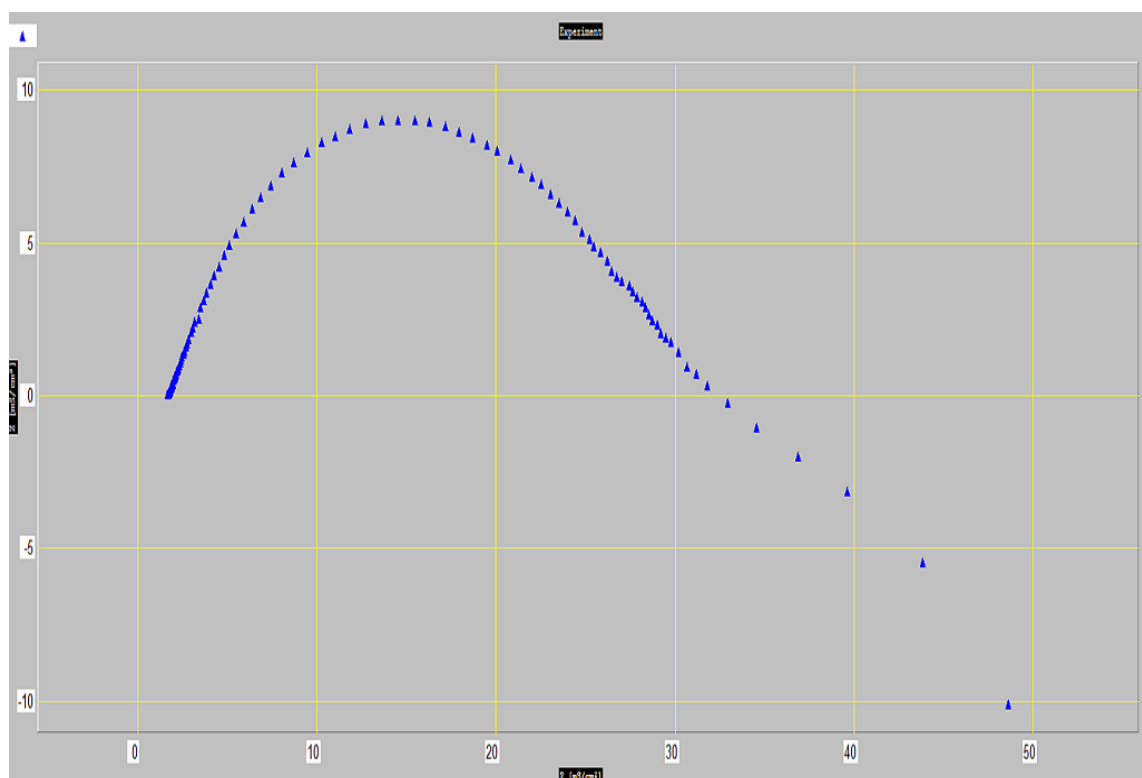


Figure 4 – Diagramme de Nyquist de l'électrode de titane, en milieu électrolytique et à potentiel ouvert.

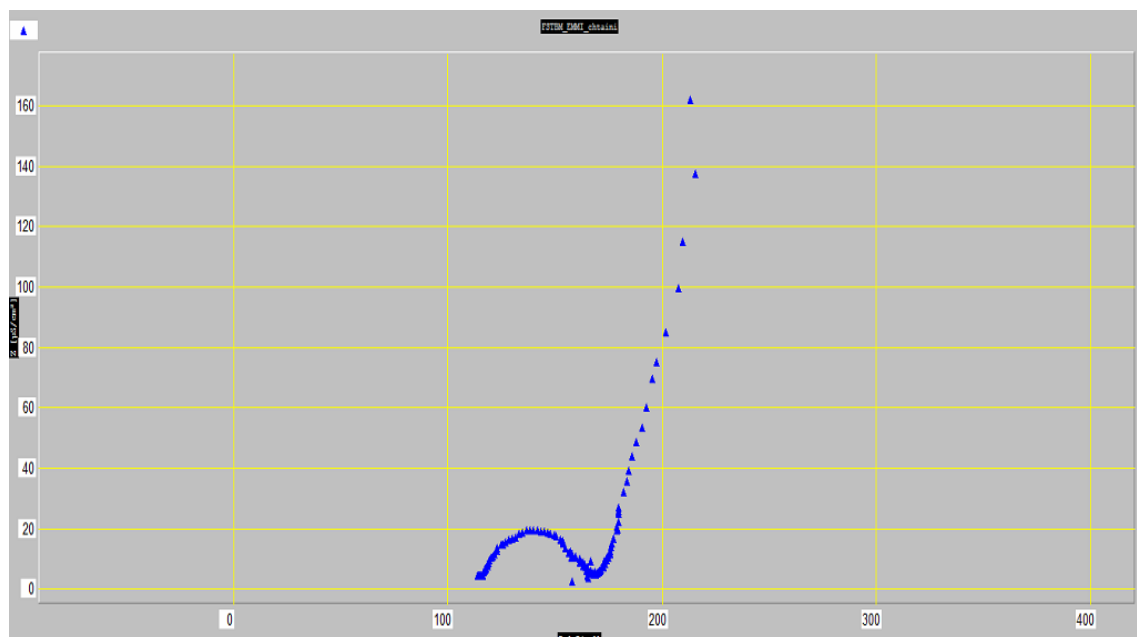
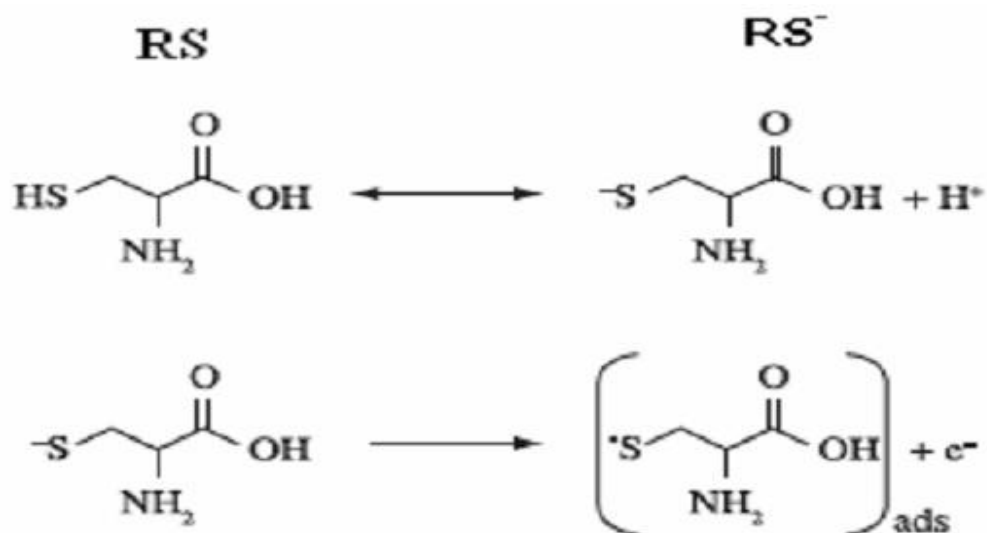


Figure 5 – Diagramme de Nyquist de l'électrode Ti/Polymère, enregistré en milieu électrolytique et à circuit ouvert.

Avant d'être incorporée dans la cellule de mesure électrochimique, l'électrode est mise en contact avec une solution contenant une solution tampon, contenant la carbocysteine, le temps de préconcentration qui a donné le meilleur résultat correspond à 15 minutes.

La figure 6 montre des courbes de voltamétrie cyclique enregistrées pour l'électrode de titane modifiée, Ti / polymère, en milieu électrolytique, après avoir été en contact avec différentes concentrations de carbocysteine, pendant 15 min (temps d'accumulation adopté). L'oxydation de la carbocysteine a montré, dans les milieux tampons étudiés à pH = 6, un comportement électrochimique bien connu, caractérisé par la suppression d'un électron du radical cationique RS correspondant. (Pic indiqué par une flèche sur la Fig. 6), selon le schéma 1 [22].



Schema 1 - Mécanisme d'oxidation du L-Cystéine sur une electrode de carbone graphite.

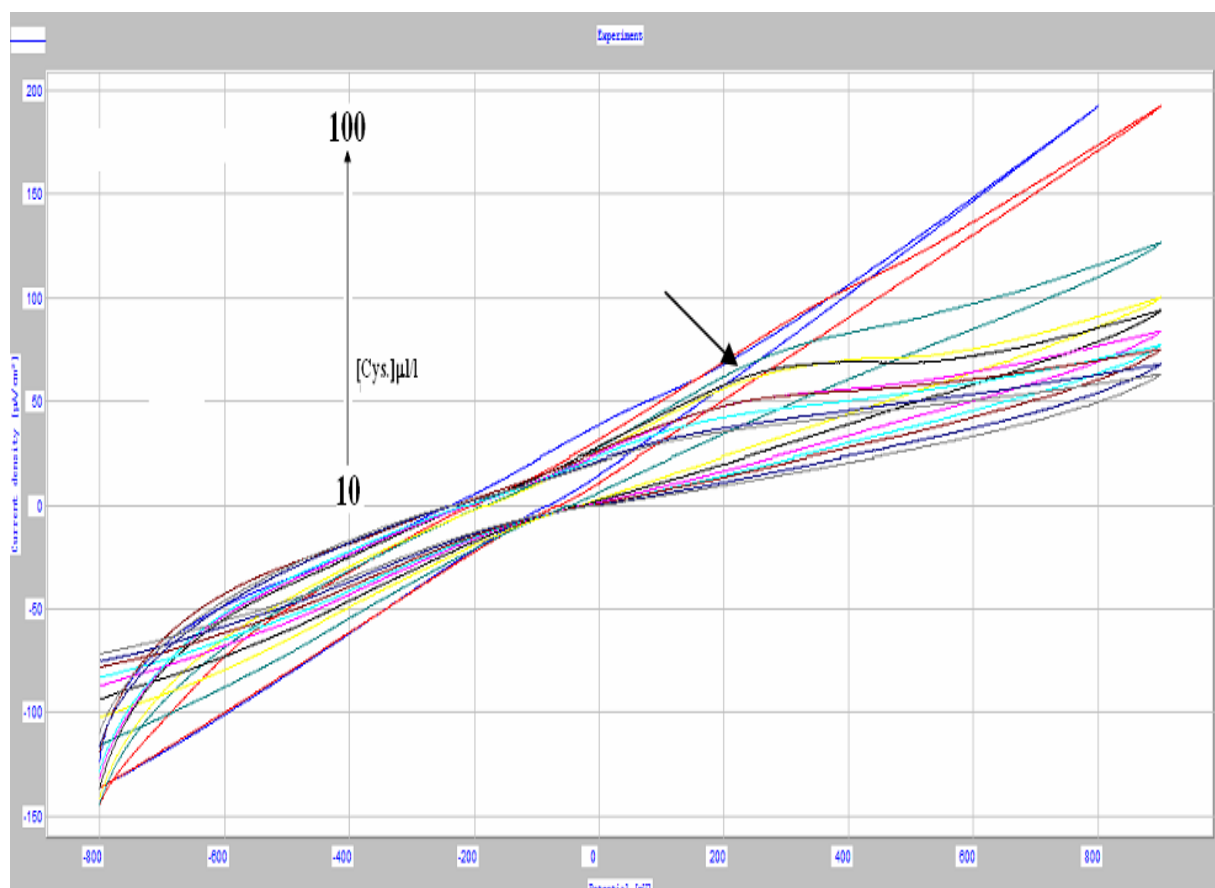


Figure 6 : Voltammogrammes cycliques enregistrés par l'électrode Ti/Polymère, à différentes concentrations du L-Cystéine en milieu tampon pH = 6.

La figure 7 montre le comportement des diagrammes d'impédance, enregistrés pour l'électrode de titane modifiée par polymérisation de l'eugénol, en milieu tampon, après contact de 15 min avec différentes concentrations de carbocystéine.

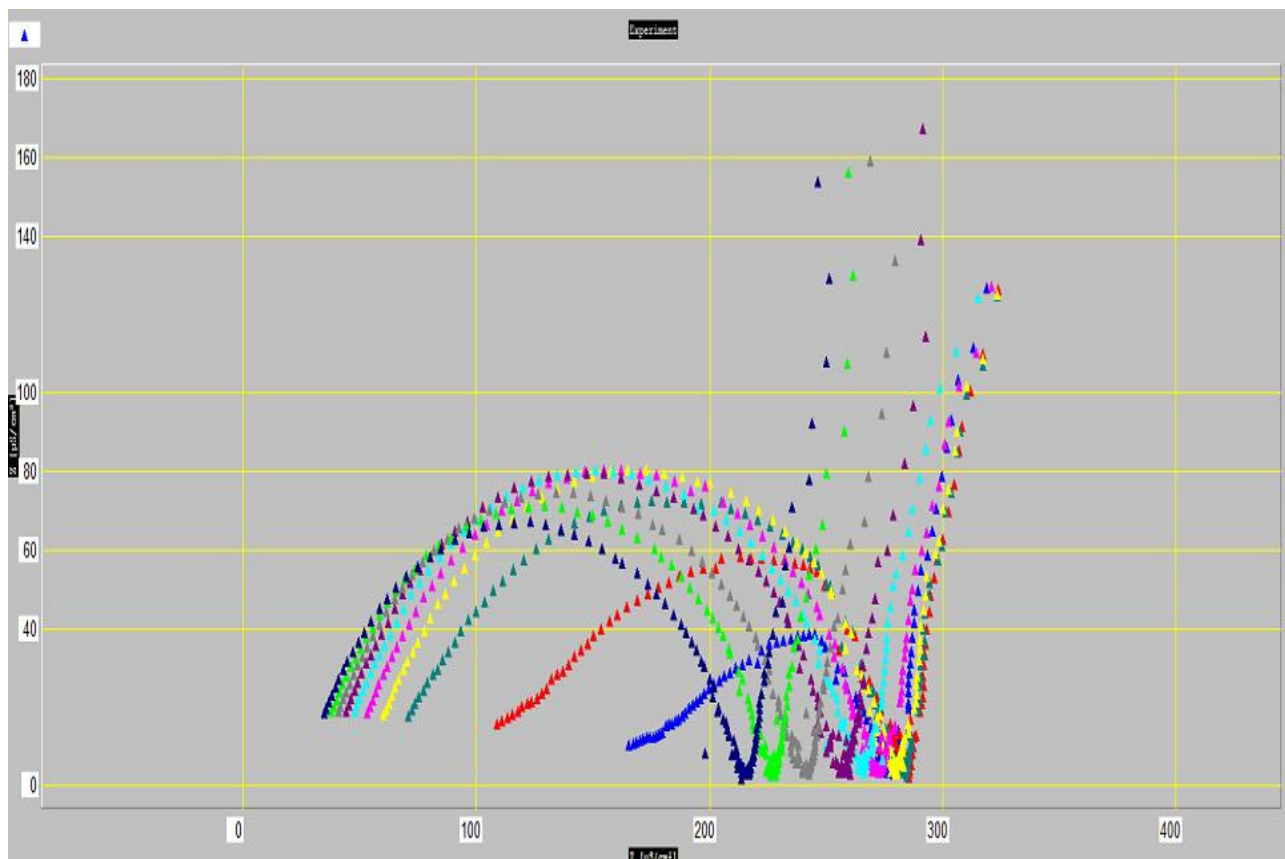


Figure 7 : Diagrammes de Nyquist enregistrés par l'électrode Ti/Polymère, à différentes concentrations du L-Cystéine, le temps de préconcentration est de 15 min, à circuit ouvert.

Conclusion:

Le présent travail a démontré que l'eugénol est adapté pour la préparation d'une électrode électro-chimiquement modifiée, basé sur la polymérisation de l'eugénol à la surface d'électrode de titane pour la détection de la carbocysteine.

Initialement, les résultats présentés dans ce chapitre, montrent clairement les propriétés électrochimiques de l'électrode modifiée Ti/polymère destinée à l'électroanalyse.

Le comportement électrochimique de la carbocysteine a été évalué en utilisant les résultats voltamétriques de l'électrode modifiée. La voltamétrie cyclique a montré l'apparition d'un pic anodique associée à l'oxydation de la Carbosysteine. L'utilisation de l'électrode de Ti/polymère indique l'analyse directe des échantillons.

References:

- [1] W.F. Ganong, Review of Medical Physiology, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1997.
- [2] F. Blasco, M.J. Medina-Hernandez, S. Sagrado, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 151–159.
- [3] N. Radic, J. Komljenovic, Lab. Robot. Autom. 10 (1998)143–149.
- [4] H. Birwe´, A. Hesse, Clin. Chim. Acta 199 (1991) 33–42.
- [5] R.A. Sherwood, J. Neurosci. Methods. 34 (1990) 17–22.
- [6] D.W. Jacobsen, V.J. Gatautis, R. Green, Clin. Chem. 40(1994) 873–881.
- [7] S.G.Erakovic, V.V.Panic, B.M.Jokic, S.I. Steva-novic, V.B.Miskovic-Stankovic, Zastita materijala 51 (2010) 24-29.
- [8] T.A. Stotheim, (Ed.), Handbook of conducting polymers, Marcel Dekker, New York, 1986
- [9] S. Dang, Y. Wang, Electroanalysis, 1989, 1, p. 99.
- [10] R. Seymour; (Ed.) Conducting polymer, Polymers Pron, New York, 1981.
- [11] B.Z.Jugovic,M.M.Gvozdenovic,J.S.Stevanovic,T.Tr sovic,B.N.Grgur, Zastita materijala 50 (2009)29-35.
- [12] F. Diaz, J.C. Lacrois, Synthesis of electroacti-ve/conductive polymer films, New J. Chem., 1988, 12, p. 171-180.
- [13] Z.Jovanovic,V. B.Miskovic-Stankovic,J.B.Bajat, Za stita materijala 49 (2008) 23-31.
- [14] M.A. Depaoli, R.J. Waltman, A.F. Diaz, J. Bargon, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1984, p. 1016-1020.
- [15] G.M.El Enany, Zastita materijala 50(2009)193-197.
- [16] M. Ozata, O.A. Butty, J. Electroanal. Chem., 1988, 257, p. 71-79.
- [17] T. Hirai, S. Kuwabata, H. Yonegama, J. Electrochem. Soc., 1988, 135, p. 1132-1137.
- [18] R.M. Pender, C.R. Martin, J. Electrochem. Soc., 1986, 133, p. 310-313.
- [19] A. El Mhammedi, L. Kinani, A. Chtaini, Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies, 11(2007)1-6.
- [20] A. Ciszewski, G. Milezarek, Electroanalysis 2001, 13, N°. 10.
- [21] M. Petek, S. Brukenstein, B. Feinberg, R.N. Adams, J. Electroanal. Chem., 1973.
- [22] C.A.M. Huitle, M.C. Lopez, M. A. Quiroz, Materials Research, 12(2009)375-384.

***Chapitre IV : Electrodes modifiées
pour la détermination du pouvoir
antioxydant des boissons alimentaires***

Introduction

Radicaux libres, espèces oxygénées activées (EOA), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants.

Historiquement le terme antioxydant était utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. Au début du XX^{ème} siècle, les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple, la corrosion des métaux, le durcissement du caoutchouc ou encore la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion. En biologie, les premières recherches sur les antioxydants concernent la limitation de l'oxydation des acides gras insaturés qui cause les rancissements. Les recherches sur l'action de la vitamine E dans la limitation de l'oxydation des lipides, ont démontré son rôle dans l'élimination des molécules contenant un atome d'oxygène actif avant que ces dernières n'attaquent pas les cellules.

Le présent travail consiste à développer de nouvelles méthodes efficaces, rapides, peu coûteuses et ne nécessitant pas de préparations préalables des échantillons. Il s'agit d'une méthode électrochimique basée sur le tracé de courbes intensités - potentiels, qui permettent d'étudier le phénomène d'oxydation qui a lieu à la surface d'une électrode conçue spécialement pour ce travail. Ce système a été testé pour l'évaluation de la capacité antioxydante du thé et du café.

Recherche bibliographique :

I. Stress oxydant

Dans une cellule eucaryote normale, l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydant ou accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Ils ont lieu dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie qui fournit 90% de l'énergie. Dans cet organelle intracellulaire l'oxygène est l'accepteur final d'électrons après une cascade de réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau cela permet de générer de l'ATP (Adénosine Triphosphates).

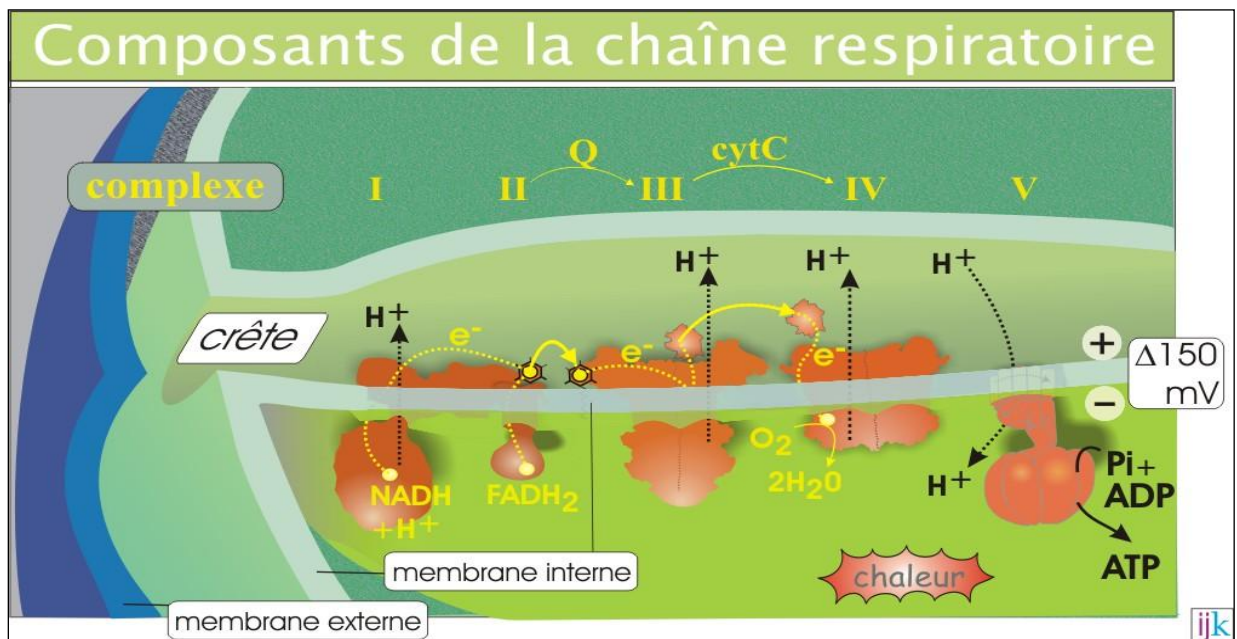


Figure 1 : chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie

Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau : il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées de l'oxygène très réactives. Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre apparaît entre molécules pro-oxydantes et antioxydantes, on parle alors de stress oxydant. [1]

1. Les radicaux libres :

1.1. Définition :

Un radical libre est un atome ou une molécule qui contient un électron (ou plus) non apparié. De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour se stabiliser. Ces espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques [2].

1.2. Nature des radicaux libres :

1.2.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène :

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons radicalaires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme. Les mitochondries utilisent la plus grosse part de l'oxygène inspiré pour la production d'énergie. Cependant, comme nous avons déjà dit, 3 à 5% de cet oxygène utilisé par les mitochondries lors de l'activité métabolique normale est inévitablement à l'origine de radicaux libres oxygénés, hautement toxiques [3].

Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en $O_2^{\cdot-}$ puis en H_2O_2 . Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS)

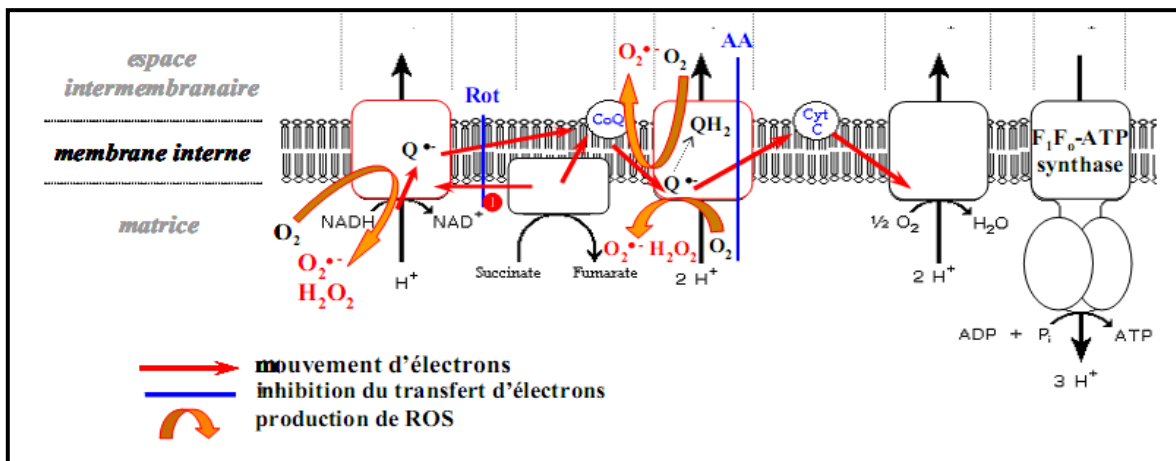
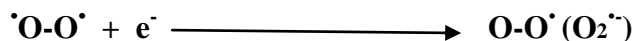


Figure 2 : sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire

1.2.1.1. Ion superoxyde : $O_2^{\cdot-}$

L'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante.

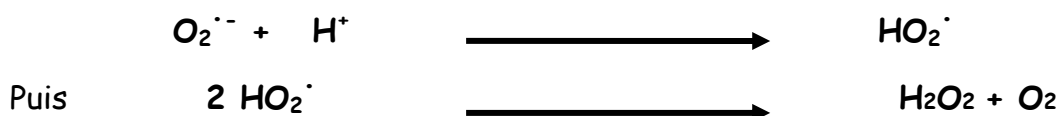


Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

1.2.1.2. Le radical peroxyde: H_2O_2

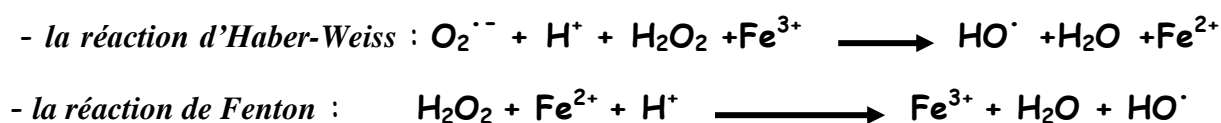
L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production.

Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



1.2.1.3. Radical libre hydroxyle : $OH\cdot$

Le radical libre hydroxyle ($OH\cdot$) est très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 10^{-6} secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme :



1.2.1.4. L'oxygène singulet : $^1 O_2$

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



Le schéma suivant résume les différentes formes d'espèces dérivées de l'oxygène.

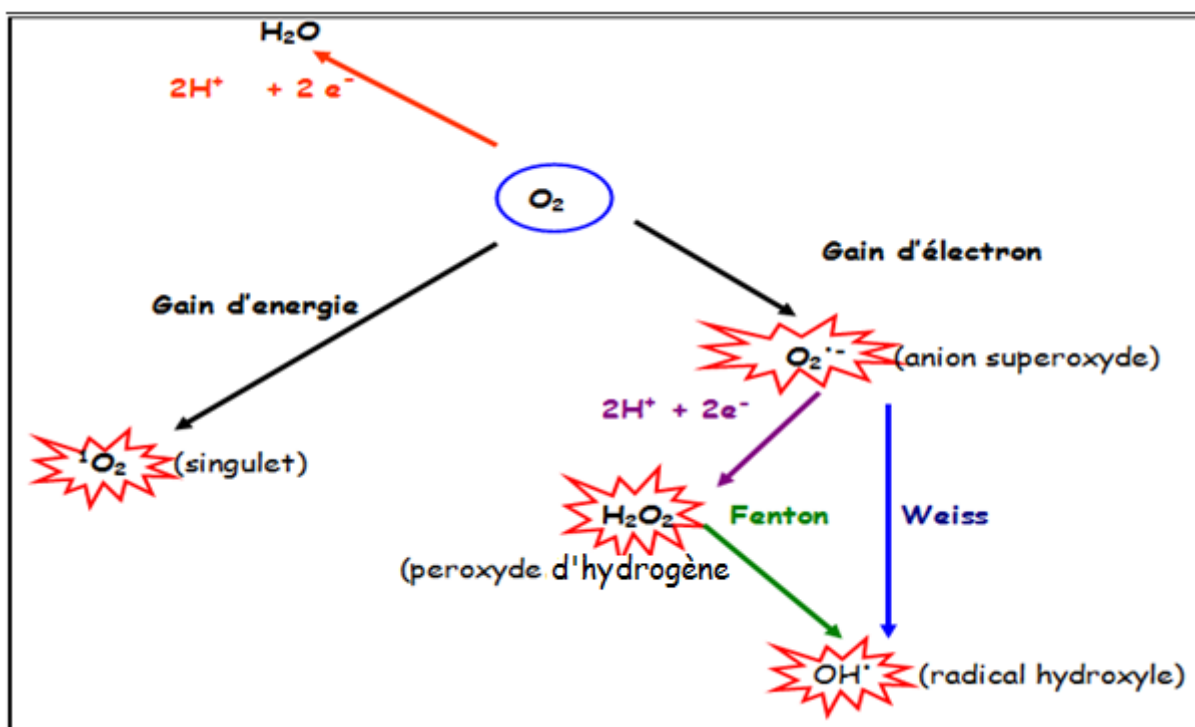


Figure 3 : schéma de différentes formes d'espèces oxygénées

1.2.2. Les espèces libres non oxygénées :

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les ROS. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ROS générant des molécules réactives et nocives [4].

1.3. Production de radicaux libres

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés.

Les sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories :

- **les sources endogènes** : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme,
- **les sources exogènes** : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme [5].

1.4. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme :

1.4.1. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire :

Les radicaux libres jouent un rôle important dans la phagocytose et dans la communication cellulaire.

- **La phagocytose** : Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries.
- **La communication cellulaire** : les radicaux libres peuvent aussi intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation, cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort.

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. En résumé :

- ◆ les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants.
- ◆ les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer. Ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire.
- ◆ les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messager intracellulaire. La fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur membranaire est à l'origine d'une succession de réactions conduisant à la genèse de ROS [5].

Le schéma suivant résume les principes généraux de la communication extracellulaire :

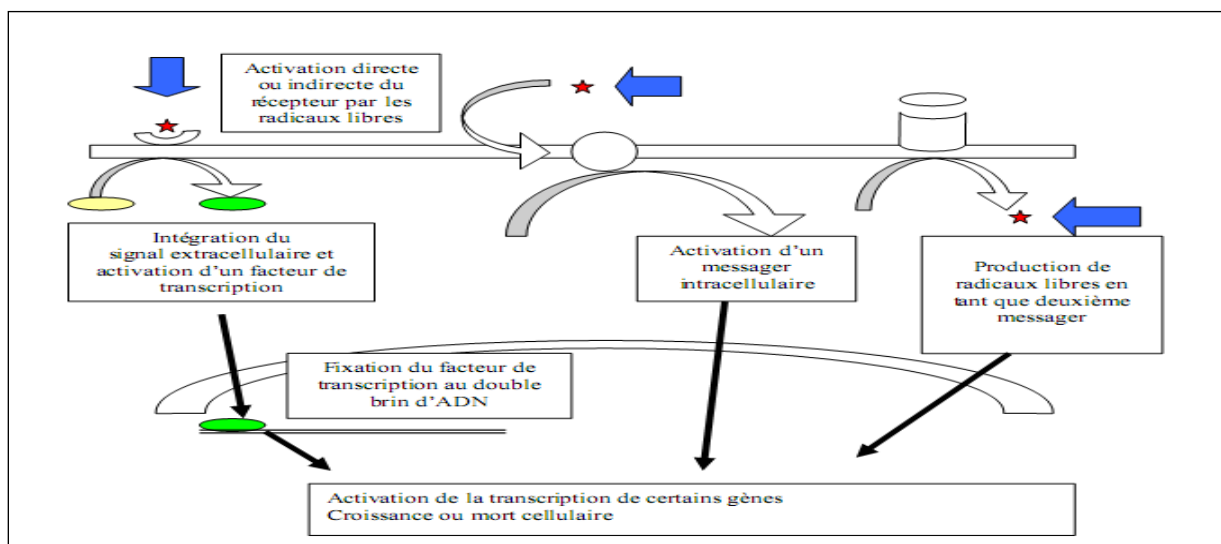


Figure 4: Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire

Légende :

- ★ : Radicaux libres
- ➡ : Site d'action éventuel des antioxydants
- : Facteur de transcription activé

Malgré leurs nombreuses fonctions cellulaires, les radicaux libres constituent des espèces hautement toxiques pour l'organisme, et responsables du stress oxydatif cellulaire.

1.4.2. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres :

La toxicité cellulaire des radicaux libres se manifeste par la survenue progressive de processus lésionnels sur différents éléments constitutifs de la cellule pouvant conduire à la mort de celle-ci [6].

1.4.2.1 Les protéines :

Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée.

1.4.2.2. Les glucides

Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs. Les dommages oxydatifs peuvent alors se propager via l'attaque des radicaux formés sur d'autres molécules.

1.4.2.3. Les lipides :

Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono et polyinsaturés des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation. Il s'agit d'une succession de réactions radicalaires à l'origine de la libération de molécules réactives. En l'absence d'antioxydants, la réaction s'auto-entretient car les espèces produites peuvent à nouveau réagir entre elles.

Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulant dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité. Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule.

1.4.2.4. L'ADN :

Les radicaux libres et en particulier $\text{OH}\cdot$, peuvent s'attaquer à l'ADN. Ils réagissent avec les nucléotides. Ils peuvent mener, par exemple, à des modifications des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN, à des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases. Les conséquences de ces altérations peuvent être immédiates. La cellule, n'étant plus capable de fonctionner correctement, entre en apoptose. Cependant, ces conséquences peuvent aussi s'exprimer sur du plus long terme. Les modifications de l'expression du programme génétique de la cellule peuvent être à l'origine d'un cancer [6].

Le stress oxydant est à l'origine de très nombreuses maladies telles que la cataracte, la sclérose, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire ainsi que le vieillissement accéléré des tissus, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. De plus, le stress oxydant entraîne des complications diabétiques, ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline. Les ROS seraient impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer. La maladie de Parkinson serait quant à elle due à un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées. Enfin, le stress oxydant joue un rôle non négligeable dans la cancérogénèse [7].

2. Les systèmes de défense : antioxydants

Pour lutter efficacement contre les dommages oxydants, l'organisme est équipé de plusieurs systèmes de défense.

Un antioxydant peut être défini comme une substance qui, présente à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation. Ce sont donc des régulateurs du taux de pro-oxydants dans l'organisme [8].

Il existe deux grandes familles d'antioxydants : enzymatiques et non-enzymatiques.

2.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les radicaux libres. Les principaux sont: superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase.

2.1.1. Superoxyde dismutase:

Ce type d'antioxydant favorise la dismutation spontanée du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes : la catalase et la glutathion peroxydase.

2.1.2. Catalase :

C'est une enzyme héminique composée de quatre chaînes polypeptidiques. Son site catalytique permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène, présent à haute concentration, selon la réaction globale suivante :



2.1.3. Glutathion peroxydase :

Au contraire, la glutathion peroxydase, sélénium dépendante, possède une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène et, par conséquent, catalyse l'élimination de H_2O_2 même présent à de très faibles concentrations.



2.2. Les antioxydants non enzymatiques :

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

Ils jouent le rôle de piéger les entités oxydantes en captant leur électron libre, en formant des entités stables. Les principales molécules sont :

2.2.1. Oligoéléments :

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Par exemple, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

2.2.2. Glutathion :

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase. Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté.

2.2.3. Vitamine E et vitamine C :

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être les plus importants dans la lutte contre le stress oxydant.

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi isoler les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique.

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\cdot-}$ et l' OH^{\cdot} . Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.

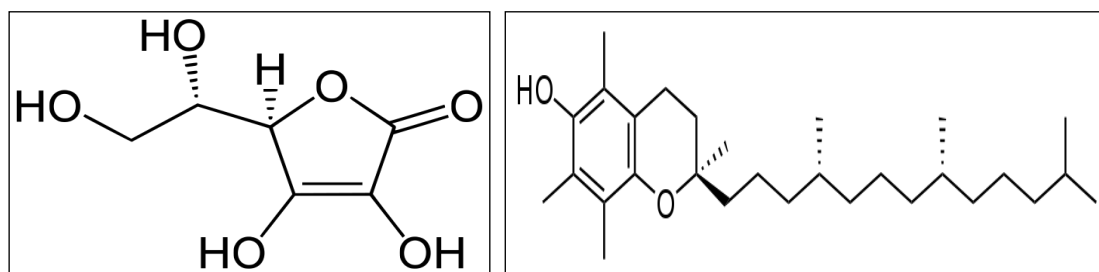


Figure 5 : formules développées de la vitamine C (à gauche) et la vitamine E (à droite)

2.2.4. vitamine A (famille des caroténoïdes)

Le **précurseur** de la vitamine A est le β -carotène. Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piègeurs de radicaux peroxydes. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être détruite.

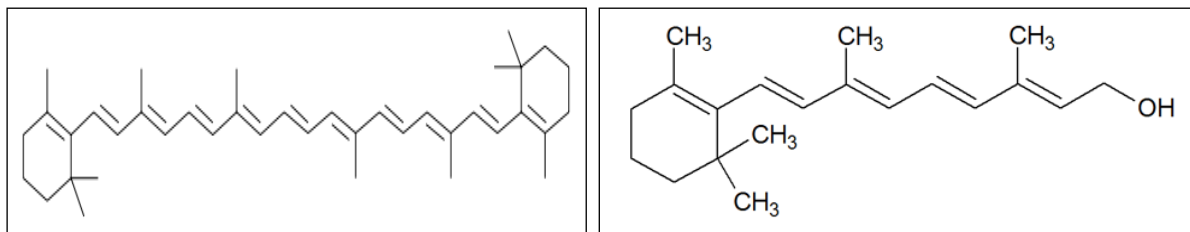


Figure 6 : formule de β -carotène (à gauche) et de la vitamine A (à droite)

2.2.5. Polyphénols et flavonoïdes :

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des Polyphénols. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes (thé, raisin, cacao, blé, orge, maïs, fruits et légumes...). Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices [9].

Le tableau 1 suivant résume les différents types d'antioxydant non enzymatique, leurs origines et leurs rôles :

Antioxydants	Origines	Fonctions
Oligoéléments	- Sélénium : poisson, œufs, viandes ... - Fer, Zinc : fruits de mer, viandes, pains complet, légumes verts. - Manganèse, cuivre : viandes et végétaux.	Cofacteurs des enzymes oxydantes
Vitamine E	Germe de blé, noix, huiles végétales, beurre, et œufs...	Réagit avec les radicaux libres dans les milieux gras. Protège les membranes, les graisses circulantes et les protéines.
Vitamine C	Fruits et légumes : citron, poivron orange, fraises...	Réagit avec les radicaux libres dans le plasma et à l'intérieur des cellules. Régénère la vitamine E et le β -carotène.
Caroténoïdes	Carottes, tomates, agrumes...	Réagit avec les radicaux libres les milieux gras. Protège les membranes, les graisses circulantes et les protéines.
Polyphénols	Fruits et légumes	Réagissent avec les radicaux libres dans les milieux aqueux et/ou gras. Protège la vitamine C.

Le schéma suivant montre la localisation des antioxydants dans les différents organes de la cellule :

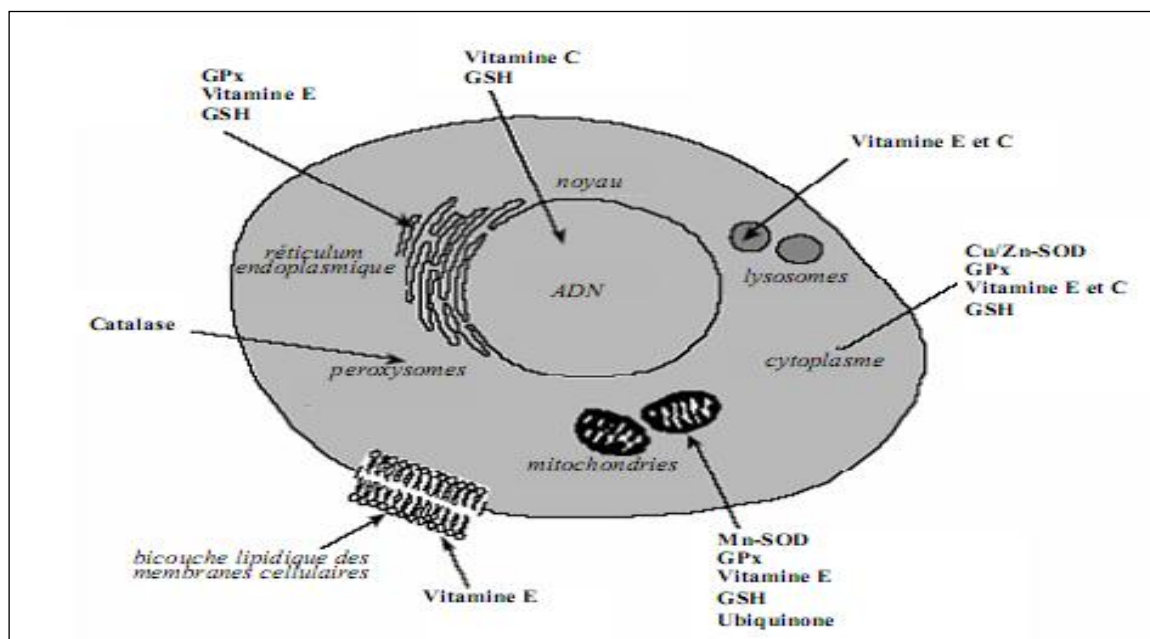


Figure 7 : répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule

II. Le thé et le café :

Comme on a déjà vu, la plupart des antioxydants sont apportés par les aliments et parmi ces derniers on a traité la capacité antioxydante du thé et du café.

1. Le thé :

1.1. Généralités sur le thé :

Le thé (*Camelia sinsensis*) est la boisson la plus consommée dans le monde. Cette plante est connue depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques, qui lui attribuent de propriétés médicinales. Il existe plusieurs types de thé. Leur composition qualitative et quantitative est dépendante du mode de fabrication, du type de culture et de type de cueillette. Le thé est particulièrement riche en composés phénoliques, puisque ceux-ci représentent le tiers de la matière sèche de la feuille [1].

1.2. Les molécules actives du thé :

Les feuilles de thé contiennent surtout des flavonoïdes et des méthylxantines (caféine et théobromine). Les principales classes des flavonoïdes du thé sont des flavonols et des flavanols, qui représentent 30 à 42% de la masse sèche des feuilles. Les flavonols du thé sont la quercétine, le kaempférol, la myricétine et leurs glycosides [9].

1.3. L'activité anti-oxydante du thé :

L'activité antioxydante du thé pourrait être due à la présence de flavonoïdes en particulier les catéchines qui neutralisent les espèces réactives de l'oxygène. Les flavonoïdes peuvent également chélater les ions métalliques libres en particulier le fer et le cuivre, ce qui réduit la production d'espèces réactives de l'oxygène catalysé par les métaux [10].

2. Le café :

2.1. Généralités sur le café :

Le café est une boisson psychoactive obtenue à partir des graines du caféier, un arbuste du genre *Coffea*. La culture du café est très développée dans de nombreux pays tropicaux, dans des plantations qui sont cultivées pour les marchés d'exportation. Le café est une des principales denrées d'origine agricole échangées sur les marchés internationaux, et souvent une contribution majeure aux exportations des régions productrices. Le café est souvent présenté comme le deuxième bien de consommation dans le monde, cependant, ce classement est remis en question par certains spécialistes [11].

2.2. Les molécules actives du café :

Le café contient plusieurs sources d'antioxydants. Il serait d'ailleurs plus riche que le thé, pourtant très réputé. Au premier rang des antioxydants du café, on trouve les fameux polyphénols. Ces composés sont ceux qui sont responsables des vertus du vin (consommé avec modération). Les polyphénols du café sont essentiellement l'acide chlorogénique, caféique et quinique. Ceux-ci ont l'avantage d'être très bien assimilés par l'organisme et possèdent un pouvoir antioxydant très puissant. On trouve d'autres antioxydants dans le café : le Kahwéol et le Cafestol, ceux-ci agiraient notamment au niveau du foie ou des reins [12,13].

Partie expérimentale :

Le but de ce travail, consiste à trouver une méthode fiable, rapide et reproductible pour tester la capacité antioxydante des aliments et boissons. En se basant sur le fait que la majorité des réactions d'oxydation sont de natures électrochimiques, nous avons procédé à l'élaboration d'un capteur électrochimique capable de traduire les réactions redox en signaux électriques, facilement interprétés par les lois fondamentales de l'électrochimie.

Le capteur électrochimique que nous proposons, est constitué d'une cellule électrochimique à trois orifices, un potentiostat, et un ordinateur muni d'un logiciel de type Master 4 qui traduit les résultats.

La partie la plus importante réside dans la cellule électrochimique, qui comporte 3 électrodes, de référence (Calomel saturée), auxiliaire (plaque de platine 1 x 1 cm²) et une électrode de travail.

L'électrolyte choisi dans ce travail est constitué d'une solution tampon phosphatée, qui a pour avantage de maintenir le pH de la solution constant, et aussi assurer une bonne conductivité ionique entre les électrodes de la cellule.

Nous avons testé les activités de quatre électrodes pour évaluer le pouvoir antioxydant du café et du thé :

- Electrode conventionnelle de titane, c'est une plaque monofacée de 1 cm² de surface (Ti),
- Electrode de titane modifié par le phosphate naturel,
- Electrode de titane modifiée par le phosphate naturel dopé par 5% de nickel (Ti-NP-5%Ni),
- Electrode de titane modifiée par le phosphate naturel dopé par 10% de nickel (Ti-NP-10%Ni).

Le phosphate dopé par le nickel est d'abord calciné à 900°C pendant une heure et déposé par voie électrochimique à la surface de la plaque de titane.

1- Caractérisation des électrodes élaborées :

Les électrodes élaborées sont caractérisées par différentes méthodes électrochimiques, afin de fixer les bornes du potentiel et aussi de tester leur stabilité mécanique dans le milieu étudié. L'état de surface a été étudié par Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

La figure 8 illustre les voltammogrammes cycliques enregistrés, respectivement par les électrodes, Ti, Ti-NP, Ti-NP-5%Ni et Ti-NP-10%Ni, en milieu électrolytique tampon phosphate, la vitesse de balayage a été fixée à 100 mV/s.

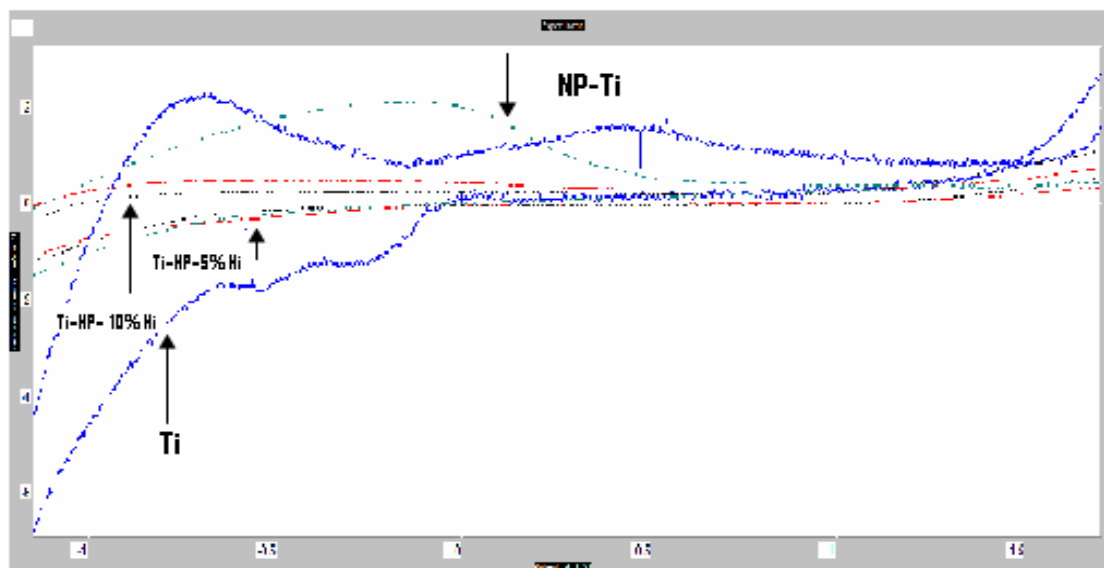


Figure 8 : Voltammogrammes cycliques enregistrés à 100 mV/s, en milieu tampon phosphate pour les quatre électrodes étudiées.

Nous constatons que le dépôt électrochimique à la surface de la plaque de titane entraîne la diminution des intensités des courants électriques, nous pouvons avancer que le NP protège la surface de titane. Lorsque le NP est dopé par différentes concentrations de nickel, nous constatons que les intensités de courant baissent d'avantage, probablement la présence du nickel dans la matrice du NP le rend électriquement passif.

Afin de confirmer les hypothèses avancées précédemment, nous avons procédé au traçage des droites de Taffel.

La figure 9 montre les droites de Taffel enregistrées en milieu tampon phosphate, respectivement par les électrodes Ti, Ti-NP 5% Ni et Ti-NP 10%Ni.

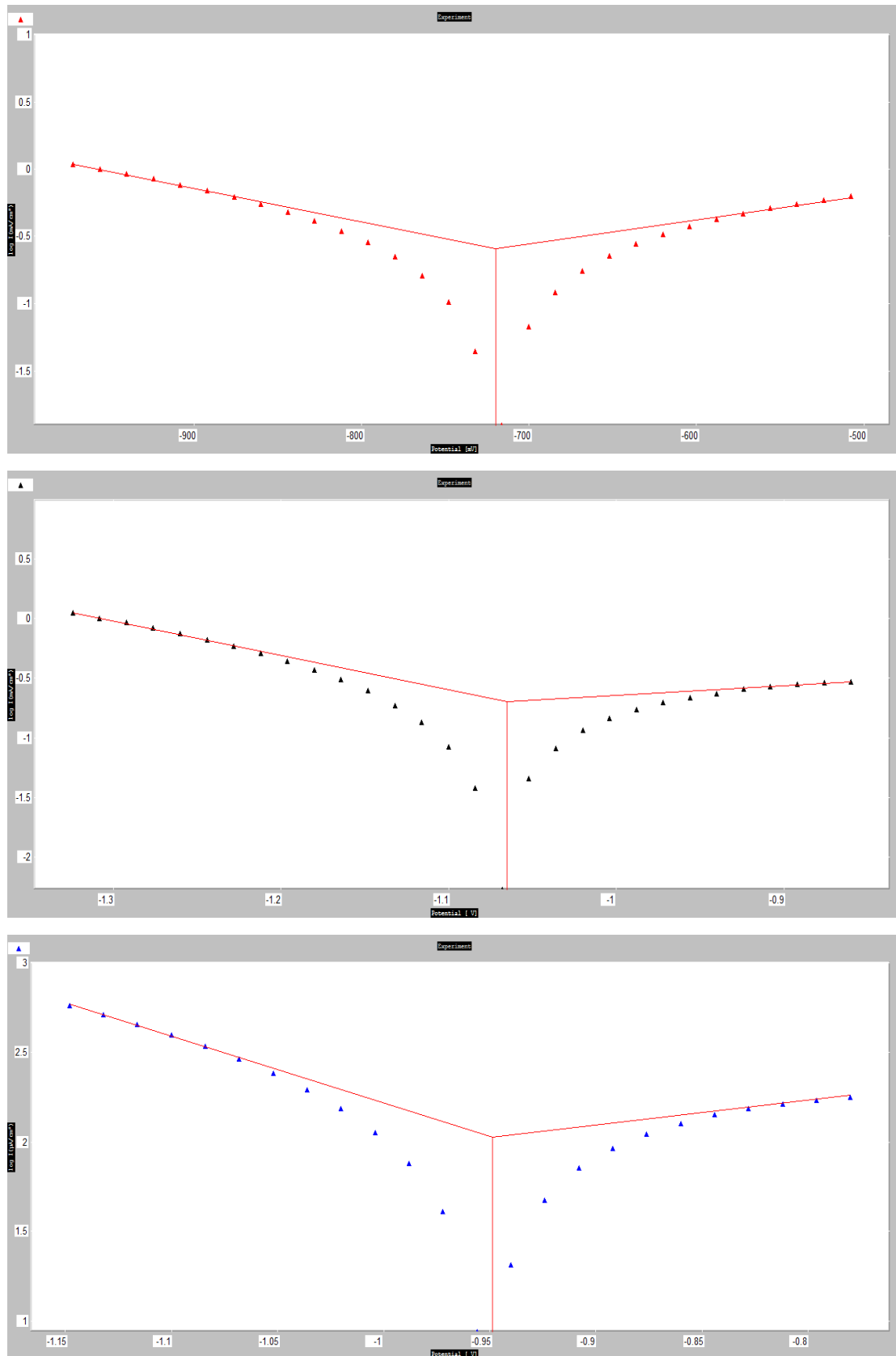


Figure 9 : Droites de Tafel enregistrées par les électrodes étudiées en milieu tampon.

A partir de ces droites nous avons déterminé les paramètres électrochimiques relatifs aux quatre électrodes étudiées (Tableau 2), en l'occurrence le potentiel de corrosion $E (i=0)$, la vitesse de corrosion (i_{corr}), les pentes de Tafel anodique et cathodique (B_a et B_c) et la résistance de polarisation (R_p).

Sample	$E (i=0)$ (mV)	R_p (ohm.cm ²)	i_{corr} (mA/cm ²)	B_a (mV)	B_c (mV)
Ti	-719.5	291.58	0.2563	534.3	-399.4
Ti-NP	-1219.8	216.15	0.2512	329.1	-353.3
Ti-NP-Ni (5%)	-1065	521.88	0.2020	1087.5	-347.1
Ti-NP-Ni (10%)	-1022.4	814.81	0.1	1599.7	-339.7

Tableau 2: Paramètres électrochimiques

A partir du Tableau, nous pouvons constater que les vitesses de corrosion (i_{cor}), baissent progressivement, lorsqu'on dépose électrochimiquement le NP, NP-Ni 5% et NP-10%Ni à la surface du titane.

2- Etude du pouvoir antioxydant du café :

Nous avons préparé une tasse de café dans les normes moyennes, ni trop concentré ni trop dilué, ensuite différentes quantités de cette préparation sont ajoutées progressivement à la solution électrolytique.

La figure 10 montre les voltammogrammes cycliques enregistrés, respectivement par l'électrode de titane, en milieu tampon en présence et en absence du café.

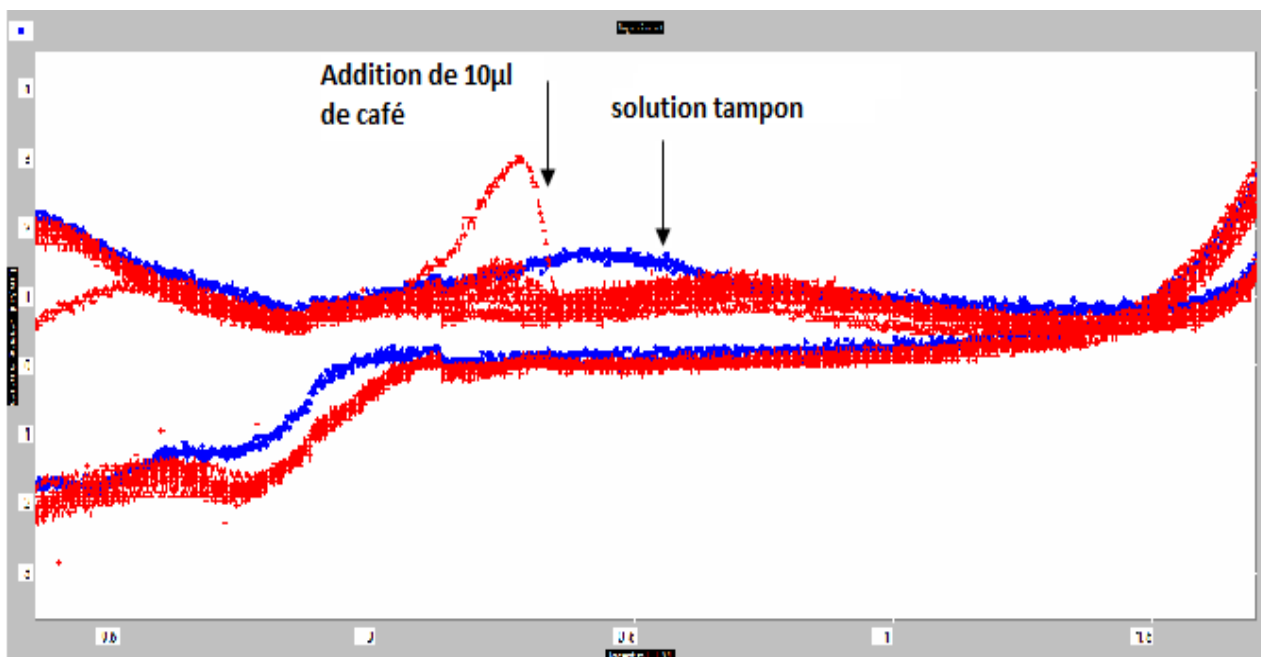


Figure 10 : Voltammogrammes cycliques de titane en milieu tampon avec et sans café, la vitesse de balayage est 50 mV/s.

Sur la figure 11 nous présentons les voltammogrammes à onde carrée, enregistrés par l'électrode de titane, respectivement en présence et en absence du café.

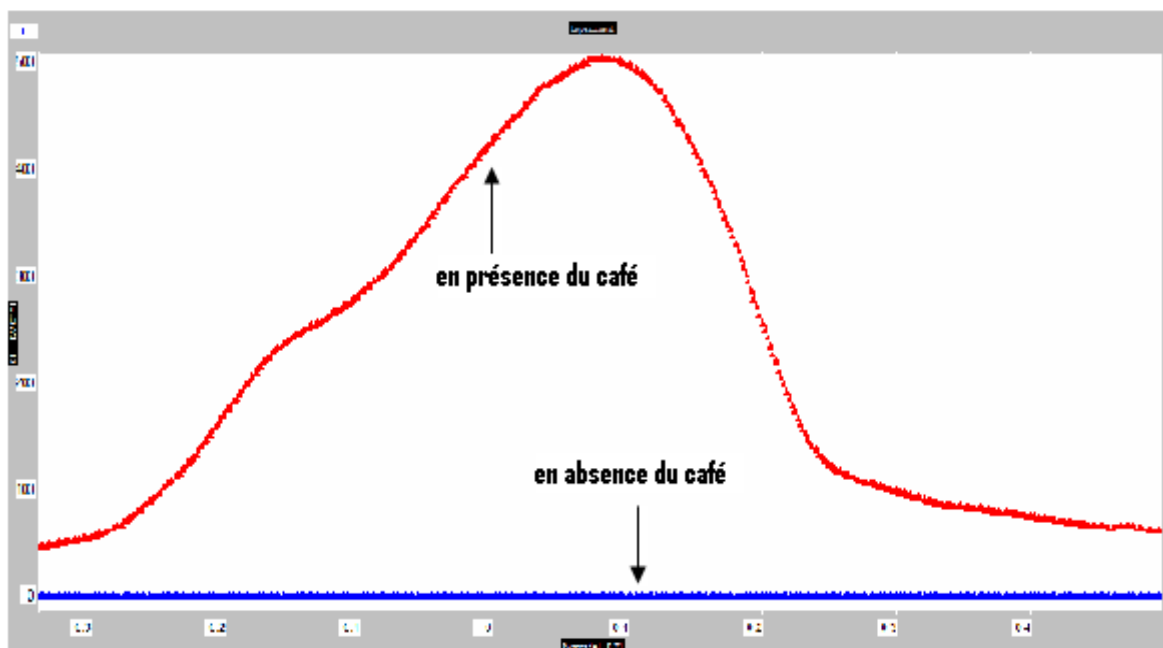


Figure 11 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés par l'électrode de Ti en présence et en absence du café, à 100 mV/s.

La voltammétrie cyclique (fig. 10) montre l'apparition d'un pic d'oxydation à environ 0.5 V, lorsqu'une quantité de 10 µl de café est ajoutée à la solution tampon, ce pic est attribué à l'oxydation du café par l'électrode de titane.

Le même résultat est observé par la voltammétrie à onde carrée, le pic dans ce cas est bien défini.

La figure 12, montre les voltamogrammes à onde carrée enregistrés par les électrodes, Ti, Ti-NP, Ti-NP-5%Ni et Ti-NP-10%Ni, en milieu tampon contenant 10µl de café.

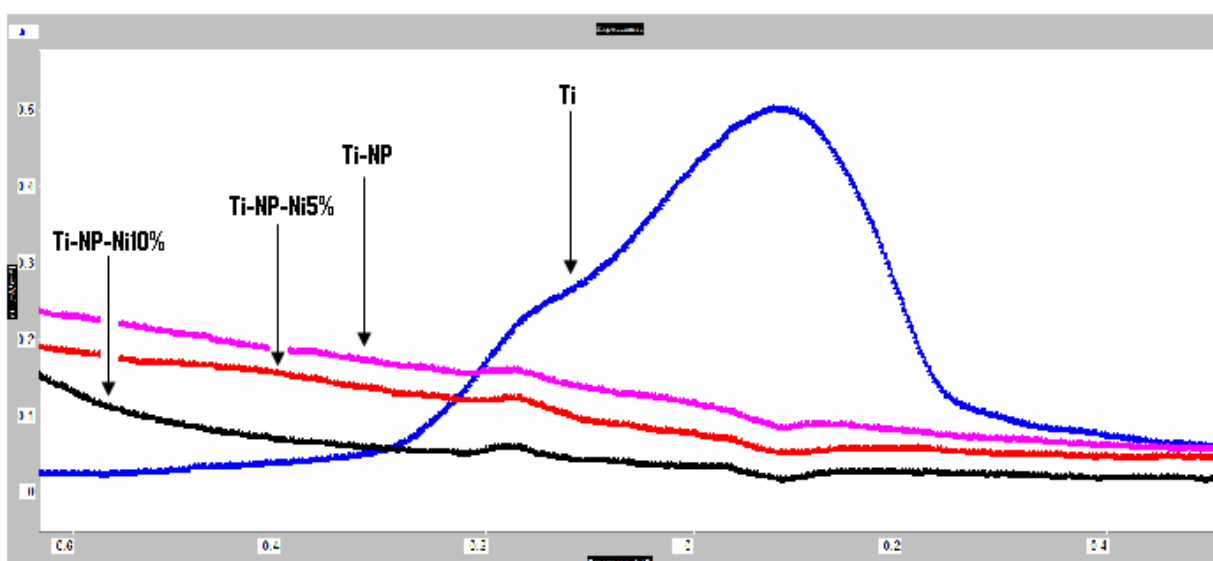


Figure 12 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour les électrodes étudiées, en présence du café.

Nous constatons que l'activité de l'oxydation du café évolue dans le sens suivant :

$$\text{Ti} > \text{Ti-NP} > \text{Ti-NP-5\%Ni} > \text{Ti-NP-10\%Ni}$$

Ce classement en faveur de la plaque de titane est en accord avec les études précédentes qui ont montré que le phosphate naturel traité, déposé à la surface du Ti par voie électrochimique, forme un film isolant. La présence progressive du nickel dans la matrice du NP rend la surface de l'électrode (Ti) d'avantage passive.

Ce résultat est confirmé par les diagrammes d'impédance donnés par la figure 13.

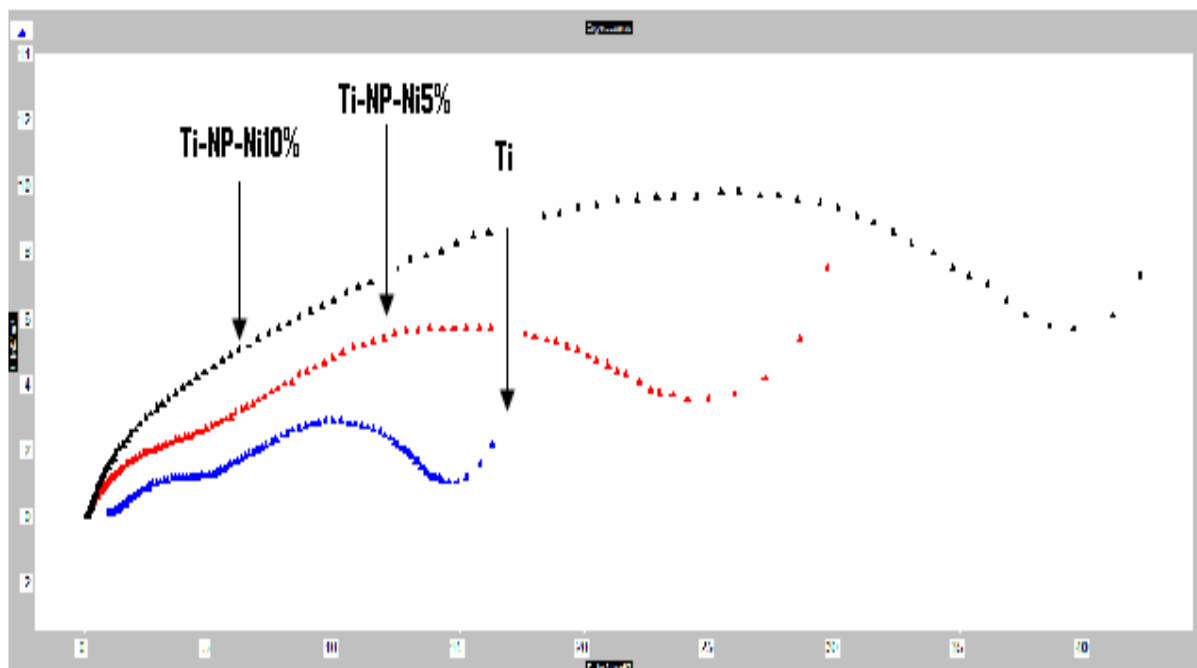


Figure 13 : Diagrammes d'impédance enregistrés par les électrodes étudiées en présence de 10 µl de café dans le milieu tampon.

Nous constatons que la résistance de transfert d'électrons (diamètre de la boucle) évolue dans le sens suivant :

$$\text{Ti-NP-Ni 10\%} > \text{Ti-NP-Ni 5\%} > \text{Ti}$$

Ce résultat confirme l'hypothèse avancé plus haut, le titane est plus actif pour l'oxydation du café.

3- Etude du pouvoir antioxydant du thé :

La figure 14 illustre les voltamogrammes à onde carrée enregistrés par l'électrode de titane en présence de différentes quantités de thé. Nous constatons que la densité de courant d'oxydation du pic augmente avec la quantité de thé.

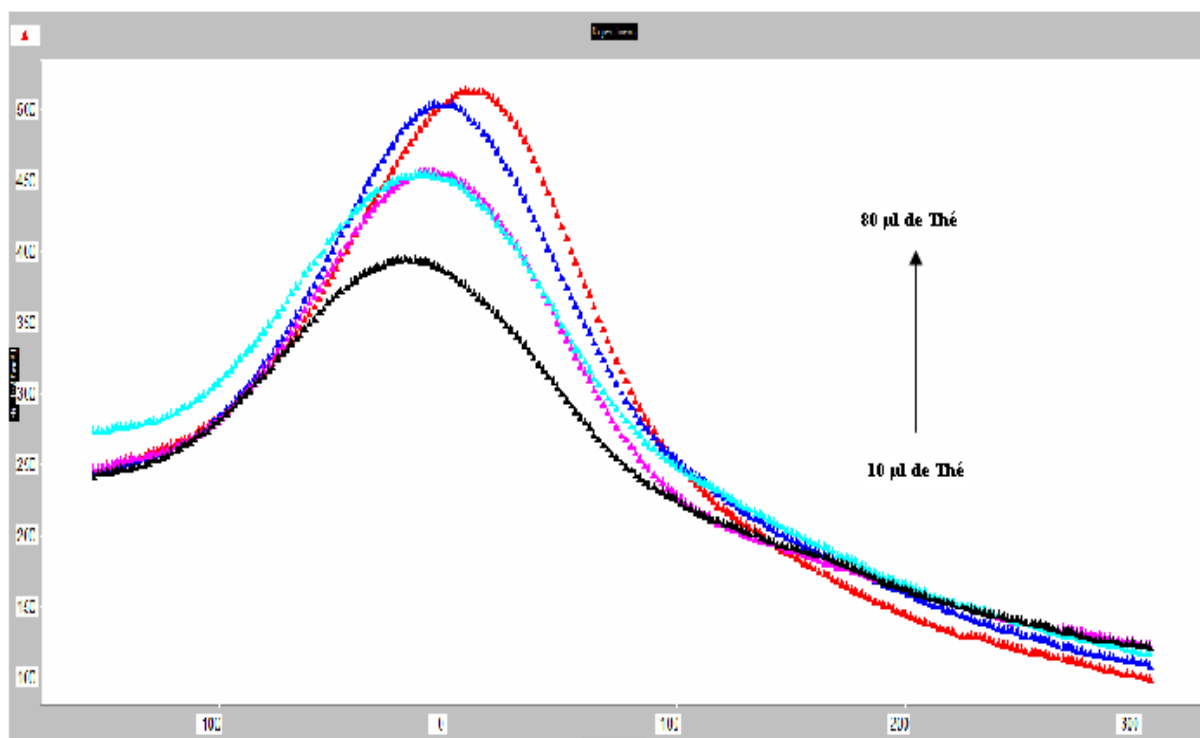


Figure 14 : Voltamogrammes à onde carrée enregistré par l'électrode de titane en milieu tampon contenant différentes quantités de thé.

Les mêmes résultats sont obtenus par les diagrammes d'impédance (Fig. 15).

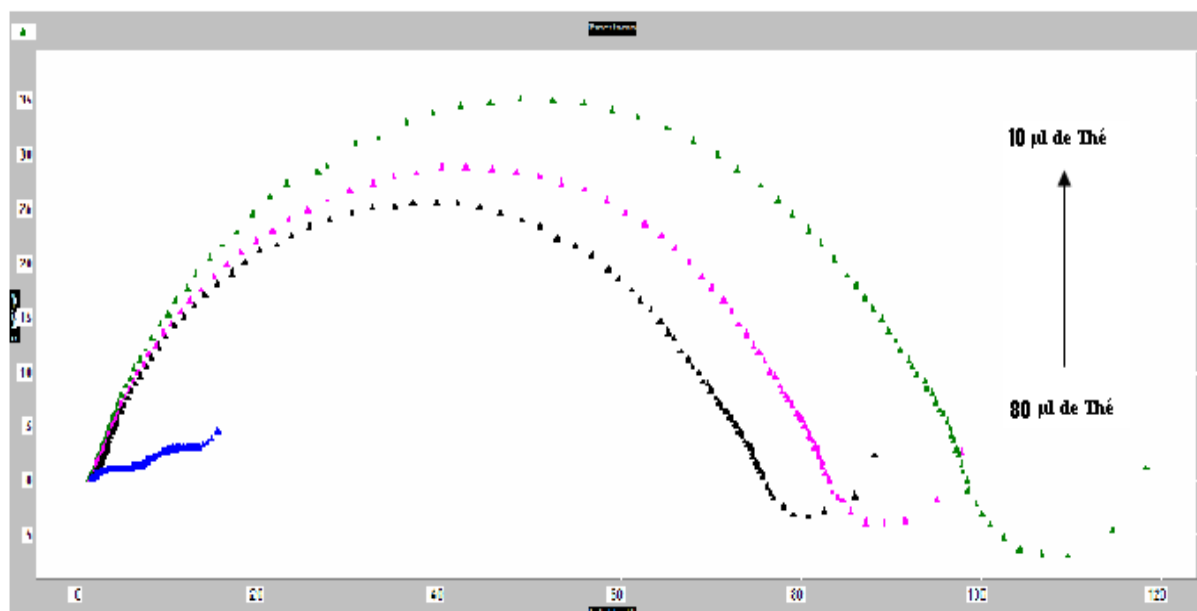


Figure 15 : Diagrammes d'impédance enregistrés par l'électrode de titane en présence de différentes quantités de thé dans le milieu.

Afin de comparer le pouvoir oxydant des deux boissons étudiées, nous représentons sur la figure 16, les voltamogrammes à onde carrée, enregistrés par une électrode de titane en milieu tampon contenant, respectivement 10 μ l de thé et/ou de café.

Nous constatons que le pouvoir antioxydant du thé est légèrement supérieur à celui du café.

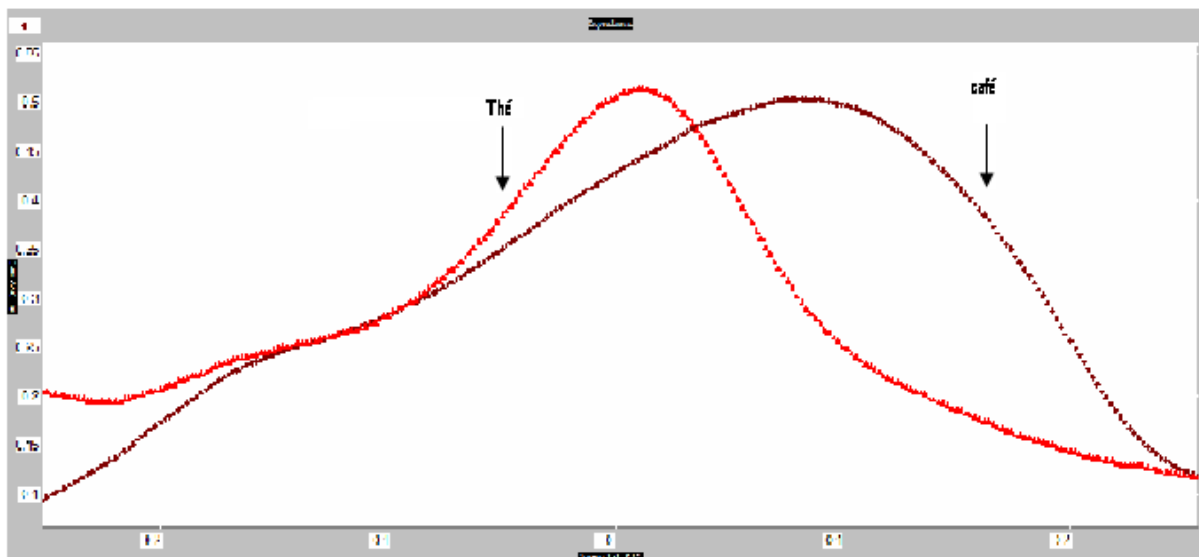


Figure 16 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés par l'électrode Ti en milieu tampon contenant 10 μ l de thé et/ou de café.

Conclusion :

Au terme de ce travail, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- La modification de l'électrode de titane par le phosphate naturel dopé ou non, a été procédée par voie électrochimique,
- Les dépôts effectués en milieu acide sont meilleurs que ceux effectués en milieux neutre et basique,
- La vitesse de corrosion des électrodes étudiées évolue dans le sens suivant :
-

$$\text{Ti-NP- Ni 10\%} < \text{Ti-NP- Ni 5\%} < \text{Ti-NP} < \text{Ti}$$

- L'activité de l'oxydation du café évolue dans le sens suivant :

$$\text{Ti} > \text{Ti-NP} > \text{Ti-NP- 5\% Ni} > \text{Ti-NP- 10\% Ni}$$

- Le thé est légèrement plus antioxydant que le café.

Références :

- 1) Nathalie AUBERVAL, prévention du stress oxydant dans les diabètes et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle, thèse. Université STRASBOURG : école doctorale des sciences de la vie et de la santé. Septembre 2010 ;
- 2) Malika Tanguy : Unité de nutrition, CHU Pontchaillou Rennes. Anne-Marie et Begué-Simon : Département de santé publique. Stratégie / mise au point : MÉDECINE juin 2009
- 3) Blandine GARAIT. Thèse sous thème : « Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin® ». Université JOSEPH FOURIER-GRENOBLE1 Sciences - Technologies - Santé. Année 2006.
- 4) Justine, Odile, Carole PASTRE. Thèse sous thème : « Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques ». L'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. Année 2005
- 5) I. Hininger-Favier « Le Stress oxydant». Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble
- 6) Marion CHABAUD. Thèse sous thème : « Utilisation des antioxydants en hépatologie chez les carnivores domestiques ». L'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON. 2007
- 7) Carole BARUS. Thèse sous titre : « Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique -Application aux produits dermocosmétiques ». Université de TOULOUSE. 2008
- 8) Pr. HEDHILI Lassad : maitre assistant à l'institut préparatoire aux études d'ingénieurs de Nabal.Tunisie.
- 9) Bénédicte PORTET. Recherche bioguidée molécules de molécules antipaludiques d'une plante Guyanaise. Thèse. TOULOUSE (2007).
- 10) Rachida BENARABA. Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : Etude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III) . thèse. UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1: SCIENCES – TECHNOLOGIE – SANTE. 2007
- 11) Wekipedia
- 12) Procafé : association pour la promotion du café. Juillet 2008.
- 13) http://www.doctissimo.fr/html/nutrition/equilibre_plaisir/articles/10483-cafe-sante-antioxydants.htm

Chapitre V : Capteurs
électrochimiques pour l'électro-
analyse des nitrates et des herbicides
dans le lait cru – Région Tadla-Azilal.

Introduction

La consommation de produits laitiers au Maroc est en forte expansion et représente un secteur particulièrement dynamique de la grande distribution alimentaire de ce pays. Dans cet univers, les entreprises de transformation des produits laitiers prennent une importance croissante, le leader sur le marché marocain, la Centrale laitière, se caractérisant par la commercialisation de leurs produits sous des marques fortes du groupe Danone. La principale clé de réussite de la centrale laitière, consiste à produire des produits laitiers dans de bonnes conditions d'hygiène.

Au Maroc, l'élevage bovin est considéré comme l'un des piliers de l'agriculture marocaine. Il contribue ainsi pour une part importante dans le produit intérieur brut agricole, assure l'emploi à une grande partie de la population rurale active, offre la quasi-totalité de la production laitière (qui couvre 87% de la demande de consommation nationale) et 60% de la production de viandes rouges.

Pour le secteur laitier, depuis le lancement du plan laitier en 1975 (mise en place de structure de production, de collecte et de transformation), ce secteur a connu une progression notable, passant d'une production de 521,6 millions de litres en 1975 à 1,370 millions de litres en 2004, soit un taux de progression moyen annuel de 3,2%. La situation conjoncturelle que connaît actuellement le secteur laitier au Maroc n'est pas seulement imputable à la problématique naturelle de rendement intrinsèque, mais aussi aux difficultés liées à une sécheresse quasi-permanente depuis une décennie.

La part de la production qui passe par l'industrie laitier (lait usiné) a connu aussi une croissance rapide, passant de 108 millions de litres en 1975 à 615 millions de litres en 1998 (Boujenane, 2002). Il s'avère donc que la production laitière représente un secteur stratégique de la politique agricole marocaine, notamment pour ses rôles de fournisseurs de protéines animales face à une démographie galopante, de création d'emploi et de richesse. Elle est gérée par les pouvoirs publics grâce à un plan d'encadrement visant à renforcer sa croissance (Guessous 1991)

Afin d'assurer l'autosatisfaction de ses besoins en lait, le Maroc a mené une politique favorisant le développement de la production et de filière laitière nationale. Outre la promotion de l'élevage (des vaches laitières de race), l'un des éléments clefs de la politique nationale a été l'organisation de circuit de commercialisation du lait, par la création de coopératives laitières. Il va sans dire que le développement de ces coopératives, bien qu'elles aient contribué à augmenter la quantité de lait produit, à d'ores et déjà posé le problème de la qualité de celui-ci.

Dans la région de Tadla, les pratiques d'élevages de plus en plus modernes, ont permis de contribuer pleinement à l'amélioration de la production laitière. Si des données quantitatives révèlent uniquement le taux de production globale de la région, d'autres plus précises concernant le rendement et la composition des laits des différentes zones hétérogènes constituant la région ne sont pas disponibles, et ce, en dépit du nombre croissant d'implantations de nouvelles unités spécialisées dans l'industrie laitière. En effet, l'hétérogénéité géographique additionnée à celle des pratiques d'élevage et de l'alimentation, aurait inévitablement des répercussions sur la quantité et la qualité du lait à la traite. L'analyse des caractéristiques des laits de chaque zone permettra ainsi de classer ces laits suivant leur composition, et de leur conférer par conséquent une valeur marchande, voire biotechnologique. La connaissance de la réalité du terrain associée à une analyse fine des voies de production du lait et de leur déterminisme demeure un outil nécessaire pour l'amélioration de la rentabilité, ainsi que la qualité physico-chimique et hygiénique du lait produit dans la région de Tadla.

L'objectif principal du présent travail est d'étudier la caractérisation physico-chimique de certains éléments du lait collecté dans différentes régions de la zone de Tadla –Azilal. Cette étude sera consacrée à l'électro-analyse des nitrates et des herbicides du lait à l'aide d'un capteur électrochimique à base d'argile.

I. Description bibliographique du lait :

1. Définition légale du lait :

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le (Congrès International de la Répression des Fraudes, Genève 1908) comme suit : « le lait est le produit intégral de la traite totale interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ». Le décret du 25 mars 1924 précise : « la dénomination "lait", sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache ». Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination « lait » suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient ». Par exemple : lait de chèvre, lait de brebis ou encore lait de femme.

2. Différents types de lait :

Les laits destinés à la consommation humaine existant actuellement peuvent être classés en deux catégories, selon leur mode de traitement :

- ✓ Lait cru : sans traitement thermique.
- ✓ Lait traité thermiquement.

a- le lait cru :

Si le lait est un produit intéressant sur le plan de la nutrition, puisqu'il n'a subi aucun traitement d'assainissement lui permettant d'assurer une meilleure conservation, sa production et sa commercialisation doivent être sévèrement contrôlées en raison des risques qu'il peut encore présenter pour la santé. En effet, il doit :

- Provenir d'animaux reconnus indemnes de brucellose et de tuberculose.
- Etre préparé (traite, conditionnement et stockage) dans des conditions hygiéniques satisfaisantes.
- Satisfaire à des critères microbiologiques déterminés « témoin de contamination » jusqu'à la date limite de consommation.

b- Le lait traité thermiquement :

Selon le degré de traitement thermique qui permet une augmentation de la durée de conservation, on distingue :

- ✓ Lait pasteurisé.
- ✓ Lait stérilisé.

b-1- Lait pasteurisé :

La pasteurisation est un traitement thermique capable de détruire l'agent de transmission de la tuberculose (bacille de koch) ; Deux catégories de laits pasteurisés sont à distinguer :

- Lait à basse pasteurisation.
- Lait à haute pasteurisation.

☀ Lait à basse pasteurisation :

Pratiquement, le traitement est réalisé à une température nettement plus élevée que celle nécessaire pour détruire le bacille de koch soit 63°C pendant 30 min ; la vérification du bon déroulement du traitement est réalisée par la recherche d'une enzyme appelée phosphatase détruite à cette température.

☀ Lait à haute pasteurisation :

C'est en 1965 que ce lait a été défini, Il se différencie du précédent par deux points :

- le traitement thermique d'assainissement qui est une pasteurisation dont le couple temps/température oscille entre 75-85°C/15-30s. La vérification de l'efficacité de ce type de traitement est effectuée Comme dans le cas du précédent type par la destruction de la phosphatase et la présence de la peroxydase (enzyme qui caractérise le traitement)
- La qualité du lait de départ est déterminée, il doit contenir moins de $5 \cdot 10^5$ germes/ml.

b-2- lait Stérilisé :

Selon le procédé de stérilisation, on distingue le lait stérilisé et le lait stérilisé U.H.T, ces laits doivent être stables jusqu'à la date limite de consommation.

✿ Lait stérilisé U.H.T :

C'est un lait traité par la chaleur (ce qui doit détruire les enzymes, et les microorganismes pathogènes), conditionné ensuite aseptiquement dans un récipient stérile thermiquement clos et étanche. Le traitement thermique peut être soit direct (injection de la vapeur d'eau) soit indirect. Il est réalisé à une température de 135°C - 150°C pendant 15 secondes environ.

Le conditionnement utilisé (U.H.T stérilisé) doit être tel qu'il permette de soustraire le lait à toute influence défavorable de la lumière. On peut considérer qu'un matériau est adapté s'il arrête les radiations lumineuses d'une longueur d'onde inférieure à 6000Å.

3. Caractéristiques physiques du lait cru de vache :

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en bêta-carotènes. Il a une odeur plus marquée, mais caractéristique. Son goût variable selon les espèces animales, est agréable et douceâtre.

Tableau 1 : Caractéristiques physiques usuelles du lait de vache (Goursaud.J 1985

pH (20°C)	6,6 à 6,7
Acidité titrable	15°D à 18°D
Densité	1,028 à 1,036
Température de congélation	-0,51°C à -0,55°C

4. Compositions chimiques du lait cru de vache :

Le lait est un édifice physico-chimique extrêmement complexe qui contient des trésors de richesses nutritionnelles articulés autour de quatre nutriments principaux qui sont :

- les protéines.
- Les glucides.
- Les lipides.
- Les sels minéraux.

Ainsi que d'autres éléments qui sont :

- Les vitamines (hydrosolubles et liposolubles).
- Les enzymes.

Les quantités de ces différents constituants peuvent varier considérablement d'une race à l'autre et d'un individu à l'autre d'une même race. Le tableau 2 présente les compositions chimiques du lait, avec les principaux composants sont :

- ✓ Eau : 900-910 g.
- ✓ Extrait sec total : 125-130g.
 - Matière grasse : 35-45g
 - Lactose : 47-52g.
 - Matières azotées : 33-36g.
 - Matières salines : 9-9,5g.
- ✓ Biocatalyseurs :
 - Enzymes : lipase, phosphatase, protéase, lacto-peroxydase, xanthine-oxydase.
 - Vitamines : vitamine A, D et des vitamines du groupe B.

Tableau 2 : Compositions chimiques du lait

	Composition g/l	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvant) + eau liée (3,7%)
Glucides (lactose)	49	En solution
Lipides	34	Emulsion des globules gras (3 à 5 microns)
Matière grasse	33	
Lécithine (phospholipides)	0,5	
Partie insaponifiable (stéroïls, carotènes tocophérols)	0,5	
Protéines	32	Suspension micellaire de phosphocaseinate de calcium (0,08 à 0,12 microns) solution (colloïdale)
Caséine	27	
Protéines solubles (globulines, albumines)	5	
Sels	9	Solution ou état colloïdal (P et Ca) Sels de K, Ca, Na, Mg et C
Constituants divers : (vitamines, enzymes, gaz dissous) ⇒ trace		

II. Généralités sur les nitrates :

II.1. Sources des nitrates :

Le nitrate est un composé inorganique composé d'un atome d'azote (N) et de trois atomes d'oxygène (O). Sa formule chimique est NO_3^- . Sa masse moléculaire est de 62 g.mol^{-1} . L'azote constituant la molécule de nitrate est dénommé azote nitrique et est généralement noté N-NO_3^- . Ainsi un gramme d'ion NO_3^- correspond à 0,22 gramme d'azote nitrique. Le nitrate est un élément minéral nutritif pour les végétaux et les microorganismes. Pour cette raison, les sels de nitrate comme par exemple le nitrate de potassium (encore appelé salpêtre, de formule KNO_3), le nitrate de sodium (NaNO_3), le nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ou le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), sont utilisés pour la fabrication de fertilisants azotés. Le nitrate est également utilisé pour la composition d'explosifs ou de ciments spéciaux, comme additif et colorant alimentaire, pour la coagulation de latex, dans l'industrie nucléaire et pour le contrôle des odeurs et de la corrosion dans les systèmes hydrauliques. Les principales sources des nitrates sont :

II.1.1. Les eaux et les sols :

Naturellement, les eaux superficielles et les sols renferment de l'azote. Celui-ci provient de la fixation de l'azote atmosphérique par certaines espèces végétales (par exemple les légumineuses), par des cyanobactéries et des bactéries. Une fois incorporé par les organismes, l'azote devient matière organique. Lors de la décomposition de cette matière organique azotée, les bactéries présentes dans les eaux et les sols peuvent la transformer en nitrates. Ceci s'effectue dans un premier temps selon le processus d'ammonification qui conduit à la production d'ammonium (NH_4^+). L'ammonium peut ensuite être transformé en nitrate suivant le processus de nitrification qui comporte deux étapes :

- la nitrosation ou nitritation (qui conduit à la formation de nitrites NO_2^- sous l'action de bactéries telles que les *Nitrosomonas*) ;
- la nitratisation (oxydation de NO_2^- en NO_3^- par des bactéries telles que les *Nitrobacters*). Alors, les nitrates peuvent suivre différentes voies.

Ces nitrates peuvent alors être assimilés par d'autres organismes (plantes, microorganismes) qui les utilisent pour leurs développements. Les nitrates étant très solubles dans l'eau, une fraction est systématiquement exportée vers les écosystèmes aquatiques localisés en aval et vers les nappes en profondeur. Les concentrations en nitrates des eaux souterraines et superficielles sont généralement inférieures à 1 mg.L^{-1} dans les systèmes exempts d'activité humaine et la concentration naturelle en N-NO_3^- des cours d'eau est

inférieure à 0,2 mg.L⁻¹ [25, 26]. Enfin, une large partie est perdue par les eaux et les sols et transformée par certaines bactéries en suivant le processus de dénitrification : l'azote retourne alors à l'atmosphère en empruntant différentes formes principalement gazeuses, dont le protoxyde d'azote N₂O, gaz à effet de serre.

La principale source de contamination des sols et des eaux par les nitrates est l'apport d'engrais azotés sur les cultures. Ces apports peuvent être effectués en utilisant divers types d'engrais azotés qui peuvent fournir de l'azote soit sous forme de nitrates (assimilable par la plante mais également beaucoup plus lessivable), soit sous formes d'urée, d'ammonium ou de lisier, qui seront progressivement transformées en nitrates. Les systèmes de traitements des eaux usées déficients, tout comme la décomposition de matières organiques animales ou végétales issues produites par l'activité humaine, peuvent être une source de contamination par les nitrates [17].

L'urine des animaux (et donc de l'homme) contient de l'ammoniac et de l'urée, qui peuvent rapidement être oxydés en nitrates. Ces rejets d'azote peuvent alors être assimilés à une pollution diffuse dans le cas d'élevages, ou à une pollution ponctuelle dans le cas d'élevages intensifs ou de rejets d'excréments humains provenant d'habitations.

II.1.2) L'atmosphère :

Les nitrates aérosols sont des particules secondaires formées dans l'atmosphère par des transformations chimiques au cours desquelles les oxydes d'azote (NO_x) réagissent avec des substances déjà présentes dans l'air, comme l'ammoniac. Le processus naturel de dénitrification conduit au chargement de l'atmosphère en oxydes d'azote. Le dioxyde d'azote alors formé est rapidement transformé en acide nitrique, lui-même converti en nitrate d'ammonium et nitrate de calcium. Des nitrates sont formés à partir de N₂ atmosphérique lors d'orages.

Les éclairs provoquent une formation d'oxydes d'azote et sont à l'origine d'une nitrification abiotique. L'acide nitrique formé se combine ultérieurement à l'ammoniac présent dans l'atmosphère et donne des microcristaux de nitrate d'ammonium qui sont ramenés à la surface du sol par les précipitations sous formes de pluies ou de neiges [30]. Les divers processus de combustion liés à l'activité anthropique (en particulier l'utilisation de véhicules à moteur), conduisent à enrichir l'atmosphère en oxydes d'azote. Comme c'est le cas pour les oxydes d'azotes issus de sources naturelles, ceux-ci sont transformés en nitrate d'ammonium et nitrate de calcium. Cette concentration atmosphérique en nitrates peut être particulièrement accrue au voisinage des grandes agglomérations où la circulation routière est importante [31].

II.2) Les rejets de nitrates :

Les rejets d'effluents domestiques chargés de matières organiques fermentescibles par des habitations isolées et les agglomérations urbaines sont à l'origine d'une partie de la pollution des eaux par les nitrates. Les concentrations moyennes en nitrates dans les urines rejetées ont rarement été étudiées en Europe. Des études menées entre 1985 et 1989 relataient une excrétion de nitrate comprise entre 32 et 96 mg.j⁻¹ [44]. La plus grande partie des nitrates ingérés sont excrétés dans les urines sous formes de nitrates, ammonium ou urée (WHO, 2003). Wagner et al. (1983) ont évalué que 60 % des nitrates ingérés étaient excrétés dans l'urine [45, 42]. En Europe, il est estimé qu'un individu rejette en moyenne 15 g d'azote sous forme organique et ammoniacal par jour. Cette estimation est à l'origine de la notion d'Equivalent Habitant azote (EqH). Cette donnée est utilisée afin de dimensionner les stations d'épuration destinées à traiter les eaux usées des agglomérations urbaines. L'azote organique et ammoniacal rejeté est susceptible d'être oxydé en NO₃⁻.

II.3) Impact des nitrates sur l'environnement :

L'effet principal des nitrates sur l'environnement consiste à favoriser la croissance végétale. Cet impact, qui peut apparaître bénéfique dans un premier temps, s'avère désastreux pour les écosystèmes aquatiques lorsque la prolifération végétale est poussée à l'excès. Le processus d'eutrophisation, qui correspond à un enrichissement naturel des milieux aquatiques en éléments nutritifs et à une augmentation de la productivité végétale, est alors considérablement accéléré. L'eutrophisation du milieu nécessite la présence d'éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore) indispensables à la croissance des végétaux aquatiques.

Le carbone est toujours présent à des concentrations suffisantes pour permettre le développement végétal. En milieux aquatiques, la croissance des végétaux est limitée par l'élément dont la concentration dans le milieu est la plus faible par rapport aux besoins des végétaux. Cet élément limitant est généralement le phosphore ou parfois l'azote. C'est donc en rejetant de l'azote et/ou du phosphore dans l'eau que l'activité anthropique va induire une accélération de l'eutrophisation. Lorsque les concentrations en azote et phosphore du milieu aquatique sont élevées, la production d'algues microscopiques (phytoplancton) et de végétaux fixés (macrophytes) est exacerbée. La quantité de matière organique présente dans le milieu aquatique s'accroît démesurément. A la mort de ces végétaux, la matière organique se décompose en consommant tout l'oxygène de la colonne d'eau, induisant ainsi l'anoxie du milieu aquatique. La plupart des animaux vivants dans ces milieux ne peuvent pas survivre dans une eau dépourvue d'oxygène. L'écosystème aquatique est ainsi conduit à disparaître. Si l'on utilise souvent le terme d'eutrophisation pour décrire cet état de dégradation des milieux

aquatiques, le terme d'eutrophisation accélérée apparaît plus précis et le terme de dystrophie est parfois usité.

L'enrichissement des écosystèmes aquatiques en éléments azotés (mais également en phosphore) conduit à leurs disfonctionnement et à la perturbation des populations animales ou végétales qui y sont naturellement inféodés. Ainsi, diverses études ont mis en évidence des corrélations entre les teneurs en nitrates dans l'eau ou les quantités d'engrais azotés épandus et le déclin des populations d'amphibiens [27, 2, 36]. Cette modification des populations peut également conduire au développement de microorganismes pathogènes ou sécrétant des toxines qui rendent impropre l'eau à divers usages (récréatifs, production d'eau potable) ou peuvent considérablement accroître les coûts des traitements des eaux. Un deuxième effet, moins aisément quantifiable pour l'instant, est la participation des nitrates, via leur dénitrification, à la formation de gaz à effet de serre. Son évaluation est en cours d'étude actuellement à travers différents programmes de recherches sur les changements globaux.

II.4) Impact sur la santé humaine :

Les nitrates présentent des avantages et des inconvénients par rapport à la sécurité alimentaire. Ils sont actifs contre les *Clostridium perfringens* et *botulinum* mais par rapport à de nombreuses autres bactéries notamment *Staphylococcus aureus* par des mécanismes probables d'oxydoréduction et d'actions enzymatiques. En effet, au cours de la cuisson les sels nitrités donnent naissance à des inhibiteurs efficaces de la croissance, mais le principal risque pour la santé humaine associé à l'ingestion de nitrates est lié à la faculté de l'organisme humain de transformer les nitrates en nitrites. Cette réduction de NO_3^- en NO_2^- est le fait de bactéries ayant une activité nitrate réductase. Il ne semble pas exister d'études relatant un effet toxique chronique des nitrates qui ne soient pas lié aux effets des nitrites.

II.4.1) Risque de méthémoglobinémie

Les nitrites formés par réduction des nitrates sont susceptibles de se fixer sur l'hémoglobine [12, 18]. Celle-ci est alors oxydée en méthémoglobine.

Le transport de l'oxygène vers les tissus qui en ont besoin ne se fait plus. Cette maladie est dénommée méthémoglobinémie. Chez l'adulte, ce risque est très faible car une enzyme réduit la méthémoglobine en hémoglobine. En revanche, cette enzyme n'est pas activée chez le nourrisson et ne devient fonctionnelle que vers trois à quatre mois. De plus le pH dans l'estomac du nourrisson est plus élevé que celui d'un adulte car les sécrétions gastriques acides sont plus faibles durant les premiers mois de la vie. Ce pH élevé semble permettre un développement plus aisé des bactéries ayant une activité nitrate réductase. Par conséquent

lorsqu'il y a ingestion d'une forte quantité de nitrate dans des conditions favorisant sa conversion en nitrites, la méthémoglobine s'accumule. L'enfant développe alors une coloration bleue de la peau qui débute par les lèvres, puis les bouts des doigts, et peut éventuellement s'étendre à l'ensemble du corps. Pour cette raison, cette pathologie qui est plus fréquente chez le nourrisson, est aussi appelée syndrome du bébé bleu ou maladie bleue du nourrisson. Certains auteurs affirment que la réduction des nitrates en nitrites n'est pas possible dans le tube digestif et que les risques imputés aux nitrates sont considérablement surestimés [18, 41]. Dès 1945, Comly (1945), mettait en relation des cyanoses chez des nourrissons ayant été alimentés avec de l'eau à fortes teneurs en nitrates (plus de 350 mg.L⁻¹) [5]. En considérant que 80 % des nitrates sont réduits en nitrites chez les nourrissons, et une formation de 10 % de méthémoglobine, Corré et Breimer (1979) ont estimé la dose toxique pour l'enfant à 1,5-2,7 mg de nitrate par kg [6]. Cependant, dans les cas de méthémoglobinémie rapportée, la somme des nitrates ingérés était plus élevée entre 33 et 150 mg.kg⁻¹ [43, 45]. Les femmes enceintes et les individus souffrant d'une déficience en glucose-6-phosphate déhydrogénase ou metHb réductase sont particulièrement sensibles à cette pathologie. Un apport suffisant de vitamine C (acide ascorbique) par l'alimentation, réduit les risques de développement de la maladie [40]. La vitamine C peut d'ailleurs être utilisée dans le traitement de la méthémoglobinémie mais son action est souvent trop lente pour agir efficacement.

II.4.2) Risque carcinogène :

Les nitrates sont susceptibles de présenter un risque lié à leur transformation en nitrites et éventuellement en nitrosamines dans le tractus digestif. Les propriétés carcinogènes de ces substances ont été découvertes il y a un demi siècle [19, 20]. Il n'existe pas de données qui démontrent avec certitude les effets carcinogènes des nitrates via la formation de nitrosamines chez l'animal [44]. Les études épidémiologiques et toxicologique n'ont pas mis en évidence de relations certaines entre ingestion de nitrates et risque de cancers (Cantor, 1997 ; Messinga et al., 2003). Démontrer avec certitude une telle relation est particulièrement difficile étant donné le temps de latence entre la cause et le dépistage de la pathologie qui peut dépasser 20 ans [12].

Cette démonstration est rendue encore plus ardue par la grande variabilité dans la durée et l'espace des teneurs en NO₃⁻ dans l'eau et les aliments. Cependant, les tests chez de nombreuses espèces animales ont montré l'effet carcinogène d'un grand nombre de nitrosamines [44]. Diverses études permettent de suspecter fortement la responsabilité de teneurs élevées en nitrates dans l'eau et les aliments, et le développement de cancers de la

prostate, du pharynx, de l'oesophage ou du colon [4, 11]. En absence de certitudes absolues, ces résultats imposent de prendre les précautions nécessaires afin de préserver la santé humaine.

Effets indirects

Dans les eaux marines littorales, l'accroissement des concentrations de nitrates entraîne l'apparition d'une prolifération algale qui peut être toxique pour l'homme directement et/ou indirectement par la consommation de coquillages. En France, la région Bretagne est particulièrement touchée depuis quelques années par la prolifération d'Ulves qui sont des algues à l'origine des « marées vertes ». Dans les eaux douces, l'eutrophisation accélérée (induite par les pollutions azotées mais aussi phosphatées) du milieu peut conduire au développement de phytoplanctons producteurs d'hépatotoxines et de neurotoxines.

II.5) Différentes méthodes d'analyse des nitrates :

Le dosage des nitrates impose que la mesure soit réalisée dans les plus courts délais après le prélèvement car le NO_3^- peut rapidement être réduit.

Les ions nitrates peuvent être dosés directement. Ces méthodes directes présentent souvent un manque de sensibilité et sont affectées par diverses matrices interférentes. Afin de palier à ces deux inconvénients, NO_3^- est souvent préalablement réduit en NO_2^- . Ce sont donc les concentrations en nitrites qui sont évaluées. Cette approche nécessite donc une détermination des teneurs en nitrites présentes dans l'échantillon avant réduction des nitrates. Les concentrations en nitrates se déduisent alors de la différence entre les concentrations en nitrites avant et après réduction [39]. L'une des méthodes les plus courantes de détermination des teneurs en nitrates consiste à réduire les nitrates en nitrites à travers une colonne de cadmium. Les nitrites sont ensuite dosés par spectrophotométrie d'absorption moléculaire après diazotation de l' amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) en conditions acides avec le dichlorure de N-(naphtyl-1) diamino-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) [39, 34]. Les nitrates peuvent également être dosés directement par spectrophotométrie d'absorption moléculaire. Ainsi, en présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium coloré en jaune et susceptible d'un dosage spectrophotométrique [34]. Dans les eaux, les nitrates peuvent également être dosés par chromatographie ionique ou directement par spectrophotométrie d'absorbance moléculaire dans l'UV lorsque la teneur en matières organiques est faible [1].

Dans les denrées alimentaires, des méthodes basées sur la réduction enzymatique [38], la chromatographie gazeuse [35], l'HPLC [32], ou l'électrophorèse capillaire [28], peuvent également être utilisées.

Les méthodes de dosages des nitrates préconisées par les normes françaises et européennes dépendent de la matrice analysée qui peut être de l'eau (AFNOR NF EN ISO 13395 T90- 012 et EN ISO 13395 :1996) ou des denrées alimentaires diverses (AFNOR NF EN ISO 14673-1 VO4-172-1 et suivantes pour le lait et les produits laitiers, NF EN 12014-2 V03-010- 2 pour les légumes et produits à bases de légumes, NF EN 12014-7 V03-010-7 et suivantes pour les produits carnés, NF EN 12014-5 VO3-010-5 pour les aliments à base de légumes pour bébés et petits enfants).

II.6) Réglementation actuelle :

La JECFA (association d'experts de la FAO et de l'OMS) et la commission européenne ont fixé entre 0 et 3,65 milligrammes de nitrates par kg et par jour la dose journalière admissible (DJA) pour l'homme. Pour un individu de 70 kg, cela correspond à 255 mg de nitrates par jour. A titre de comparaison, l'OMS [44] estime entre 120 et 300 mg la dose journalière ingérée quotidiennement par un adulte Européen. La DJA fixée par l'agence Américaine de protection de l'environnement (EPA) est fixée à environ $7,1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Les apports alimentaires journaliers moyens en nitrates sont estimés entre 50 et 150 mg.j^{-1} pour un Européen et entre 40 et 100 mg.j^{-1} pour un Américain [24]. Dans le cas de régimes végétariens, l'ingestion de NO_3^- semble plus importante et peut dépasser 300 mg.j^{-1} [43]. Cet apport alimentaire (eau d'alimentation exclue) est estimé à 25 mg.j^{-1} pour un enfant âgé de deux mois [44].

II.6.1) L'eau de consommation :

La valeur guide maximale de l'OMS pour les teneurs en nitrate dans les eaux de consommation est de 50 mg.L^{-1} . Le décret 2001-1220 du 20 décembre 2001 fixe pour la France les concentrations maximales en nitrates dans l'eau de consommation à 50 mg.L^{-1} . La valeur guide recommandée par l'Europe est de 25 mg.L^{-1} . L'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) fixe cette limite à 45 mg.L^{-1} (10 mg.L^{-1} de N-NO_3^-).

II.6.2) Les aliments :

Les teneurs en nitrates dans les viandes sont également réglementées. La législation européenne (Directive de l'Union Européenne 95/2) suggère de limiter les additifs en début de traitement des viandes et impose une limite résiduelle de 250 mg de nitrates par kilogramme de viande. En France, l'arrêté du 15 septembre 1964 (JOFR du 3 octobre 1964, p. 8924), la circulaire du 29 janvier 1965, le CSHPF du 23 mai 1978 et le code des usages II 39-3-124, réglementent les conditions et doses d'emploi de ces additifs en fonction des groupes de produits traités (pâtes et conserves de viandes, produits de la salaison non soumis à une maturation dessiccation, produits de la salaison soumis à une maturation dessiccation) [37].

La législation Française limite les teneurs en nitrates dans les charcuteries à 150 mg.kg⁻¹ et dans les aliments pour bébés à 50 mg.kg⁻¹. La Commission Européenne fixe les concentrations maximales admises dans les épinards frais et les laitues cultivées sous serre récoltés entre le 1^{er} novembre et le 31 mars à respectivement 3000 et 4500 mg.kg⁻¹. Ces teneurs sont abaissées respectivement à 2500 et 3500 mg.kg⁻¹ pour ceux collectés entre le 1^{er} avril et le 31 octobre. La limite est de 2000 mg.kg⁻¹ pour les épinards cuisinés ou congelés et de 2500 mg.kg⁻¹ pour les laitues cultivées en plein air.

II.7) Recommandation en vertu des principes de précaution :

Compte tenu des études qui confirment le risque d'effets nocifs aigus (méthémoglobinémie aiguë du nourrisson) à partir de 50 mg.L⁻¹ de nitrates dans l'eau de consommation [8, 9], il apparaît recommandable pour les populations à risque (nourrissons, femmes enceintes ou qui allaitent, personnes âgées dont l'acidité gastrique est diminuée, etc.) de s'alimenter à partir d'eau garantissant une teneur en nitrates inférieure à ce seuil. Il a également été montré que les nourrissons alimentés au sein présentent une flore intestinale caractérisée par une activité nitrate réductase moindre que les bébés alimentés au biberon [12]. Le risque de méthémoglobinémie pourrait donc être accru chez ces derniers. Il apparaît recommandable d'assurer au nourrisson jusqu'à l'âge minimum de trois mois une alimentation au sein susceptible de minimiser le développement de bactéries nitratoréductrices et d'éviter d'exposer directement l'enfant à un apport de nitrate issu de l'eau d'alimentation. Les nitrates pouvant se retrouver dans le lait maternel, les mamans qui allaitent doivent éviter de boire de l'eau riche en nitrates. En général, l'apport de nitrate par le lait maternel semble négligeable. Green et al. (1981) ont estimé la concentration dans le lait maternel à 1,4 mg.L⁻¹ de nitrate [10]. Dans le cas d'une alimentation au biberon, il est indispensable de s'assurer de l'absence ou de la très faible teneur en nitrate dans l'eau utilisée pour la préparation des aliments. Pour un enfant qui serait nourri avec une alimentation préparée à partir d'une eau contenant 50 mg.L⁻¹ de nitrate, l'ingestion de nitrate serait proche de 8,5 mg de nitrates par kilo et par jour [45]. Cet apport serait près de six fois la dose toxique pour un nourrisson calculé selon Corré et Breimer (1979) [6], et plus de deux fois supérieur à l'apport maximal journalier admissible défini par la JECFA pour un adulte. Il convient de rappeler que le nourrisson est beaucoup plus sensible à l'ingestion de nitrate que l'adulte. Il apparaît également prudent de limiter l'usage de légumes connus pour renfermer de fortes teneurs en NO₃⁻ (carottes, épinards, betteraves) pour l'alimentation des nourrissons de moins de quatre mois. Si certains auteurs (L'hirondel et L'hirondel, 2002 ; Testud, 2004) réfutent en partie les risques de méthémoglobinémie et de cancer imputés aux nitrates [18, 41], tous les

auteurs s'entendent sur l'importance de s'assurer d'une grande hygiène lors de la préparation d'aliments pour nourrissons afin d'éviter une contamination par les bactéries nitro-réductrices.

L'alimentation du nourrisson doit donc être préparée avec des aliments en parfait état de conservation, en utilisant des ustensiles propres. L'aliment ne doit pas avoir séjourné à température ambiante durant une longue période avant d'être ingéré.

Les données actuelles des études épidémiologiques ne permettent pas de tirer une conclusion définitive sur les risques cancérigènes liés à une forte consommation de nitrates. Le risque est cependant loin d'être écarté. Le principe de précaution impose donc de limiter l'apport de nitrates que ce soit par l'intermédiaire d'aliments et/ou d'eaux contaminés.

II.8. Méthodes d'analyse des nitrates :

La majorité des méthodes d'analyse de l'ion nitrate se basent sur la détection de l'ion nitrate NO_3^- , relativement inerte, est réduit chimiquement en NO_2^- , beaucoup plus réactif et plus facilement détectable. Le procédé de conversion de NO_3^- en NO_2^- le plus communément utilisé et le plus efficace est la colonne Cu/Cd, composée de grains de cadmium sur lesquels a été déposé du cuivre qui réduit quantitativement le nitrate en nitrite. La concentration en nitrite est ensuite déterminée par spectroscopie, chimiluminescence ou électrochimie [33]. La méthode spectroscopique se révèle la plus facile de par la simplicité de l'appareillage et du protocole expérimentale, alors que les méthodes de chimiluminescence et de conductimétrie, généralement combinées à une séparation par chromatographie, offrent de meilleures performances mais restent limitées à des applications en laboratoire du fait de la complexité de l'instrumentation. La demande grandissante de mesures rapides et réalisables en tout lieu contribue au développement des capteurs.

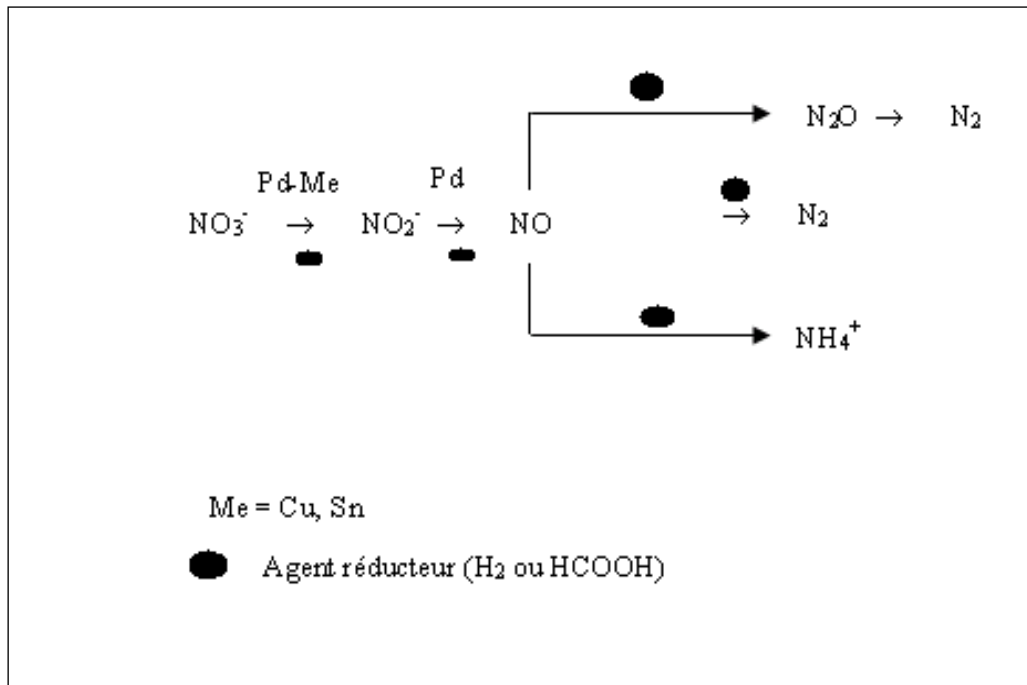
D'autres méthodes électrochimiques, telles que l'ampérométrie [22], l'électroréduction ou l'électrocoagulation [23], sont également utilisées.

Après la détection et la coagulation des nitrates, se pose le problème du contrôle de leur concentration pour répondre aux normes imposées par nos besoins en eau potable et par la volonté de protéger l'environnement. Il existe différents procédés de dénitrification des eaux : des méthodes physico-chimiques, telles que les membranes échangeuses d'ions, l'osmose inverse ou l'électrodialyse, ainsi que des procédés biologiques sont couramment utilisés.

Les premières opèrent une séparation de l'ion nitrate, produisant des effluents concentrés. Ces concentrats peuvent ensuite être traités afin d'obtenir de l'acide nitrique pour l'industrie, la dénitrification biologique, par contre, convertit NO_3^- en N_2 , produit inoffensif pour l'environnement, et a l'avantage d'être sélective à l'ion nitrate uniquement. Cette méthode

présente cependant des risques de contamination microbiologique de l'eau ainsi traitée ou la production de NO_2^- dans le cas d'une dénitrification incomplète.

Une alternative pour l'élimination de l'ion nitrate par sa conversion en N_2 est la réduction catalytique de NO_3^- en solution aqueuse, largement étudiée depuis la fin du siècle passé. Le défi à relever dans ce domaine est la préparation d'un bon catalyseur, qui doit montrer une grande activité tout en offrant le meilleur contrôle possible de la sélectivité. Les métaux nobles sont connus pour leurs propriétés catalytiques d'hydrogénation, mais se révèlent peu actifs pour la réduction de l'ion nitrate. Les travaux réalisés ont démontré que la réduction de NO_3^- ne pouvait se faire efficacement que sur des catalyseurs bimétalliques, composés d'un métal noble pour le contrôle de la sélectivité et d'un métal moins noble jouant le rôle de promoteur de la réaction. De plus, pour un catalyseur donné, l'activité et la sélectivité sont fortement influencées par les conditions de mesure : concentration en agent réducteur (H_2 ou HCOOH), pH, température, proportions des deux métaux dans le catalyseur. A l'heure actuelle, les meilleurs catalyseurs connus pour la réduction de NO_3^- sont des assemblages bimétalliques à base de palladium, en combinant avec un autre métal (Cu, Sn) actif pour la première étape de réduction de NO_3^- en NO_2^- [22]. La réduction catalytique de l'ion nitrate sur ces catalyseurs bimétalliques peut être schématisée comme suit :



NO_3^- s'adsorbe sur les sites (Me), symbolisant le métal qui sert de promoteur et est réduit en NO_2^- qui peut lui-même être hydrogéné sur les sites Pd. Les meilleurs résultats ont été obtenus

pour les catalyseurs Pd-Cu. Plus récemment, des catalyseurs Pd-Cu ont été préparés pour la réduction de NO_3^- [46].

Parallèlement, de nombreuses études sont menées sur l'électroréduction de l'ion nitrate, qui présente les mêmes potentialités que la réduction catalytique : d'une part l'élimination de NO_3^- par sa conversion en N_2 ou en produits tels que NH_3 ou NH_2OH , utiles pour des applications en industrie, et d'autre part la possibilité de contrôler la sélectivité de la réaction. Cependant, la réduction électrochimique de NO_3^- s'avère complexe à étudier du fait du nombre important d'intermédiaires stables et de produits susceptibles d'être formés. Ces produits dépendent non seulement de la nature de l'électrode, mais également de paramètres expérimentaux comme le pH du milieu ou le potentiel de l'électrode.

Divers métaux ont été utilisés comme matériaux d'électrode pour la réduction du nitrate. Le groupe de Koper (2005) a étudié et comparé l'activité électrocatalytique de plusieurs métaux de transition. L'activité des différentes électrodes décroît selon la séquence : $\text{Rh} > \text{Ru} > \text{Ir} > \text{Pd}, \text{Pt} > \text{Cu} > \text{Ag} > \text{Au}$.

Références

- [1]- APHA, 1976, Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA), Washington, 420-423.
- [2]- Bishop C. A., Mahnonny N. A., Struger J., Ng P., Pettit K. E., 1999, Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed,
- [3]- Ontario, Canada (1990-1992). Environ. Monitor. Assess., 59, 21-43.
- [4]- Cantor K. P., 1997, Drinking water and cancer. Cancer Cause Control 8, 292-308.
- [5]- Comly H., 1945, Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. J. Am. Med. Assoc. 129, 112-116.
- [6]- Corré W. J., Breimer T., 1979, Nitrate and nitrite in vegetables. Centre for Agricultural Publishing Documentation (Literature Survey No. 39), Wageningen.
- [7]- Duijvenbooden W., Matthijsen A. J. C. M., 1989, integrated criteria document: Nitrate effects. Rapport n° 758473012, RIVM, Bilthoven.
- [8]- Fan A. M., Willhite C. C., Book S. A., 1987, Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. Regul.Toxicol. Pharmacol., 7, 135-148.
- [9]- Fan A. M., Steinberg V. E., 1996, Health Implications of Nitrate and Nitrite in Drinking Water : An Update on Methemoglobinemia Occurrence and Reproductive and Developmental Toxicity. Regul. Toxicol. Pharmacol., 23, 35-43.
- [10]- Green L. C., Ruiz de Luzuriaga K., Wagner D. A., Rand W., Istfan N., Young V. R., Tannenbaum S. R., 1981, Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7764-7768.
- [11]- Gulis G., Czompolyova M., Cerhanw J. R., 2001, An Ecologic Study of Nitrate in Municipal Drinking Water and Cancer: Incidence in Trnava District, Slovakia. Environ. Res. Section A, 88, 182-187.
- [12]- Hill M. J., 1991, Nitrates and nitrites in food and water. Ellis Horwood, London, 196 pp.
- [13]- Janssen L. H. J. M., Visser H., Roemer F. G., 1989, Analysis of large scale sulphate, nitrate, chloride and ammonium concentrations in the Netherlands using an aerosol measuring network. Atmos. Environ., 23, 2783-2796.
- [14]- G.E. Dima, G.L. Beltramo, M.T.M. Koper, Electrochimica Acta, 50(2005)4318-4326.
- [15]- Leaf C. D., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., 1989, L-Arginine is a precursor to nitrate biosynthesis in humans. Biochem. Biophys. Res. Comm. 163, 1032-1037.
- [16]- Lespine A., Périquet A., 2001, Nitrate, alimentation et santé. Institut technique des céréales et des fourrages (ITCF), Paris, 24 pp.
- [17]- Levallois P., Phaneuf D., 1994, La contamination de l'eau potable par les nitrates : analyse des risques à la santé. Rev. Can. santé publique, 85, 192-196.

- [18]- L'hirondel J., L'hirondel J. L., 2002, Nitrate and Man: Toxic, Harmless or Beneficial? CABI Publishing, New York, 168 pp.
- [19]- Magee P. N., Barnes J. M., 1956, The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Brit. J. Cancer*, 10, 114-120.
- [20]- Magee P. N., Barnes J. M., 1967, Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, 10, 163-169.
- [21]- Marletta M. A., 1988, Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.* 1, 250-257.
- [22]- H. Massai, B.B. Loura, M.J. Ketcha, A. Chtaini, *Portugaliae Electrochimica Acta* 2009, 27(6), 691-698
- [23]- H. Massai, B.B. Laura, M.J. Ketcha, A. Chtaini, *Bulletin of the Catalysis Society of India*, 2 (2009) 64-68
- [24]- Messinga T. T., Speijers G. J. A., Meulenbelt J., 2003, Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol. Rev.*, 22, 41-51.
- [25]- Meybeck M., 1982, Carbon, nitrogen and phosphorus transport by world rivers. *Amer. J. Sci.*, 282, 401-450.
- [26]- Meybeck M., 1989, The quality of rivers : from pristine stage to global pollution. *Palaeogeogr. Palaeocl.*, 75, 283-309.
- [27]- Oldham R. S., Latham D. M., Hilton-Brown D., Towns M., Cooke A. S., Burn A., 1997, The effect of ammonium nitrate fertiliser on frog (*Rana temporaria*) survival. *Ag. Ecosyst. Environ.*, 61, 69-74.
- [28]- Öztekin N., Said Nutku M., Bedia Erim F., 2002, Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chem.*, 76,103-106.
- [29]- Peterson A., Stoltze S., 1999, Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. *Food Add. Contam.* 16, 291-299.
- [30]- Ramade F., 1998, *Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau*. Ediscience International, Paris, 786 pp.
- [31]- Ramade F., 2005, *Éléments d'écologie : Ecologie appliquée*. 6ème édition, Dunod, Paris, 864
- [32]- Reece P., Hird H., 2000, Modification of the ion exchange HPLC procedure for the detection of nitrate and nitrite in dairy products. *Food Addit. Contam.*, 17, 219-222.
- [33]- Robert J. Magee, Salah A. E. F. Shahine and Cecil L. Wilson, **Chemistry and Materials Science**, 52(2005)1019-1022.

- [34]- Rodier J., Bazin C., Broutin J. C., Chambon P., Champsaur H., Rodi L., 1996, L'analyse de l'eau. 8ème édition, Dunod, Paris, 1383 pp.
- [35]- Ross N. D., Hotchkiss J. H., 1985, determination of nitrate in dried foods by gas chromatography-thermal energy analyser. *J. Assc. Off. Anal. Chem.*, 68, 41-43.
- [36]- Rouse J. D., Bishop C. A., Struger J., 1999, Nitrogen pollution: An assessment of its threat to amphibian survival. *Environ. Health Perspect.*, 107, 799-803.
- [37]- RREDA., 1989, Répertoire sur la réglementation européenne des denrées alimentaires (RREDA). APRIA Diffusion, Tome 1, Paris.
- [38]- Schmidt H. H. H. W., Warner T. D., Nakane M., Forstermann U., Murad F., 1992, Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthase in RAW264.7 macrophage. *Mol. Pharmacol.*, 41, 615-624.
- [39]- Slack P. T., 1987, Analytical methods manual. 2nd edition, British Food Manufacturing Industries Research Association, Leatherhead.
- [40]- Super M., Heese H., MacKenzie D., Dempster W., DuPlessis J., Ferreira J., 1981, An epidemiological study of well water nitrates in a group of South West African/Namibian infants. *Water Res.* 15, 1265-1270.
- [41]- Testud F., 2004, Engrais minéraux. *Toxicol. Pathol.* 1, 21-28.
- [42]- Wagner D. A., Schultz D. S., Deen W. M., Young V. R., Tannenbaum S. R., 1983, Metabolic fate of an oral dose of [15N]-labelled nitrate in humans : effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res.*, 43, 1921-1925.
- [43]- Walker R., 1990, Nitrates, nitrites and N-Nitrosocompounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Add. Cont.*, 7, 717-768.
- [44]- WHO, 1995, Concern for Europe's Tomorrow, Health and the environment in the WHO European region. World Health Organization (WHO), Rapport WHO European Centre for Environment and Health, Stuttgart, 537 pp.
- [45]- WHO, 2003, Nitrate and nitrite in Drinking-water (Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality). World Health Organization (WHO), Rapport WHO/SDE/WSH/04.03/56, 16 pp.
- [46]- W. Yi, S. Yashinoui, K. Yuichi, *Applied Catalysis*, 361 (2009) 123-129.

III- Généralités sur les pesticides :

Les pesticides (insecticides, raticides, fongicides, et herbicides) sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux ou les plantes jugés nuisibles aux plantations. Malheureusement, tous les pesticides épandus ne remplissent pas leur emploi. Une grande partie d'entre eux est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leurs applications, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou des sols sur lesquels ils ont été répandus. Disséminés par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage, ils retombent avec les pluies directement sur les plans d'eau et sur les sols d'où ils sont ensuite drainés jusque dans les milieux aquatiques par les eaux de pluie (ruissellement et infiltration). Les pesticides sont ainsi aujourd'hui à l'origine d'une pollution diffuse qui contamine toutes les eaux continentales : cours d'eau, eaux souterraines et zones littorales.

Les pesticides sont très rarement employés à l'état pur pour des raisons principalement de sécurité [1], mais elles sont sous formes diluées dans des préparations liquides ou sèches. Les différents produits entrant dans ces compositions, sont des adjuvants de formulation [2].

Les pesticides, produits phytosanitaires, se répartissent en plusieurs grandes familles dont les herbicides pour lutter contre les mauvaises herbes, les insecticides contre les insectes, les fongicides contre les champignons. Ces nombreux produits de synthèse sont susceptibles de toucher les cours d'eau et l'eau souterraine des zones de culture intensive où ces produits sont largement utilisés. La quantité de pesticides présents dans l'environnement est donc très difficile à évaluer d'autant plus que les phénomènes de dégradation peuvent donner des sous-produits inconnus, dans certains cas, plus toxiques que le pesticide de départ. Ces dernières années, l'inquiétude grandit en raison des risques possibles que présente la présence de ces pesticides dans l'eau et les aliments [3-5] pour la santé publique et les écosystèmes [6-9]. Dans le présent travail nous nous intéresserons à deux herbicides largement utilisés au Cameroun et au Maroc à savoir le paraquat et le diquat.

III.1. Paraquat

Le paraquat (dichlorure 1,1-diméthyl-4,4-bipyridylum) est un herbicide de contact comportant deux noyaux pyridyle qui est le plus souvent commercialisé sous forme de dichlorure de paraquat. Il est utilisé dans la lutte contre les mauvaises herbes aquatiques, les mauvaises herbes dans les cultures semencières et les vergers, comme dessicant et défoliant pour les fanes de coton, du maïs, du riz et de pomme de terre et comme matériel d'aide à la récolte du soja.

III.1.1. Propriétés physico-chimiques de paraquat

Le paraquat n'a pas de pression de vapeur mesurable et il est très soluble dans l'eau (environ 620 g l⁻¹ à 20°C) [10]. Appliqué sous forme de dichlorure à la surface des plantes, le paraquat fait l'objet d'une photodégradation en dichlorure de 4-carboxyl-1-méthylpyridinium et en chlorhydrate de méthylamine [11].

Il peut aussi subir la dégradation microbienne et, en raison de la présence de l'ion paraquat chargé positivement, il est rapidement et complètement adsorbé sur les particules d'argile dans la couche supérieure du sol [11]. Une fois inactivé par le sol, le paraquat ne disparaît que très lentement et il est peu probable qu'il atteigne la nappe phréatique par lixiviation [12]. Lorsqu'on l'applique dans les systèmes aquatiques, il disparaît rapidement, en l'espace de six à quatorze jours, à cause de son adsorption dans les sédiments et les plantes et de son prélèvement par les plantes [11].

III.1.2. Toxicité de paraquat

Le paraquat est extrêmement toxique vis-à-vis de ceux qui l'utilisent. On compterait, de par le monde, quelques deux mille décès d'utilisateurs par an. Les effets toxiques du paraquat sont principalement dus aux cations et aux anions des halogènes [13]. Une majeure inquiétude est l'ingestion accidentelle et délibérée de l'ingrédient actif trouvé dans l'herbicide, surtout que les petites quantités de paraquat sont fatales. L'exposition à l'ingrédient actif concentré est un problème pendant le mélange et la charge des vaporisateurs. L'empoisonnement tranchant peut résulter au niveau de système respiratoire et affecter le système nerveux et les reins. Il cause beaucoup de cas d'empoisonnement humain, avec le poumon qui est le tissu cible fondamental [14]. La mort est causée généralement par une fibrose pulmonaire évolutionnaire et une prolifération de l'épithélium pulmonaire [15]. Dans les pays en voie de développement, les conditions incontrôlées d'usage d'herbicides rendent l'usage très difficile et par conséquent est à l'origine des problèmes de la santé.

III.2. Diquat

Le Diquat (dibromure 1, 1'-diméthyl-4, 4'-bipyridilium) est un hydrocarbure cyclique, dérivé du pyridilium synthétisé pour la première fois par Budavari en 1996 [16]. Il est exclusivement plus largement utilisé. Il est commercialisé en général sous forme de sel de dibromure ou de dichlorure monohydraté [17]. Il est employé comme agent de dessiccation avant la récolte de diverses cultures semencières, pour le défanage de la pomme de terre et pour la destruction des mauvaises herbes aquatiques.

III.2.1. Propriétés physico-chimiques

Le diquat est une poudre cristalline de couleur jaune pâle stable en conditions neutre et acide [16,18], instable en condition alcaline (hydrolyse) [17]. Il n'est pas volatil et n'a pas de pression de vapeur mesurable [19].

En raison de sa double charge positive, le cation du diquat est solidement adsorbé sur les minéraux argileux négatifs du sol [20]. Par conséquent, il demeure dans les couches supérieures du sol pendant une longue période [21], et il est peu probable qu'il soit lixivié dans la nappe phréatique. Le diquat appliqué comme dés herbant dans les milieux aquatiques disparaît de l'eau après quatre semaines par adsorption sur les plantes et les sédiments [22]. La photodécomposition contribue également à la disparition du diquat dans l'eau [22].

III.2.2. Toxicité de diquat

Le diquat présente une certaine affinité pour le foie et le rein mais une faible affinité pulmonaire [17]. L'ingestion d'une quantité massive de diquat est responsable d'une nécrose généralisée, d'abord digestive puis myocardique, hépatique et rénale [23]. La symptomatologie digestive est au premier plan (douleurs buccales, pharyngées). En 24 heures s'installent une insuffisance circulatoire, une insuffisance rénale aiguë, une hépatite toxique, des troubles de conscience, des convulsions puis un coma et l'intoxiqué décède parfois de troubles du rythme ventriculaire [24]. L'atteinte hépatique est modérée. La fibrose pulmonaire, caractéristique du paraquat n'a pas été décrite [17], probablement par faible affinité du diquat pour le tissu pulmonaire [25]. Le diquat a donc la réputation d'être moins toxique que le paraquat, réputation en partie non justifiée par les six décès sur onze cas publiés [26]. La mortalité est en fait élevée [27] rétro sternale, abdominale avec vomissements abondants et diarrhées souvent hémorragiques.

III.3. Paramètres physicochimiques du paraquat et du diquat

Les concentrations maximales permises par le Règlement sur la qualité de l'eau potable sont présentement de 70 $\mu\text{g l}^{-1}$ pour le diquat et de 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ pour le paraquat. Leurs caractéristiques chimiques sont rassemblées dans le [tableau 1](#):

Tableau 1: Paramètres physicochimiques du paraquat et du diquat.

Paramètres physico-chimiques	Paraquat	Diquat
Masse atomique	257.2	344.07
Température de fusion	175-180°C	180 °C
Température d'ébullition (P= 1 Atm)	>300°C	300°C
Solubilité	620 g l ⁻¹	700 g l ⁻¹
pH	6-7	6-7
Limite de qualité	0.01mg l ⁻¹ [28]	0.07mg l ⁻¹ [29]

IV. Electro-analyse des pesticides :

IV.1. Méthodes d'analyse des résidus de pesticides :

Plusieurs techniques ont été décrites pour la détermination des résidus de pesticides dans l'eau telles que le dosage biologique [11,12], électrophorèse capillaire (CE) [30,31] et la chromatographie liquide à haute performances (HPLC) en utilisant la détection par UV [32,33], immunoassay [34-37], potentiometrie [38,39]. La plupart de ces techniques souffrent soit de l'instabilité du réactif ou de système instrumental, elles exigent un prétraitement étendu des échantillons. Les électrodes modifiées sont en particulier largement utilisées en analyse de traces des polluants chimiques [40-42]. De plus, leur petite taille, leur facilité d'utilisation ou encore la possibilité qu'ils offrent de réaliser des mesures sur site en fait des outils particulièrement intéressants.

IV.2. Méthodes électrochimiques d'analyse des résidus de pesticides :

Actuellement, la majorité des techniques destinées à évaluer la qualité des eaux sont pratiquées au laboratoire et fournissent des informations qualitatives et quantitatives relatives à la composition des échantillons prélevés sur le terrain ainsi que des données écotoxicologiques. Sans remettre en cause l'intérêt de telles techniques, elles n'en demeurent pas moins inadaptées à une surveillance sur site en continu et en temps réel.

La diversité et la sensibilité des analyses exigées actuellement ont contraint l'expérimentateur à utiliser des techniques plus précises et plus performantes, susceptibles de fournir des résultats qualitatifs et quantitatifs dans des milieux complexes, permettant aussi l'investigation de plusieurs composés au cours d'une même opération. Les méthodes électrochimiques répondent généralement à ces critères tout en offrant d'autres avantages à savoir une excellente précision et une manipulation aisée et rapide.

Les électrodes chimiquement modifiées apparaissent justement comme des instruments capables de répondre à ces exigences. D'une manière générale, leur utilisation est simple et elles peuvent facilement être employées, *in situ*, pour des mesures en temps réel.

Les travaux récents, rapportés dans la littérature, ont montré des méthodologies analytiques qui emploient des microélectrodes (ME) à plusieurs applications comme électrode de travail [41-47]. Leur application et construction a été augmentée intensivement, année après année. Le nombre de travaux concernant la construction, caractérisation et application des ME est considérable dans la dernière décennie [48-54]

Electrochimiquement, les pesticides ont été analysés dans les surfaces des électrodes différentes, on peut citer les métaux nobles [45], mercure [55] et d'électrodes chimiquement modifiées [56,57].

Les pesticides ont fait l'objet de très nombreuses études afin de mettre au point des électrodes modifiées à partir de technologies différentes [58]. Souza et *al.* proposent, par exemple, une microélectrode d'or pour la détection du paraquat [47]. L'électrode à pâte de carbone modifiée par la résine d'Amberlite XAD-2 a été développée pour la détermination du paraquat par voltamétrie à redissolution cathodique [59]. Cependant, la limite de détection (0.10 mg par ml) trouvée par cette méthode n'était pas très satisfaisante. De plus, les surfactants qui sont des formulants du paraquat, ont fortement perturbé cette méthode. Récemment, l'électrode du carbone vitreux modifiée par l'argile a prouvé une grande activité pour la détermination du paraquat avec une détection limite d'environ 5×10^{-10} mol l⁻¹ [60]. La voltamétrie couplée à la spectroscopie de résonance paramagnétique d'électron (RPE) [61] a été développée pour déterminer le cyanoparaquat dans le carbonate du propylène.

Le paraquat est parfois détecté dans son état cationique, sur des électrodes à pâte de carbone modifiées par les zéolites et aussi sur des électrodes de carbone vitreux, en utilisant les méthodes électrochimiques, en l'occurrence, la voltamétrie cyclique, la chronoampérométrie, la voltamétrie à onde carré et la chronocoulométrie [62,63]. Il a été observé que le produit neutre obtenu par la réduction de paraquat, forme un dépôt insoluble sur la surface de l'électrode.

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 [64,65].

V- Généralités sur les argiles et les phosphates naturels :

V.1 Les Argiles :

V.1.1 Définition de l'argile :

L'argile désigne tout matériau naturel composé des grains fins, qui passe à l'état plastique en présence de teneurs en eau appropriées et durcit par séchage ou par chauffage, la plasticité étant l'aptitude du matériau à acquérir et conserver toute forme possible au façonnage. Les applications scientifiques et technologiques des argiles sont très nombreuses et dépendent pour la plupart non seulement de la structure et des propriétés spécifiques de l'espèce argileuse considérée mais aussi et souvent de sa minéralogie locale c'est-à-dire des minéraux ou impuretés qui lui sont associées et susceptibles de modifier certaines de ses propriétés. Or pour un même type d'argile, les impuretés varient d'une région du globe à l'autre, il s'en suit que les traitements que doit subir le matériau argileux pour la même application varieront également.

Ces observations nous ont amené à entreprendre une étude des matériaux argileux camerounais, en vue de leur éventuelle utilisation scientifique ou technologique.

V.1.2 Utilisation des argiles

Les argiles sont utilisées par l'homme depuis la nuit des temps [44]. Leur emploi, par exemple pour la fabrication de briques de terre crue, de pisé, de tablettes d'argile ou de récipient a contribué au même titre que l'agriculture au développement des premières civilisations. Aujourd'hui elles sont employées aussi bien comme constituant mineur (Peintures, matières plastiques, cosmétiques, produits pharmaceutique, adsorbant, catalyseur, etc) que comme matière première majoritaire, par exemple pour la production de matériaux céramiques de grande diffusion. Alors que la consommation de ces produits tend à se généraliser, leur production reste très peu développée dans certains pays en voie de développement. Un certain nombre de travaux ont déjà été effectués sur des matériaux argileux camerounais à base de kaolinite, d'illite, de palygorskite, de smectite, ou de talc. Ils ont concerné l'étude des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés catalytiques. [67,68].

V.2 Les phosphates naturels (PN) :

VI.2.1 Introduction

Le sous sol marocain recèle une richesse importante en phosphate sédimentaire qui classe le Maroc dans les premiers rangs du marché des phosphates et ses dérivés.

Le phosphate naturel désigne le produit issu de l'exploitation et du traitement métallurgique ultérieur des minerais contenant du phosphore. En plus du minéral principal

contenant du phosphore, les gisements de PN contiennent également des minéraux accessoires ou des impuretés de gangue.

Les phosphates naturels sédimentaires sont composés principalement d'apatites. Ces apatites montrent une substitution isomorphe étendue dans le réseau cristallin. Ainsi, elles présentent une grande variation dans leur composition chimique et montrent en conséquence un large éventail de propriétés. Dans les dépôts sédimentaires, les principaux minéraux phosphatés sont des francolites (fluoroapatites microcristallines carbonatées), qui sont en association avec une grande variété de minéraux accessoires et d'impuretés.

Le travail que nous allons présenter rentre dans le cadre de la valorisation du phosphate naturel marocain pour le développement d'une nouvelle utilisation en tant que Capteurs/adsorbant pour la dépollution des eaux usées. De ce fait le développement de procédés permettant l'élimination des métaux toxiques ou nuisibles aux écosystèmes, est l'une aussi des priorités de la recherche actuelle.

V.2.2 Utilisation des phosphates naturels.

En raison de leur composition chimique extrêmement variable et complexe, les PN sont des sources d'éléments nutritifs autres que le phosphore. Ils sont habituellement appliqués pour compléter le niveau du statut phosphaté du sol, mais leur dissolution fournit également d'autres éléments nutritifs présents dans le Phosphate naturel. Les PN jouent un rôle important en contribuant à améliorer la fertilité du sol et le contrôle de la dégradation du sol, en particulier, pour éviter la surexploitation des éléments nutritifs (épuisement). Les phosphates naturels sont la source commerciale de phosphore utilisée comme matière pour la fabrication des engrais phosphatés et de certains produits chimiques. Ils sont utilisés dans la catalyse hétérogène, ils sont aussi utilisés dans la protection de l'environnement tel que l'élimination des métaux lourds des eaux polluées etc...

VI- Mode de détection et de conversion des substances chimiques par voie électrochimique.

VI.1 Généralités sur les électrodes modifiées.

Les travaux effectués ces dernières années se situent essentiellement à l'interface entre la chimie et la physique. Ils ont pour but de structurer et de fonctionnaliser la surface d'une électrode afin de lui conférer des propriétés nouvelles, absentes d'une électrode nue, qui permettent ensuite une application entre autres dans le domaine de l'analyse chimique. Ceci a permis de créer de véritables architectures supramoléculaires à la surface d'une électrode, avec une grande variété de constituants, allant de simples molécules ou particules inorganiques jusqu'à des molécules complexes.

Un des objectifs essentiels des électrochimistes est le contrôle de la réactivité de l'interface électrode-solution. L'application d'un potentiel permet de faire varier le niveau énergétique de l'interface mais généralement sans contrôle de sélectivité. De façon à imposer et à contrôler les propriétés de l'interface, de nombreux chercheurs de plusieurs disciplines ont modifié la surface d'électrodes par toutes sortes de composés organiques ou organométalliques [69-72]. Depuis l'électropolymerisation du pyrrole par Diaz et ses collaborateurs [73], les électrodes modifiées ont été essayées dans des domaines d'applications divers : photosensibilisation, électrochromisme, anti-corrosion [74], batterie et accumulateur de faible poids, et également électrocatalyse [75,76]. Ces recherches permettent l'étude des réactions de transfert de matière aux interfaces solide/solution et le développement de méthodologies électro-analytiques permettant de caractériser et d'exploiter les propriétés des matériaux inorganiques tels que les zéolithes, apatite, les silices, et d'autres solides apparentés.

Les objectifs principaux de ces recherches sont, d'une part, de contribuer à une meilleure compréhension des réactions de transfert de matière dans l'environnement et, d'autre part, de proposer de nouveaux moyens d'investigation, de contrôle, de mesure, et de remédiation des milieux liquides et des interfaces solide/ solution faisant intervenir des solutés toxiques (notamment des espèces métalliques). L'accroissement des connaissances dans ce domaine nécessite des efforts de recherche privilégiant à la fois le développement des nouvelles méthodologies permettant l'analyse de ces phénomènes dans des conditions *in situ*, la mise au point de capteurs permettant l'étude de la spéciation et l'analyse de traces, ainsi que l'émergence de nouveaux procédés de dépollution à la surface d'un électrocatalyseur.

Le contrôle des propriétés physico-chimiques de l'interface électrode/électrolyte vise essentiellement à élargir le champ d'application des électrodes à l'étude de molécules peu ou non réactives (électrocatalyse), afin d'améliorer, voire de contrôler la réactivité, d'accroître la sensibilité des mesures et la sélectivité d'une réaction électrochimique. Ce contrôle est en particulier rendu possible par la modification de la surface de l'électrode. L'électrode ainsi modifiée acquiert les propriétés chimiques et électrochimiques du système modifié.

Le terme général d'électrode chimiquement modifiée [77] désigne toute électrode à la surface de laquelle une espèce chimique aux propriétés spécifiques (groupe rédox, catalyseur, complexant, adsorbant,...) a été délibérément fixée. Les premiers dans ce domaine ont été Lane et Hubbard [78] qui, en 1973, ont démontré l'influence importante de la modification d'électrodes de platine, par adsorption de dérivés éthyléniques, sur la cinétique de réaction électrochimiques. A la suite de ces premiers travaux, les méthodes qui ont été d'abord développées pour préparer des électrodes modifiées chimiquement ont fait appel à

l'adsorption ou à la fixation covalente (greffage) de molécules simples, conduisant à la modification de la surface de l'électrode par une monocouche de réactif [79,80]. Cependant, la technique de modification d'électrodes qui a été la plus développée est celle basée sur le dépôt de multicouches de réactif, opération généralement réalisée par l'adsorption de film de polymères à la surface de l'électrode, qui permet d'obtenir de véritables matériaux moléculaires d'électrode de structure tridimensionnelle [81,82].

Un des avantages de ces systèmes est qu'ils nécessitent l'utilisation d'une quantité minimum de réactifs, souvent coûteux, pour réaliser des analyses. Un autre avantage est la sélectivité des électrodes chimiquement modifiées. En effet, par un choix judicieux du réactif immobilisé, il est possible de contrôler la sélectivité de l'analyse. De plus ces électrodes permettent d'augmenter la sensibilité grâce à l'étape de préconcentration. Pendant cette étape d'accumulation, l'espèce cible est préconcentrée dans un petit volume à la surface de l'électrode, ce qui permet de mesurer de très faibles concentrations. L'étape de préconcentration est aussi une étape de séparation, extrayant l'espèce cible du milieu. Elle présente l'avantage d'être réalisée en circuit ouvert.

Il faut toutefois noter que pendant l'analyse voltamétrique l'espèce cible peut ne pas être redissoute dans la solution d'analyse et l'électrode modifiée doit alors être régénérée chimiquement afin d'être de nouveau utilisable ; de cette façon, elles permettent de contrôler la sélectivité, d'augmenter la sensibilité et leur méthode de préparation va influencer la stabilité du système.

Dans ce contexte, les électrodes chimiquement modifiées sont une voie prometteuse pour l'analyse de traces des polluants par différentes méthodes électrochimiques : voltamétrie cyclique, voltamétrie à impulsion différentielle, voltamétrie à onde carré chronoampérométrie, chronopotentiométrie, etc....

Il existe deux procédures importantes de modification des électrodes que nous allons décrire brièvement.

VI.1.1 Modification de la surface des électrodes solides.

Cette procédure a été adoptée par plusieurs auteurs pour la détection des micropolluants organiques et inorganiques.

VI.1.1.1. Modification covalente

La modification covalente implique des liaisons covalentes entre la surface de l'électrode et le modificateur pour former une monocouche. On peut citer le travail de J.

Schreurs et *al.* [83] qui ont étudié la liaison de l'ion cobalt (Co^{2+}) par une fonction amide à la surface d'une électrode de carbone vitreux.

VI.1.1.2. Modification par adsorption

Cette stratégie a été adoptée par plusieurs auteurs [84-88]. Les métaux tels que le platine, l'or, l'argent et l'acier sont depuis longtemps utilisés en raison de leurs excellentes propriétés électriques et mécaniques. Ces électrodes sont très sensibles à des phénomènes d'adsorption.

Le phénomène d'adsorption à la surface des solides peut se mettre en évidence de façon la plus directe en enfermant dans une enceinte une certaine quantité d'adsorbat mise en présence d'un solide. L'expérience montre que dans, certains cas, la concentration du substrat diminue, ce que l'on ne peut expliquer que par une fixation des molécules du substrat à la surface du solide en excluant leur dissolution dans la masse du solide qui est exceptionnelle. Le même phénomène d'adsorption peut aussi s'observer lorsqu'on met au contact d'un solide un gaz dont on suit la variation de la pression.

On a progressivement été amené à distinguer deux grands types d'adsorption : l'adsorption physique et l'adsorption chimique ou encore la physisorption et chimisorption respectivement. Les différences entre elles sont celles qui existent entre transformations physiques et transformations chimiques, c'est-à-dire entre celles qui supposent la mise en jeu d'interactions moléculaires du types Van Der Waals, donc peu énergétiques, et celles qui supposent la mise en jeu de liaisons beaucoup plus solides et plus spécifiques dites liaisons chimiques.

L'adsorption repose sur un échange électronique entre la surface et les espèces de la solution, elle dépend donc des caractéristiques des deux éléments et notamment de leurs états énergétiques respectifs.

D'un point de vue électrochimique, nous devons considérer que le processus à l'électrode englobe les molécules, atomes, ions et radicaux intermédiaires de réaction, qui sont susceptibles de s'adsorber. Cette hétérogénéité se traduit par l'existence d'une double couche dont les caractéristiques sont modifiées lors de l'adsorption qui sera alors physique ou chimique.

a. Adsorption physique

Aucune liaison chimique n'est formée entre le substrat et l'électrolyte, leurs nuages électroniques demeurent séparés mais ils subissent une déformation. La forme la plus simple de l'adsorption physique est électrostatique : liaison d'un ion avec une charge de surface. Les molécules neutres peuvent aussi être sujettes à une adsorption physique par l'intermédiaire des forces de Van Der Waals. Ainsi, les charges électriques libres et les dipôles induits ou

permanents participent à la mise en place de la physisorption : ceci implique que le champ électrique de la couche d'adsorption et donc le potentiel de l'électrode l'influence directement.

b. Adsorption Chimique

Elle est engendrée par des forces beaucoup plus intenses que celles rencontrées dans la physisorption. Il y'a formation d'une liaison de coordination entre un atome polaire de la molécule et un atome du métal.

L'adsorption d'une molécule ne met pas en jeu des énergies suffisantes pour la dissocier, elle se situe alors à environ 6-8 Å de la surface. L'adsorption chimique est cinétiquement plus lente que l'adsorption physique.

VI.1.1.3 Modification par film polymérique ou modification multicouches.

Une première étude décrivant la préparation électrochimique d'un film conducteur de polypyrrole a été publiée en 1968 [89]. En 1979, Diaz et ses collaborateurs [73] décrivent une électropolymerisation du pyrrole dans l'acétonitrile. Puis, d'autres polymères ont pu être obtenus par voie électrochimique : polyzulène, polythiophène, polyindole [90], polycarbazole [91], polyfluorènes [92].

Les premières électrodes modifiées par des complexes possédant un groupement électropolymérisable a été décrites par Meyer et ses collaborateurs [93].

Différents complexes de fer, de ruthénium et d'osmium ont été électropolymérisés à la surface d'une électrode de platine et de carbone vitreux. D'autres électropolymérisations ont été publiées concernant des complexes à ligands polypyridines [94-96] et porphyrines [97,98].

La modification d'une surface d'or par des polymères a suscité beaucoup d'intérêt depuis la première publication de Nuzzo et *al.* [99]. Elle apparaît comme une bonne approche pour l'accumulation des espèces cibles par complexation. En effet, elle permet d'immobiliser une grande quantité de ligands à la surface d'électrode, donc d'accumuler une plus grande quantité d'analyte et d'obtenir ainsi une sensibilité plus élevée. Wallace et *al.* [100] ont étudié en 1986 une électrode modifiée par un polypyrrole fonctionnalisé par le dithiocarbamate pour la détection de cuivre.

La modification d'une électrode solide par un film de polymère permet de former des multicouches d'espèces actives à sa surface. Typiquement, les polymères utilisés pour la modification chimique d'électrode ont un groupement électrochimiquement ou chimiquement actif, comme par exemple des sites redox ou chélateurs [101,102].

Un des axes majeurs des méthodes électrochimiques est le développement des électrodes modifiées dans des études antérieures d'électrodeposition des métaux nobles (Ag,

Au, Pt, Pd...) [103-105]. Il a été trouvé que le métal noble déposé offre une grande activité catalytique pour plusieurs réactions de réduction et d'oxydation.

L'état très dispersé du métal noble sur la surface de substrat, et la surface de substrat était prouvé pour être plus actif que les électrodes du métal. Viltscinka et *al.* ont été les premiers à modifier l'électrode de graphite par un film d'or afin de déterminer le mercure en utilisant la voltamétrie linéaire par redissolution anodique [106]. Le même film a été utilisé pour la détermination de l'arsenic en modifiant différentes électrodes comme le carbone vitreux et l'électrode de platine [107,108].

Svancara et *al.* ont utilisé l'électrode à pâte de carbone modifiée par un film de mercure pour la détermination de Zn(II) dans l'eau potable en utilisant la voltamétrie pulsionnelle différentielle par redissolution anodique [109].

Un des grands progrès dans l'électrochimie réside dans l'utilisation des électrodes chimiquement modifiées en vue d'éliminer certains polluants organiques et/ou inorganiques. Les méthodes chimiques et photochimiques ont été remplacées par des électrodes modifiées par des oxydes [110-113] ou par des électrodes de diamant dopé au bore [114-117].

En fait, la conversion et/ou l'incinération d'une variété large de composés aromatiques peut avoir lieu à la surface de la matière des électrodes avec une efficacité satisfaisante. Dans le processus de la conversion, les composés aromatiques sont seulement transformés en composés biocompatibles pour permettre leur élimination supplémentaire par les traitements biologiques. Selon la matière de l'électrode, le mécanisme d'oxydation se fait à travers l'introduction préliminaire d'oxygène dans le réseau d'oxyde et qui en résulte un changement d'état d'oxydation du métal. Ce mécanisme a lieu dans le cas par exemple des électrodes à base d'(IrO_2 et RuO_2 , SnO_2 , PbO_2) [111,118-122].

VI.1.2. Modification directe : les électrodes à pâte de carbone

Les électrodes à pâte de carbone (EPC) sont un exemple d'électrodes composites, fabriquées à partir d'une mixture de plusieurs composés. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Adams en 1958 [123]. Les EPCs sont préparées en mélangeant de la poudre de carbone avec un liant adapté comme la paraffine liquide ou la graisse de silicone. La pâte mixée est en suite mise en forme dans un corps d'électrode, comme une seringue en plastique ou un tube de verre. Une électrode à pâte de carbone chimiquement modifiée (EPCCM) est obtenue par ajout d'un réactif chimique à la mixture [124,125] la surface d'une telle électrode peut être renouvelée par essaiage léger.

Plusieurs modes de modification de l'électrode ont été utilisés, pour la détermination d'ions ou de molécules organiques et bio-organiques : introduction dans la pâte d'un adsorbant tel que les polymères [126,127] et la silice [128], dissolution directe de molécules complexantes [129] dans le liant ou fixation de ces molécules sur un solide...

En 1964 Kuwana *et al.* [130,131] ont modifié l'électrode à pâte de carbone par dissolution de composés organiques électroactifs tels que l'antraquinone ou les 5-aminobenzophénone dans le liant. Ces auteurs ont montré que l'électrode à pâte de carbone contenant un constituant autre que le liant, peut avoir un comportement distinct, lui permettant d'améliorer ses performances. Cette méthode a beaucoup contribué au développement de cette électrode, principalement en électroanalyses [132,133]. En fonction de l'électrolyte support, l'électrode à pâte de carbone peut être utilisée dans un large domaine de potentiels, -1.4 V/ECS à +1.3 V/ECS et même atteindre un potentiel de +1.7V/ECS selon Lindquist [134].

La réponse de l'électrode dépend de la quantité et la nature de modificateur, de l'électrolyte et éventuellement de temps de préconcentration et de la concentration de la solution à analyser. La fixation de l'espèce cible en solution à la surface de modificateur introduit dans la pâte atteint l'équilibre au bout d'une durée fixe et implique une saturation de l'électrode. La réponse de l'électrode est invariable après cet équilibre.

Deux types d'électrodes doivent être envisagés selon le liant assurant la cohésion de la pâte est conducteur ou non conducteur.

VI.1.2.1. Electrodes à pâte de carbone à liant non conducteur

Les liants utilisés sont généralement les huiles de paraffine ou de silane, le nujol, bromoforme ou le bromonaphtalène. La vitesse de transfert des électrons diminue avec l'addition du liant [135]. Le rapport liant-carbone est déterminé selon la consistance et les propriétés désirées de la pâte. Généralement ces rapports sont de 18ml de paraffine pour 5g de carbone ou 2ml de nujol pour 1g de carbone. Dans le cas de ces électrodes, seule la fraction de composé électroactifs se trouvant à l'interface pâte de carbone-électrolyte externe participe aux transferts de charges.

Depuis 1975, les électrodes à pâte de carbone à liant non conducteur modifiées ont trouvé un grand nombre d'applications en électroanalyses des solutions [136]. Yao *et al.* [137] ont appliqué la méthode décrite par Kuwana [125] en dissolvant directement dans le liant, paraffine, un aldéhyde afin de fixer l'espèce électroactive à analyser. Cette modification de l'électrode permet l'amélioration de sa performance par une augmentation de sa sensibilité et de sa sélectivité ou par protection de sa surface de réaction non désirée.

VI.1.2.2. Electrode à pâte de carbone à liant conducteur

Dans ces électrodes, le liant conducteur peut être identique à l'électrolyte ou de nature différente. Contrairement aux électrodes à pâte de carbone à liant non conducteur, celles à liant conducteur fournissent des courbes volta-amperométriques présentant uniquement des pics attribuables, soit à des réductions, soit à des oxydations, se produisant à des potentiels bien déterminés et très reproductibles. Il convient de souligner que, quel que soit le mécanisme envisagé, les différents auteurs s'accordent pour reconnaître que la transformation électrochimique des solides incorporés dans ce type d'électrode peut être totale si les quantités de solide ne sont pas trop importantes et si les vitesses de balayage sont suffisamment faibles. Il ne s'agit donc plus de réaction superficielle, se produisant uniquement à l'interface de l'électrolyte à pâte de carbone, comme dans les électrodes à liant non conducteur avec un échange électronique s'opérant au sein de la masse de la pâte de carbone. De ce fait les quantités d'électricité mises en jeu sont beaucoup plus grandes et on observe des quantités de courants d'oxydation ou de réduction plus importantes.

VI. Capteurs électrochimiques pour l'électro-analyse des nitrates et herbicides dans le lait –Région Tadla Azilal.

Dans ce travail, nous proposons de tester l'efficacité et la sensibilité d'un capteur électrochimique, conçu et développé par l'Equipe d'Electrochimie Moléculaire et Matériaux Inorganiques de la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal, à l'analyse des traces de nitrate et herbicides dans le lait collecté dans la Région Tadla Azilal. Le principe et la nature du capteur fait l'objet d'un brevet international en cours (*Ref. EMMI. Capt. 23. 547F*).

1. Capteurs électrochimiques :

Un capteur est un dispositif électronique qui sert à transformer une grandeur physique, chimique, biologique (mesurande) en un signal électrique exploitable, généralement une tension ou un courant (Fig. 1).

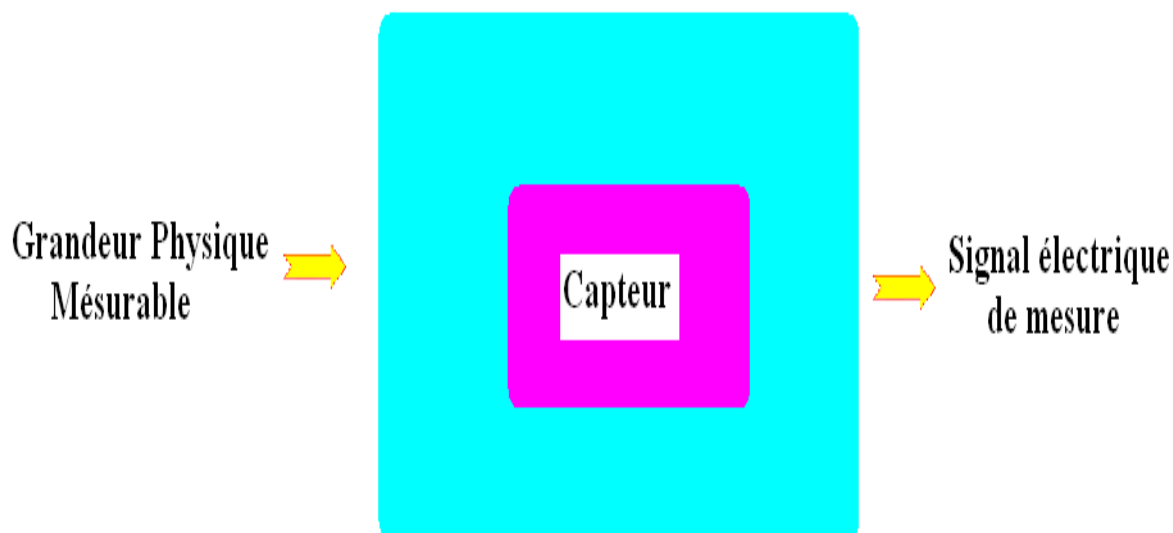


Figure 1. Principe d'un capteur

1. a. Constitution d'un capteur :

Les parties constitutives d'un capteur sont les suivantes (Fig. 2):

- Corps d'épreuve: est un élément physique ou chimique qui réagit sélectivement à la grandeur à mesurer. Il a pour rôle de transformer la grandeur physique mesurable.
- Élément transducteur: est un élément sensible lié au corps d'épreuve. Il traduit les réactions du corps d'épreuve en une grandeur le plus souvent électrique constituant le signal de sortie.
- Module électronique de conditionnement : C'est un dispositif qui convertit le signal de sortie du capteur en un signal de mesure standard. Il fait le lien entre le capteur et le système de contrôle commande. Il a pour rôle d'amplifier et de faire le traitement du signal électrique.

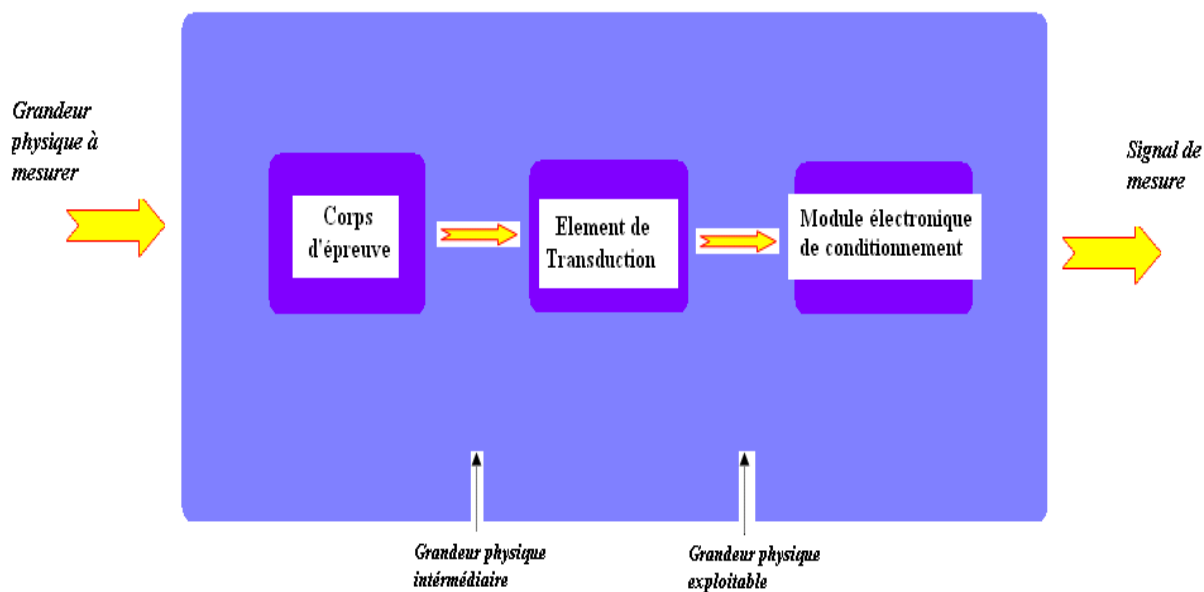


Figure 2. Structure d'un capteur

2. Capteur à nitrate :

Le capteur à nitrate est basé sur la réaction de réduction du nitrate (Fig. 3). Le courant électrique correspondant à la réaction est proportionnel à la concentration du nitrate.

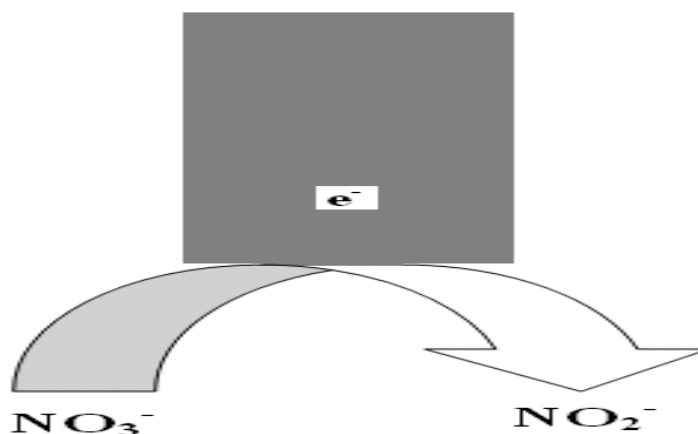
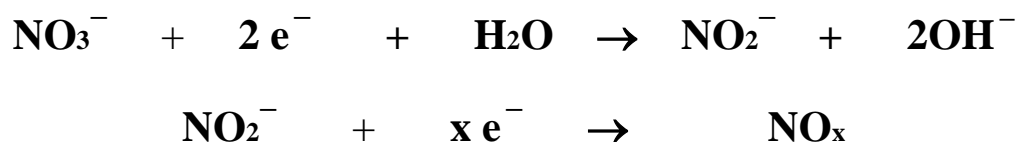


Figure 3. Principe de fonctionnement du capteur à nitrate

Les réactions électrochimiques qui ont lieu à la surface de l'électrode de travail du capteur sont :



Le capteur comprend trois électrodes:

- Electrode de travail : électrode à base d'argile traité et dopé par un catalyseur, elle sert d'échanger les électrons avec l'analyte (nitrate ou nitrite) ;
- Electrode de référence : Ag-AgCl
- Contre électrode : plaque de platine

L'électrolyte support est une solution d'acide perchlorate (0.1M)

3. Application analytique du capteur EMMI. Capt. :

Pour évaluer les performances de notre capteur, nous avons opté pour l'analyse des nitrates et quelques herbicides dans le lait collecté dans la région de Tadla Azilal.

Dans cette région à vocation agricole, l'agriculture contribue à la pollution des nappes à cause de l'utilisation, parfois irrationnelle, des engrais et des pesticides que les agriculteurs utilisent afin d'augmenter la productivité de la parcelle. Ces additifs auront sûrement un impact négatif sur la qualité du lait.

3.1 Collecte de lait dans la Région Tadla Azilal :

Le périmètre du Tadla, situé à 200 km au sud-est de Casablanca, couvre une superficie de 100 000 ha, et se trouve à une altitude d'environ 400m, gérés par l'Office régional de mise en valeur du Tadla (ORMVAT). Ce périmètre est alimenté par des ressources en eau de surface, mais les prélèvements en nappe ont connu un développement individuel massif depuis les années 1980 suite à des épisodes de sécheresse répétés. Si les techniques d'irrigation restent essentiellement gravitaires, au moins sur les exploitations familiales dont la taille varie entre 1 et 20 hectares, l'utilisation conjuguée des eaux de surface et des eaux souterraines s'est progressivement généralisée sur le périmètre pour combler les déficits de l'offre de l'Ormvat face à un accroissement de la demande en eau.

Au Nord, la plaine de Tadla est limitée par le plateau des phosphates, et au Sud par la chaîne de l'atlas. Elle se rétrécit à l'Est entre le plateau d'Oued Zem et la retombée atlasique. Sa limite régionale est constituée par le cours d'Oued Abid à l'Ouest. Oum Rabiaa, l'un des plus importants du royaume partage la plaine en deux régions hydrauliques distinctes : les Béni Moussa sur la rive gauche et les Béni Amir sur la celle droite.

La libéralisation des assolements à partir de 1996 s'est traduite par un accroissement de la gamme des productions pratiquées sur le périmètre. Les cultures fourragères, essentiellement de la luzerne complétée récemment par du bersim et du maïs ensilage (3 000 ha en 2005), occupent une place croissante avec l'implantation locale d'une laiterie industrielle ; 17 000 exploitations se sont ainsi orientées vers une production mixte lait-viande basée sur un troupeau de 55 000 vaches laitières ; 65 % des 175 millions de litres de lait produits sont livrés à la laiterie. La productivité moyenne par vache est relativement faible (3 000 l par an) si l'on considère que 28 % des animaux sont de race pure et 60 % de type croisé (source Ormvat). Face à la multiplicité des éleveurs individuels, l'industriel a suscité la mise en place de coopératives de collecte, au nombre de 82 sur le périmètre. Ces coopératives possèdent un à plusieurs centres de collecte Face à la multiplicité des éleveurs individuels, l'industriel a suscité la mise en place de coopératives de collecte, au nombre de 82 sur le périmètre. Ces coopératives possèdent un à plusieurs centres de collecte où les éleveurs livrent leur lait (Fig. 4).

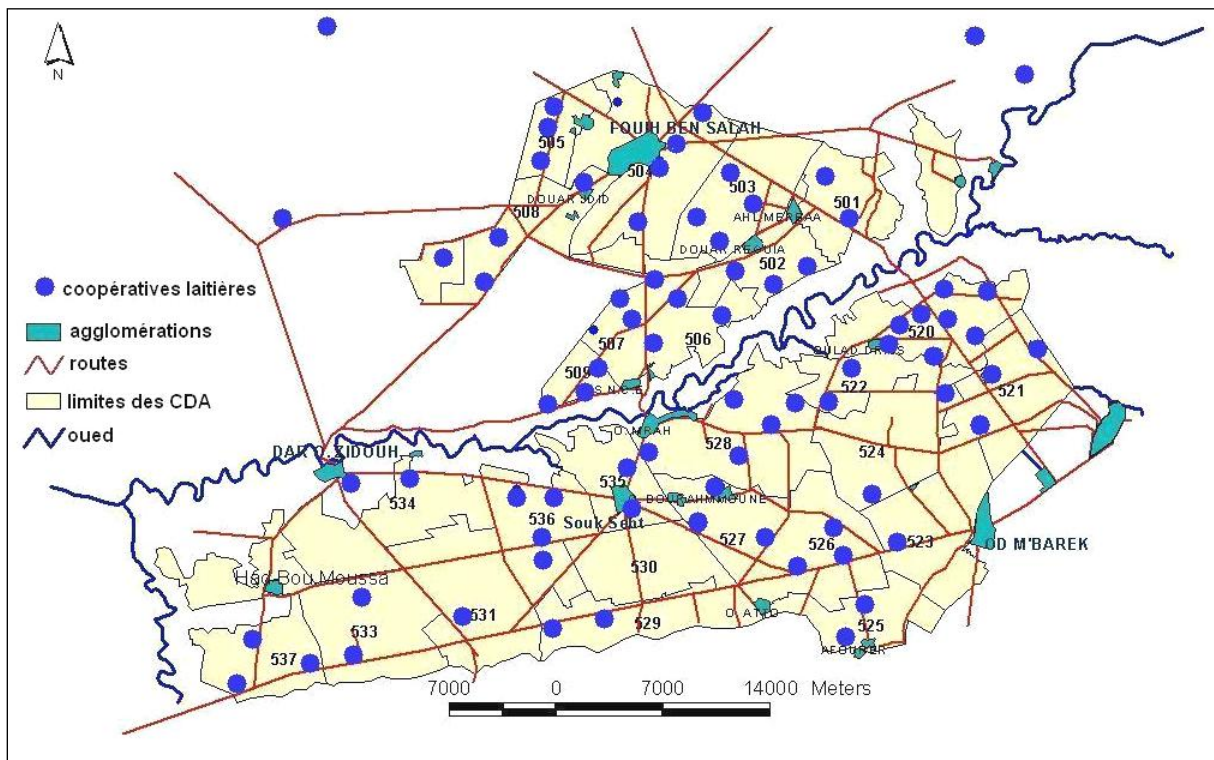


Figure 4. Différents endroits de collecte du lait. Région Tadla Azilal.

Les échantillons analysés proviennent de différents endroits de la région, et sont utilisés sans aucun prétraitement.

4. Partie expérimentale :

a)- Réactifs :

La solution électrolytique a été maintenue pendant 20 s à circuit ouvert et désoxygéné par barbotage de l'azote gazeux pur avant chaque mesure électrochimique afin d'éliminer l'oxyde formé avec de l'air. Toutes les solutions ont été préparées par l'eau déminéralisée de haute pureté et toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante.

Les échantillons de lait de vache cru ont été recueillis à partir des centres de collecte de lait, dans la région de Tadla-Azilal, (18 sites coopératives) au cours des périodes entre la fin d'Avril et Juin, ces échantillons ont été prélevés en début de matinée. 100ml de chaque échantillon de lait cru a été pris à partir des réservoirs refroidis, dans des flacons stériles et ont été immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire.

b)- Préparation de l'électrode :

Les électrodes modifiées ont été préparées en mélangeant une poudre de carbone et le kaolin avec du sulfate de potassium. Le corps de l'électrode de travail était un cylindre en PTFE qui a été serrés avec de la pâte de carbone. La zone géométrique de cette électrode est de 0,15 cm².

c)- Appareillages :

Les expériences électrochimiques ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat voltalab (model PGSTAT 100, Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) contrôlé par un logiciel voltalab Master 4. Un système conventionnel de trois électrodes a été utilisé, l'électrode à pâte de carbone a été utilisée comme électrode de travail. La contre électrode est une plaque de platine et l'électrode au calomel comme électrode de référence. Le pH mètre (Radiometer Copenhagen, PHM210, Tacussel, French) est utilisé pour ajuster les valeurs du pH.

d)- Procédure :

Les conditions optimales sont établies en suivant la variation de l'intensité maximale de courant de pics en fonction de la variation des paramètres physico-chimiques à savoir le temps de préconcentration et la teneur d'électrode de travail en catalyseur. Après optimisation des paramètres physico-chimiques, les courbes de calibration ont été obtenues en variant la concentration de l'analyte (nitrate). Toutes les expériences ont été emportées sous la température ambiante.

L'étude du comportement électrochimique des polluants (nitrate) est réalisé à la surface de l'électrode de travail en utilisant la voltamétrie à ondes carrées (Square Wave Voltammetry ou encore SQW) et la voltamétrie linéaire dans la gamme de potentiel de 0 à -1.5. L'électrode à pâte de carbone modifié a été immergée dans une cellule contenant 20 ml de l'échantillon de lait pour obtenir le dépôt chimique. En attendant, la solution a été agitée par un barreau aimanté de 1,6 cm (rotation de 600 rpm) à circuit ouvert. Après une étape de préconcentration, l'électrode a été retirée de la cellule de préconcentration est introduite dans une cellule contenant l'électrolyte support.

5. Résultats et discussion pour l'électro-analyse des nitrates:

a)- Caractérisation voltamétrique préliminaire :

La figure 5 montre un voltammogramme linéaire entre -1,4 et 0V pour l'électrode à pâte de carbone modifiée à différentes vitesses de balayage, 50, 200 et 500mV/S obtenue après une exposition à $4,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l d'une solution de nitrate de sodium sous agitation.

Deux ondes associés à la réduction des nitrates ou des intermédiaires, une inflexion (C1) à environ -0,2 V et un pic distinct (C2) à environ -0,72 V, le premier pic C1 est due à la réduction des nitrates (NO_3^-) en (NO_2^-) selon la réaction suivante[10] :

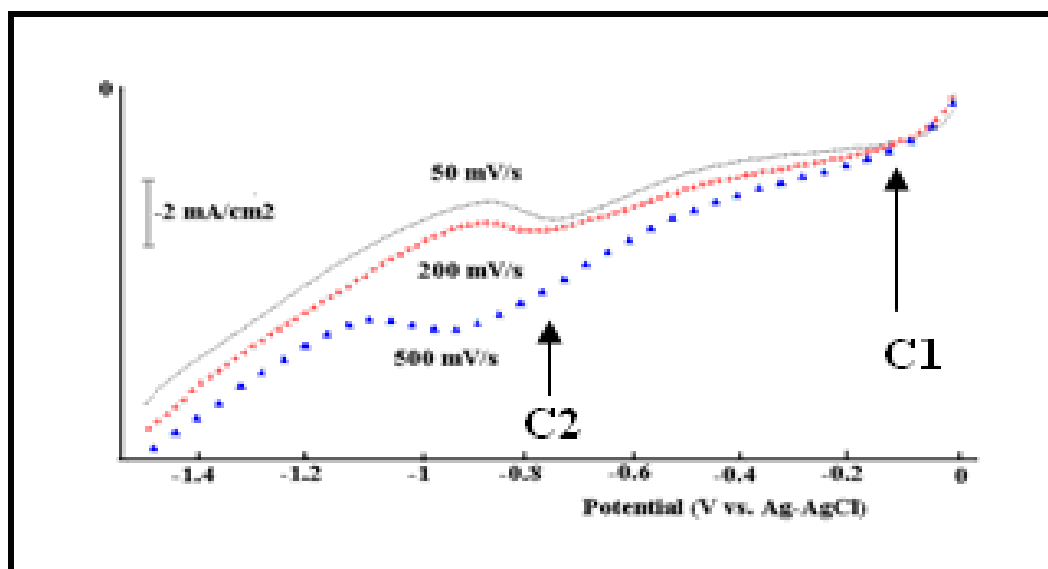
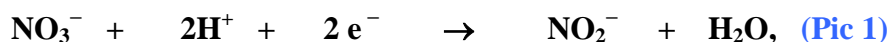
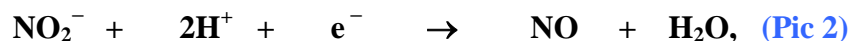


Figure 5. Voltammogramme linéaire enregistré pour l'électrode préparée , en présence des ions nitrates. Effet de la vitesse de balayage.

La deuxième onde (C2) correspondant à la réduction de nitrite de NO par la réaction suivante :



Le même comportement est enregistré par voltamétrie à onde carrée, pour la solution de nitrate de sodium (figure 6). Nous observons clairement la diminution de la réduction des pics en fonction de la concentration de NO_3^- .

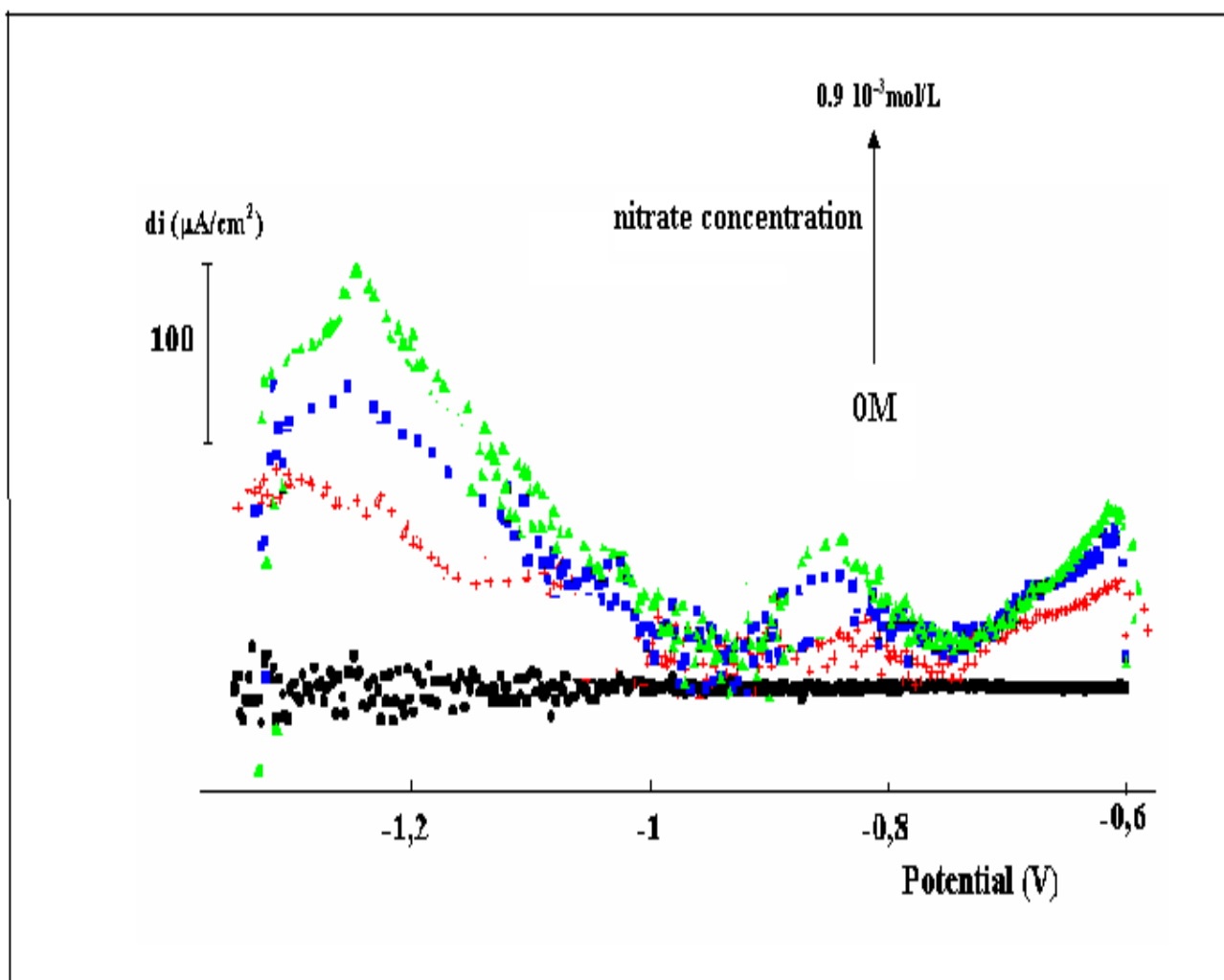
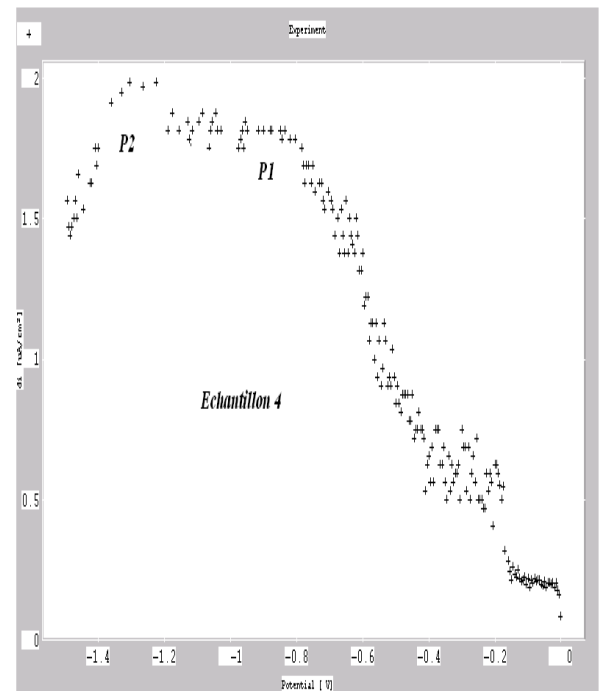
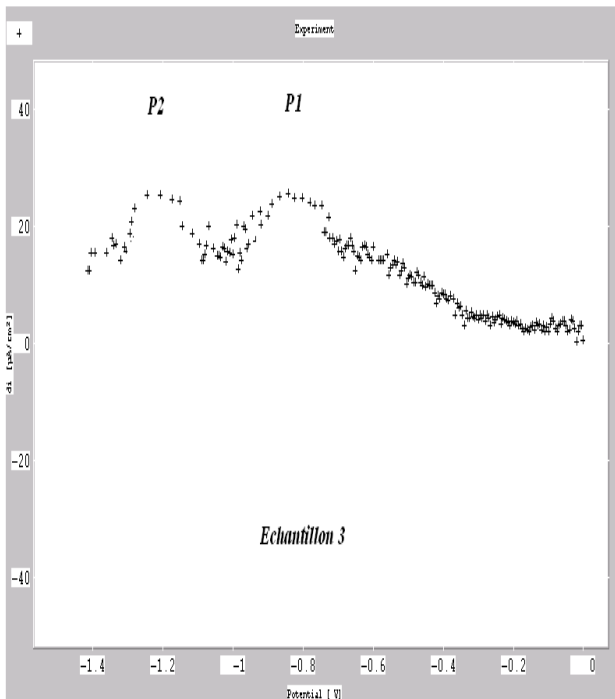
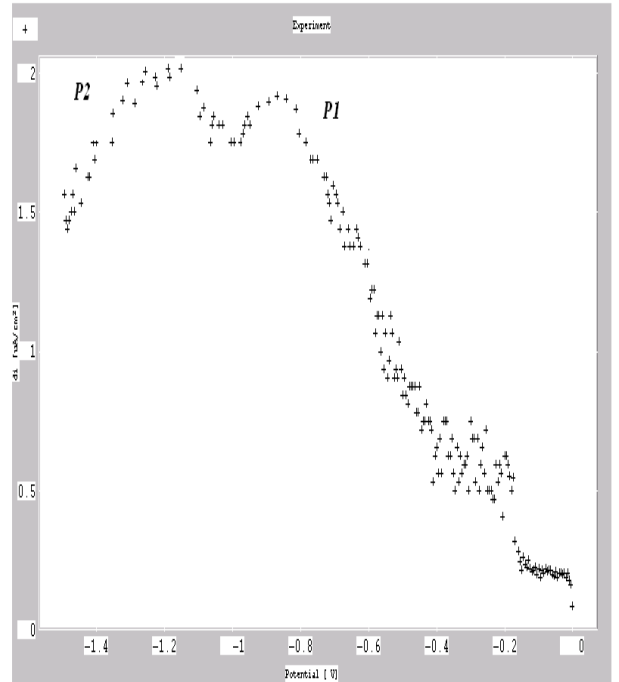
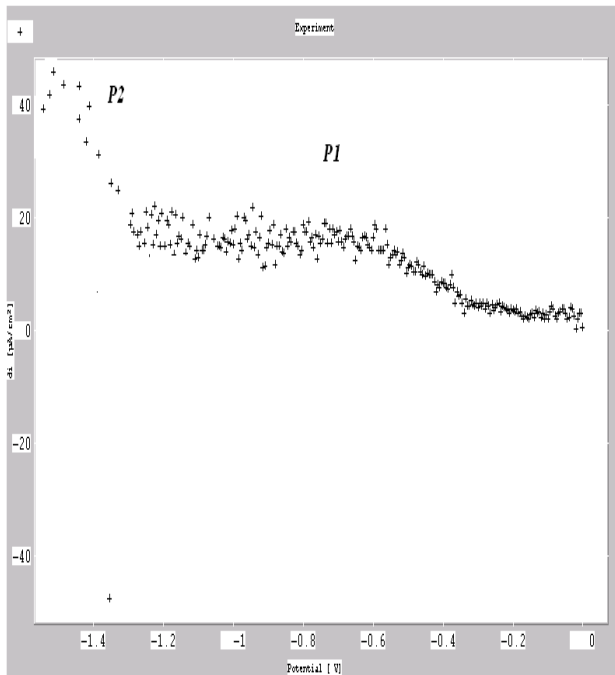
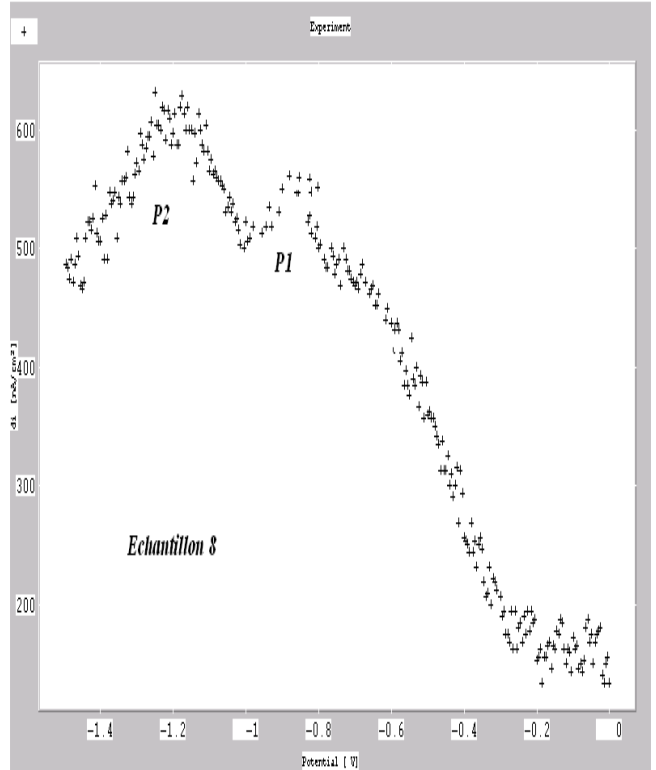
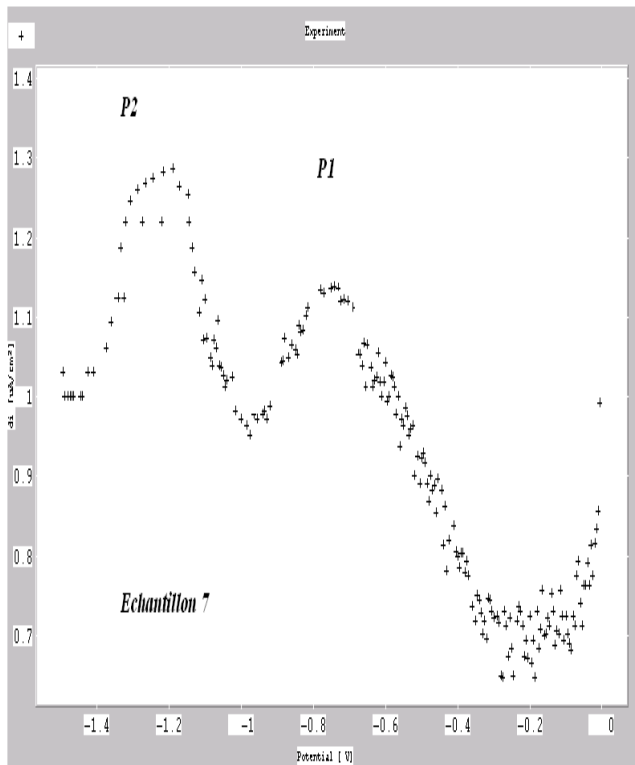
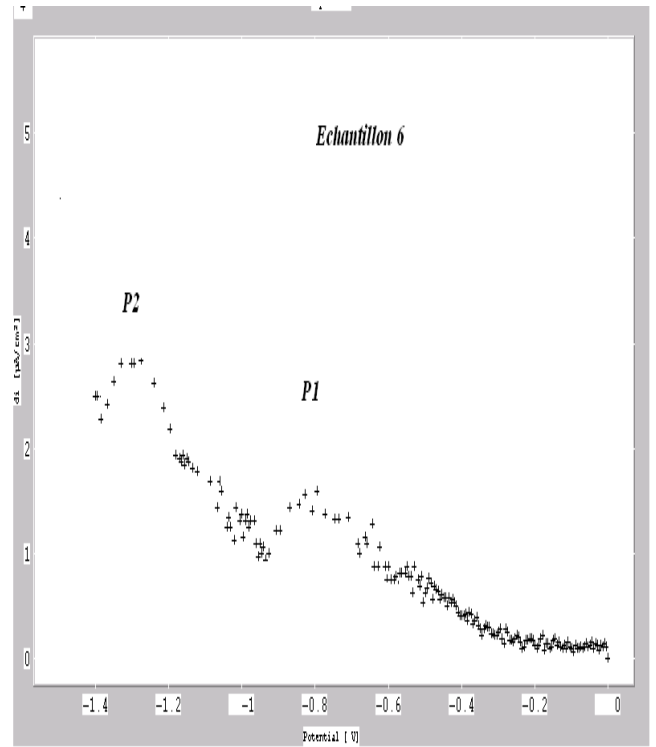
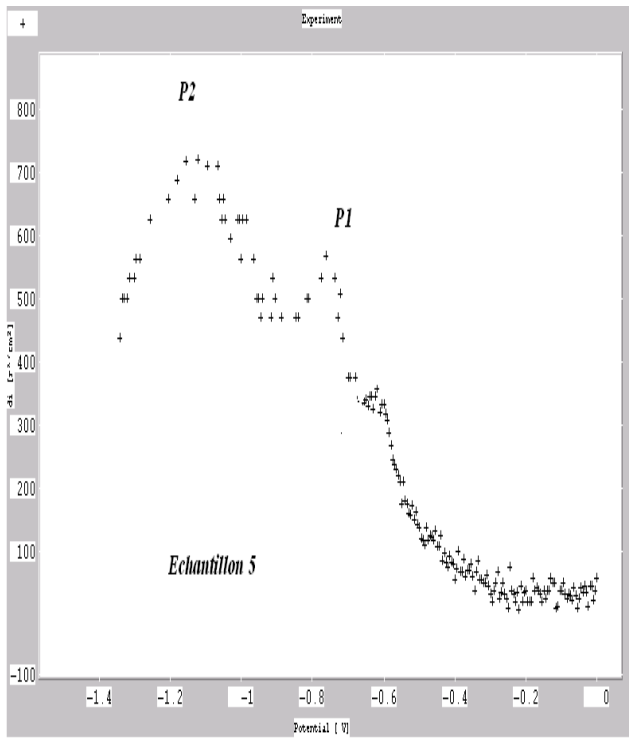
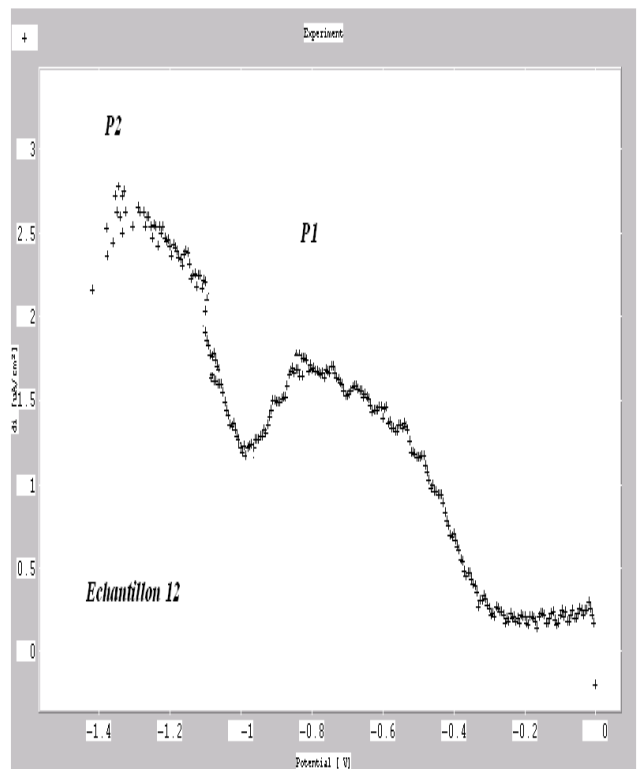
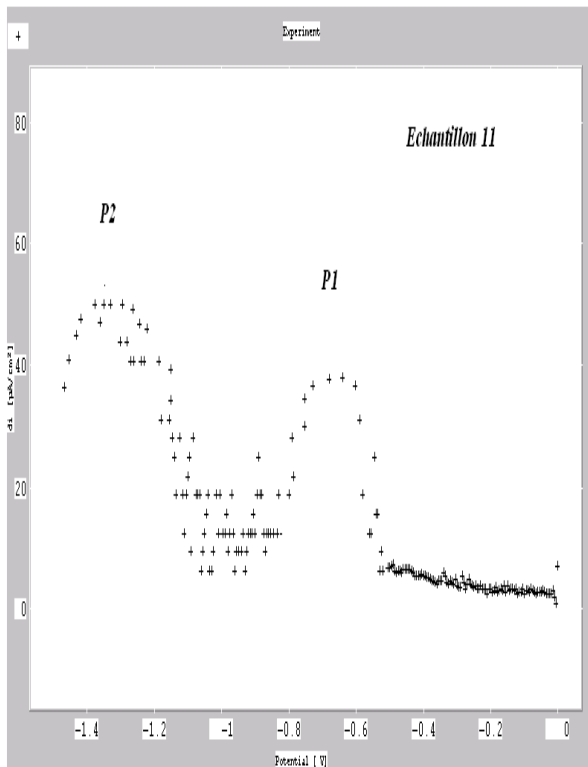
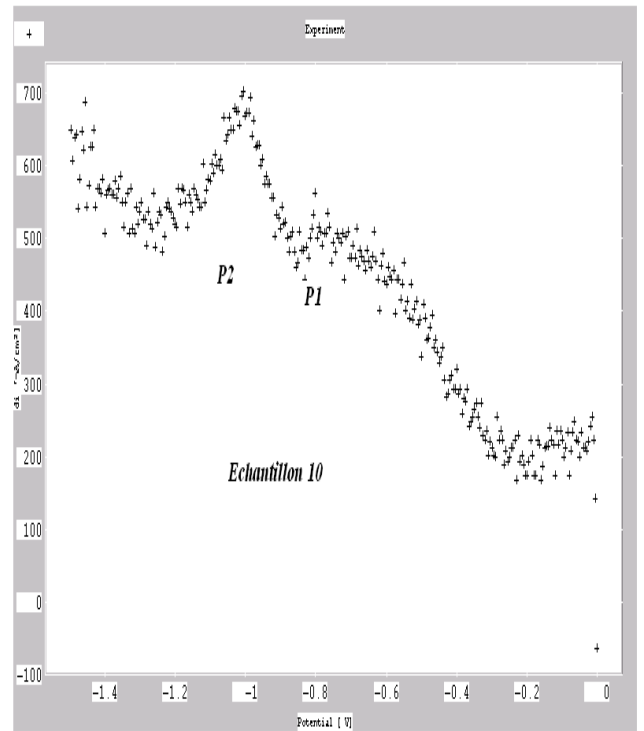
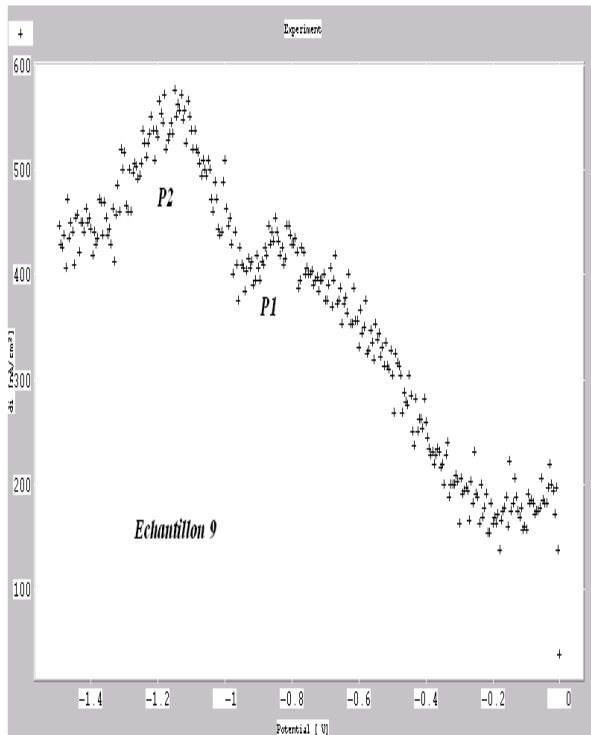
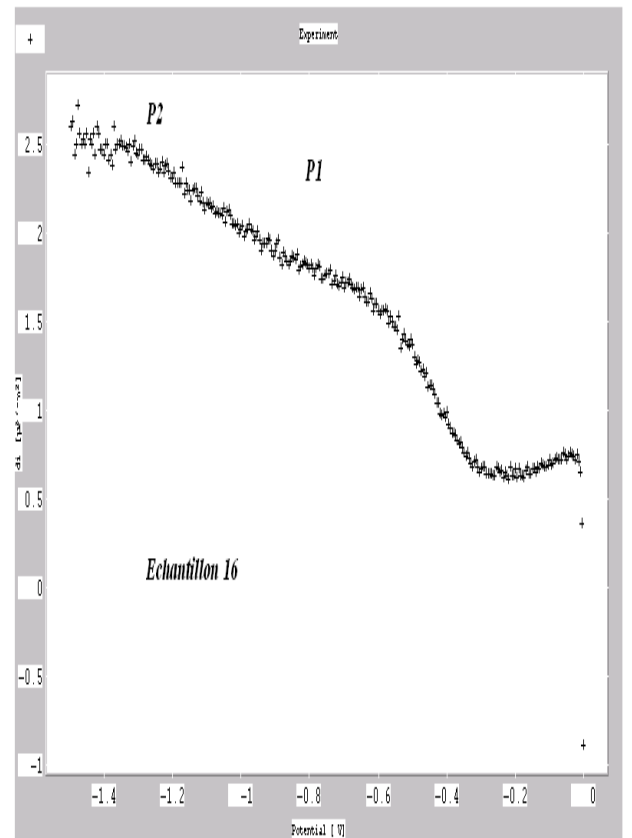
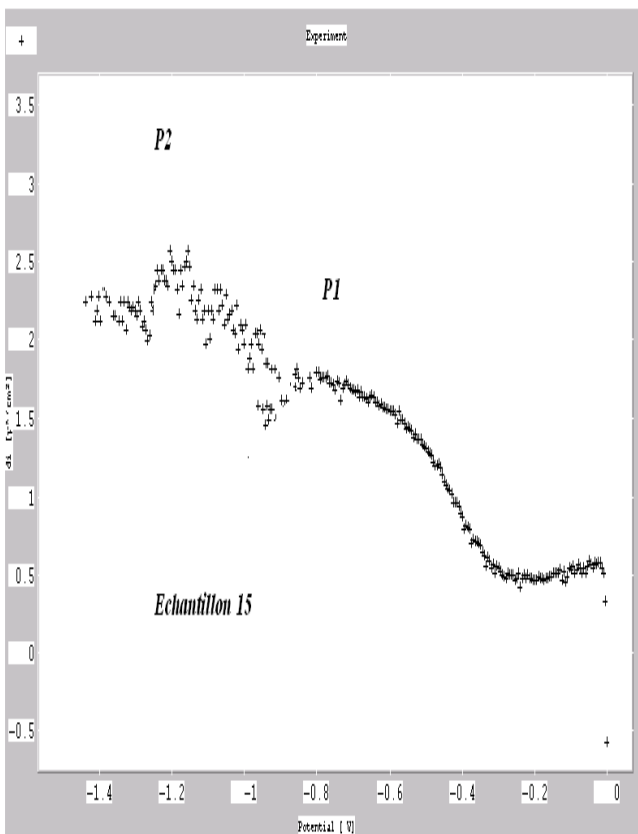
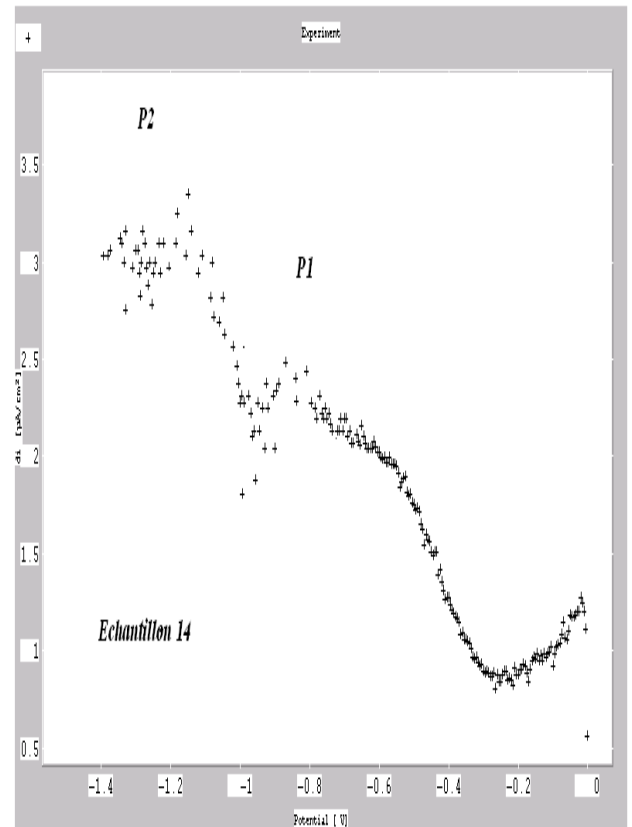
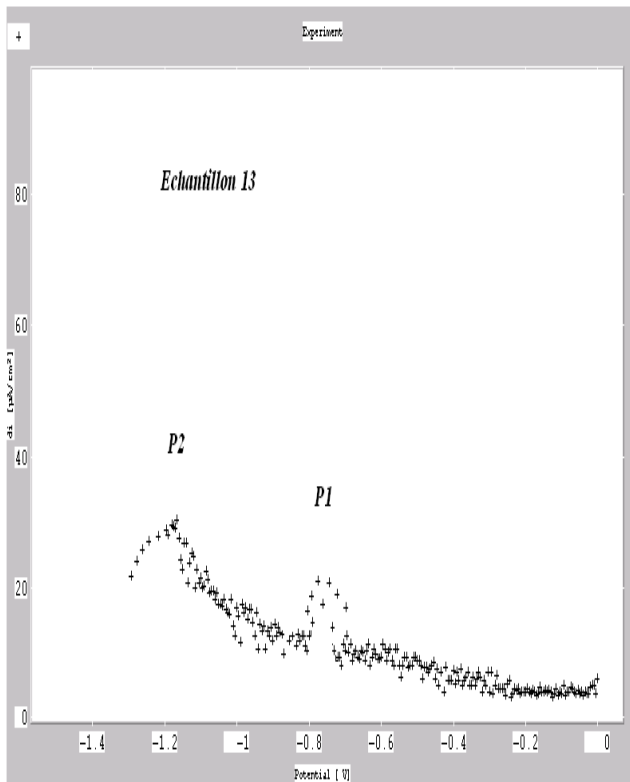


Fig. 6. Square wave enregistré par la KCPE dans un milieu électrolytique de 0.1M de HClO_4 , contenant différentes concentrations de nitrate









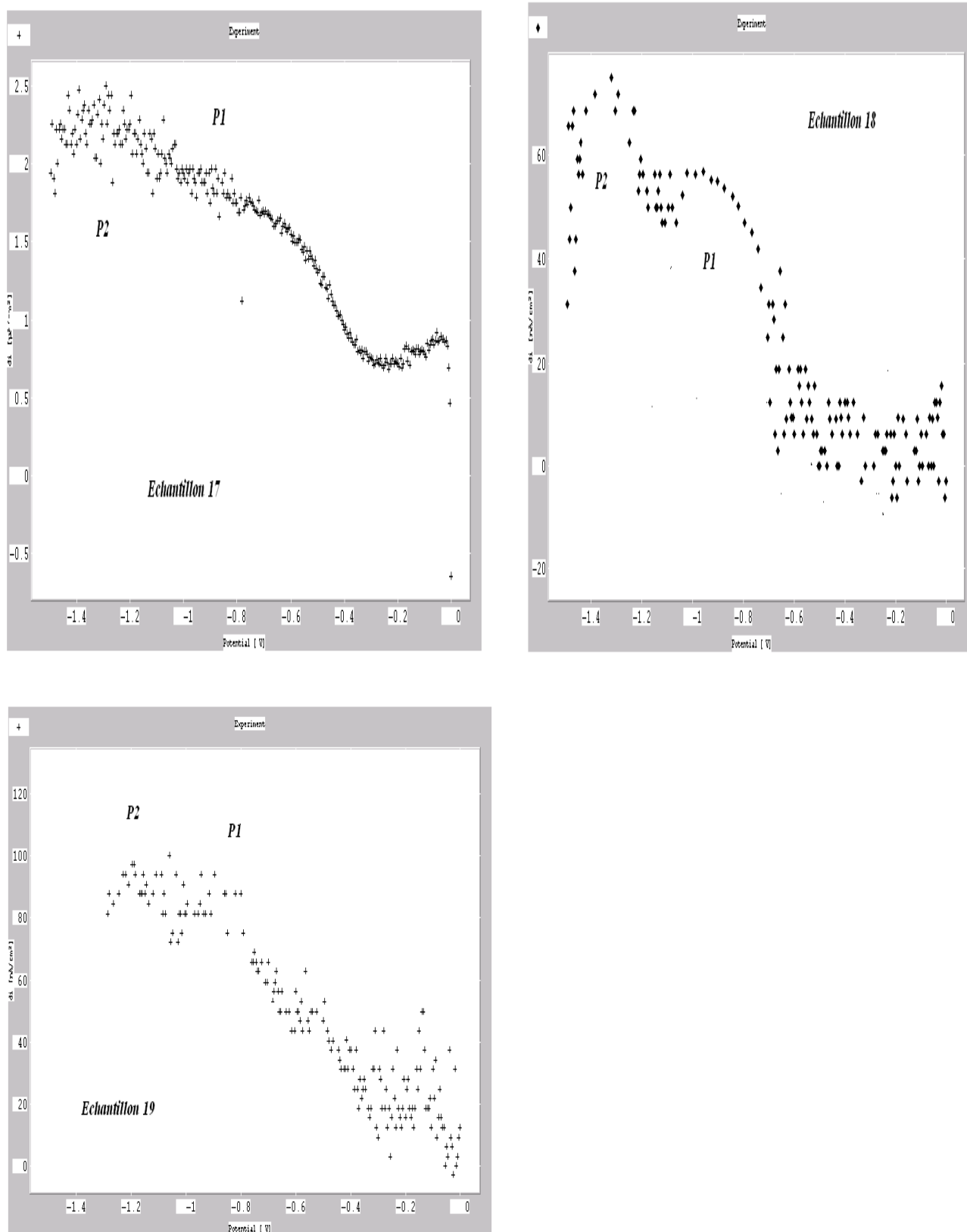


Figure 7. Squares waves enregistrés après imprégnation de l'électrode de travail dans différents échantillon du lait. Temps de préconcentration : 10 min, milieu électrolytique HClO_4 0.1M.

b)- Influence du temps d'imprégnation :

Le temps de pré concentration correspond à la durée d'imprégnation de l'électrode de travail dans l'échantillon contenant le lait riche ou non en nitrate, le temps choisi correspond à 10 minutes (Fig. 8).

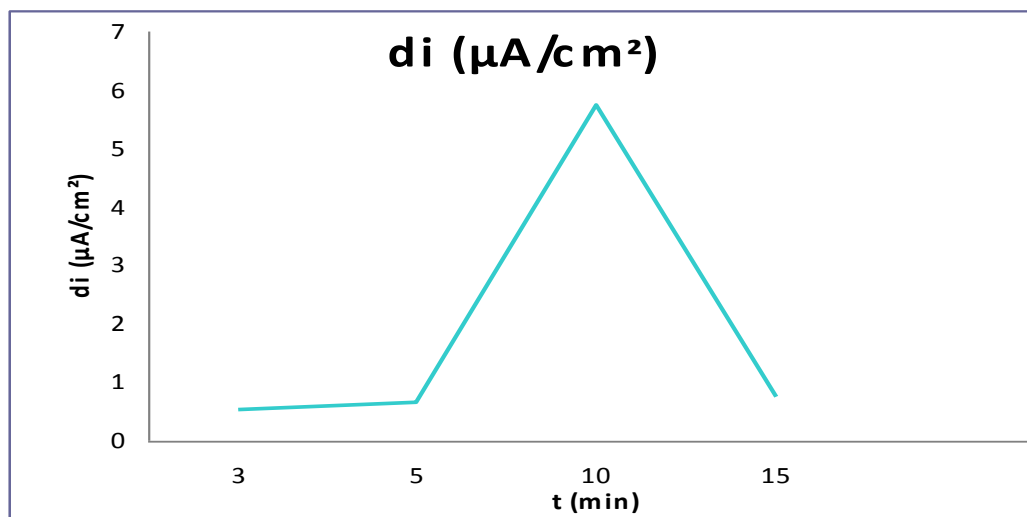
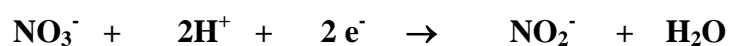


Figure 8. Evolution du pic de réduction de nitrate en fonction du temps de pré-concentration

c)- Courbe d'étalonnage :

La figure 9 représente la courbe d'étalonnage relative au pic 1, qui correspond à la réduction du nitrate (NO_3^-) selon la réaction :



Cette courbe a été tracée en considérant un échantillon témoin, sur lequel nous avons ajouté progressivement des quantités variables de nitrates compris entre 10^{-3} et 10^{-4} mol/l.

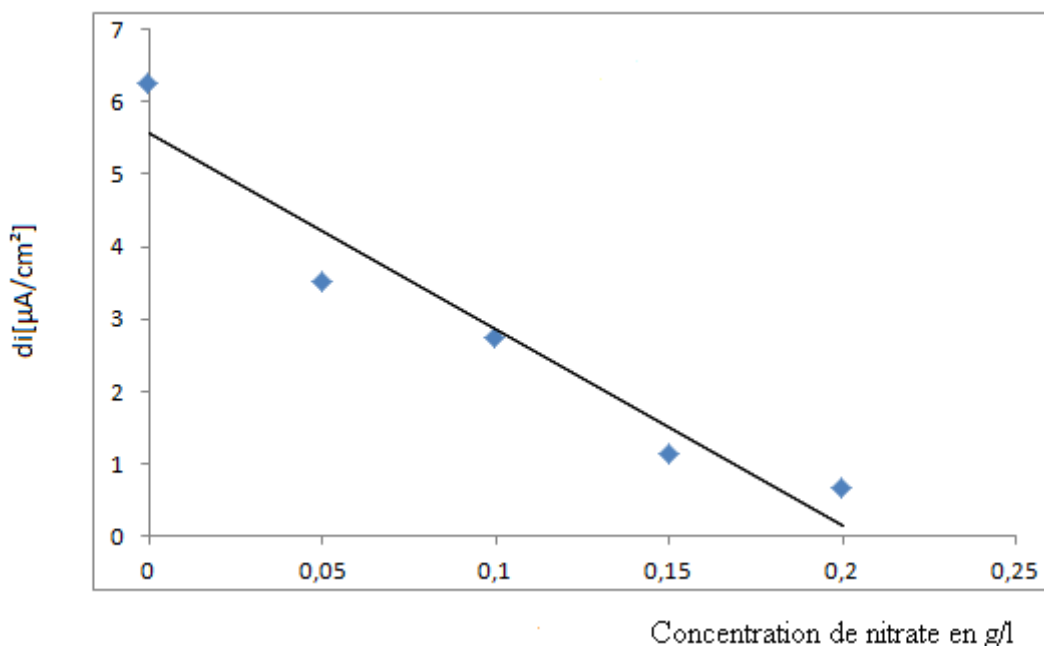


Figure 9. Courbe de titrage du nitrate

La concentration du nitrate est en g/l de lait. Et l'équation de la courbe de titrage est :

$$d_i [\mu\text{A}/\text{cm}^2] = -27.12 [\text{NO}_3^-] + 5.566, \quad (R=0,987)$$

Selon Miller [11] l'écart type (SD) mesurée au potentiel de réduction des nitrates pendant 10 voltamogrammes de la solution a été calculée à partir de:

$$S.D. = \frac{1}{(n - 2)} \sum_{j=0}^n (i_j - I_j)^2 \quad (4)$$

Avec i_j c'est la valeur expérimentale, j est le nombre d'expérience et I_j est la valeur recalculé correspondant à la même concentration en utilisant l'équation de la droite de régression. Le calcul S.D. a été utilisé dans la détermination de la limite de détection tel que : (DL=3×SD/pente) et la limite de quantification (QL= 10 × S.D. / pente).

A partir de ces valeurs, les limites de détection et de quantification sont respectivement de l'ordre de 2.2×10^{-6} mol/L and 1.8×10^{-7} mol/L

d)- Application pratique :

Le tableau 3 regroupe les résultats de l'analyse des échantillons prélevés dans différentes coopératives de la région.

Tableau 3. Résultats de l'analyse sur différents échantillons

Echantillon	1	2	3	4	5	6
[NO₃⁻] g/l	ND	2,75516	3,78022	3,79498	3,77286	3,52212
Echantillon	7	8	9	10	11	12
[NO₃⁻] g/l	3,27138	3,71386	3,78022	3,72862	ND	2,86578
Echantillon	13	14	15	16	17	18
[NO₃⁻] g/l	ND	2,40856	2,85104	2,8879	2,68878	4,07078

Nous constatons que la teneur en nitrate varie d'un échantillon à l'autre, il faut préciser que la collecte du lait a lieu sur un large périmètre de la région. La région de Tadla Azilal est connue par la diversité de culture et l'utilisation des engrais d'un champ à l'autre, ajoutant à cette donnée la qualité de l'eau qui varie d'un puit à l'autre.

La figure 10 illustre l'évolution de la concentration en fonction des échantillons étudiés. La concentration de nitrate oscille sur un large intervalle.

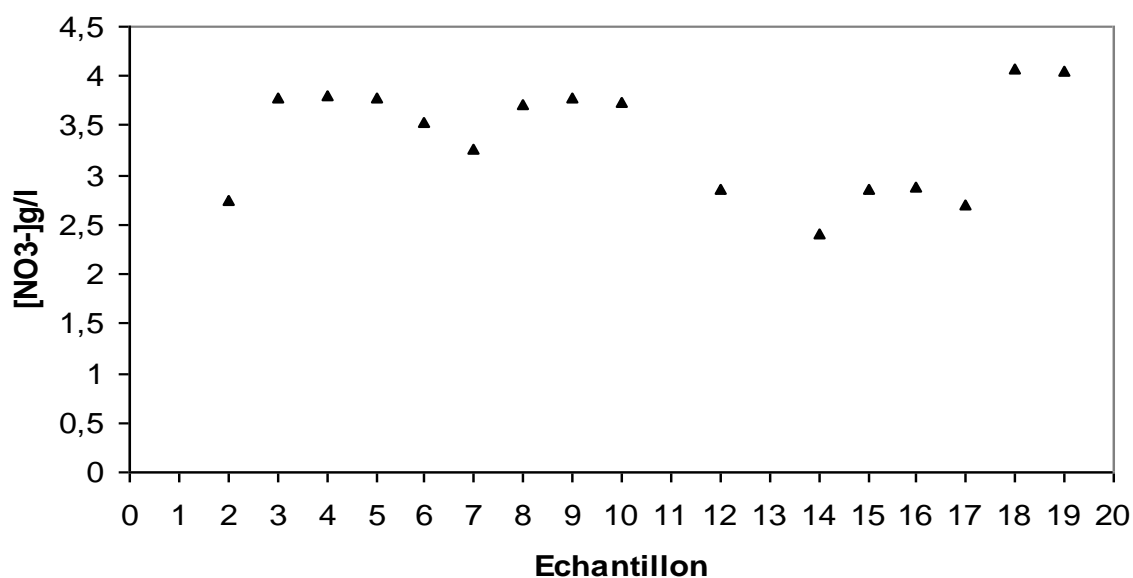


Figure 10. Evolution de la concentration de nitrate en fonction des échantillons étudiés

Si on considère les données de l'Organisation Mondiale de la Santé relatives à la consommation du lait par la population, le lait collecté dans la région Tadla Azilal (19 échantillons) apporte à l'organisme des quantités variables de nitrate, qui bien évidemment sera transformé par le liquide physiologique et la salive en nitrite et en complexes. Le tableau 4 rassemble les quantités de nitrate en fonction du poids corporel par échantillon.

Tableau 4. Quantité de nitrate absorbée par l'organisme par jour en fonction du poids corporel.

Echantillon	1	2	3	4	5	6
[NO₃⁻] mg/kg/jrs	ND	59	80	81,2	80,7	75,4
Echantillon	7	8	9	10	11	12
[NO₃⁻] mg/kg/jrs	70	79	80,9	79,8	ND	61,3
Echantillon	13	14	15	16	17	18
[NO₃⁻] mg/kg/jrs	ND	51,5	61	61,8	57,5	87,1

6. Résultats et discussion pour l'électro-analyse des pesticides :

6.1- Courbe d'étalonnage enregistré pour la paraquat dans le lait :

La figure 11 présente des courbes typiques de voltammétrie à ondes carrées enregistrées pour le capteur élaboré, après 10 min de temps de pré-concentration, sur des solutions contenant des concentrations du paraquat de l'ordre de 10^{-7} M. les densités de pics de réduction augmentent linéairement avec la concentration du paraquat selon l'équation de dosage :

$$di = 0.8663 [PQ] - 0.0395$$

Où **di** est exprimé en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ et **[PQ]** en $\mu\text{g}/\text{L}$ et la courbe de titrage est donnée dans la figure 12.

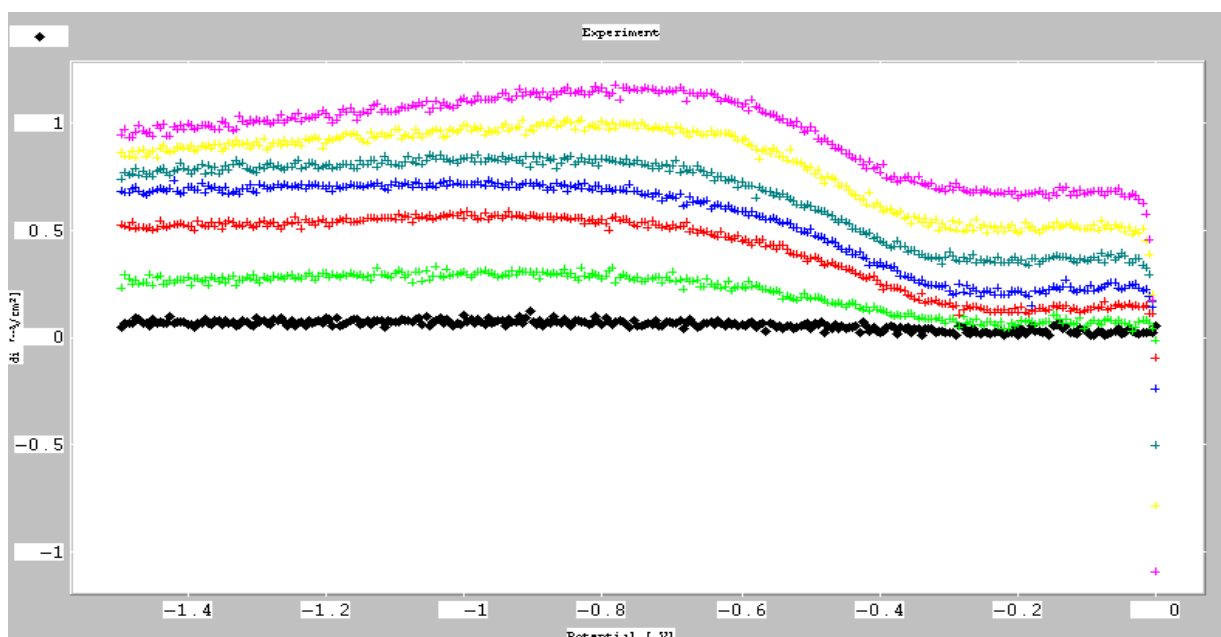


Figure 11. SQW enregistrés pour différentes concentrations du paraquat dans le lait

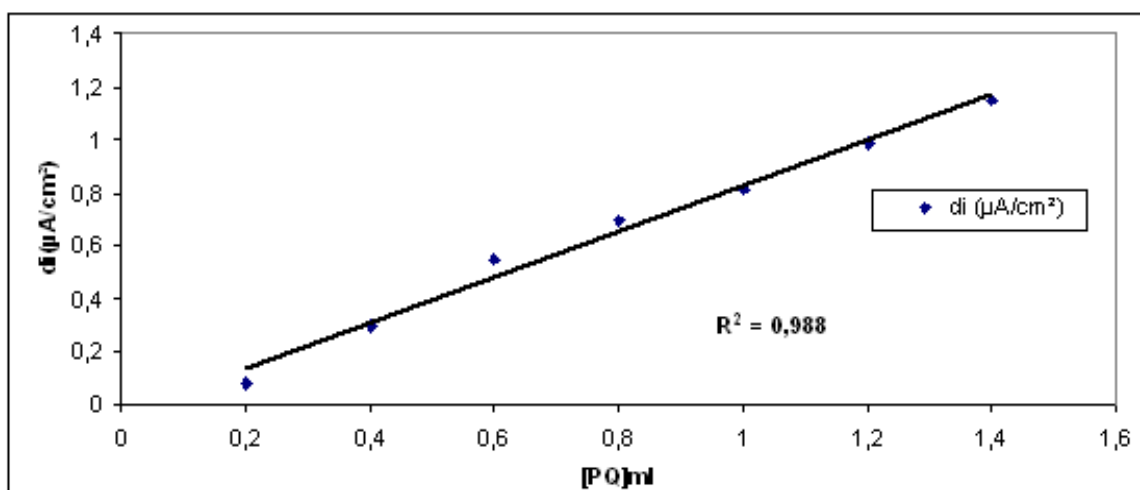


Figure 12. Courbe d'étalonnage du paraquat dans le lait

6.2- Analyse du paraquat dans le lait collecté dans la région :

Le paraquat est utilisé largement dans plusieurs pays pour lutter contre les mauvaises herbes aquatiques, ou comme dessicatif et défoliant de coton et de pomme de terre et encore comme matière d'aide à la récolte du soja. Cependant, ces moyens produisent un risque potentiel pour les êtres humains, animaux et à l'environnement parce qu'ils causent beaucoup de cas d'empoisonnement humain, en particulier au niveau des poumons, d'où la nécessité d'analyser et de détecter ces herbicides dans les résidus des produits alimentaires et en particulier dans le lait.

Au Maroc, le paraquat et le diquat représentent les herbicides les plus utilisés dans la culture de la pomme de terre et de pomme. Leurs usages sont encore autorisés dans ces cultures pour manque d'alternatif adéquat.

L'analyse portée sur 5 échantillons pris au hasard a donné les résultats suivants :

Tableau 5. Résultats de l'analyse sur différents échantillons

Echantillon	1	2	3	4	5
di ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	0,6057	0,8531	0,6222	0,8731	0,8787
10^{-3} [PQ] $\mu\text{l/l}$	0,7447	1,03	0,7638	1,0534	1,0599

Les résultats obtenus montrent que les échantillons ne contiennent pas de paraquat sinon des traces

Conclusion :

Les résultats préliminaires ont montré que les échantillons de lait dosés contiennent effectivement des quantités de nitrate à différentes doses. La variation de la concentration de nitrate dépend principalement des régions de collecte, ces résultats sont inférieures à la teneur maximale en nitrates recommandées par l'Organisation mondiale de la Santé.

Notre électrode qui est à la base d'argile camerounaise a montré une sensibilité à la détection des herbicides, mais une grande efficacité quant à la réduction des nitrates

L'utilisation de l'électrode à pâte de carbone modifié par le kaolin a amélioré la détection voltamétrique de nitrate et de nitrite. La réduction de ces ions sur l'électrode modifiée se produit d'une manière irréversible. L'optimisation des conditions expérimentales a donné une limite de détection de nitrate de $2,2 \times 10^{-6}$ mol / L. Cette électrode était extrêmement simple et à faible coût, avec des réactifs instables et non toxiques.

Références

- [1] G.Giry, Sorption de trois herbicides sur un sol limousin. Influence de coadsorbats organiques, Thèse de l'Université de Limoges, (1998).
- [2] J. Fourmier, Chimie des pesticides, Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, (1988) 91-113.
- [3] P. Cabras, A. Angioni, J. Agr. Food Chem., 48(4) (2000) 967-973.
- [4] S.A. Senseman, T.L. Lavy, J.D. Mattice, E.E.Gbur, B.W. Skulman. Environ. Sci. Tech., 31 (1997) 395-401.
- [5] T.D. Bucheli, S.R.Müller, S. Heberle, R.P. Schwarzenbach, Environ. Sci. Tech., 32 (1998) 3457-3464.
- [6] P.K. Gupta, Toxicol., 198 (2004) 83-90.
- [7] F. Konradsen, W. Van der Hoek, D.C.Cole, G. Hutchinson, H.Daisley, S. Singh, M. Eddleston, Toxicol., 192 (2003) 249-261.
- [8] S. Mourato, E. Ozdemiroglu, V. Foster, Environ. Sci. Technol., 34 (2000) 1456-1461.
- [9] R. Schultz, C. Hahn, E.R. Bennet, J.M. Dabrowski, G. Thiere, S.K.C. Peall, Environ. Sci. Technol., 37 (2003) 2139-2144.
- [10] FAO/OMS, Data Sheet on pesticides, N°4-Paraquat. Organisation mondiale de la santé, Genève, (1975).
- [11] IPCS. Environmental Health Criteria Document N°39, Paraquat and diquat. International Programme on Chemical Safety, Genève, (1984).
- [12] L.A. Summers, The bipyridinium herbicides. Academic Press, London, (1980).
- [13] J. T. Stevens, D. D. Sumner, Jr., Eds. Academic Press, New York, NY, (1991) 1088.
- [14] C.M. Chen, A.C. Lua, J. Toxicol. Environ. Health A, 59 (2000) 477.
- [15] National academy of sciences. Drinking water and health, vol. 1, National Research Council, Washington, DC, 1977.
- [16] S. Budavari, The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12th ed, Rahway, New Jersey, Merck and co, Inc, p 568, (1996).
- [17] WHO (1984). Paraquat and Diquat. (Environmental Health Criteria 39). International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva; Cluzeau S (Ed) (1996). Index Phytosanitaire, 32^{ème} éd, Paris, Association de coordination technique agricole, pp 277-278.
- [18] S. Cluzeau, Index Phytosanitaire, 32^{ème} éd, Paris, Association de coordination technique agricole, pp 277-278, (Ed) (1996).
- [19] Agriculture Canada. Guide to the chemicals used in crop protection. 7e édition. Publication n° 1093 (1982).

- [20] The Royal Society of Chemistry. The agrochemicals handbook. 2e édition (première mise à jour, avril 1988). Nottingham (1988).
- [21] Weed Science Society of America. Herbicide handbook. 5e édition. Champaign, IL (1983).
- [22] Hazardous Substances Databank. Toxicology Data Network. U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD (1988).
- [23] FAO/OMS. Pesticide residues in food, 1978. Evaluations. Données et recommandations du Comité mixte des résidus de pesticides, Rome, 27 novembre – 6 décembre 1978. Document n° 15 (Suppl.) de la Production et de la protection des végétaux de la FAO, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, (1979).
- [24] L.G. McCarthy, CP. Speth, *Ann. Emerg. Med.*, 12 (1983) 394-396.
- [25] M.J. Ellenhorn, D.G. Barceloux, *Medical Toxicology: diagnosis and treatment of human toxicology*, New York, Elsevier, (1988) 1092-1093.
- [26] R. Vanholder, F. Colardyn, J. DeReuck, M. Praet, N. Lameire, S. Ringoir, *Am. J. Med.*, 70 (1981) 1267-1271.
- [27] S.M. Pond, Pesticides: paraquat and diquat. In: Pond LR et al, *Goldfrank's Toxicologic Emergency*, 4th ed, Norwalk, Appleton & Lange, (1990) 713-719.
- [28] FAO/OMS. Data sheet on pesticides, No 4- Paraquat. Organisation mondiale de la santé, Genève, (1975).
- [29] FAO/OMS. Pesticide residues in food, 1982. Évaluations. Données et recommandations de la réunion mixte sur les résidus de pesticides tenue à Rome du 23 novembre au 2 décembre 1982. Document no 49 de la série Plant Production and Protection de la FAO (1983).
- [30] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *Anal. Chim. Acta*, 408(1-2) (2000) 263-154.
- [31] E. Vinner, M. Stievenart, L. Humbert, D. Mathieu, M. Lhermithe, *Biom. Chromatogr.*, 15(5) (2001) 342-34.
- [32] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 669(1-2) (1994) 217-224.
- [33] R. Gill, S. C. Qua. A. C. Moffat, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 275.
- [34] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 669(1-2) (1994) 217-224.
- [35] I. Ahmad, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1983) 663.
- [36] Z. Niewola, J.P. Benner, H. Swaine, *Analyst*, 111 (1986) 399.
- [37] R.A. Braithwait, *Hum. Toxicol.*, 6 (1987) 83.
- [38] V.V. Cosofret, R.P. Buck, *Anal. Chim. Acta*, 162 (1984) 375.
- [39] B. Saad, M. Ariffin, M. I. Saleh, *Talanta*, 47 (1998) 1231.
- [40] P. Manisankar, S. Viswanathan, H.G. Prabu, *Int. J. Anal. Chem.*, 82 (2002) 331.

- [41] P. Manisankar, S. Viswanathan, H.G. Prabu, *Int. J. Anal. Chem.*, 84 (2004) 389.
- [42] P. Manisankar, C. Vedhi, S. Viswanathan, H.G. Prabu, *J. Environ. Sci. Health Part B*, 39 (2004) 89.
- [43] E. Nebling, T. Grunwald, J. Albers, P. Schafer, R. Hintsche, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 689.
- [44] X. Xie, D. Stueben, Z. Berner, J. Albers, R. Hintsche, E. Jantzen, *Sens., Actuators B*, 97 (2004) 168.
- [45] D. De Souza, S.A.S. Machado, *Quim. Nova*, 26 (2003) 644.
- [46] R.A. De Toledo, M. Castilho, L.H. Mazo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 36 (2005) 1113.
- [47] D. D. Souza, S. A. S. Machado, R.C. Pires, *Talanta*, 69 (2006) 1200–1207.
- [48] C.G. Zoski, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1041.
- [49] R.M. Wightman, D.O. Wipf, in: A.J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry, A Series of Advances*, vol.13, Marcel Dekker, New York, 1984.
- [50] K. Stulik, C. Amatore, K. Holub, V. Marecek, W. Kutner, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 1483.
- [51] V. Komanicky, W.R. Fawcett, *Electrochim. Acta*, 49 (2004) 1185.
- [52] J. Osteryoung, in: M.I. Montenegro, M.A. Queirss, J.L. Dasbach (Eds.), *Microelectrodes: Theory and Applications*, Applied Sciences, Canada, 1991.
- [53] A.N. Correia, L.H. Mascaro, S.A.S. Machado, L.H. Mazo, L.A. Avaca, *Quim. Nova*, 18 (1995) 475.
- [54] A. Walcarius, L. Lamberts, *J. Electroanal. Chem.*, 406 (1996) 59.
- [55] T.H. Lu, I.W. Sun, *Talanta*, 53 (2000) 443-451.
- [56] M.A El Mhammedi, M. Bakasse, A. Chtaini, *Electroanalysis*, 19 (16) (2007) 1727 – 1733.
- [57] M.J. Dennison, A.P.F. Turner, *Biotechnology Advances*, 13 (1995) 1-12.
- [58] E. Alvarez, M.-T. Sevilla, J.M. Pinilla, L. Hernandez, *Anal. Chim. Acta*, 260 (1992) 19.
- [59] J.-M. Zen, S.-H. Jeng, H.-J. Chen, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 498.
- [60] R.G. Compton, A.M. Waller, P.M. S. Monk, D.R. Rosseinsky, *J. Electroanal. Chem.*, 267(1989) 309-312.
- [61] A. Walcarius, L. Lamberts, G. Derouane, *Electrochim. Acta*, 38 (1993) 2257.
- [62] E. Eric Engelman, D. H. Evans, *J. Electroanal. Chem.*, 349 (1993) 141-158.
- [63] D. Schubnell, M. Lehnann, W. Baumann, *Biosensors and Bioelectronics*, 14 (1999) 465-472.
- [64] L. Campanella, F. Cubadda, M.P. Sanmartino, *Water Ressources*, 35(1) (2000) 69-76
- [65] Association Internationale Pour l'Étude des Argiles, *Newsletter n°32*, February 1996.
- [66] PAULING L., *Nature de la liaison chimique*. Paris : Presses Universitaires de France, 1949.

- [67] CARROLL D. L., KEMP T. H., BASTOW T. J., SMITH M. E., Solid-state NMR characterization of the thermal transformation of a Hungarian white illite. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2005, vol. 28, p. 31-43.
- [68] J. Schreurs, E. Barendrecht, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 103 (1984) 205.
- [69] L.R. Faulkner, *Chem. Engen. News*, 29 (1984).
- [70] R.J. Waltman, J. Bargon, *Can. J. Chem.*, 64 (1986) 76.
- [71] H.D. Abruna, *Coord. Chem. Rev.*, 86 (1988) 135.
- [72] A.F. Diaz, K.K. Knazawa, G.P. Gardini, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 635 (1975).
- [73] A. El Mhammedi, A. Chtaini, A. El Bouadili, *Bull. Electrochem.*, 20 (12) (2004) 533-537.
- [74] M.A. El Mhammedi, M. Bakasse, A. Chtaini, *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, 10 (2007) 1-12
- [75] M.A. El Mhammedi, M. Bakasse, A. Chtaini, *J. Hazard. Mater.*, 145 (2007) 1-7.
- [76] J.L. Anderson, L.A. Coury, Jr. et J. Leddy, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 519-89.
- [77] R.F. Lane, A.T. Hubbard, *J. Phys. Chem.*, 77(1973) 1401-10.
- [78] H.O. Finklea, *Electroanal. Chem.*, 19(1996) 109-335.
- [79] A.J. Downard, *Electroanalysis*, 12(2000) 1085-96.
- [80] R.W. Murray, *Electroanal. Chem.*, 13 (1984) 191-386.
- [81] M. Kaneko, D. Woehrl, *Adv. Polym. Sci.*, 84 (1998) 141-228.
- [82] J. Schreurs, Thesis, Eindhoven University of Technology, 1983.
- [83] R.F. Lane, A.T. Hubbard, *J. Phys. Chem.*, 77 (1973) 1401.
- [84] J.M. Pinilla, L. Hernandez, A.J. Conesa, *Anal Chim. Acta*, 319 (1996) 25.
- [85] Yull. D'yachenko, V.V. Kondrat'ev, Z.H. *Anal. Khim.*, 53 (1998) 401.
- [86] Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner, *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 85.
- [87] M. Kopanica, L. Novotny, *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 211.
- [88] A. Dall'Olio, G. Dascola, V. Varacca, V. Bocchi, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 267 (1968) 433.
- [89] G. Touillon, F. Garnier, *J. Electroanal. Chem.*, 135 (1982) 173.
- [90] a- A. Desbene-Monvernay, P.C. Lacaze, J.E. Dubois, *J. electroanal. Chem.*, 129 (1981) 229.
- b- A. Desbene-Monvernay, J.E Dubois, P.C Lacaze, *J. Electroanal. Chem.*, 189 (1985) 51.
- [91] J. Rault-Berthelot, J. Simonet, *N. J. de chimie*, 10 (1986)169.
- [92] H.D. Abruna, P. Denisevich, M. Umana, T.J. Meyer, R.W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 1.
- [93] J.M. Galvert, R.H. Schmehl, B.P. Sullivan, J.S. Facci, T.J. Meyer, R.W. Murray, *Inorg. Chem.*, 22(1983) 2151.

- [94] G.E. Jeffrey, H.S. Munro, D. Parker, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 644.
- [95] S. Cosnier, A. Deronzier, J.C. Moutet, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 2390.
- [96] K.A. Macor, T.G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 105(1983) 5601.
- [97] A. Bettelheim, B.A. White, S.A. Raybuck, R.W. Murray, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 1009.
- [98] R.G. Nuzzo, D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 4481-3.
- [99] D.M.T. O'Riordan, G.G. Wallace, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 131.
- [100] M.A. Rahman, M.-S. Won, Y.-B. Shim, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 1129.
- [101] M.A. Rahman, D.S. Park, M.-S. Won, S.-M. Park, Y.-B. Shim, *Electroanalysis*, 16 (2004) 1370.
- [102] E. Theodoridou, A. D. Jannakoudakis and D. Jannakoudakis, *Synth. Met.*, 9 (1984) 19
- [103] A. D. Jannakoudakis, E. Theodoridou, D. Jannakoudakis, *Synth. Met.*, 10 (1985) 131.
- [104] E. Theodoridou, A. D. Jannakoudakis, J. O. Besenhard and R. F. Sauter, *Synth. Met.*, 14 (1986) 125.
- [105] E.A. Vitichinskaya, L.L. Zeigman, S.G. Morton, *Electroanalysis*, 7 (1995) 264.
- [106] A.M. Vasil'ev, Z.A. Temerdashev, T.G. Tsyupko, *Zh Anal. Khim.*, 54 (1999) 728.
- [107] H. Huang, P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, 380 (1999) 27.
- [108] I. Svancara, M. Pravda, M. Hvizdalova, K. Vytras, K. Kalcher and *Electroanalysis*, 6 (1994) 663.
- [109] Ch. Comninellis, G.P. Vercesi, *J. Appl. Electrochem.*, 21 (1991) 335.
- [110] R. Kotz, S. Stucki, B.J. Carcer, *J. Appl. Electrochem.*, 21 (1991) 14-99.
- [111] N.J. Bunce, S.G. Merica, J. Lipkowski, *Chemosphere*, 35 (1997) 2719.
- [112] Y.J. Feng, X.Y. Li, *Water Res.*, 37 (2003) 2399.
- [113] M. Panizza, P.-A. Michaud, G. Cerisola, Ch. Comninellis, *J. Electroanal. Chem.*, 507 (2001) 206.
- [114] M. Panizza, P.-A. Michaud, G. Cerisola, Ch. Comninellis, *Electrochem. Commun.*, 3 (2001) 336.
- [115] P. Canizares, J. Garcí'a-Gomez, C. Saez, M.A. Rodrigo, *J. Appl. Electrochem.*, 33 (2003) 917.
- [116] L. Codognoto, S.A.S. Machado, L.A. Avaca, *J. Appl. Electrochem.*, 33 (2003) 951.
- [117] Ch. Comninellis, C. Pulgarin, *J. Appl. Electrochem.*, 23 (1993) 108.
- [118] S. Stucki, R. Kotz, B.J. Carcer, W. Suter, *J. Appl. Electrochem.*, 21 (1991) 99.
- [119] A.M. Polcaro, S. Palmas, S. Dernini, *Curr. Top. Electrochem.*, 4 (1997) 137.
- [120] J. Iniesta, J. González-García, E. Expo'sito, V. Montiel, A. Aldaz, *Water Res.*, 35 (2001) 3291.

- [121] B. Idbelkas, D. Takky, *Ann. Chim. Sci. Mater.*, 26 (2001) 33.
- [122] R.N. Adams, *Anal. Chem.*, 0 (1958) 1576.
- [123] K. Ravichandran, R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1586-91.
- [124] T. Kuwana, W.G. French, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 241-2.
- [125] R.C. Bower, R.W. Murray, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 461.
- [126] G.L. Lundquist, G. Washinger, J.A. Cox, *Anal. Chem.*, 47(1975) 319.
- [127] M.A. Ruizbarrio, J.M. Pingarron Carrazon, *J. Anal. Chem.*, 344 (1992) 34.
- [128] A.R. Paniagva, M.D. Vazquez, M.L. Tascon, P.S. Batanero, *Electroanalysis*, 5 (1993) 155.
- [129] T. Kuwana, W.G. French, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 241.
- [130] F.A. Schult, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem.*, 10 (1995) 95.
- [131] R.P. Baldwin, L. Kryger, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1790.
- [132] J. Wang, T. Martinez, *Electroanalysis*, 2 (1990) 419.
- [133] J. Linqvist, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1006.
- [134] K. Kalcher, *Electroanalysis*, 2 (1990) 419.
- [135] B.F. Walknis, J.R. Sehling, E. Kariv, L.L. Miller, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97 (1975) 3549.
- [136] T. Yao, S. Musha, *Anal. Chim. Acta*, 110 (1979) 203.

Conclusion générale :

L'étude menée concerne d'une part la préparation d'un capteur électrochimique capable de détecter des herbicides, telles que, le paraquat et le diquat, ainsi les nitrates contenus dans le lait cru, collecté dans la région de Tadla-Azilal, et d'autres part, l'élaboration des capteurs électrochimiques pour le dosage de quelques médicaments largement utilisés au Maroc, ainsi de déterminer la capacité antioxydante du café et du thé.

Il s'agit des électrodes à pâte de carbone modifiées. L'activité électrochimique intrinsèque des électrodes, ainsi que l'effet de la cinétique de l'incorporation des composites ont été évalués par voltamétrie cyclique, voltamétrie à onde carrée, la structure et la morphologie des couches ont été examinées par microscopie électronique à balayage (MEB).

En conclusion, nous avons pu mettre à profit le pouvoir adsorbant des nitrates et des herbicides étudiés par nos électrodes modifiées, qui ont prouvé une grande performance pour la détection du paraquat, du diquat, et des nitrates, contenues dans des milieux aqueux synthétiques.

Le test de ces capteurs sur des aliments tel que, le lait a montré que la sensibilité des électrodes modifiées à base d'argile dépend fortement de la nature et de la quantité de la matière organique présente dans les échantillons. Les résultats obtenus nous informent sur la cinétique d'adsorption des nitrates et du paraquat, et démontrent que l'électrode à base d'argile est particulièrement capable, de détecter des traces du paraquat et des nitrates sur la surface de l'électrode. Cette étude a montré qu'il est possible de synthétiser des matériaux d'électrodes stables et performants pour la détection des polluants organiques en utilisant la voltamétrie cyclique et la voltamétrie à onde carrée.

Dans un autre sens, nous avons entrepris une étude dans le 3^{ème} chapitre consacré à la préparation d'une nouvelle électrode à pâte de carbone modifiée par électrodéposition du manganèse sur une pâte de carbone graphite, destinée pour le dosage du paracétamol, le comportement électrochimique du paracétamol a été évalué par les méthodes électrochimiques.

La méthode proposée pour la détection de ce médicament est caractérisée par la simplicité d'invention. Les résultats obtenus montrent que la méthode proposée (SWV) rapide et meilleure que les méthodes conventionnelles.

De plus, nous avons aussi mis au point, dans ce chapitre, la préparation et la caractérisation d'une autre électrode à base de carbone graphite modifiée par le polymère d'eugénol, pour le dosage de la carbocysteine. Initialement, les résultats présentés dans ce chapitre, montrent clairement les propriétés électrochimiques de l'électrode modifiée Ti/polymère. Le comportement électrochimique de la carbocysteine a été évalué en utilisant les résultats voltamétriques de l'électrode modifiée. La voltamétrie cyclique a montré l'apparition d'un pic anodique associée à l'oxydation de la carbocysteine

Dans le 4^{ème} chapitre, nous nous sommes intéressés à développer de nouvelles méthodes efficaces, rapides, peu coûteuses et ne nécessitent pas de préparations préalables des échantillons, qui permettent d'étudier le phénomène d'oxydation qui a lieu à la surface d'une électrode conçue spécialement pour ce travail. Ce système a été testé pour l'évaluation de la capacité anti-oxydante du café. Dans ce cadre nous avons effectué une comparaison entre quatre électrodes tel que : Ti, Ti-NP, Ti-NP-5%Ni et Ti-NP-10%Ni. La modification de l'électrode de titane par le phosphate naturel dopé ou non, a été procédée par voie électrochimique et les résultats obtenus montrent que l'activité de l'oxydation du café évolue dans le sens suivant :

$$\text{Ti} > \text{Ti-NP} > \text{Ti-NP- 5\% Ni} > \text{Ti-NP- 10\% Ni}$$

D'après ces résultats et à travers les paramètres de validation, nous avons montré la précision des méthodes électrochimiques utilisées.

Au cours de ce travail, nous pouvons dire que les méthodes de dosage sont fiables, efficaces et répétables. Par ailleurs, cela ne nous empêche pas d'améliorer les méthodes utilisées. Il nous semble indispensable de mettre en place des systèmes fiables, efficaces et à notre portée pour assurer la qualité des produits.