



**UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**



**Béni-Mellal**

**Centre d'Etudes Doctorales**

**Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé**

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du

**Doctorat**

Par

**NGONO THERESE ROSIE LAURIANE**

Discipline : **Chimie Physique**

Spécialité : **Electrocatalyse**

**Développement d'un dispositif bioanalytique pour la  
détermination du pouvoir antioxydant et la reconnaissance  
moléculaire spécifique.**

**Soutenue le 10 Mai 2014 devant la commission d'examen :**

<b>Président</b>	<b>: Pr. A HAFID</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal</b>
<b>Rapporteurs</b>	<b>: Pr .M. TALEB</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar Mahraz-Fes</b>
	<b>Pr .A. KHERIBECH</b>	<b>Faculté des Sciences d'EL Jadida</b>
	<b>Pr .M. KHOULI</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal</b>
<b>Examineurs</b>	<b>: Pr .B. LOURA</b>	<b>Université de Maroua, Cameroun</b>
	<b>Pr. K. HABBARI</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal</b>
<b>Encadrant</b>	<b>: Pr .A. CHTAINI</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal</b>
<b>Co-encadrante</b>	<b>: Pr .R. NAJIH</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal</b>



A la mémoire de mon père Essama Owona Michel, « papa j'aurais tant voulu que tu partages ces moments avec moi ».

A mon mari Dr Vincent de Paul MAMA, merci chéri pour tous tes sacrifices.

A mes enfants, Michel Cédric ESSAMA MAMA, Linda Laetitia Christina NGETOUNDI MAMA et à ma petite belle-mère comme j'aime bien t'appeler, Adelaïde Lylia Nadia NGA MAMA.

# Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Equipe d'Electrochimie Moléculaire et Matériaux Inorganiques (EEMMI) de l'Université Sultan Moulay Slimane à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal (Maroc). Mes remerciements vont à l'endroit :

- Du Professeur Abdelilah CHTAINI, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, mais également pour son encadrement pendant toutes ces années. Sa disponibilité, son enthousiasme, et surtout ses vastes connaissances scientifiques m'ont été indispensables. Je me rappelle encore de cette phrase que vous m'aviez dite Professeur « Rosie c'est le destin qui t'a emmené ici à Béni-Mellal ». Je voudrais aussi vous remercier pour le temps et la patience que vous m'avez consacrée tout au long de ces années et pour avoir cru en mes capacités me permettant d'aboutir à la production de cette thèse.

- De l'équipe dirigeante de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal en l'occurrence le Professeur Ahmed ZEGHAL Doyen, le Professeur ZYAD Abdelmajid, Vice-doyen et sans oublier le Directeur du centre d'études Doctorales de ladite Faculté.

- De tous les enseignants de la Faculté des Sciences et Techniques, en particulier à Professeur Rachida NAJIH pour tous ses précieux conseils, au Professeur Mostafa KHOUILI, au professeur Abdrafia HAFID, au professeur RAKIB, au professeur Mbarki...

- De tous les agents d'appui de cette illustre institution.

- du Professeur Abderrafia HAFID pour avoir accepté de présider le jury. Son soutien sans limite et ses qualités humaines resteront gravés dans ma mémoire.

- Des membres de jury de thèse : le Professeur Mustapha TALEB de la faculté des Sciences Dhar Mahraz-Fes, le Professeur Abdelmoula KHERIBECH de la faculté des Sciences et Techniques El Jadida.pour, le Professeur Mostafa KHOUILI de la faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, le Professeur Benoit LOURA de l'Université de Maroua et le Professeur Khalid HABBARI de la faculté des Sciences et Technique de Béni Mellal pour avoir mobilisé leur temps et leurs compétences pour examiner ce travail.

- Des Professeurs, Norbert NDONG, Marie-Thérèse OBAMA, Benoit LOURA Benguella et KETCHA Joseph Mbadcam pour leurs précieux conseils.

- De mes compatriotes pour l'esprit de fraternité que vous avez eu à mon égard, je pense au Dr HAROUNA Massai, au Dr HAMBATE GOMDJE Valéry, au Docteur TCHEKA Constant et à Raymond ONGUENE.

- De mes camarades et stagiaires de Laboratoire, Dr HAMBATE GOMDJE Valéry, Dr Salah EL Quatli, Abdelmajid Sadiki Lamari, Aziz Tahri, Jamila BOUADILI, Hayat OUBENAMAR, Hind HISSOU, Najet BELKAMSSA, AMMAR Soukaina, ERCHAIKY Dounia pour les moments de doute et de joie que nous avons partagés ensemble.

- De tous les étudiants du centre d'Etudes doctorales avec qui on a partagé, un matériel de labo, un cours ou un déjeuner.

- De mes colocataires, Lylia HOMPERAT, Vivien Romaric EKOUELE MBAKI, Dorina BOUSSA, Christella Bienvenue MIZELE FINOUNOU.

- De ma famille et à ma belle famille qui m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même : je pense en premier lieu à ma mère Mme Essama Philomène qui m'a toujours encouragé, à ma belle mère Mme NKOLO Adelaïde et à mon beau père M. NKOLO Pierre Damien, merci d'avoir gardé mes bébés durant toutes ces années, à mes sœurs Suzanne NDI et à son mari et Sandrine Michèle ESSAMA, à mon beau frère OTABELA Serges et à sa femme Florence, à mes frères sa Majesté ESSAMA Owona Hervé, ESSAMA Ngono Achille, ESSAMA Mbezele Yves Bernard, ONANA Owona Ninou, NGAH Francine et enfin à Aicha LOUNGUE.

- De mes oncles ABEGA Joseph et NKODO Come et à ma tante BISSA Clémentine je tiens à dire un grand merci pour tous leurs précieux conseils. Je ne saurais oublier mon cher neveu Michel Stéphane ESSAMA Owona.

- De Sa Majesté M. NGAMANGA MESSI Alain, Proviseur du Lycée classique de Mfou, et de mon père NDI Oscar, ancien proviseur dudit Lycée, aujourd'hui retraité, qui

m'ont permis de venir finaliser cette thèse, merci Messieurs les Provisseurs pour votre gentillesse et votre compréhension.

- De « mon fils » comme j'aime t'appeler affectueusement le Dr MBANG Joseph, au Dr NKE Gisèle ma belle sœur et à mon grand frère VOUNDI Simon Pierre, AMOUGOU Désiré et à BINAM Moïse pour tous vos mots d'encouragement.

- De mes copines Mari Rose AHANDA et Judith NDJALA, pour leur présence, leur soutien, pour tous les moments partagés et ceux à venir... Merci.

Je ne saurais terminer sans dire une fois de plus merci de tout cœur à mon cher époux pour avoir cru en moi, « Chéri merci pour ta patience et pour tout ton amour à mon égard ».

# SOMMAIRE

<b>DEDICACE.....</b>	<b>I</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>II</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
I. Le stress oxydant ou les conséquences d'un déséquilibre.....	7
II. Les systèmes de défenses : les molécules antioxydantes.....	21
III. Généralités sur les denrées alimentaires .....	32
IV. Mode de détection et de conversion des substances chimiques par voie électrochimique .....	36
<b>Chapitre II : TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.....</b>	<b>60</b>
I. Généralités.....	61
II. L'Electrodéposition.....	63
III. Voltamétrie .....	66
IV. Mesure de l'impédance électrochimique (EIS) .....	74
V. Chronoampérométrie .....	78
VI. Chronopotentiométrie.....	79
VII. Techniques d'analyses de surface .....	81
Références bibliographiques.....	84
<b>Chapitre III : DÉTERMINATION BIOANALYTIQUE DES DENRÉES ALIMENTAIRES.....</b>	<b>85</b>
Introduction .....	86
I. Procédure.....	87
II. Réacteur électrochimique.....	87
III. Caractérisation de l'électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre (CGE-Cu) .....	89
IV. Réacteur bio analytique .....	92

V. Détermination du pouvoir anti oxydant de l'ail.....	93
VI. Détermination du pouvoir anti oxydant du thé vert .....	97
VII. Détermination du pouvoir anti oxydant du café.....	99
Conclusion .....	102
Références .....	103
<b>Chapitre IV : ÉVALUATION DU POUVOIR ANTI OXYDANT DES MOLÉCULES ORGANIQUES SYNTHÉTISÉES .....</b>	<b>104</b>
Introduction .....	105
I. Etudes Electrochimiques .....	107
II. Pouvoir anti oxydant des molécules étudiées .....	112
Conclusion .....	117
Références .....	119
<b>Chapitre V : DÉVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF POUR LA RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE EN DIAGNOSTIC CLINIQUE .....</b>	<b>120</b>
Introduction .....	121
I. Molécules proposées pour la chélation des métaux lourds .....	122
II. Préparation de l'électrode .....	124
III. Mesures électrochimiques .....	126
IV. Comportement électrochimique des électrodes modifiées par les molécules proposées .....	126
V. Etude électrochimique de la chélation des métaux.....	128
VI. Paramètres de l'analyse.....	134
Conclusion .....	136
Références .....	137
<b>ANNEXES.....</b>	<b>142</b>
Annexe 1.....	143
II. Listes des Communications orales et par affiche.....	144
Annexe 2 : Spectres RMN ( <sup>1</sup> H).....	145
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>147</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	8
Figure 2 : Déséquilibre entre les molécules pro oxydantes et antioxydants .....	9
Figure 3: Mécanisme de production des ROS et RNS .....	13
Figure 4 : Lésions radio-induites de l'ADN [56] .....	18
Figure 5 : Formule développée du Glutathion .....	25
Figure 6 : Mécanisme d'oxydation de l'acide urique en milieu neutre sur une électrode en graphite pyrolytique [91].....	26
Figure 7 : Vitamine C (acide ascorbique) et sa forme oxydée .....	28
Figure 8 : $\beta$ -carotènes .....	28
Figure 9 : Formule du gallate de propyle .....	28
Figure 10 : Formules développées du BHT et du BHA .....	29
Figure 11 : Structure de quelques flavonoïdes .....	30
Figure 12 : Structure de dérivés de l'acide p-hydroxycinnamique .....	31
Figure 13 : Structure chimique de quelques stilbènes.....	32
Figure 14 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat .....	67
Figure 15 : Evolution du potentiel en fonction du temps en voltamétrie cyclique .....	69
Figure 16 : Voltamogrammes cycliques pour des systèmes : réversible (A), quasi réversible (B) et (C) et totalement irréversible (D).....	69
Figure 17 : Voltamogramme cyclique enregistré pour un couple redox en solution. ....	72
Figure 18 : Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps. ....	73
Figure 19 : Voltamogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée. ....	74
Figure 20 : Représentation de la variation de l'impédance d'un système électrochimique en fonction de la pulsation $\omega$ . Cas idéal où les pulsations $\omega_c$ , $\omega_a$ , $\omega_d$ sont suffisamment différentes les unes des autres. ....	75
Figure 21 : Diagramme de Bode qui représente log module et $\phi$ en fonction de log $\omega$ .....	77
Figure 22 : Diagramme de Nyquist représentant $-Z_I$ en fonction de $Z_R$ .....	77
Figure 23 : Chronoampérogramme typique ; $i_{res}$ le courant résiduel [15].....	78

Figure 24 : Chronopotentiogramme typique d'un système électrochimique réversible .....	80
Figure 25 : Système bio électrochimique pour la détermination du pouvoir anti oxydant. ....	86
Figure 26 : Electro déposition du cuivre à la surface de l'électrode à pâte de carbone. ....	88
Figure 27 : Voltamogrammes enregistrés en milieu tampon pour les électrodes, a- CGE et b- CGE-Cu à la vitesse de balayage de 100mv/s.....	89
Figure 28 : Effet de la vitesse de balayage sur l'allure du voltamogramme enregistré pour l'électrode CPE-Cu dans une solution de tampon phosphate 01M.....	90
Figure 29 : Etude de la corrosion par piqûre relative aux électrodes, a- CPE-Cu et b- CPE... 90	90
Figure 30 : Courbes de polarisation enregistrées pour les électrodes, a-pâte de carbone graphite, b- pâte de carbone graphite modifiée par le cuivre .....	91
Figure 31 : Microscopie Electronique à Balayage de l'électrode à pâte de carbone Modifiée par le Cuivre.....	92
Figure 32 : Voltamogrammes à ondes carrées enregistrés pour CPE-Cu, en milieu tampon contenant le peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations. ....	94
Figure 33 : Courbe de calibration de $H_2O_2$ sur CPE-Cu en milieu tampon phosphate.....	94
Figure 34 : Evolution de la densité de courant de réduction de 80 $\mu$ L/100mL de $H_2O_2$ avec la concentration de l'ail.....	95
Figure 35 : Evolution du PAO de l'ail avec la concentration du peroxyde d'hydrogène .....	96
Figure 36 : Evolution de la densité de courant d'oxydation du thé avec la concentration.....	97
Figure 37 : Inhibition de la réduction de $H_2O_2$ par le thé.....	98
Figure 38 : Evolution du PAO du thé avec la concentration de $H_2O_2$ . ....	98
Figure 39 : Evolution de la capacité oxydante du café avec la concentration .....	99
Figure 40 : Evolution de la densité de courant de réduction de 100 $\mu$ L/100mL de $H_2O_2$ avec la concentration du café. ....	100
Figure 41 : Voltamogrammes à ondes carrées enregistrés pour l'électrode CPE-Cu en milieu tampon contenant le peroxyde d'hydrogène, le thé et/ou le café. ....	101
Figure 42 : Voltamogrammes cycliques enregistrés par l'ECG-Cu, a- en milieu tampon, b- en milieu tampon contenant la molécule A, à 100 mV/s. ....	108
Figure 43 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon, b- en milieu tampon contenant la molécule A.....	108
Figure 44 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon contenant la molécule B .....	109
Figure 45 : Voltamogrammes cycliques enregistrés par l'ECG-Cu, en milieu tampon contenant la molécule C, à 100 mV/s.....	110

Figure 46 : Voltammogrammes cycliques enregistrés par l'ECG-Cu, en milieu tampon contenant, respectivement les molécules : A, B et C à 100 mV/s.....	111
Figure 47 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon contenant, respectivement les molécules A, B et C. ....	111
Figure 48 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon, d- contenant 100 $\mu$ L/100 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , c- ajout de 8 $\mu$ L/100 mL de la molécule A, b- ajout de 12 $\mu$ L/100 mL et a- ajout de 14 $\mu$ L/100 mL.....	112
Figure 49 : Evolution de la densité de courant de réduction de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec la concentration de la molécule A. ....	113
Figure 50 : Evolution du pouvoir anti oxydant de la molécule A par le peroxyde d'hydrogène .....	114
Figure 51 : Evolution de la densité de courant de réduction de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par l'ajout de l'extrait de la molécule B.....	115
Figure 52 : Evolution du pouvoir antioxydant de la molécule B avec la concentration du peroxyde d'hydrogène.....	115
Figure 53 : Variation de la densité de courant de réduction de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec la concentration de la molécule C.....	116
Figure 54 : Evolution du pouvoir antioxydant de la molécule C avec la concentration du peroxyde d'hydrogène.....	117
Figure 55 : Evolution du pouvoir antioxydant des trois molécules étudiées avec la concentration .....	118
Figure 56 : Structure des molécules utilisées comme chélateur.....	123
Figure 57 : Protocole de préparation de l'électrode à pâte de carbone modifiée. ....	124
Figure 58 : Mécanisme de fixation de la molécule organique à la surface de l'électrode à pâte de carbone. ....	125
Figure 59 : Modification de la surface de l'électrode à pâte de carbone. ....	125
Figure 60 : Voltammogrammes enregistrés, respectivement, par l'électrode à pâte de carbone (a) et l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule (A), en milieu tampon à 100 mV/s. ....	127
Figure 61 : Voltammogrammes enregistrés, respectivement, par l'électrode à pâte de carbone (a) et l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule (B), en milieu tampon à 100 mV/s. ....	127

Figure 62 : Voltamogrammes enregistrés, respectivement, par l'électrode à pâte de carbone (a) et l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule (C), en milieu tampon à 100 mV/s. ....	128
Figure 63 : Voltamogrammes enregistrés par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule A, en milieu tampon contenant le cation $Pb^{2+}$ , à 100 mV/s. ....	129
Figure 64 : Voltamogrammes enregistrés par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule B, en milieu tampon contenant le cation $Cd^{2+}$ , à 100 mV/s. ....	129
Figure 65 : Voltamogrammes enregistrés par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule C, en milieu tampon contenant le cation $Cu^{2+}$ , à 100 mV/s. ....	131
Figure 66 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film développé par la molécule A. ....	131
Figure 67 : Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation avec la concentration du $Pb^{2+}$ . ....	132
Figure 68 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film développé par la molécule B. ....	132
Figure 69 : Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation avec la concentration du $Cd^{2+}$ . ....	133
Figure 70 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film développé par la molécule C. en milieu tampon. ....	133
Figure 71 : Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation avec la concentration du $Cu^{2+}$ . ....	134

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition de l'ail frais .....	34
Tableau 2 : Caractéristiques chimiques de cuivre .....	65
Tableau 3 : Propriétés atomiques .....	65
Tableau 4 : Résumé des paramètres électrochimiques pour les électrodes étudiées .....	91
Tableau 5 : Electroanalyse du Cadmium.....	135
Tableau 6 : Electroanalyse du Cuivre.....	135
Tableau 7 : Electroanalyse du Plomb .....	135

# RÉSUMÉ

Les électrodes à base de carbone occupent une position importante dans l'électroanalyse tant par leur faible coût et leur mise en œuvre aisée que par leurs performances électrochimiques en analyses organiques et inorganiques.

Notre choix s'est porté sur l'électrode à pâte de carbone parce qu'elle présente des avantages par rapport aux autres électrodes solides classiques, tels qu'un renouvellement de surface aisé et exempt d'effet de mémoire et une grande sensibilité vis-à-vis de certaines substances. Dans cette étude nous avons utilisé les électrodes à pâte de carbone modifiées dans un premier temps par le cuivre, pour sa grande conductivité électrique et thermique et sa résistance élevée à la corrosion et dans un second temps par des molécules organiques.

L'activité et l'efficacité électrochimique de ces électrodes ont été évaluées par voltamétrie cyclique et voltamétrie à onde carrée. La structure et la morphologie des couches formées ont été examinées par microscopie électronique à balayage (MEB).

Pour évaluer la capacité antioxydante des denrées alimentaires, nous avons élaboré un système bioanalytique pour la production des radicaux libres « in situ ». Les résultats obtenus sur le thé, le café et l'ail montrent bien leur effet inhibiteur sur les radicaux libres. Par la suite une équation mathématique a été proposée afin d'évaluer la capacité antioxydante des aliments.

Le comportement des molécules de synthèse face aux radicaux libres ( $H_2O_2$ ) par voie électrochimique a été étudié. Il en découle de cette étude que les molécules synthétisées peuvent inhiber l'action des radicaux libres.

Dans un autre sens, nous avons étudié la réactivité des électrodes à pâte de carbone modifiées par les molécules organiques. Il en ressort de cette étude que ces électrodes peuvent chélater les métaux, qu'elles sont sensibles et présentent une bonne reproductibilité pour la détection du plomb, du Cadmium et du cuivre à l'état de trace.

## ABSTRACT

Electrodes based in carbon occupy an important position in electroanalysis as their low cost and easy implantation by the electrochemical performance in organic and inorganic analysis.

Our choice fell on the carbon paste electrode because it has advantages over other conventional electrodes, such as renewal area easy, free memory effect and a high sensitivity with some substances.

In this study we used electrodes carbone paste modified firstly by copper, for its high electrical and thermal conductivity and high resistance corrosion, secondly by organic molecules.

The electrochemical activity and efficiency of these electrodes was evaluated by cyclic voltametry and square wave voltametry. The structure and morphology of layers formed were examined by scanning electron microscopy (SEM).

For the evaluation of the antioxidant power of food, we developed a bioanalytical system for the production *in situ* of free radicals. The results obtained on tea, coffee and garlic show their inhibitory effect on free radicals. Thereafter, a mathematical formula has been proposed to assess the antioxidant capacity of the food.

The behavior of the synthetic molecules against free radicals ( $H_2O_2$ ) was electrochemically studied. It follows from this study that, the synthesized molecules can inhibit the action of free radicals.

In another sense, we studied the reactivity of carbon paste modified by organic molecules, its appears from this study that, those electrodes can chelate metals, which are sensitive and have good reproducibility for the detection of lead, cadmium and copper trace.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN: Acide désoxyribonucléique
- ATP: Adénosine triphosphate
- ASV: Anodic stripping voltammery
- ERO: Espèce réactive de l'oxygène
- RCS: Reactive chlorine species
- RNS: Reactive species nitrogen
- CPE : Electrode à pâte de carbone
- SQW: Square wave voltamétrie
- SO: Superoxyde
- SOD : Superoxyde Dismutase
- GPX : Glutathion peroxydase
- ECS : Electrode au calomel saturé
- DPASV:differential pulse anodic stripping voltametry
- ECG-Cu : Electrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre
- HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
- MEB : Microscopie électronique à balayage
- MET : Microscopie électronique à transmission
- CV : Voltamétrie cyclique
- LD : Limite de détection
- LQ : Limite de quantification
- SD : Déviation standard
- ME : Microélectrodes
- UV : Ultraviolet
- PAO : Pouvoir antioxydant
- CAO : Capacité antioxydante



# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

L'intérêt porté à la recherche sur les électrodes modifiées a connu une augmentation remarquable durant les dernières décennies. L'actualité de ces études peut s'analyser en examinant les publications majeures qui ont jalonné ces dernières années, car c'est 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, agroalimentaire et environnementaux. Les électrodes peuvent être des solides (graphite, carbone vitreux, silicium, diamant....), des métaux solides (or, platine, palladium, etc...) ou liquides (mercure, aluminium fondu...). La modification des surfaces d'électrodes permet de leur conférer des propriétés spécifiques en vue d'applications dans les domaines des transducteurs, des capteurs chimiques et biocapteurs, ou de l'électro catalyse [ref]. Les travaux de recherche actuels visent toujours à améliorer les performances analytiques des électrodes modifiées, notamment en termes de spécificité et de sensibilité, en tirant profit des avantages liés au concept et procédé de modification de surfaces des électrodes.

Le carbone, matériel très important d'électrode qui est largement utilisé en raison de beaucoup d'avantages, y compris l'inertie chimique, large domaine de potentiel, faible courant résiduel, coût bas, facilité de modification et grande polyvalence. Les électrodes de carbone peuvent être modifiées par adsorption physique non spécifique ou adsorption chimique spécifique ou par l'établissement facile de liaisons covalentes. Des électrodes à base de carbone sont utilisées pour différents buts, analyses de métaux lourds et de bio-détecteur jouant le rôle de jonctions de commutation dans l'électronique moléculaire.

Dans ce cadre, l'électrochimie, discipline d'association des processus chimiques et de l'électricité, offre depuis plus d'un siècle un grand nombre de procédés dans des champs d'applications diversifiés : analyse, énergie, traitement de surface, synthèse... L'électrochimie analytique est particulièrement sollicitée par notre société actuelle, avide de proposer des outils de contrôle de la qualité des produits chimiques ou agroalimentaires, de suivi de l'environnement et d'aide au diagnostic des problèmes de santé inhérents au vieillissement de la population et à son mode de vie. Par ailleurs, l'électrochimie est utilisée pour la conception de nouveaux matériaux par l'électrosynthèse ou l'électro- dépôt de métaux ou de semi-conducteurs. Il a été développé un nombre important de méthodes électrochimiques adaptées à ces objectifs. La simplicité d'utilisation ainsi que le faible coût de ces techniques en font des outils compétitifs dans les domaines de l'analyse chimique, de la micro-fabrication, des

batteries, etc. Ces applications avancées ont été rendues possibles par le développement en parallèle de plusieurs domaines. D'une part, les méthodes électrochimiques, qui dépendent de la mesure du courant ou du potentiel, ont profité des avancées technologiques dans le domaine de l'électronique. D'autre part, les progrès continus de la miniaturisation et de la chimie ont permis l'élaboration d'ultra-microélectrodes et d'électrodes à surface chimiquement modifiée augmentant considérablement l'étendue des applications potentielles des techniques électrochimiques. Enfin, la compréhension théorique des phénomènes électrochimiques se produisant à la surface d'une électrode a énormément progressé, entre autres dans les domaines de la cinétique des réactions, du transport des espèces en solution, et des phénomènes de nucléation et de croissance des dépôts.

Le métabolisme oxydatif est essentiel pour la vie cellulaire. Cependant l'un de ses effets secondaire est la production des radicaux libres très réactifs. Parmi ces radicaux on retrouve le superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ), le peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ), l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ) ainsi que leurs dérivés comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux ( $HOCL$ ) et peroxy nitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ). Toutes ces espèces chimiques sont nommées composés réactifs de l'oxygène (en anglais : reactive oxygen species (ROS)). L'impact majeur de ces composés sur l'organisme est la détérioration de certaines voies biochimiques qui entraînent, à terme, le vieillissement prématuré des tissus. Ce processus biologique, connu sous le nom générique de « stress oxydant », est aujourd'hui au centre de plusieurs pathologies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, ou neurodégénératives. Le stress oxydatif est décrit comme un déséquilibre entre la quantité des radicaux libres et le pouvoir défensif du système antioxydant composé d'enzymes protectrices comme la catalase, la peroxydase et la superoxyde dismutase. Pour lutter contre les stress oxydatif notre organisme est équipé d'une grande variété de molécules désignées sous le terme d'antioxydant, qui assurent une protection de sites biologiques des plus efficaces du fait d'une élimination directe des molécules pro-oxydantes. Lorsque ces molécules ne peuvent pas être fournies par l'organisme, elles sont apportées dans les aliments que nous consommons. Une méthode rapide de la quantification du pouvoir antioxydant des nutriments pourrait alors servir de critère sélectif des aliments. Elle pourrait ainsi être utilisée comme un critère de sélection des variétés, des espèces, du degré de maturation et des conditions de cultures afin d'obtenir des aliments ayant une teneur en antioxydants élevé.

Actuellement, la détection et le dosage des radicaux libres et des agents antioxydants 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 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. 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 reconnaissance et l'analyse de traces, ainsi que l'émergence de nouveaux procédés.

Notre équipe développe une thématique de recherche basée sur la conception et la synthèse de nouveaux motifs de reconnaissance moléculaire afin de mettre au point de nouvelles techniques dans le domaine biologique. La détection de la reconnaissance moléculaire peut être contrôlée grâce à un récepteur bi-fonctionnel constitué par l'association d'un site de complexation, pouvant interagir sélectivement avec un substrat. Il est aussi possible d'en réaliser le dosage. 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 au procédé de modification de surfaces des électrodes.

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

Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif de pérenniser le procédé analytique et de le renforcer dans deux voies : d'une part dans le domaine de la recherche fondamentale, en proposant des capteurs spécifiques des molécules antioxydantes grâce aux développements d'électrodes modifiées qui aboutissent à des mesures sélectives, spécifiques et quantitatives ; et d'autre part au niveau de transfert de technologie, par la conception et l'utilisation des électrodes *in situ* ou dans des modèles réels (sang, urine, sérum...).

Ce mémoire s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier chapitre introduit les notions de stress oxydant, radicaux libres et leurs conséquences sur l'organisme. Nous nous intéressons ensuite aux systèmes de défense antioxydantes, endogènes et exogènes. Dans la suite, nous rappellerons aussi les différents modes de modifications des électrodes solides et à pâte de carbone de même leurs utilisations en électrochimie.

Le deuxième chapitre présente de manière synthétique et non exhaustive les principes et les méthodes électrochimiques relatées dans la littérature et utilisées au cours de ce travail ; en deuxième partie, une attention particulière sera portée sur la présentation des méthodes d'analyses des surfaces des électrodes.

Dans le troisième chapitre, nous proposons un procédé nouveau, qui permet de mesurer le pouvoir antioxydant des denrées alimentaires en un temps record. Il s'agit de coupler un réacteur, qui produit les radicaux libres, *in situ*, à un capteur électrochimique adéquat, permettant de faire une étude analytique fiable.

Dans le quatrième chapitre, Nous avons procédé à la synthèse de molécules organiques, non toxiques, que nous estimons avoir des propriétés capables d'inhiber l'effet des radicaux libres et réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette étude a pour but d'ouvrir de nouvelles perspectives d'application, notamment comme additifs alimentaires ou cosmétiques.

Le cinquième chapitre est consacré à la préparation d'une nouvelle génération d'électrodes destinées à la reconnaissance moléculaire. Il s'agit des électrodes à pâte de carbone modifiée par une couche de molécules organiques. Dans cette étude nous cherchons à développer des molécules capables de chélater le Cuivre et la possibilité de développer des molécules organiques, non toxiques capable de réduire la concentration des métaux tels que le plomb et le cadmium dans le sang et le tissu.

On terminera par une conclusion générale dans laquelle sont exposés les principaux résultats de ce travail.

**Chapitre I:**  
**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

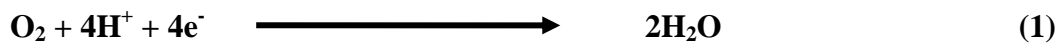
Ce chapitre est consacré à une description générale des radicaux libres et de leur implication dans le stress oxydant. Outre les pathologies liées au stress oxydant, les molécules antioxydantes sont aussi présentées.

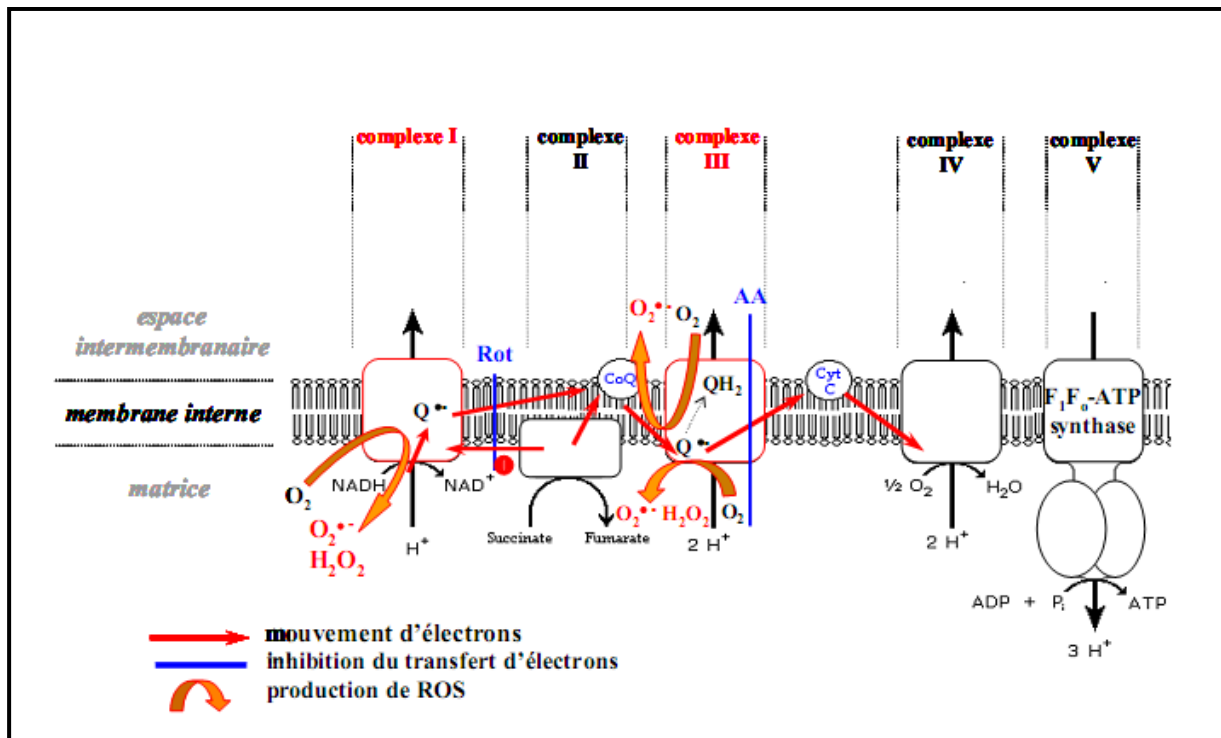
## I. Le stress oxydant ou les conséquences d'un déséquilibre

### I.1. Le paradoxe de l'oxygène

L'oxygène moléculaire, apparu voici trois milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est le deuxième élément le plus abondant de la biosphère. Principalement formé lors de la photosynthèse [1]. C'est un carburant indispensable à la vie des cellules aérobies. L'oxygène en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre deux seulement dans un processus anaérobie) [2].

Les mitochondries, "poumons" de la cellule, sont responsables de la production de l'énergie indispensable au travail cellulaire (**Figure 1**). C'est au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale que s'effectue la réduction de l'oxygène en eau [3]. Cette réaction de réduction implique quatre électrons et elle est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes cytochromes localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cette réaction est cruciale, puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales.





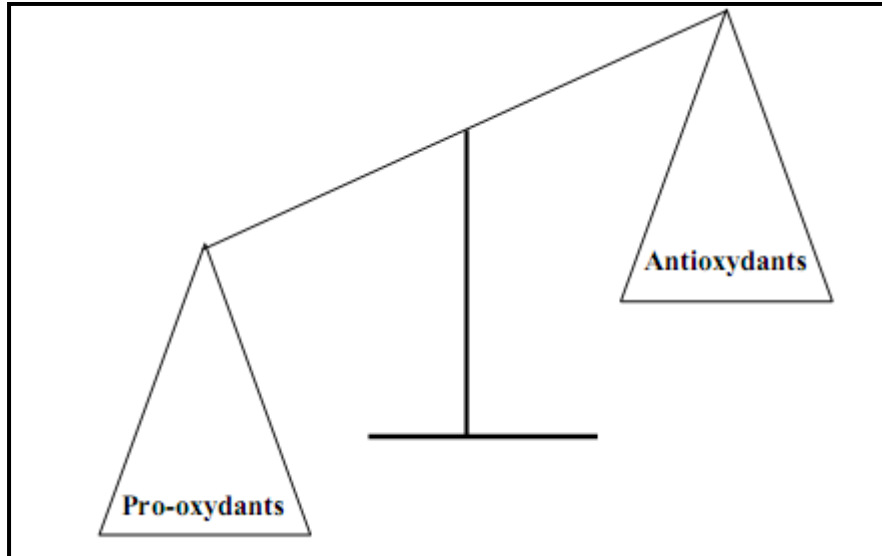
**Figure 1 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale**

Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau : il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivés de l'oxygène très réactives (ERO) [4-6].

A l'état naturel, l'oxygène, qui comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche externe ou périphérique est très instable, a une très forte tendance à « oxyder » les composés qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires ; Ces composés deviennent ainsi à leur tour instables, initiant une véritable chaîne de peroxydation (lipidique).

La production de ces espèces pro-oxydantes est normale et s'accompagne d'un rôle physiologique important. Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre profond apparaît dans la balance entre molécules pro-oxydantes et antioxydantes, en faveur des entités oxydantes, on parle alors de *stress oxydant* [7,8]. Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre entités oxydantes et molécules antioxydantes. Les entités oxydantes sont souvent des radicaux libres.





**Figure 2 : Déséquilibre entre les molécules pro oxydantes et antioxydants**

## **I.2. Les radicaux libres**

### **Introduction**

Les radicaux libres interviennent dans un grand nombre de domaines en chimie, aussi bien en chimie sous rayonnement ionisant, chimie des radioéléments, qu'en chimie organique, inorganique, photochimie... Généralement les réactions d'oxydoréduction font intervenir des intermédiaires radicalaires. Ces réactions sont omniprésentes dans le milieu vivant et gouvernent des processus aussi importants que la reproduction des espèces, la mutagenèse, la défense contre les maladies. Ces réactions interviennent dans le vieillissement et dans certaines pathologies.

### **I.2.1. Définition**

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur) [9,10]. Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux.

En 1954, Gilbert et Gerschman désignent pour la première fois les radicaux libres comme responsables de processus de dégradation au sein des cellules biologiques [11]. Peu après, Harman montre la participation des radicaux libres dans des événements physiologiques majeurs, particulièrement au cours du processus du vieillissement [12,13]. Du fait de leur courte durée de vie, la plupart des radicaux libres réagissent quasiment

instantanément avec d'autres molécules voisines. Néanmoins, la toxicité d'une espèce n'est pas nécessairement corrélée à sa réactivité. De plus, certaines molécules non-radicalaires présentent également une activité oxydante accrue parmi lesquelles le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le peroxydinitrite (ONOO<sup>-</sup>) ou l'acide hypochloreux (HClO).

## **I.2.2.Nature des radicaux libres**

Il existe trois grandes familles d'espèces réactives :

- Les espèces réactives de l'oxygène ou ERO en anglais Reactive Oxygen Species : ROS ; issues de la réduction incomplète de l'oxygène, dont le précurseur est l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Il est à l'origine de la formation d'autres ROS, tel que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le radical hydroxyle OH<sup>•</sup> ; l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub> est également une entité oxydante.
- les espèces réactives de l'azote ou RNS reactive nitrogen species qui donnent entre autres des peroxydinitrites (ONOO<sup>-</sup>), du monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) et le radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>)
- les espèces réactives du chlore ou RCS reactive chlorine species comme l'acide hypochlorique HOCl.

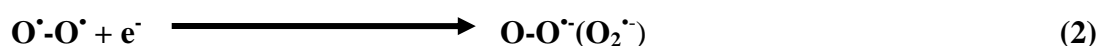
Enfin, il existe d'autres variétés d'entités oxydantes ou de radicaux, comme par exemple l'acide hydrobromique HOBr.

### ***1.2.2.1. Les espèces libres 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. Ce qui le rend par conséquent très instable avec une forte tendance à oxyder tous les composants qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour appairer l'un de ses électrons célibataires. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées.

#### ***1.2.2.1.a. Anion superoxyde : O<sub>2</sub><sup>•-</sup>***

L'Anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante :

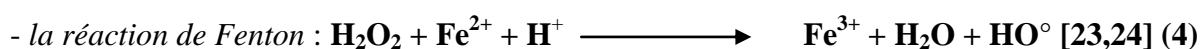
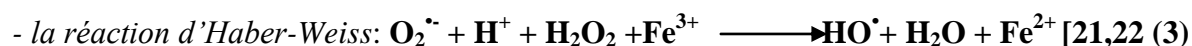


Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives [14]. Il est

produit au cours de réactions d'autooxydation de molécules telles que les quinones, de réactions enzymatiques (monooxygénases à cytochrome P450, NADPH oxydase, xanthine, oxydase, etc.), lors du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire et sous l'action de facteurs environnementaux tels que les radiations ionisantes (X, gamma) ou certains xénobiotiques [15]. En solution aqueuse, l'anion superoxyde se comporte comme un faible agent oxydant capable d'oxyder l'acide ascorbique ou des thiols. Par contre, c'est un fort agent réducteur pouvant réduire certains complexes de métaux. Ces réactions peuvent donner lieu à sa dismutation en générant de l'oxygène moléculaire et une autre espèce réactive (mais non radicalaire): le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il est également capable de se dismuter par voie enzymatique (via la superoxyde dismutase) ou spontanément [16]. Ainsi, tout système générateur d'anion superoxyde produit indirectement du peroxyde d'hydrogène. D'autres oxydases peuvent être directement à l'origine de la formation de celui-ci comme, par exemple, l'acyl-CoA oxydase, la NADH oxydase ou la glutathion oxydase [15].

#### ***1.2.2.1.b). Radical libre hydroxyle : OH•***

Le radical libre hydroxyle (OH•) est très réactif et diffuse facilement. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 10<sup>-6</sup> secondes. Il est théoriquement capable d'attaquer toutes les molécules (hydroxylation des cycles aromatiques, initiation des cycles lipoperoxydation), mais son action est limitée par sa très courte durée de vie [16-18]. Il peut également 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 [19, 20]. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme :



#### ***1.2.2.1.c). L'oxygène singulet : <sup>1</sup>O<sub>2</sub>***

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 [25]. Il réagit comme agent oxydant électrophile et peut attaquer tous types de molécules organiques (lipides, protéines, acides aminées, hydrate de carbone, thiols, phénols, nucléotides...). Il possède une facilité particulière à former des composés d'addition avec des liaisons insaturées (les doubles liaisons carbone-carbone des acides gras polyinsaturés). Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



#### I.2.2.1.d). Le radical peroxyde : $H_2O_2$

Il est aussi appelé dioxyde de dihydrogène ou « eau oxygénée ». Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène ERO même s'il n'a pas une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs, il possède une durée de vie pouvant atteindre plusieurs minutes. Il peut être obtenu soit par dismutation spontanée soit par dismutation catalysée par la SOD. Son potentiel oxydo-réducteur  $E_o = +0,66V$  est moyen comparé à celui de l' $O_2$  et de  $ONOO^-$  ce qui en fait est un oxydant médiocre, incapable d'oxyder les fonctions thiols [26]. Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



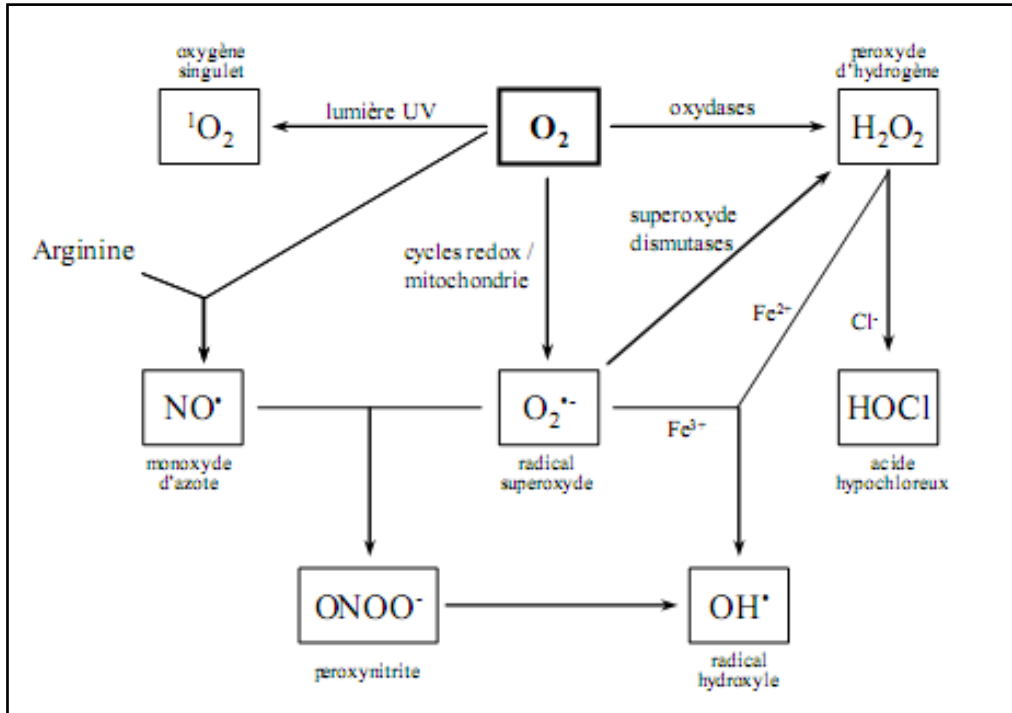
Soit par réduction univalent de  $O_2$  en deux étapes, grâce à l'intervention des enzymes.



#### I.2.2.2. Les espèces réactives de l'azote (RNS)

Le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) est issu de l'oxydation de l'un des azotes terminaux de l'acide aminé L-Arginine.  $NO^{\cdot}$  peut réagir avec une grande variété de substances et de radicaux libres et conduire, par exemple après réaction avec  $H_2O_2$ , à la formation de nitrite ( $NO_2^-$ ) ou de nitrate ( $NO_3^-$ ). Le peroxyde de nitrite ( $ONOO^-$ ) est formé suite à la réaction entre  $O_2^{\cdot-}$  et  $NO^{\cdot}$  avec une constante de vitesse de  $6,7109 L.mol^{-1}.s^{-1}$ [27]. La forme protonnée du radical peroxyde de nitrite ( $ONOOH$ ) est un puissant agent oxydant causant des dommages importants et similaires à ceux observés avec  $OH^{\cdot}$  [28].

La figure ci-dessous regroupe les différentes formes de ROS et RNS



**Figure 3: Mécanisme de production des ROS et RNS**

### **I.3. Production des radicaux libres**

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O<sub>2</sub> 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 [29].

Les sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories : endogènes et exogènes.

#### ***1.3.1. Sources endogènes***

Les sources endogènes de production de ROS et de RNS sont les mitochondries (respiration mitochondriale), les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages), ces dernières participant à la défense immunitaire de l'organisme. Des radicaux libres sont également produits au cours de la synthèse de molécules suite à des réactions biochimiques [30]. Et aussi, les maladies, telles que les désordres métalliques ou l'ischémie, sont également sources d'espèces pro-oxydantes ou encore radicaux libres.

### ***1.3.2.Sources exogènes : agents physiques et chimiques***

Une production d'ERO peut être engendrée par l'exposition à divers agents environnementaux physiques ou chimiques. Les facteurs environnementaux contribuent également à la formation d'entités radicalaires ou de ROS. Une production beaucoup trop importante d'entités réactives est observée dans le cas d'intoxication aux métaux lourds ou dans les phénomènes d'irradiation. En effet des études menées sur des plasmas d'enfants vivant dans des zones pétrochimiques polluées en Serbie ont montré une augmentation de 26% d'un marqueur de peroxydation lipidique (malondialdéhyde) et une diminution de 11% de l'activité de l'enzyme SOD [31]. De plus, des métaux lourds comme le cadmium, le mercure ou l'arsenic sont souvent trouvés dans l'environnement. L'homme y est de plus en plus exposés que ce soit par le sol, l'air ou l'eau. Des études ont montré que ces métaux lourds ont la capacité de générer des espèces radicalaires actives provoquant des dommages cellulaires importants en diminuant les activités enzymatiques et en lésant la bicouche lipidiques et les molécules d'ADN [32].

Les rayonnements ionisants, les rayons UV induisent la synthèse de radicaux libres ( $O_2^{\circ-}$ ,  $OH^{\circ}$ ,  $\frac{1}{2} O_2$ ) et de molécules génératrices de radicaux libres ( $H_2O_2$ ) [33]. En outre, des résidus de la fumée de la cigarette, l'alcool, ou même certains médicaments sont une source importante de radicaux libres par oxydation des composés au niveau du cytochrome P450 [25]. L'exposition exogène des cellules au peroxyde d'hydrogène, au peroxy-nitrique ou à des composés générateurs des ERO comme le paraquat (herbicide) entraîne la production d'ERO ou ROS tel que l'anion superoxyde dans le cas du paraquat. Le métabolisme des agents antitumoraux tels que l'adriamycine et la bléomycine constitue également une source de production des ERO [34]. Une alimentation pauvre en antioxydants ou lors d'un accroissement brutal de l'apport en oxygène peut également générer les radicaux libres.

## **I.4. Rôle physiologique des radicaux libres**

De façon physiologique, les espèces réactives radicalaires ( $OH^{\circ}$ ) ou non ( $H_2O_2$ ), existent dans la cellule et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables [35, 36]. Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie à l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles ont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire, agir en tant que second messager cellulaire, intervenir dans les voies de transduction du signal et ainsi réguler les fonctions cellulaires [37].

### ***1.4.1. Rôle dans 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. Après sa phagocytose par un macrophage, une bactérie se retrouve dans une vésicule appelée phagosome. Celui-ci va fusionner avec un lysosome pour donner un phago-lysosome. Alors, une succession de réactions appelées « explosion respiratoire » a lieu [38].

### ***1.4.2. Rôle dans la communication cellulaire***

Les ROS peuvent agir en tant que « molécule-signal » et ainsi 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 cellulaire [36, 41]. 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.

## **1.5. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres**

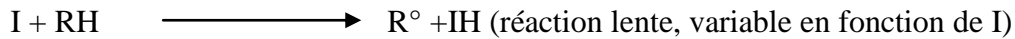
Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées [37, 20].

### ***1.5.1. Les lipides***

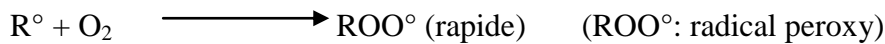
Les premières cibles des radicaux libres sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras mono- et polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles en raison de leur degré élevé d'insaturation [39,

40]. 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.

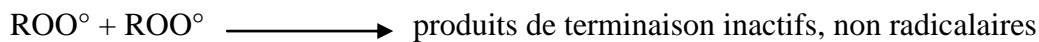
**INITIATION : I : initiateur**



**PROPAGATION:**



**TERMINAISON :**



**Schéma 1 : Mécanismes de la peroxydation lipidique**

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, de sa perméabilité et de l'excitabilité des membranes [41]. 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. La peroxydation de lipides fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN et être à l'origine de substances mutagènes [42].

**1.5.2. Les protéines**

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine [43,44]. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $Cu^{2+}$  et le  $Fe^{2+}$  peuvent être classées en deux catégories :

1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique,

2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) [43]. L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur [45].



Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS [46].

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 [26, 38-43].

### ***1.5.3. 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 [47].

### ***1.5.4. L'ADN***

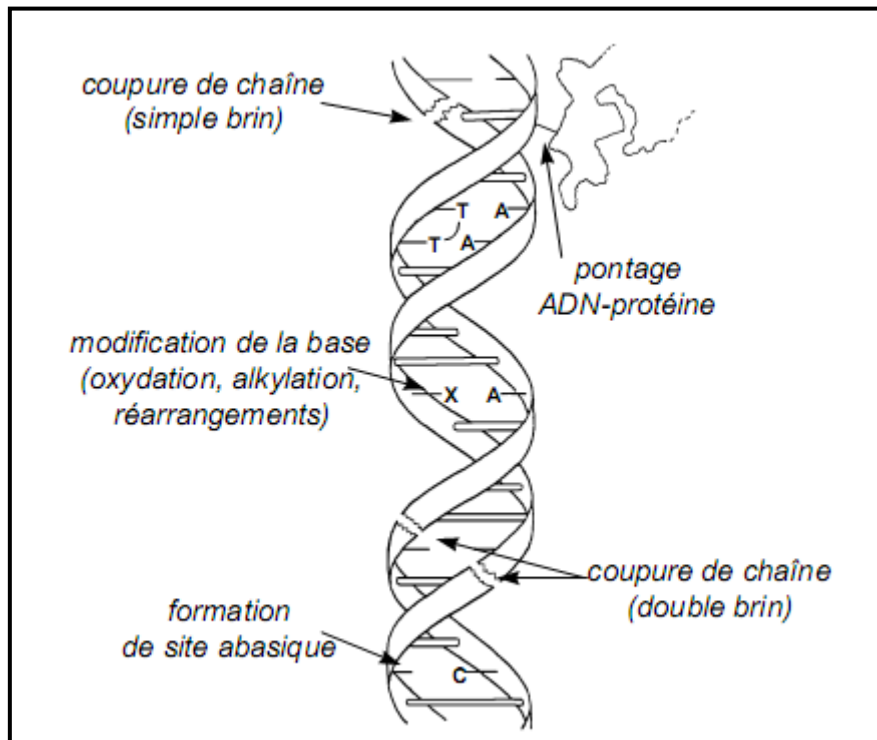
Il existe, au sein de la cellule deux types d'ADN : L'ADN nucléaire (ADNn) et l'ADN mitochondrial (ADMm). Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn [48-50].

Les réactions d'oxydations de l'ADN créent un grand nombre de dommages de l'ADN et peuvent être classées en deux catégories :

#### ***1.5.4.1. Oxydation directe***

Parmi ces dommages, nous pouvons citer les lésions de bases purines et pyrimidines. La plus abondante des bases oxydées est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)[51], en effet la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants tels que que l'OH<sup>•</sup> et le peroxytrite [52].

Le spectre des lésions de l'ADN est large [53-55], modifications des bases uriques et pyrimidiques, perte de bases (« sites abasiques cassures simple- ou double-brins, altérations des sucres (2-désoxyriboses) et aussi pontages ADN-protéines (Figure I.8).



**Figure 4 :** Lésions radio-induites de l'ADN [56]

#### ***1.5.4.2. Modification de base par fixation de produits secondaires de l'ADN***

Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation des lipides (dont le MDA et le 4-HNE) peuvent s'ajouter au groupe amines des bases de l'ADN et constituer ainsi une classe de dégâts oxydatifs de l'ADN [42, 57].

Les radicaux libres et en particulier  $\text{OH}^\bullet$ , 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 [29, 41]. 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.

Les radicaux libres peuvent être à l'origine de multiples lésions cellulaires. C'est pourquoi, ils seraient impliqués dans le développement de maladies telles que le cancer, les

maladies neuro-dégénératives et la pathogenèse des infections virales... Ils peuvent s'attaquer aux cellules du système immunitaire et donc altérer les réactions de défenses de l'organisme. Ils peuvent léser des neurones et entraîner leur mort. L'accumulation avec l'âge des radicaux et donc des dégâts qu'ils génèrent, seraient un des facteurs expliquant le vieillissement cellulaire [58].

## **I.6. Les stress oxydant et les pathologies**

Une production importante de ROS joue un rôle important dans la pathogenèse de nombreuses maladies. Ils sont impliqués dans l'ischémie/ré-perfusion, les maladies neurodégénératives, les cancers, le diabète, l'infarctus, l'hypertension mais aussi dans la formation des lésions vasculaires de l'athérosclérose [59, 60].

### **I.6.1. L'ischémie-reperfusion**

Ce phénomène a beaucoup été décrit au niveau du cœur [61]. Lors de l'ischémie, le glucose sanguin chute comme la glycolyse, la phosphorylation oxydative et la production d'ATP. La déplétion en ATP provoque d'une part une accumulation de l'AMP responsable d'une accumulation d'hypoxanthine et d'autre part une diminution de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase nécessaire au maintien du gradient d'ion sodium et potassium entre la cellule et le compartiment extracellulaire. Ce maintien n'étant plus assuré, une dépolarisation membranaire a lieu provoquant une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule à l'origine de la formation de ROS au niveau de la mitochondrie et de l'activation d'une protéase calcium dépendante comme la calpaïne [62, 63]. Les ROS associées à la calpaïne, vont convertir la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase dont l'accepteur final d'électron est l'oxygène générant des anions superoxydes et  $\text{H}_2\text{O}_2$  [64].

### **I.6.2. Les maladies neurodégénératives**

Des études ont montré dans des cerveaux de patient souffrant de la maladie d'Alzheimer beaucoup de marqueur du stress oxydant étaient retrouvés et il a été montré qu'ils aggravaient les symptômes associés à la maladie [65-67]. Dans la maladie de Parkinson, c'est la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire qui est responsable de la pathologie. L'auto-oxydation de la dopamine produit des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène dans cette même zone cérébrale. Ces neurones dopaminergiques soumis à des fortes concentrations en ROS peuvent dégénérer si les défenses antioxydantes ne sont pas suffisantes [64].

### **I.6.3. Le cancer**

Les espèces réactives semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisqu'elles peuvent être responsables de mutation dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer [68]. Les radicaux libres interviennent dans l'activation de pro-carcinogènes en carcinogènes créant des lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 [25].

### **I.6.4. L'âge**

Deux théories expliquent le vieillissement, l'une génétique et l'autre métabolique. La première rend compte de la diminution des télomères aux cours de la réplication cellulaire et la seconde de l'accumulation des déchets métaboliques produit par l'organisme. Les marqueurs du stress oxydant sont élevés chez les personnes âgées [69]. Le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production par les mitochondries de radicaux [70].

### **I.6.5. Le diabète**

Lors de la pathologie diabétique, l'hyperglycémie constitue un stress oxydant [71]. Elle est responsable de l'augmentation de la glycolyse qui par accroissement du potentiel de la membrane mitochondriale augmente la formation de radicaux. De plus, elle inhibe la glycéraldéhyde -3 phosphate déshydrogénase ce qui diminue la formation du cofacteur de l'homéostasie redox [72].

### **I.6.6. L'athérosclérose**

Le mot athérosclérose a été proposé en 1904 par Félix Marchand à partir des mots de racine grecque « athéré » qui signifie bouillie et « skléros » qui signifie dur.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) décrivait l'athérosclérose en 1958 comme « une association variable de remaniement de la couche interne des artères de gros et moyen calibre. Elle consiste en une accumulation focale de graisses (les lipides), de glucides complexes (les sucres), de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modification de la structure interne de l'artère »[73].

L'athérosclérose est donc responsable de la formation de plaques qui se développent à l'intérieur de l'artère et vont augmenter de volume. A un stade évolué, ces plaques peuvent

boucher l'artère. Très souvent, des phénomènes inflammatoires et sanguins précipitent les événements car la plaque d'athérome peut rapidement générer la formation de caillots de sang qui vont obturer l'artère.

## **II. Les systèmes de défenses : les molécules antioxydantes**

Pour lutter efficacement contre les dommages oxydants, l'organisme est équipé de plusieurs systèmes de défense comme les systèmes de réparation (enzymes réparatrices de l'ADN) ou d'élimination de molécules endommagées par les ROS. Les systèmes dits de prévention empêchent la formation de radicaux libres, notamment par chélation des métaux de transition. Des protéines telles que l'albumine, la céruloplasmine [74] ou la ferritine [75] ainsi que des hormones (œstrogène [76] ou mélatonine [77]) participent également, de façon indirecte, à la lutte contre le stress oxydant. Enfin, une grande variété de molécules, désignées sous le terme d'antioxydants, assurent une protection des sites biologiques des plus efficaces, du fait d'une élimination directe des molécules pro-oxydantes.

### **II.1. Définition**

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 [35,78].

Les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : 1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. 2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres [79].

### **II.2. Historique des antioxydants**

Le terme antioxydant était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. A la fin du XIX<sup>ème</sup> et au début du XX<sup>ème</sup> 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 [80].

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants concernent la limitation de l'oxydation des acides gras insaturés, cause du rancissement. L'activité antioxydante est

facilement mesurée en enfermant des corps gras dans des récipients hermétiques avec de l'oxygène, puis en vérifiant le taux d'absorption de ce dernier. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants. 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 les cellules.

### **II.3. Origine des antioxydants**

Selon le type, les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ROS, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant du glutathion (GSH), molécule biologique antioxydante d'importance. Les antioxydants sont donc des régulateurs du taux de pro-oxydants dans l'organisme.

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories avec :

- les enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme.
- les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules.

### **II.4. Famille d'antioxydants**

Il existe trois familles d'antioxydants :

- ✓ Enzymatiques,
- ✓ Moléculaires naturels,
- ✓ Synthétiques.

#### ***II.4.1. Les antioxydants enzymatiques***

Les enzymes antioxydantes sont les premières lignes de défenses contre les entités oxydantes. Face à la production permanente de ROS, les organismes vivants ont développé des systèmes de défense qui les protègent des dommages liés aux formes radicalaires. Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal. En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser. Elles sont au nombre de quatre et fonctionnent en complémentarité.

### ***II.4.1.1. Superoxyde dismutase***

Ce type d'antioxydant est composé d'enzymes, à action directe sur les ROS. Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$  ; selon l'équation [81]



Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes : la catalase et la glutathion peroxydase. D'après l'équation ci-après :



La SOD existe sous trois isoformes chez les mammifères qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique:

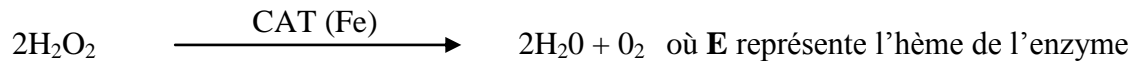
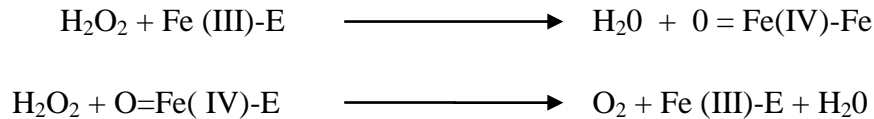
- une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD),
- une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et
- une forme extracellulaire (EC-SOD).

Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire [82]. La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries.

Les SOD à base de cuivre et de zinc conduisent à des constantes de vitesse de réaction de l'ordre de  $1,6.10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ [36].

### ***II.4.1.2. Catalase***

Le peroxyde d'hydrogène généré notamment lors de la dismutation de l'anion superoxyde est dégradé par la catalase par une transformation en  $H_2O$  et  $O_2$ . Cette enzyme est formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacun un groupe hème, qui constitue les sites actifs de la CAT. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupe hème réalise une coupure hétérolytique au niveau de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène. Ce qui crée une molécule d'eau et un groupement Fe (IV) très oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène. Cette réaction est illustrée par les deux équations suivantes :



Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. [83].

#### ***II.4.1.3. Glutathion peroxydase et réductase***

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) [84]. Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique [83].

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

#### ***II.4.1.4. les 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. Ainsi, 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)[83].



## II.4.2. Les antioxydants non enzymatiques ou moléculaires

Les antioxydants non enzymatiques ou moléculaires ne sont pas, pour la plupart, synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Il en existe deux types : les antioxydants endogènes et les antioxydants exogènes.

### II.4.2.1. Les antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes sont fabriqués par les cellules de notre corps. On distingue : le glutathion et l'acide urique.

#### II.4.2.1.1. Le Glutathion

Les thiols, composés contenant le groupement sulfhydryle (SH), jouent un rôle important dans la protection des systèmes biologiques contre les agressions oxydantes. Ils sont aussi impliqués dans la transduction des signaux biologiques et la régulation métabolique et de l'expression des gènes. Parmi les thiols, le glutathion (GSH) est le plus abondamment présent dans le milieu intracellulaire ( $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>).

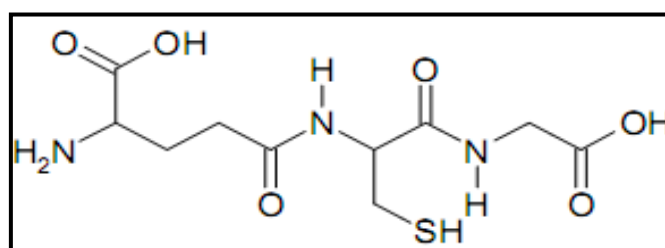
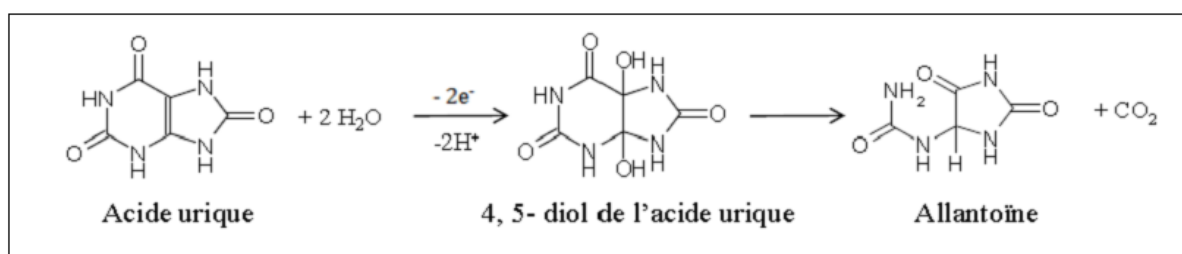


Figure 5 : Formule développée du Glutathion

Le GSH est un tripeptide composé de trois acides aminés : l'acide L-Glutamique, la L-Cystéine et la L-Glycine (Figure 9). Il est présent en grande quantité dans les organes exposés aux toxines tels que les reins, le foie, les poumons ou les intestins. Au contraire, il est peu présent dans les fluides biologiques. Le GSH joue un rôle primordial dans les cellules où il participe à la synthèse des protéines et de l'ADN, au transport des acides aminés et plus généralement à la détoxification cellulaire. Enfin, le glutathion (GSH) et les thiols en général, sont d'excellents réducteurs, donneurs d'hydrogène et de puissants piègeurs de radicaux, réagissant directement avec le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde, le radical hydroxyle [87] et le monoxyde d'azote [88].

#### II.4.2.1.2. L'acide urique

L'acide urique est un antioxydant hydrosoluble dont la formule chimique est  $C_5N_4O_3H_4$ . En 1981, Ames et al ont montré que l'acide urique réduit les radicaux peroxyde [89], hydroxyle, du monoxyde et du dioxyde d'azote. L'acide urique est également un neutralisant puissant de l'ozone, de l'oxygène singulet, de l'acide hypochloreux et du radical superoxyde. Fichter et Kern [90], utilisant une électrode d'oxydes de plomb, sont parmi les premiers ayant montré que l'oxydation de l'acide urique est biélectronique et irréversible et que les produits d'oxydation dépendent du milieu d'étude (allantoïne en milieu neutre et urée en milieu acide). En 1965, Struck et Elving ont proposé un mécanisme d'oxydation de l'acide urique sur électrode en graphite pyrolytique (figure 6).



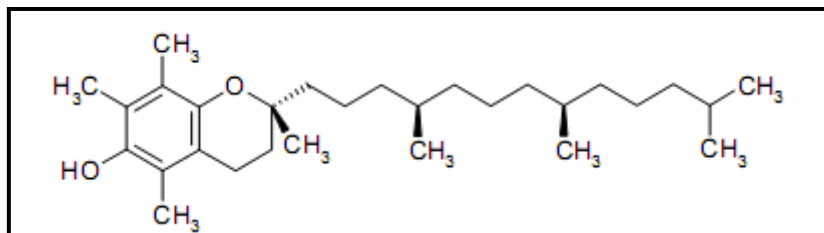
**Figure 6 :** Mécanisme d'oxydation de l'acide urique en milieu neutre sur une électrode en graphite pyrolytique [91].

#### II.4.2.2. Les antioxydants exogènes

Ce sont que nous consommons tous les jours dans notre régime alimentaire, notamment ceux contenus dans les fruits et légumes.

##### II.4.2.2.1. La vitamine E (ou $\alpha$ -tocophérol)

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celle de la famille des tocophérols (alpha, beta, gamma, delta) ( $E^\circ = 0,48 V$ ) [92]. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines.



**Figure 7:** Formule développée de la Vitamine E (ou  $\alpha$ -tocophérol) (T-OH)

La vitamine E est la molécule antioxydante liposoluble la plus abondante de notre organisme. Elle est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang liée aux lipoprotéines. Elle est chargée de neutraliser les radicaux libres en excès, et agit de deux façons différentes, soit en piégeant directement les ROS, soit en régulant à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NAD(P)H réductase. [93].

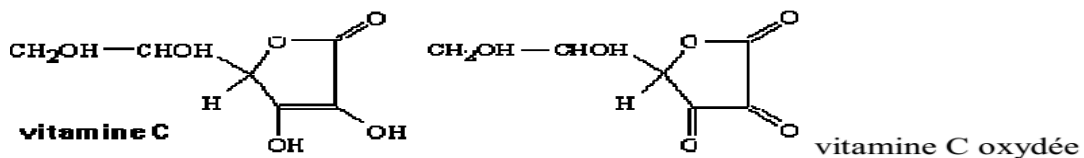


Dans cette réaction de piégeage, la vitamine E devient à son tour radicalaire et la vitamine C la régénère.

La vitamine E n'est pas bio synthétisée. Elle est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive. On la trouve aussi en moindre quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine, les poissons gras.

#### **II.4.2.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)**

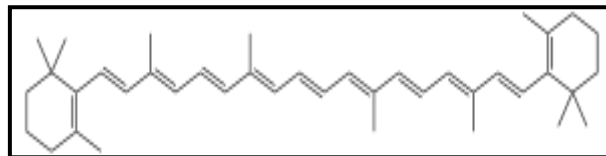
La vitamine C ou acide ascorbique (AA) (Figure 13) est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires (compartiments hydrophiles) [93], présent sous sa forme anionique ( $AH^{-}$ ) au pH physiologique. Elle est capable de réagir directement sur les ROS et en particulier  $O^{2-}$  (à pH 7,4) et se transforme en vitamine oxydée (figure I.13) Une fois la vitamine C oxydée elle perd son pouvoir antioxydant. Son oxydation a été étudiée sur différentes électrodes ; à goutte de mercure, vitreux et platine [94,95]. La vitamine C est importante pour tous les animaux, y compris les hommes, parce qu'elle est vitale à la production de collagène.



**Figure 8 :** Vitamine C (acide ascorbique) et sa forme oxydée

#### II.4.2.2.3. Vitamine A

Le précurseur de la vitamine A est le  $\beta$ -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 [96].



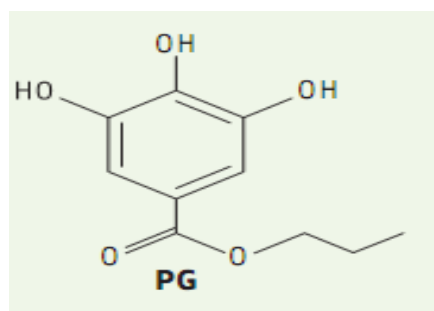
**Figure 9 :**  $\beta$ -carotènes

#### II.4.3. les antioxydants synthétiques

Comme antioxydants synthétiques on peut citer :

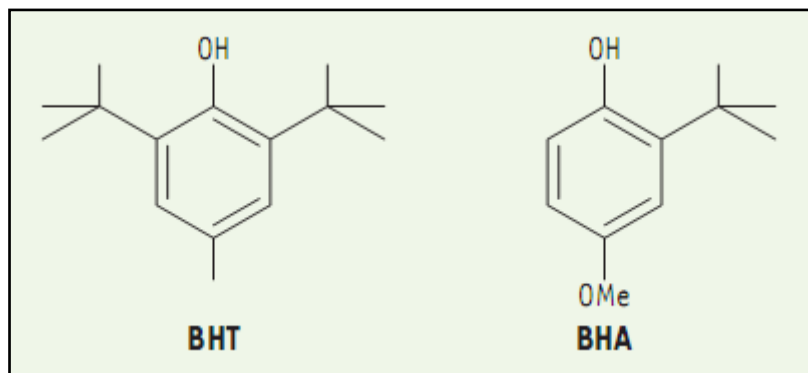
- Le butylhydroxyanisole (BHA),
- le butylhydroxytoluène (BHT),

Les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles.



**Figure 7 :** Formule du gallate de propyle

Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement [97,98].



**Figure 8 :** Formules développées du BHT et du BHA

#### ***II.4.4. les antioxydants phénoliques***

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de hauts poids moléculaires.

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines.

##### ***II.4.4.1. Les antioxydants phénoliques naturels***

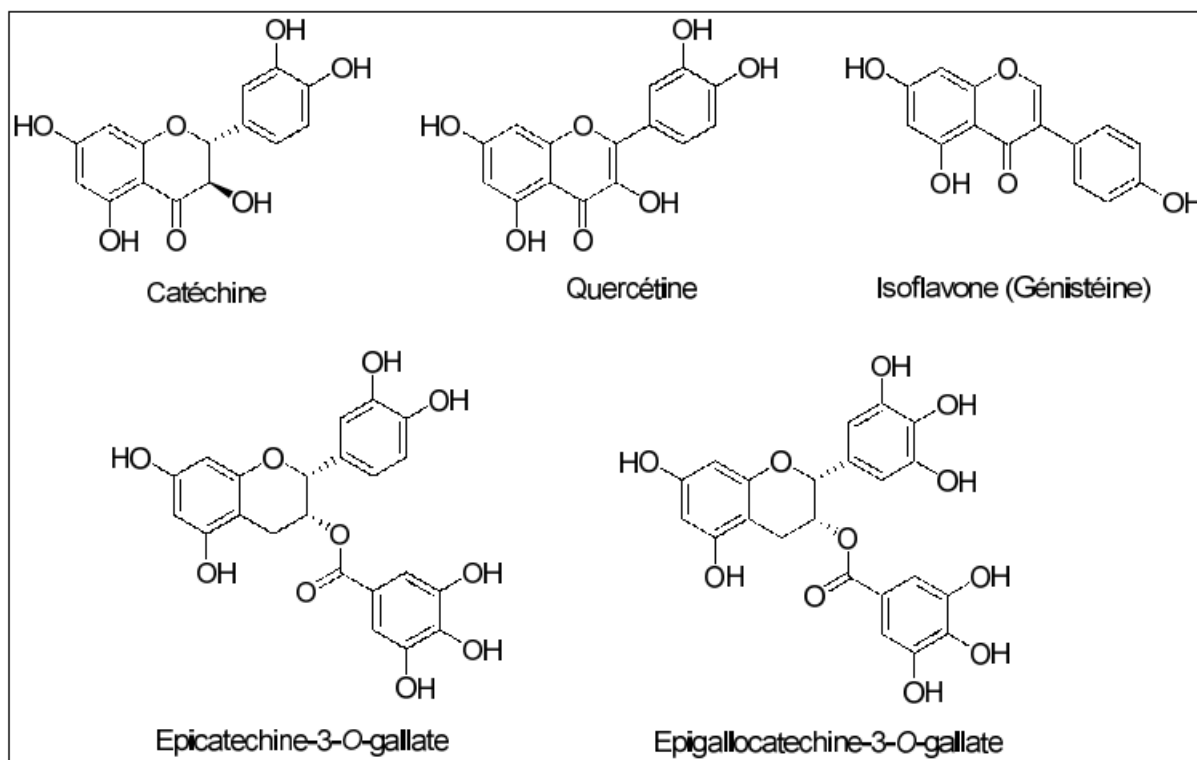
Les antioxydants présents dans le raisin, le thé, le café ou les fruits sont souvent de type phénolique. Les composés phénoliques présents dans les denrées alimentaires peuvent être séparés entre les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

###### ***II.4.4.1.1. Les flavonoïdes***

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont : flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones ou acide gallique, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. Les études chez l'homme ont permis de montrer que les flavonoïdes, et notamment

les isoflavones contenus dans le soja, permettent de réduire le taux de mauvais cholestérol [99].

Cependant le grand intérêt a été donné à leur potentiel de prévenir les maladies cardiovasculaires. Le thé, les oignons, ail et les pommes sont la principale source d'apport des flavonoïdes (le thé 48% de la prise totale, les oignons 29% et les pommes 7%) [100].



**Figure 9** : Structure de quelques flavonoïdes

Parmi les flavonoïdes, il existe aussi les anthocyanes qui sont présents dans un certain nombre de végétaux tels : myrtille, mûre, raisin noir, aubergine, prune, bleuet (airelle bleue du Canada), mauve, etc. Ils donnent leur couleur aussi bien aux feuilles d'automne qu'aux fruits rouges.

Des études montrent que les anthocyanines exercent une influence bénéfique sur toute une variété de problèmes de santé. Une des raisons de cette influence réside dans leurs propriétés antioxydantes [101]. Cependant, leur biodisponibilité reste faible.

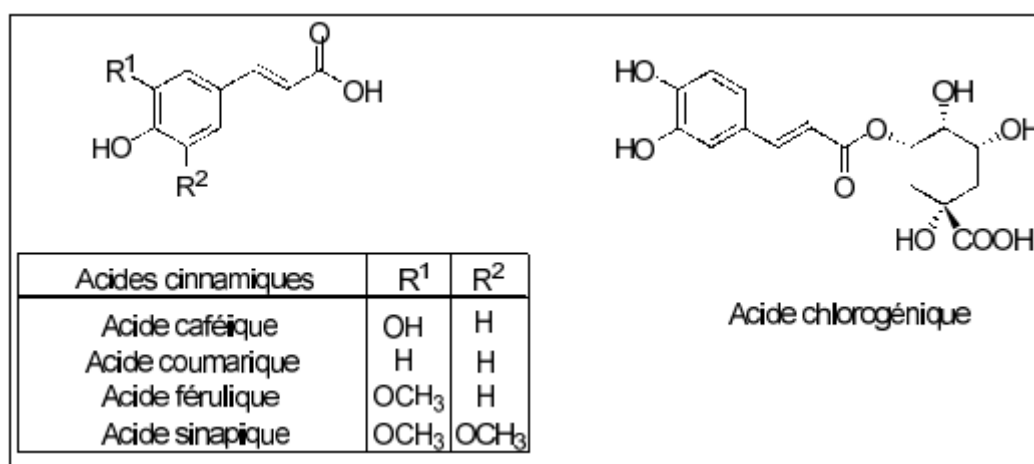
#### **II.4.4.1.2. Les non flavonoïdes**

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques et les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

### II.3.4.1.2.1. Les acides phénoliques

Les composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (**Figure 18**). Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique qui a très largement démontré son activité antioxydante, l'acide férulique et l'acide sinapique [102].

On trouve aussi des dérivés de ces acides, comme l'acide chlorogénique présent dans les pommes. Ce dernier s'avère être un antioxydant intéressant, à tel point que de nombreux laboratoires tentent d'en faire sa synthèse [103].



**Figure 10** : Structure de dérivés de l'acide p-hydroxycinnamique

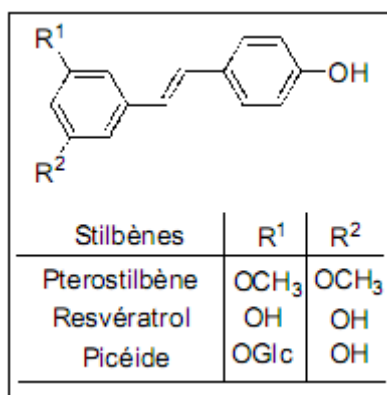
### II.4.4.1.2.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons  $\pi$  sur la totalité de la molécule.

Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité LDL. Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires [104].

Les plus abondants dans le raisin sont le trans-resvératrol et son dérivé glucosylé : lepicéide, ainsi que les dimères comme le resvératrol qui présent dans le raisin noir et dont l'activité antioxydante est probablement associée à sa capacité à régénérer la vitamine C [105].

Ce composé intervient également dans différents mécanismes biologiques (inhibition de l'agrégation des plaquettes, antagonisme aux récepteurs à oestrogènes, propriétés anti-inflammatoires, etc.)[106].



**Figure 11** : Structure chimique de quelques stilbènes

#### ***II.4.4.2. Les antioxydants phénoliques de synthèse***

Il existe aussi de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels.

Une équipe espagnole a synthétisé des acides gras phénoliques qui ont montré après des études physico-chimiques un rôle important dans la capacité anti radicalaire [107].

Un nouveau polyphénol dendritique a été synthétisé, et a montré une forte capacité antioxydante et protectrice des LDL in vitro contre les attaques des radicaux libres [108].

### **III. Généralités sur les denrées alimentaires**

Les aliments que nous allons décrire font partie de la classe des antioxydants exogènes qui sont apportés au cours de notre alimentation, ils ont été analysés au cours de cette étude.

#### **III.1.L'ail**

L'ail est une plante aromatique connue depuis l'antiquité. Bien que de nos jours elle soit principalement utilisée pour ses vertus culinaires, en prêtant sa saveur piquante à divers mets, on lui a attribué diverses fonctions au cours du temps. Considérée aussi bien comme sacrée, magique ou protectrice selon certains, elle a aussi été méprisée à cause de sa forte odeur. La Chine est le plus gros producteur mondial d'ail. En Europe, les cultures sont concentrées dans les pays méditerranéens (Espagne, France, Italie).



D'un point de vue botanique, la plante que nous connaissons sous le nom d'ail est en réalité une des trois cents espèces du genre *Allium*. Son nom complet est l'ail cultivé, de son nom scientifique *Allium sativum* [109]. Il s'agit d'une plante herbacée bulbeuse de la famille des Alliaceae (anciennement classée sous les Liliaceae) où sont aussi classés les oignons, l'échalote, la ciboulette ou encore le poireau.

L'ail semble être originaire d'Asie Centrale car il constitue un des plus anciens signes de l'écriture asiatique. Dès 3200 à 2800 avant J.-C., on retrouve cet aliment dessiné dans les fresques des pyramides de l'Égypte Ancienne. Ses propriétés médicinales sont vite reconnues. Dans la médecine égyptienne, on lui attribuait une vingtaine de propriétés pour soigner ou apaiser les maladies cardiaques; les maux de tête, de gorge; les morsures ou encore les tumeurs. On retrouve ces propriétés dans le codex Ebers qui est un livre médical datant de 1500 avant J.-C. En Italie, l'armée l'utilisait comme vermifuge dès le I<sup>er</sup> siècle après J.-C. En Grèce, les athlètes des premiers jeux olympiques mâchaient de l'ail parce qu'on lui prêtait des propriétés stimulantes. En Inde, il servait d'antiseptique pour les blessures et les ulcères. En Angleterre, l'ail est utilisé dès le 16<sup>ème</sup> siècle pour ses vertus aphrodisiaques avérées ou supposées; les marins s'en servaient pour lutter contre les séquelles dues au scorbut. En France, Pasteur étudie ses vertus antibiotiques en 1858. Pendant les 2 guerres il est utilisé comme antiseptique contre la gangrène. Bon nombre de propriétés pharmacologiques et thérapeutiques lui sont encore aujourd'hui attribuées.

### **III.1.1. Vertus et composition**

De manière générale, on attribue à l'ail des qualités: antibactérienne, antibiotique, anticancéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypolipémiante, hypotensive, inhibitrice de l'agrégation plaquettaire, expectorante et immunostimulante ! C'est pour ces différentes raisons qu'il serait prescrit lors d'hypertension, d'hypercholestérolémie, de bronchite, de maux de gorge ou lors de calculs urinaires [110]. Diverses études ont démontré la capacité antioxydante [111] de l'ail, l'ail aurait aussi des vertus antifongiques et agirait contre les mycoses digestives [110]. Etant donné les nombreuses qualités qu'on lui suppose, l'ail a beaucoup été étudié. Pour essayer de comprendre les capacités médicinales qui lui sont accordées, il faut examiner sa composition. La composition de l'ail frais est représentée dans le tableau ci-après :

**Tableau 1** : Composition de l'ail frais [112]

<b>Composés</b>	<b>mg/g m.h.</b>	<b>Composés</b>	<b>mg/g m.h.</b>
Eau	620-680	Adénosine	0.1
Carbohydrates	260-300	Saponines	0.4-1.1
Fructosanes	220-250	Vitamines	0.15
Fibres	15	Minéraux	7
Protéines	15-21	Sulfures	2.3-2.7
Acides aminés	10-15	Azote	6-13
Composants organosulfurés	11-35	Lipides	1-2
β-Sitostérol	0.015	Acides phénoliques	0.8
<b>*m.h./ matière humique</b>			

Outre son apport en vitamines et minéraux, l'ail contient des polysaccharides (cellulose et fructane), des acides aminés et des enzymes (aliinase et peroxydase), mais ses qualités pharmacologiques sont principalement attribuées à ses composés soufrés, tels que l'alliine, l'allicine ou l'ajoène. L'alliine représente 0,24% de la masse totale du bulbe d'ail frais. L'ail frais produit 1,3 à 6,6 mg d'allicine/g d'ail selon la variété et l'origine de la plante [113]. Il renferme également des substances stéroïdiques, dont des saponines, qui joueraient un rôle dans ses capacités médicinales [109,114].

Les effets de l'ail sur les maladies cardiovasculaires semblent plus significatifs. En effet, des études les évaluant lors de la consommation d'un supplément ou d'extrait d'ail, montre une légère diminution du taux de cholestérol total et des triglycérides sanguins.

### **III.2. Le café**

Le café constitue l'une des boissons les plus consommées au monde. Sa composition varie selon la variété de café, le mode de production des grains de café vert, et les conditions de leur torréfaction. On estime à 400 milliards le nombre de tasses de café bues par an dans le monde, soit environ 12 000 tasses par seconde (source : International Coffee Organization). Il existe un grand nombre d'espèces de caféiers (plus de 80) mais seules deux d'entre elles sont réellement exploitées dans le monde : *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* [115]. Le café robusta constitue la variété la plus répandue de *Coffea canephora*. Dans le cas de notre étude nous avons utilisé le café arabica.

### **III.2.1. Composition du café**

La composition du café est très complexe, avec plus d'une centaine de substances chimiques identifiées. Elle est également variable car les espèces, les variétés végétales et les procédés technologiques contribuent à la diversité des caractéristiques organoleptiques des cafés.

La composition chimique du café est dominé par les hydrates de carbone, incluant les polysaccharides (cellulose), les dixaccharide (sucrose) et les monosaccharides (glucose, galactose, fructose, manose, mannose, xylose et ribose) [116], les lipides comme les triglycérides (75%).

Le café (en tant que boisson) présente l'avantage de posséder un profil phénolique simple, majoritairement représenté par l'acide chlorogénique (dérivé hydroxycinnamique): de 250 et 750 mg/L [117]. Ceux-ci ont l'avantage d'être très bien assimilés dans l'organisme et possèdent un pouvoir antioxydant très puissant. On trouve d'autres antioxydants dans le café notamment le kahwéol et le cafestol, ceux-ci agiraient au niveau du foie ou des reins. Plusieurs constituants du café sont susceptibles de chélater certains ions métalliques, comme par exemple le fer ferreux, et donc d'avoir une activité anti-oxydante en limitant la dégradation de l'ADN. C'est le cas des polyphénols (principalement l'acide n-chlorogénique) et des mélanoidines (polymères bruns formés par la réaction de Maillard au cours de la torréfaction) [118].

### **III.3. Le thé**

Le thé encore appelé (*Camellia sinensis*) est également l'une des boissons les plus consommées dans le monde après l'eau. Cette plante est connue depuis plusieurs millénaires, en particulier par les populations asiatiques qui lui attribuaient des propriétés médicinales. Il est consommé en raison de sa saveur, ses caractéristiques aromatiques et effets bénéfiques pour la santé. 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 [119].

#### **III.3.1. Composition du thé**

Le thé est principalement riche en composés phénoliques, puisque ceux-ci représentent le tiers de la matière sèche de la feuille; les feuilles de thé contiennent surtout des flavonoïdes et méthylxanthine (caféine et théobromine). Les principales classes des flavonoïdes du thé sont les flavonols et les flavanols qui représentent 30 à 42% de la masse sèche des feuilles les

flavonols du thé sont la quercétine, le kaempférol, la myricitine et leurs glycosides [120]. Des analyses d'extraits de thé par CLHP et CLHP-MS ont identifié la présence des flavonols liées à des groupements glycosyls (glucose, rhamnose, arabinose,...). Le thé vert contient aussi une quantité significative d'acides phénoliques (acide gallique, acide coumarique,...)[121].

### **III.3.2. L'activité antioxydante du thé**

L'activité bénéfique de thé vert sur la santé est essentiellement attribuée aux propriétés antioxydantes de ses polyphénols. Les polyphénols du thé vert sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les espèces oxygénées réactives (EOR) par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène, mais aussi, en chélatant les ions des métaux de transition sous des complexes inertes. De nombreux travaux scientifiques ont rapporté que les catéchines du thé vert ont un pouvoir antioxydant plus puissant que celui de la vitamine C et E [122,123].

## **IV. Mode de détection et de conversion des substances chimiques par voie électrochimique**

### **IV.1. Généralités sur les électrodes modifiées**

Le concept d'électrodes modifiées est apparu il y a une vingtaine d'années en vue d'améliorer la réactivité et surtout la sélectivité des réactions électrochimiques. Les travaux effectués ces dernières années se situent essentiellement à l'interface entre la chimie et la physique. Ces derniers temps, différentes stratégies ont été employées pour la modification de l'électrode. 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. Pour autant, les motivations sont communes :

- (i) l'amélioration de la sélectivité et de la sensibilité de la mesure électrochimique,
  - (ii) la réduction des problèmes d'adsorption des produits d'oxydation à la surface de l'électrode.
  - (iii) la prévention de réactions indésirables rivalisant cinétiquement avec les réactions ciblées.
- Sans oublier les motivations d'ordres économique et temporel par le fait que ces méthodes sont moins coûteuses et moins consommatrices de temps par rapport aux autres méthodes analytiques classiques. Pour ces raisons, les électrodes chimiquement modifiées sont

largement décrites comme des outils analytiques sensibles et sélectifs et sont adoptées dans différents domaines d'application : analyse en biologie clinique, suivi des procédés agroalimentaires, contrôle de l'environnement...

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 [124-126]. Depuis l'électropolymerisation du pyrrole par Diaz et ses collaborateurs [127], les électrodes modifiées ont été essayées dans des domaines d'applications divers : photosensibilisation, électrochromisme, anti-corrosion [128], batterie et accumulateur de faible poids, et également électrocatalyse [129, 130]. 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) et ceux ayant des vertus thérapeutiques (antioxydant). 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 et d'évaluation d'antioxydant.

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 [131] 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 [132] 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 [133, 134]. 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 [135, 136].

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.

Récemment une électrode de carbone vitreux modifiée avec 4, 4'-Oxydiphénylene Bisdiazonium tétrafluoroborate a été utilisé comme un capteur voltampérométrique sensible pour les flavonoïdes [137]. Un système de production enzymatique contrôlée de radicaux superoxydes basé sur la xanthine oxydase a été utilisé. L'ajout d'antioxydants facilité par la décomposition du radical en plus de la dismutation spontanée [138]. L'oxydation électrochimique des acides caféïques, chlorogéniques, sinapiques, féruliques et p-coumariques a été étudiée par voltamétrie cyclique sur une électrode de carbone vitreux et modifié de carbone vitreux [139] La co-immobilisation du cytochrome C et XOD sur

électrode d'or modifiée et appliquée à la détermination de la capacité antioxydant de l'ail [140].

Dans ce contexte, les électrodes chimiquement modifiées sont une voie prometteuse pour l'analyse de traces de métaux et des molécules antioxydantes 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.

#### ***IV.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.

##### ***IV.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. [141] qui ont étudié la liaison de l'ion cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) par une fonction amide à la surface d'une électrode de carbone vitreux.

##### ***IV.1.1.2. Modification par adsorption***

Cette stratégie a été adoptée par plusieurs auteurs [142-144]. 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. Ces deux types d'adsorption sont influencés par la nature et la charge du métal, la structure chimique du produit organique ou inorganique et le type d'électrolyte [145].

#### *IV.1.1.2.1. 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 Walls. 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.

#### *IV.1.1.2.2. 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.



### ***IV.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 [146]. Une étape importante dans le développement des polymères conducteurs s'est produite en 1979 quand Diaz et ses collaborateurs [147] ont montré que les films de polypyrroles synthétisés par électropolymerisation présentaient une conductivité électrique élevée et une bonne homogénéité [148]. Puis, d'autres polymères ont pu être obtenus par voie électrochimique : polyzulène, polythiophène, polyindole [149], polycarbazole [150], polyfluorènes [151].

Les premières électrodes modifiées par des complexes possédant un groupement électropolymérisable ont été décrites par Meyer et ses collaborateurs [152]. 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 [153] et porphyrines [154].

La modification d'une surface d'or par des polymères a suscité beaucoup d'intérêt depuis la première publication de Nuzzo et al. [155]. 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. [156] 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 [157]

Un des axes majeurs des méthodes électrochimiques est le développement des électrodes modifiées dans des études antérieures d'électrodéposition des métaux nobles (Ag, Au, Pt, Pd...) [158]. 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 doser le mercure en utilisant la voltamétrie linéaire par redissolution anodique [159]. 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 [160].

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 [161].

Un des grands progrès dans l'électrochimie réside dans l'utilisation des électrodes chimiquement modifiées en vue d'éliminer certains polluants organiques et/ou inorganique de faire l'electroanalyse des composés.

Les méthodes chimiques et photochimiques ont été remplacées par des électrodes modifiées par des oxydes [162] ou par des électrodes de diamant dopé au bore [163]. 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<sub>2</sub>, RuO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub> et PbO<sub>2</sub>) [164].

#### **IV.1.2. Modification directe : les électrodes à pâte de carbone**

L'électrode à pâte de carbone (EPC) fut introduite dès 1958 par R. N. Adams [165], les propriétés de ce type d'électrode dépendent de la pureté des composés utilisés pour préparer la pâte, de la proportion carbone / agent liant [166], de la taille des particules de graphite, du traitement et de mode de renouvellement de la surface de l'électrode [167]. L'électrode à pâte de carbone utilisée est préparée en mélangeant de la poudre de graphite avec de l'huile paraffine en utilisant un mortier et un pilon. La pâte de carbone préparée est encastrée dans un dans un corps d'électrode, comme une seringue en plastique ou un tube de verre. Deux types d'électrodes doivent être envisagés selon le liant assurant la cohésion de la pâte est conducteur ou non conducteur.

##### ***IV.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 ou le bromoforme. La vitesse de transfert des électrons diminue avec l'addition du liant [168]. Le rapport liant-carbone est déterminé selon la consistance et les propriétés désirées de la pâte. Généralement ces rapports sont de 0.4g de paraffine pour 1.6g de carbone ou 2ml de nujol

pour 1g de carbone. Dans le cas de ces électrodes, seule la fraction de composé électroactif se trouvant à l'interface pâte de carbone-electrolyte 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 électroanalyse des solutions [169]. Yao et al. [170] ont appliqué la méthode décrite par Kuwana [171] 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.

#### ***IV.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 voltampérométriques 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 réactions superficielles, 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.

#### ***IV.1.3. Les électrodes métalliques***

Les électrodes métalliques se répartissent eux-mêmes en électrodes métalliques purs d'où un seul constituant, le métal lui-même, et électrodes à plusieurs constituants. Dans les premiers on rencontre des poudres métalliques, des fils, des feuilles, des films évaporés ou des métaux colloïdaux. Dans les secondes on trouve les métaux supportés ou additionnés.

##### ***IV.1.3.1. Electrodes à base des métaux purs***

Les métaux tels que le platine, l'argent, l'or, l'acier et le titane sont depuis longtemps utilisés [172] en raison de leurs excellentes propriétés électriques et mécaniques. Ces électrodes sont

très sensibles à des phénomènes d'adsorption. Pour ces électrodes on peut procéder par électrodéposition, pour modifier la surface de l'électrode.

#### ***IV.1.3.2. Electrodes à base des métaux supportés ou additionnées***

Le métal peut être simplement dispersé sur un support dans le but d'accroître sa surface spécifique sans que le support ne joue de rôle catalytique. Il peut encore être additionné de certaines substances qui améliorent son activité. Enfin, il arrive que le support soit catalytiquement actif et que l'on ait ce que l'on appelle un catalyseur bifonctionnel. Comme exemple important de ce dernier cas, on peut citer les catalyseurs dans lesquels le platine et le palladium sont supportés sur le charbon actif pour l'oxydation de l'acide formique [173]. Les propriétés d'un catalyseur métallique dépendent le plus souvent de l'état de dispersion de la phase active, de la nature du support et du précurseur utilisé, ainsi que du protocole opératoire.

Le Dépôt de précurseur s'effectue par imprégnation (faible interaction précurseur/support), par échange de ligands ou par échange d'ions. Quel que soit la méthode utilisée, l'état de dispersion du métal dépendra de la surface spécifique du support, c'est-à-dire soit directement (cas de l'imprégnation) soit indirectement (cas de l'échange) car le nombre de sites d'échange est en général proportionnel à la surface du support. La méthode par imprégnation consiste en un dépôt du métal sur la surface du support par adsorption physique (interaction par force de Van Der Waals). Dans ce cas la faible interaction précurseur/support ne permet généralement pas d'obtenir une dispersion très élevée.

La méthode par échange ionique consiste en un échange anionique ou cationique, entre les solutions de précurseur métallique et certains sites particuliers du support. Cette méthode est particulièrement adaptée à l'obtention d'une grande dispersion de la phase active que l'on veut déposer. La plupart des supports oxydes peuvent adsorber soit des acides soit des bases. Toutefois le point d'équilibre pour ce caractère amphotère se situe dans des zones de pH fort différentes selon la nature du support.

La méthode par échange de ligands est effectuée dans le cas où le précurseur est un organométallique. L'échange peut se produire entre les groupements hydroxyles de surface et les ligands du précurseur. Par conséquent ceci aboutit à une forte interaction précurseur /support.

#### ***IV.1.4. Les électrodes non métalliques***

Ces solides peuvent être utilisés soit à l'état massif, ce qui est le cas le plus fréquent, soit sous forme de film à la surface du métal de base massif [174]. Le film d'oxyde peut être préparé par oxydation ménagée et contrôlée du métal.

### **IV.2. Application des électrodes modifiées dans l'agroalimentaire**

#### **IV.2.1. Méthodes d'analyse des antioxydants**

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes. Il y a un intérêt croissant en antioxydants, en particulier dans ceux destinés à prévenir les effets présumés néfastes des radicaux libres dans le corps humain, ainsi que la détérioration des graisses et d'autres constituants des denrées alimentaires [175]. Plusieurs techniques analytiques pour l'évaluation du pouvoir antioxydant sont connues et peuvent être classées en deux catégories : les méthodes spectrométriques et chromatographiques et les méthodes électrochimiques.

#### ***IV.2. 1.1. Les méthodes spectrométriques et chromatographiques***

Les techniques d'analyses spectrométriques reposent sur la réaction d'un radical, cation radicalaire ou complexe avec une molécule d'agent antioxydant capable de fournir un atome d'hydrogène. Comme méthode on peut citer :

- *La méthode DPPH (2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle )*

Le DPPH est un radical stable, en raison de la délocalisation de l'électron libre sur la molécule entière. Ainsi, le DPPH ne peut dimériser, comme c'est le cas avec la plupart des radicaux libres.

Les auteurs tels que C.Popovici et al [176] ont utilisés cette méthode pour évaluer le pouvoir antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.

- *La méthode ABTS (2,2-azino-bis (acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique))*

ABTS peut être oxydé par le persulfate de potassium ou du dioxyde de manganèse, donnant lieu au cation radical ABTS. N.Pelligrini et al [177] ont déterminé l'activité antioxydante des boissons par la méthode ABTS.

- *La méthode FRAP ( Ferric Reducing Antioxydant Power)*

Cette méthode repose sur la réduction par les antioxydants du complexe des ions ferriques TPTZ (2,4, 6-tri-(2-pyridyl)-1,3, 5-triazine). La quantité de fer réduite est mesurée par l'absorbance et peut être corrélée à la quantité d'antioxydants. Les recherches de M.I. Gil et al [178] ont appliqué cette méthode afin de déterminer la capacité antioxydante des composés phénoliques, des caroténoïdes et de la vitamine C dans la nectarine, des pêches et des prunes de Californie.

- *L'analyse ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).*

La méthode ORAC permet de mesurer l'activité antioxydante contre le radical induit par le 2,2-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), à 37°C. Elle a été utilisée par K. Thaipong et al [179] pour déterminer l'activité antioxydante d'un extrait de fruit de goyave dans le méthanol.

- *La méthode PFRAP (Potassium Ferricyanide Reducing power).*

Les composés contenant les molécules antioxydantes vont réagir avec le ferricyanure de potassium. L'absorbance augmente et peut être liée à la capacité réductrice des antioxydants /extraits antioxydants. En 2011, les travaux de J. Meng et al [180] ont utilisé cette méthode pour déterminer la capacité antioxydante de composés phénoliques des raisins produits dans la province de Xinjiang (Chine)

- *L'analyse CUPRAC (Cupric Reducing Antioxydant Power)*

Les antioxydants standards ou extraits sont mélangés avec le  $\text{CuSO}_4$  et la neocuproïne. Après 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 450nm. Lors du dosage, Cu(II) est réduit en Cu(I) sous l'action électrodonneur des antioxydants présents. Cette technique est appliquée par plusieurs chercheurs pour déterminer le pouvoir antioxydant ; c'est le cas des travaux de R. Apak et al [181]

- *La spectroscopie de fluorescence*

Cette méthode de fluorescence a été développée [182], pour examiner comment l'organisation de la membrane latérale des stérols affecte la puissance antioxydante. Cette information a été utilisée pour évaluer les éventuels effets néfastes de la liposolubilité des antioxydants, qui a été rapportée dans les études cliniques récentes.

- *Les méthodes chromatographiques.*

Elles sont souvent appliquées pour la séparation et la détection des molécules antioxydantes et sont utilisées avant les techniques spectrophotométriques et électrochimiques pour l'évaluation de la capacité antioxydante totale. Parmi ces techniques, les plus couramment utilisées sont : la chromatographie en phase gazeuse qui est un type courant de

chromatographie utilisée pour la séparation et l'analyse des composés. La capacité antioxydante de l'huile de Curcuma (ayant les propriétés antimutagènes) a également été déterminée par chromatographie en phase gazeuse [183]. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est généralement utilisée pour la détermination des molécules antioxydantes. La HPLC avec détection par fluorescence [182] a été utilisée pour la détermination de gallate de propyle, l'acide nordihydroguaiarétique, l'hydroxyanisole butylé, la ter-butylhydroquinone et le gallate d'octyle dans les huiles comestibles et les aliments. On a pu évaluer l'activité antioxydante des extraits d'écorces des racines des plantes par HPLC couplé à la détection électrochimique (HPLC-ED) [184].

#### ***IV.2.1.2. Les méthodes électrochimiques***

Les techniques électrochimiques ou méthodes ont également été utilisées pour la détermination du pouvoir antioxydant à savoir la voltamétrie cyclique, la voltamétrie à onde carrée, la chronoampérométrie, etc. La capacité antioxydante des extraits végétaux secs [185] a été déterminée par la voltamétrie cyclique réalisée sur une électrode de travail en carbone vitreux. Le thé vert, le thé noir, le romarin et le café, ont été sélectionnés et analysés afin de tester la capacité antioxydante des extraits secs respectifs. La détermination ampérométrique de l'activité antioxydante [186] a été basée sur la réduction de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH) à l'électrode de carbone vitreux.

Les électrodes modifiées ont été utilisées pour la détermination de la capacité antioxydante dans les vins, les résultats étant cohérents avec ceux obtenus par spectrophotométrie [187]

#### ***IV.2.1.3. Biocapteurs***

Un biocapteur, constitué d'une pâte de carbone à base d'ADN a été élaboré pour l'évaluation électro catalytique de la capacité antioxydante. Récemment, des biocapteurs ont été développés par co-immobilisation covalente du Cyt C et de la XOD sur la surface des électrodes sérigraphiées en graphite. Ces biocapteurs ont été utilisés pour la détermination de la CAO de l'ail et des jus d'orange, mais seulement par rapport au radical superoxyde (SO), car la catalase a été ajoutée dans la solution pour éliminer les interférences dues au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [188,189].

D'autres essais d'immobilisation de la XOD ont été décrits comme l'inclusion de l'enzyme dans des bioréacteurs [190-194]. Cependant, aucun n'a été utilisé pour l'estimation de la CAO dans des échantillons réels.

## **Conclusion**

L'ensemble des méthodes précédemment décrites présentes des inconvénients, les techniques comme l'HPLC et les spectroscopies ne sont pas simple à mettre en place : les phases de prétraitement et d'analyse peuvent être relativement longue rendant les mesure différés dans le temps, on a aussi la durée de vie très courte des radicaux.

Compte tenu de ce qui en découle, notre équipe d'électrochimie moléculaire et matériaux inorganiques s'est proposé d'élaborer des électrodes modifiées pour la détermination du pouvoir antioxydant des aliments et de présenter une nouvelle génération d'électrodes destinées à la complexation et à la chélation des métaux.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Leverage X., *Stress oxydant et antioxydants*, Cahiers de nutrition et de diététique (2009) 44, 219-224.
- [2] Sertheyn D.; Mouithys Mickala Et Al; *la nature chimique et la réactivité de l'oxygène* ; Ann.Med.Vet.n (2002), 146,137-153.
- [3] Callenj.-C.;*Biologie cellulaire - Des molécules aux organismes* Dunod,(1999), Paris.
- [4] Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., Naito, Y. *Free radicals in chemistry, biology and medicine*, ed, Oica International, (2000),Londres.
- [5] Cadenas E., Davies J.A. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging*. Free Radic Biol Med,(2000), 29(3-4) : 222-230.
- [6] Pincemail J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.. *Évaluation du stress oxydant : une réalité pour le médecin généraliste*. Vaisseaux, Cœur, Poumon (1999)4:148-154.
- [7] Sies H. ; *Oxidative stress : introductory remarks*. H.Sies editor: Academic Press, London (1985), 1-2.
- [8] Sies H..*Role of reactive oxygen species in biological processes*. Klin Wochenschr 9,(1991),965-8.
- [9] Garait B., *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin* ; thèse 2006, Université de Joseph Fourier, 196 p.
- [10] Halliwell B., Gutteridge J.M.C.. *Free Radicals in Biology and Medicine*. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds, (1999) : 1-543.
- [11] Gilbertd. L., Gerschman R.; *Perspective on the history of oxygen and life* Springer, New-York, (1981).
- [12] Harman D.; *Aging, a theory based on free radical and radical chemistry*; J. Gerontol., 11 (1956) 298-300.
- [13] Harman D.;*The aging process*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 7124-7128.
- [14] Mccord J.M.; Fridovich; *The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase*; J. biol. Chem; (1968) 243, 5736-5760.
- [15] Sies H., Cadenas E.,*Biological basis of detoxication of oxygen free radicals*in Biological Basis of Detoxication, edited by J. Caldwell and W.B. Jakoby (London:Academic Press), (1983) pp. 181-211.
- [16] Deby-Dupont G., Deby C, Lamy M. *Oxygen therapy in intensive care patients: a vital poison?* in: Vincent J.I., Ed. Year book of Intensive Care and Emergency Medicine. Berlin : Springer Verlag ; (1999) pp : 417-432.

- [17] Deby-Dupont G., Deby C., Lamy M., *Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène*, Réanimation, (2002),11 : 28-39.
- [18] Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., *Critical review of rate constant for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (HO•/O•) in aqueous solution*. J. phys. Chem. Ref. Data., 17 : 2 (1988) 513-759.
- [19] Deby-Dupont G, Deby C, Lamy M., *Espèces oxygénées activées et radicaux libres*. in : Carlet J, Martin C, Offenstadt G, Eds. États infectieux graves - Perspectives thérapeutiques. Paris : Masson ; (1995). p. 130-48.
- [20] Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y. *Free radicals in chemistry, biology and medicine*, ed. Oica International, Londres (2000).
- [21] Haber F., Weiss J.; *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*; Proc. R. Soc. London, 147 (1934) 332-351.
- [22] Rushj. D., Bielski B. H. J.; *Pulse radiolytic studies of the reactions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Fe(II)/Fe(III) ions. The reactivity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with ferric ions and its implication of the occurrence of the Haber-Weiss reaction*; J. Phys. Chem., 89 (1985) 5062-5066.
- [23] Wardman P., Candeias L. P. *Fenton chemistry: an introduction*. Radiat Res 145 (5) (1996): 523-531.
- [24] Fenton H.J.H. *Oxidation of tartaric acid in the presence of ferrous ion*. J. Chem Soc., 65 (1984) 899-910.
- [25] Favier A. *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L'actualité Chimique (2003), N° 269-270, 108-115.
- [26] Forman H.J. ; Torres M. *Redox signaling in macrophages*. Mol. Aspects Med ; (2001), 22, 189-216.
- [27] Pedriellip., Skibsted L. H.; *Antioxidant synergy and regeneration effect of Quercetin, (-)-Epicatechin, and (+)-Catechin on  $\alpha$ -Tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate*; J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 7138-7144.
- [28] Vicettir., Ishitanit., Salasa., Ayalam.; *Use of alpha-tocopherol combined with synergists and compared to other antioxidants on the oxidative stability of sardine skin lipids*; J. Food Compos. Anal., 18 (2005) 131-137.
- [29] Balaban RS., Nemoto S. and Finkel T; *Mitochondria: oxidants, and aging* Cell 120, (2005) 83-495.
- [30] Freeman Ba and Crapo JD.; *Hyperoxia increase oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria*. J. Biol .Chem 256, (1981): 10986-10992.

- [31] Hatch G.E., Pollution and oxidative stress in schoolchildren, *Indian pediatr*; (2010), 47(3) : 233-9.
- [32] Flora et al, Heavy metals induces oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian.J.Med.Res*; (2008), 128(4): 501-23.
- [33] Ward J.F., Evans J.W. and Calabro-Jones P.m.; Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *British Journal of Cancer* 55, (1987): 105-112.
- [34] Haton C. *Effet du rayonnement ionisant sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale*, thèse (2005), physiologie et physiopathologie, Université Paris VI, 168.
- [35] Halliwell B., Gutteridge J. M. C.. *Free radicals and catalytic metal ions in human disease, an overview*. *Methods Enzymol*; (1990), 186 : 1-85.
- [36] Sies H. *Strategies of antioxidant defense*; *Euro.J.Biochem.*,(1993), 15(2):213.9.
- [37] Dikalov et al; *Measurement of active oxygen species in cardiovascular studies*. *Hypertension*, (2007), 49(4):717-27.
- [38] P.Therond, *Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant*, *Ann Pharm Fr*, (2006), 64,383-389.
- [39] Hulbert A. J.*On the importance of fatty acid composition of membranes for aging*. *J Theor Biol* 234, (2005): 277-288.
- [40] Pamplona R., Portero-OTIN M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A. and Barja G *Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals*. *Mech Ageing Dev* (2000):112, 169-183.
- [41] Hong J. H., Kim M. J., Park M. R., *Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats*. *Clin Chim Acta* 340, (2004): 107-115.
- [42] Marnett L.J.,*Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. *Mutat Res* 424, (1999):83-95.
- [43] Levine R. L. *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease*. *Free Radic Biol Med* 32, (2002): 790-796.
- [44] Peng J., Jones G. L. and Watson K., *Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements*. *Free Radic Biol Med* 28, (2000): 1598-1606.
- [45] Welch W. J. *Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease*. *Physiol Rev* 72, (1992): 1063-1081.
- [46] Essig D. A. and Nosek T. M. *Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species?* *Can J Appl Physiol* 22, (1997) : 409-428.

- [47] Pastre C. *Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques*, (2005), vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 120 p.
- [48] Ames B.N., Shigenaga M. K. and Hagen T. M. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc Natl Acad Sci USA 90, (1993): 7915-7922.
- [49] Cann R. L. and Wilson A. C. *Length mutations in human mitochondrial DNA*. Genetics 104, (1983): 699-711.
- [50] Stevnsner et al.; *Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging*. Exp. Gerontol.37:(2002) : 1189-1196.
- [51] Helbock et al.; *8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage*. Methods enzymol.300, (1999): 156-166.
- [52] Cadet et al.; *Hydroxyl radicals and DNA base damage*. Mutat. Res. 424 (1999) : 9-21.
- [53] Von Sonntag C., *The chemical basis of radiation biology*, New York, Taylor & Francis, (1987) p. 117-166, 221-294.
- [54] Cadet J., Berger M., Douki T. and Ravanat J-L.; *Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance*: Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1997, v. 31, p. 1-87.
- [55] Cadet J., Douki T., Gasparutto D., and Ravanat J-L., *Oxidative damage to DNA formation, measurement and biochemical features*, Mutat Res, (2003)v. 531, p. 5-23.
- [56] <http://www-dsv cea.fr>, consulté le 18 septembre (2011).
- [57] Nair et al.; *Ethno DNA-base adducts from endogenous reactive species*. Mutat. Res. 424, (1999): 59-69.
- [58] Beckman B., Ames B. N.; *The free radical theory of aging matures*; Physiol. Rev.,78 (1998) 547-581.
- [59] Madamanchi et al; *Oxidative stress and vascular disease*. Arterioscler, Thromb. Vasc.Biol; (2005), 25(1): 29-38.
- [60] Mueller et al; *ATVB in focus : redox mechanisms in blood vessels*.Arterioscler, Thromb.Vasc.Biol; (2005), 25(2): 274-8.
- [61] Ceconi et al ; *Oxidative in cardiovascular disease :myth or fact?* Arch.Biochem.Biophys. (2003), 420(2): 217-21.
- [62] Katsura et al; *Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A<sub>2</sub> and C activation during ischemia*. J.Neurochem; (1993) 61(5):1677-84.
- [63] Budd S. L., *Mechanism of neuronal damage in brain hypoxia ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation*. Pharmacol.Ther; (1998), 80(2): 203-29.

- [64] Sorg O, *Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?* C.R.Biol; (2004), 327(7): 649-62.
- [65] Rao A. V., Balachandran B., *Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases.* Nutr.Neuro sci; (2002), 5(5): 291-309.
- [66] Hardy J., Selkoe D. J.. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science, (2002), 298 (5595): 962-4.
- [67] Mattson M. P., *Oxidative stress perturbed calcium homeostasis and immune dysfunction in alzheimer's disease.* J. Neurovirol.; (2002), 2002, 8(6): 539-50.
- [68]Migliore L.,Coppedè F.*Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases.* Mutat. Res.; (2002), 512(2-3): 135-53.
- [69] Finkel T., Holbrook N.J., *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* Nature, (2000), 408(6809): 239-47.
- [70] Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W. C.; *Mechanisms of the aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis.* Free Radic.Biol.Med.; (2002), 33(5):575-86.
- [71] Leverve X, *Hyperglycemia and oxidative stress: Complex relationship with attractive prospects.* Intensive Care Med; (2003), 29(4): 511-4.
- [72] Berger M. M., *Nutritional manipulation of oxydative stress: review of evidence.* Nutrition chimique et métabolisme, (2006), 20(1):48-53.
- [73] Salvayre R., Auge N., *Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose.* Chapman, Eds. Masson: Paris, (2003), (14): 269-290.
- [74] Gladstonm., Feldman J. G., Levytska V., Magnussen B.; *Antioxidant activity of serum ceruloplasmin and transferrin available iron-binding capacity in smokers and nonsmokers;* Am. Rev. Respir. Dis., 135 (1987) 783-787.
- [75] Cairog., Tacchini L., Pogliaghi G; *Induction of ferritin synthesis by oxidative stress;* J. Biol. Chem., 270 (1995): 700-703.
- [76] Green P. S., Simpkins J. W.; *Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action;* Int. J. Dev. Neurosci., 18 (2000) 347-458.
- [77] Reiterr. J., Tand.-X., Osuna C., Gitto E.; *Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress;* J. Biomed. Sci.,7 (2000) 444-458.
- [78]Halliwell B.; *Antioxidant characterization: Methodology and mechanism;* Biochem.Pharmacol., 49 (1995) 1341-1348.
- [79] Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M. G. and Esquivel M. M, *Melissa officinalis, L.: Study of antioxidant activity in supercritical residues,* Journal of Supercritical Fluids, 21 (2001) 51–60.

- [80] Halliwell B., Gutteridge J. M.; *Free radicals in biology and medicine*, third edition Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England, (2007).
- [81] Deby C., *La biochimie de l'oxygène*, La Recherche, (1991): v. 22, p. 56-64.
- [82] Sturtz L. A. et al; *A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage.* J Biol Chem 276, (2001): 38084-38089.
- [83] Powers S. K. and Lennon S. L. *Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle.* Proc Nutr Soc 58, (1999): 1025-1033.
- [84] Powers S. K. And Lennon S. L.; *Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle.* Proc Nutr Soc 58, (1999): 1025-1033.
- [85] Nomura K. et al ; *Y Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis.* Biochem J 351, (2000):183-193.
- [86] Wolters M., Hermann S., KATZ N.; Hahn A. *Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German Woman.*Eur J Clin, (2005): vol 24.
- [87] Payyu B.; *Cellular defences against damage from reactive oxygen species;* *Physiol. Rev.*, 74 (1994) 139-142.
- [88] Folkes I. K., Wardman P.; *Kinetics of the reaction between nitric oxide and glutathione: implications for thiol depletion in cells;* *Free Rad. Biol. Med.*,37 (2004) 549-556.
- [89] S. Harish, J. Mathiyarasu, K. L. N . Phani, V. Yegnaraman ; *PEDOT/Palladium composite material: synthesis, characterization and application to simultaneous determination of dopamine and uric acid.* J. Appl. Electrochem., 38 (2008) 1583-1588.
- [90] M. Zidan,W. T. Tan, Z. Zainal, A. H. Abdullah, J. K. Goh ; *Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid mediated bylithium doped microparticles Bi2O3/MWCNT modified glassy carbon electrode.*Int. J. Electrochem. Sci, 5 (2010) 501-508.
- [91] Z. Dursun, B. Gelmez ; *Simultaneous determination of ascorbic Acid, dopamine and uric acid at Pt nanoparticles decorated multiwall carbon nanotubes modified GCE.*Electroanalysis., 22 (2010) 1106-1114.
- [92] Packer L. et al.; *Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid.*Free Radic Biol Med 22, (1997)359-378.
- [93] Vertuani S., ANGUSTI A., Manfredini, S., *Curr. Pharm. Des.*, (2004),10,1677-1694.
- [94] A. Balamurugana, S.-M. Chen ; *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co-(5-amino-2-naphthalenesulfonic acid)) (PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for*

selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. *Anal. Chim. Acta*, 596 (2007) 92-98.

[95] S. S. Kumar, M. Jayaraman, K. L. Phani, Y. Kumar ; Y. Venkatraman; Determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes. *Electroanalysis*, 17 (2005) 2281-2286.

[96] Nadji Belkheiri; *Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes*, thèse (2010), Université de Toulouse ; p .214.

[97] Iton., Fukushimas., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T.; *Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats*; *J. Natl. Cancer Inst.*, 70 (1983) 343-352.

[98] Chen C., Pearson A. M., Gray J. I.; *Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds*; *Food Chem.*, 43 (1992) 177-183.

[99] Anderson, J.W., Johnston E, B.M., Cook-Newell M.E., *N. Engl. J. Med.*, (1995), 333, 276-282.

[100] Meltzerh. M., and Malterud K. E.. *Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease?* *Scand. J. Nutr.* (1997), 41 (2). p 50.

[101] Bertuglia S., Malandrino S., Colantuoni A., *Pharmacol. Res.*, 1995, 31, 183-187.

[102] Goetz G., F. Kyerat, Metaisa., Kunz N., Tabacchi M., *phytochemistry.*, (1999), 52, 759-767.

[103] Sefkow M., *Eur. J. Org. Chem.*, (2001), 1137-1141.

[104] Frankel E.N., Waterhouse, Kinsella A.L., *The Lancet.*, (1993), 341, 1103-1104.

[105] Fang J. G., Lu M., Chen Z. H., *Chem. Eur. J.*, (2002), 8, 4191- 4198.

[106] Pace-Asciak, C.R., Hahn S., Diamandis, E.P., *Clin. Chim. Acta.*, (1995), 235, 207-219.

[107] Torres de Pinedo, A., Penalver P., Perez-Victoria I., C., *Food. Chem.*, (2007), 105, 657-665.

[108] Lee C.Y., Sharma, A., Cheong, J.E., Nelson J.L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2009), 19, 6326-6330.

[109] R. Rivlin, *Historical perspective on the use of garlic. Journal of Nutrition*, 131, 951S–954S. (2001).

[110] Amagase, H. *Clarifying the real bioactive constituents of garlic. Journal.*

[111] Kroger E., *L'ail plus qu'un simple aliment. Québec pharmacie*, (2002) 49(10).

[112] Lawson L.D., Bauer R., *Phytomedicines of Europe, Chemistry and biological activity. ASC Symposium Séries* (1998) 691:176-209.

[113] Blocke.; *The chemistry of garlic and onion. Scientific American* (1985) 252:94-99.

[114] Jean-Michel Hurtel (2001). *L'ail allium savitum. Plantes et médecine.*

- [115] Campa C., Doubeau S., et al. Quantitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. *Food Chemistry* (2005) 93(1): 135-139.
- [116] I.G Casella, M.Gatta, E.Desimoni, *J.Chromatography*, 814 (1998)63-70.
- [117] Clifford M. N.; Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (2000) 80(7),1033-1043.
- [118] Morales F. J. Assessing the non-specific hydroxyl radical scavenging properties of melanoidins in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta* (2005) 534: 171-176.
- [119] Pei-gen Xiao, Zhen-yu Li, 2002. *Tea Bioactivity and Therapeutic Potential*. CRC Press. 17-34.
- [120] Peterson J. et coll, (2005). *J. Food Compos. Anal.*, 18,487-501.
- [121] Finger A. et coll., (1991). *J. Sci. Food Agric.*,55, 313-321.
- [122] Coimbra S. et coll, (2006). *Clin. Nutr.* ,25,790-796.
- [123] McKay D. L., Blumberg J. B., (2002). *J.Am. Coll..Nutr.*, 21,1–13.
- [124] Shreurs J.;Barendrecht E.; *Recl.Trav.Chem. Pays-Bas*, 103 (1984) 205.
- [125] Waltman R.J., Bargon J., *Can. J. Chem.*, 64 (1986) 76.
- [126] Abruna H.D., *Coord. Chem. Rev.*, 86 (1988) 135.
- [127] Diaz A. F., Knazawa K. K., Gardini G. P.,. *Chem. Soc., Chem. Commun.*, 635 (1975).
- [128] El Mhammedi A., Chtaini A., El Bouadili A., *Bull. Electrochem.*, 20 (12) (2004) 533-537.
- [129] El Mhammedi M.A., Bakasse M., Chtaini A., *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, 10 (2007) 1-12.
- [130] El Mhammedi M. A., Bakasse M., Chtaini,A. *J. Hazard. Mater.*, 145 (2007)1–7.
- [131] Anderson J.L., Coury, Jr L.A. Et Leddy J., *Anal. Chem.*, 70 (1998) 519-89.
- [132] Lane R. F., Hubbard A. T., *J. Phys. Chem.*, 77(1973) 1401-10.
- [133] Finklea H.O., *Electroanal. Chem.*, 19(1996) 109-335.
- [134] Downard A. J., *Electroanalysis*, 12(2000) 1085-96.
- [135] Murray R. W., *Electroanal. Chem.*, 13 (1984) 191-386.
- [136] Kaneko M., Woehrlé D., *Adv. Polym. Sci.*, 84 (1998) 141-228.
- [137] Elif Mevlidiye Sarıtaş, Ecir Yılmaz, *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 3 (6), (2011), 587 – 600.
- [138] S. Ignatov, D. Shishniashvili, B. Ge, F.W. Scheller, F. Lisdat, *Biosensors and Bioelectronics*.17 (3), (2002), 191–199.



- [139] W.R. Sousa, C D Rocha, C. Lúcia Cardoso, D. Helena S Silva, M. Valnice B Zanon, *Journal of Food Composition and Analysis* 17(5), (2004), 619–633.
- [140] Montserrat Cortina-Puig, *Talanta* 79 (2009) 289–294.
- [141] Schreurs J., Thesis, Eindhoven University of Technology,(1983).
- [142] Lane R. F., Hubbard A. T., *J. Phys. Chem.*, 77 (1973) 1401.
- [143] Bonfil Y., Brand M., Kirowa-Eisner E., *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 85.
- [144] Kopanica M., Novotny L., *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 211.
- [145] Thomas J. G. N., 5th European Symposium on Corrosion Inhibitors, Ann. Univ. Ferrara, Italy, 453 (1980).
- [146] Dall’olio A., Dascola G., Varacca V., *C.R. Acad. Sci. Paris*, 267 (1968) 433.
- [147] Diaz A. F., Knazawa K. K., Gardini G. P., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 635 (1975).
- [148] Diaz A. F., Kanazawa K. K., Gardini G. P. ; Electrochemical polymerization of pyrrole. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 14 (1979) 635-636.
- [149] Touillon G., Garnier F., *J. Electroanal. Chem.*, 135 (1982) 173.
- [150] Desbene-Monvernay A., Lacaze P. C., *J. electroanal. Chem.*, 129 (1981) 229.
- [151] Rault-Berthelot J., Simonet J., *N. J. de chimie*, 10 (1986)169.
- [152] Abruna H. D., Denisevich P., Umana M., Meyer T. J., Murray R. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 1.
- [153] Cosnier S., Deronzier A., Moutet J. C., *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 2390.
- [154] Bettelheim A., White B. A., Raybuck S. A., Murray R. W., *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 1009.
- [155] Nuzzo R. G., Allara D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 4481-3.
- [156] O’riordan D. M. T., Wallace G. G., *Anal. Chem.*, 58 (1986) 131.
- [157] Rahman M. A., Park D. S., Won M.-S., Park S.-M., Shim Y.-B., *Electroanalysis*, 16 (2004) 1370.
- [158] Theodoridou E., Jannakoudakis A. D., Besenhard J. O., *Synth. Met.*, 14 (1986) 125.
- [159] Vitchiniskaia E. A., Zeigman L. L., Morton S. G., *Electroanalysis*, 7 (1995) 264.
- [160] Huang H., Dasgupta P. K, *Anal. Chim. Acta*, 380 (1999) 27.
- [161] Svancara I., Pravda M., Hvizdalova M., Vytras K., K. Kalcher and *Electroanalysis*, 6 (1994) 663.
- [162] Feng Y. J., Li X. Y., *Water Res*, 37 (2003) 2399.
- [163] Codognoto L., Machado S. A. S., Avaca L. A., *J. Appl. Electrochem.*, 33 (2003) 951.
- [164] Idbelkas B., Takky D., *Ann. Chim. Sci. Mater.*, 26 (2001) 33.
- [165] R. N. Adams, *Anal. Chem.* 30, (1958), 1576.

- [166] J. Lindquist, *Anal. Chem.* 45, (1973), 9.
- [167] K. Stulik et V. Pacakova, "Electroanalytical measurements in flowing liquids" Ellis Horwood, Chichester, UK, (1987).
- [168] J. Wang, T. Martinez, *Electroanalysis*, 2 (1990) 419.
- [169] J. Linquist, *Anal.Chem.*, 45 (1973) 1006.
- [170] K. Kalcher, *Electroanalysis*, 2 (1990) 419.
- [171] K. Ravichandran, R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1586-91.
- [172] T. Yao, S. Musha, *Anal.Chim.Acta*, 110 (1979) 203.
- [173] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *Ana.Chim.Acta*, 408(1-2) (2000) 263-154.
- [174] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr.A*, 669(1-2) (1994)217-224.
- [175] SC.Litescu, AV.Sandra, SAV.Eremia, M.Diaconu, A.Tache, et al. In Tech Rijeka Croatia (2011).
- [176] AM.Pisoschi, MC.Cheregi and AF.Danet. *Molecules* (2009) 14: 480-493.
- [177] N .Pellegrini, M.Serafini, B.Colombi, D.Del Rio, S.Salvatore, et al, *J Nutr* (2003).
- [178] J.Borowski, A.Szajdek, E J.Borowska, E.Ciska and H.Zielinski, *Eur Food Res Technol* (2008) 226: 459-465.
- [179] K.Thaipong, U.Boonprakob, K.Crosby, L.Cisneros-Zevallos and DH.Byrne, *Journal of Food Composition and Analysis* (2006) 19: 669–675.
- [180] J.Meng, Y.Fang, A.Zhang, S.Chen, T.Xu, et al. *Food Res Int.* (2011)
- [181] KF.Magalhaes, ARL.Caires and SL.Oliveira. *Encontro de Fisica.* (2011).
- [182] GK.Jayaprakasha, B.Girenavar and BS.Patil, *Bioresource Technol* (2008) 99: 4484-4494.
- [183] M.Oishi, T.Matsuda, S.Nojiri, K.Saito, *Food Hygiene and Safety Science* (2002) 43: 104-109.
- [184] VA.Dos Santos, DP.Dos Santos, I.Castro-Gamboa, MV.Zanoni, M.Furlan, *Molecules* (2010) 15: 6956-6973.
- [185] L Campanella, E.Martini, E.Rita and M.Tomassetti, *J Food Agric Environ* (2006)4: 135-144.
- [186] S.Milardovic, D Ivekovic and BS.Grabaric,*Bioelectrochemistry* (2006) 68: 175-180.
- [187] MF.Barroso, N .de-los-Santos-Álvareza, MJ .Lobo-Castanón, AJ .MirandaOrdieres, C. Delerue- Matos, et al,*Biosensors and Bioelectronics* (2011) 26: 2396-2401.
- [188] M. Cortina-Puig, X. Munoz-Berbel, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, *Electrochemical characterization of a superoxide biosensor based on the co-immobilization of cytochrome c*

and XOD on SAM-modified gold electrodes and application to garlic samples, *Talanta*, (2009), 79, 289.

[189] M. Cortina-Puig, X. Munoz-Berbel, R. Rouillon, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, Development of a cytochrome c-based screen-printed biosensor for the determination of the antioxidant capacity of orange juices, *Bioelectrochem.*, (2009), 76, 76.

[190] S. Banu, G.M. Greenway, T. McCreedy, R. Shaddick, Microfabricated bioreactor chips for immobilised enzyme assays, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 486, 149.

[191] S. Banu, G.M. Greenway, R.A. Wheatley, Luminol chemiluminescence induced by immobilised xanthine oxidase, *Anal. Chim. Acta*, (2005), 541, 91.

[192] Krylov A.V., H. Adamzig, A.D. Walter, B. Lochel, Ez Kurth, O. Pulz, J. Szeponik, F. Wegerich, F. Lisdat, Parallel generation and detection of superoxide and hydrogen peroxide in a fluidic chip, *Sens. Actuators, B*, (2006), 119, 118.

[193].Richter T, L.-L. Schultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Bilitewski, D.J. Harrison, Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic device. Determination of xanthine., *Sens. Actuat. B*, (2002), 81, 369.

[194] H. Ukeda, A.K. Sarker, D. Kawana, M. Sawamura, Flow-injection assay of superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium, *Anal. Sci.*, (1999), 15, 353.

**Chapitre II :**  
**TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES**

Dans cette partie, nous parlons de l'électrochimie, nous ne pouvons l'aborder sans d'abord faire allusion à quelques généralités sur les phénomènes électrochimiques. Ce chapitre a donc pour objectif d'exposer les éléments, principes et méthodes électrochimiques nécessaires à la compréhension des résultats et des interprétations qui seront présentés aux chapitres suivants. Il ne constitue pas une description exhaustive des méthodes électrochimiques existantes, mais se focalise sur les techniques expérimentales utilisées par la suite.

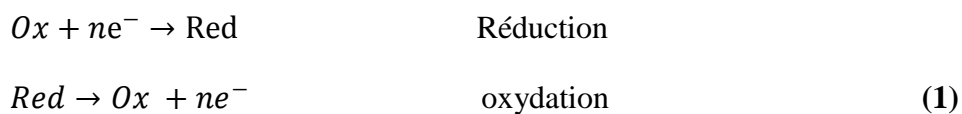
## I. Généralités

L'électrochimie est la discipline qui en charge l'étude des interfaces entre un conducteur électronique et un conducteur ionique.

Un processus électrochimique est donc constitué par l'ensemble des phénomènes associés à la production d'un transfert de charge électrique à travers une interface formée par la mise en contact d'un conducteur électronique (métaux, semi-conducteurs, conducteurs électroniques) et d'un conducteur ionique (solutions électrolytiques, électrolytes solides, sels fondus). Les états d'équilibres d'un système sont appréhendés par une étude thermodynamique [1].

### I.1. Interfaces à l'équilibre et loi de Nernst

Un système électrochimique ou couple oxydo-réducteur (couple redox) est constitué d'un oxydant (Ox) et d'un réducteur (Red). Il est en outre le siège d'une réaction de transfert d'un ou plusieurs électrons :



Ainsi, un oxydant est défini comme une espèce susceptible de capter un ou plusieurs électrons et un réducteur comme une espèce susceptible de céder un ou plusieurs électrons. A chaque couple est associé un potentiel d'équilibre ( $E_{eq}$ ) défini par la loi de Nernst :

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \right) \quad (2)$$

où  $E^0$  représente le potentiel standard du couple Ox/Red,

$R$  la constante des gaz parfaits ( $R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ),

**T** la température absolue (en **K**), **n** le nombre d'électrons échangés au cours du transfert électronique,

**F** la constante de Faraday (**F = 96500 C.mol<sup>-1</sup>**)

et **a<sub>Ox</sub>** et **a<sub>Red</sub>** les activités des espèces **Ox** et **Red**.

En considérant que la force ionique de la solution reste inchangée au cours de l'expérience et que les composés se comportent idéalement en solution, on peut alors faire intervenir les concentrations des espèces électroactives en solution ( $C_{Ox}^{Sol}$  et  $C_{red}^{Sol}$ ) et non plus les activités.

L'équation (2) devient alors :

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}^{Sol}}{C_{red}^{Sol}} \quad (3)$$

Pour une équation de type  $Ox + m H^+ + n e^- \rightleftharpoons Red$ , le potentiel d'équilibre s'écrit :

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \left( \frac{a_{ox} \cdot a_{H^+}^m}{a_{red}} \right) \quad (4)$$

$$E_{eq} = E^0 - \frac{m}{n} 0,06 pH + \frac{RT}{nF} \left( \frac{a_{ox}}{a_{red}} \right) \quad (4')$$

ou encore à 298 K :

Le potentiel standard apparent (**E<sup>0'</sup>**) est alors défini par :

$$E^{0'} = E^0 - \frac{m}{n} 0,06 pH \quad (5)$$

Le rapport  $\frac{m}{n}$  représente le nombre de protons échangés par nombre d'électrons transférés.

## II. L'Electrodéposition

D'autres méthodes de dépôt de métaux existent à savoir l'évaporation, la pulvérisation et l'électroless. Cependant, ces techniques ne permettent pas de réaliser des structures avec des épaisseurs avoisinantes 100 $\mu$ m et des nano interconnexions (1 $\mu$ m - 2 $\mu$ m d'épaisseur) à travers une membrane poreuse [2].

### II.1. Principe de l'électrodéposition

L'électrolyte est par définition le milieu d'immersion de l'électrode contenant l'espèce à oxyder ou à réduire. Si une électrode métallique ou non métallique est plongée dans un bain contenant un de ses sels, un échange électronique peut s'établir entre les orbitales des atomes appartenant à l'électrode et celles des ions contenus dans l'électrolyte. Et si un électrolyte contient un sel de l'électrode métallique, il est alors envisageable à un potentiel donné de déposer ce métal. Le processus d'électrodéposition peut être décrit de manière simplifiée par les trois étapes suivantes :

- **Le transfert de masse**

Ce transfert correspond à l'apport des ions hydratés du sein de la solution jusqu'à interface métal-solution.

Trois facteurs conjugués déterminent ce phénomène :

1. La migration des ions sous l'effet du champ électrique résultant de la différence de potentiel entre l'anode et la cathode ;
2. La diffusion liée au mouvement d'espèces due au gradient de concentration au voisinage de l'interface électrode-solution tendant à compenser la consommation de matière à l'électrode ;
3. La convection de la solution (agitations mécanique, thermique...).

- **Le transfert de charge,**

Les transferts de charges s'effectuent le plus fréquemment en plusieurs réactions élémentaires faisant intervenir des espèces intermédiaires. La vitesse globale de décharge est alors déterminée par l'interdépendance de toutes ces réactions élémentaires.

- **La cristallisation**

Le développement du réseau cristallin à partir des adions dépend maintenant substantiellement des aspects de la surface de l'électrode (nature, état de surface, contaminations, additifs, température, surtension...). L'adion se développant

préférentiellement sur une surface plane, il diffuse alors vers une imperfection du réseau cristallin afin de s'y intégrer.

A part les trois étapes d'un processus d'électrodéposition détaillées ci-dessus, la formation d'un dépôt électrolytique nécessite aussi l'utilisation d'un bain de bonne conductivité et d'une satisfaisante stabilité dans l'objectif de reproductibilité. Les choix de potentiels de décharge, des gammes de température, des densités de courant et d'agitations, constituent autant de paramètres à gérer et à déterminer afin d'obtenir des dépôts correspondant aux caractéristiques recherchées.

L'adjonction de certaines substances dans l'électrolyte peut engendrer des modifications de cinétiques et de croissances des dépôts. Ces additifs métalliques ou organiques permettent de modifier sensiblement les propriétés physico-chimiques des dépôts et de contrôler certaines caractéristiques (taille des cristallites, absence de piqûres...)

Le dépôt des métaux peut être effectué soit à potentiel imposé correspondant au pic de réduction de l'ion, soit par balayage successif. Il dépend essentiellement du matériau, de l'électrolyte et du milieu réactionnel (solvant, pH, concentration). Dans notre travail nous nous intéressons au dépôt du cuivre. L'électrodéposition a constitué une méthode que nous avons utilisée pour modifier nos électrodes au cours de cette thèse.

### ***II.1.1. Généralités sur le cuivre***

La découverte du cuivre et ses premières utilisations remontent au néolithique, environ 8 000 ans av J. C. Déjà à l'époque, les contemporains de l'Age de la pierre connaissaient la malléabilité du métal, rencontré à l'état natif, qui permettait de fabriquer de façon simple des outils en les modelant par martelage.

#### ***II.1.1.1 Description et propriétés de cuivre et ses alliages***

Le cuivre est un des rares métaux qui existe à l'état natif. Il est de couleur rougeâtre résiste à l'air et à l'eau mais, il se patine lentement en présence de carbonate. Le cuivre exposé à l'air s'oxyde lentement en formant une patine de couleur verte, caractéristique de certains édifices ou statue.

Avec l'or, le seul métal naturellement coloré, Le meilleur conducteur de l'électricité et la chaleur après l'argent. Présence moyenne dans l'ensemble de l'écorce terrestre: 55 g à la tonne est cependant assez faible. On le trouve le plus fréquemment sous forme de sulfure ou de sulfosel, le cuivre est rarement utilisé pur.



Le cuivre offre à cet égard les meilleures caractérisations après l'argent, métal plus rare et plus cher. Grâce à ses nombreuses propriétés, le cuivre est un élément moteur de la modernité. Les principales caractéristiques de cuivre sont résumées dans les tableaux 2 et 3.

**Tableau 2** : Caractéristiques chimiques de cuivre.

Nom, Symbole, Numéro	Cuivre, Cu, 29
Série chimique	Métaux de transition
Groupe, Période, Bloc	11, 4, d
Masse volumique, Dureté	8920 kg/m <sup>3</sup> , 3
Densité	8,94
Volume molaire	7,09 cm <sup>3</sup>
Couleur	Cuivré, métallique

**Tableau 3** : Propriétés atomiques

Masse atomique	63,536 g/mol
Numéro atomique	29
Rayon	135(155pm)
Rayon de covalence	138 pm
Rayon de Van der Waals	140 pm
Rayon ionique	73 pm
Configuration électronique	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
Electron par niveau n'énergie	2, 8,18, 1
Etats d'oxydation (oxyde)	2, 2, 1 (faiblement basique)
Structure cristalline	Cubique face centrée

### ***II.1.1.2. Applications du cuivre et ses alliages***

Grâce à ses propriétés, en particulier sa grande conductivité électrique et thermique, sa bonne résistance à la traction, sa malléabilité, sa ductilité, son point de fusion élevé, ses propriétés non magnétiques et sa résistance élevée à la corrosion, le cuivre est utilisé dans de nombreux domaines :

❖ Dans toute l'industrie électrique, comme la distribution de l'énergie électrique, la fabrication du matériel électrique et des composants électronique. A titre d'exemple, 95% des fils conducteurs d'un airbus sont en cuivre.

❖ Dans l'industrie métallique telle que la fabrication de pièces de monnaie, les ustensiles de cuisine, la robinetterie, les pompes et canalisations d'eau de mer.

❖ Aux laboratoires, on peut citer son utilisation comme cible dans les tubes à rayons X pour la diffraction sur poudres.

Afin de rivaliser avec les méthodes analytiques les plus sensibles, l'électrochimie s'est dotée des techniques expérimentales modernes telles que :

- ✓ La voltamétrie linéaire
- ✓ La voltamétrie cyclique
- ✓ La voltamétrie à onde carré

### III. 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.

#### III.1. Composants et principes des techniques voltamétriques

Les unités de base d'un analyseur voltamétrique sont illustrées par la figure 15. 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 ; En règle générale, l'électrode de travail doit être stable pendant une très grande période, doit posséder un bon rapport signal/bruit du fond et doit être également simple à manipuler et à conditionner. De plus, les solutés à analyser doivent y développer une

cinétique de réaction électrochimique rapide dans un large domaine de potentiel accessible [3].

ii) *Une électrode de référence* : les électrodes de référence utilisées sont des électrodes d'argent / chlorure d'argent Ag/AgCl (KCl 3M) de marque BAS (Bioanalytical Systems, USA) ou l'électrode au calomel saturée (reliée à un capillaire de Luggin) de marque METTLER TOLEDO.

iii) *Une contre électrode ou électrode auxiliaire* : il s'agit d'une électrode en inox, en platine ou bien en carbone qui assure le passage du courant. En effet, les électrons libérés au cours la réaction d'oxydoréduction créent un courant entre l'électrode auxiliaire et l'électrode de travail.

- **Un circuit électronique**, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant.

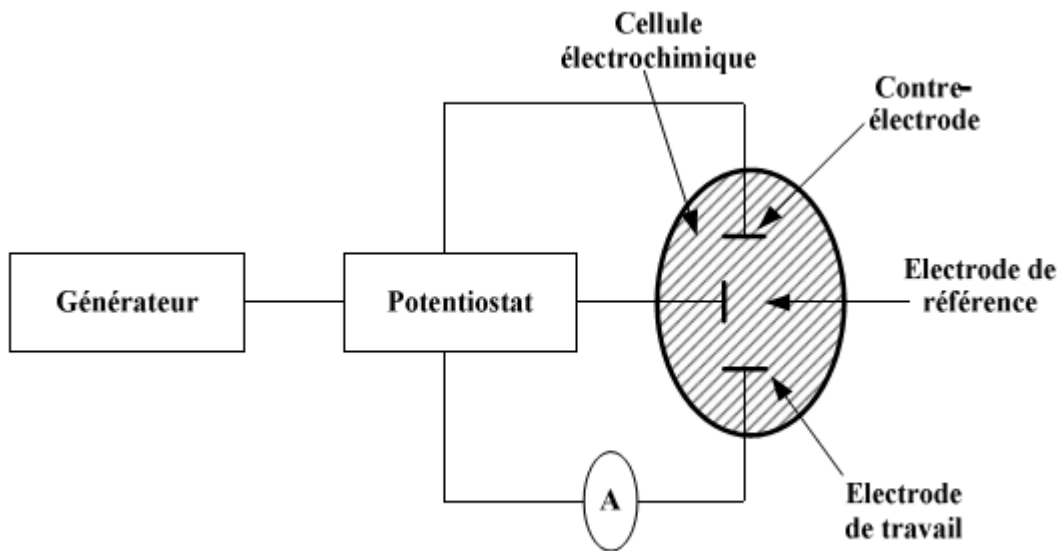


Figure 12 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat

### III.2. Analyses voltamétriques

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 [4]. 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 :

$$E = E_i \pm vt \quad (6)$$

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 voltamogrammes.

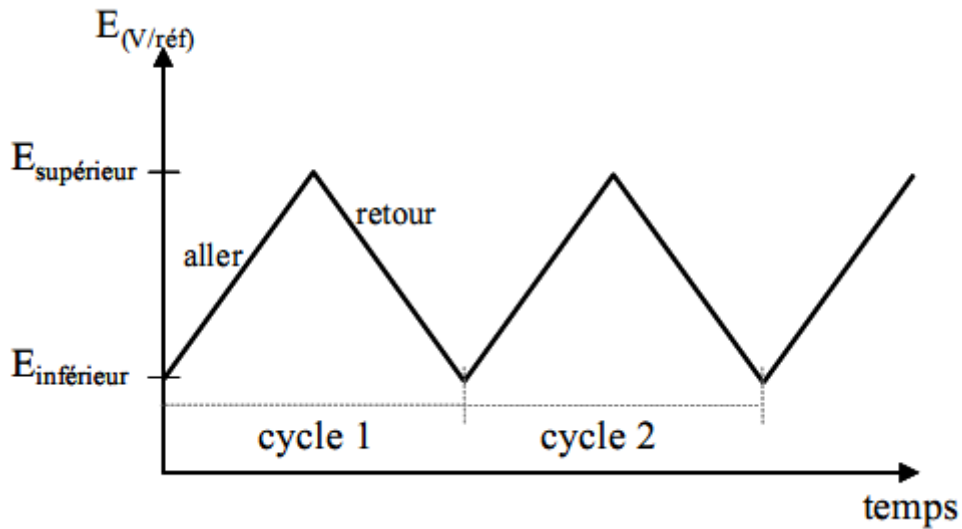
La variation du potentiel  $E$  peut être linéaire ou modulée, donnant lieu à des techniques possédant des caractéristiques différentes. Le courant  $i$  dans le circuit est principalement la somme de deux courants: le courant faradique,  $i_f$ , et le courant capacitif,  $i_c$ .

### III.2.1. La voltamétrie linéaire

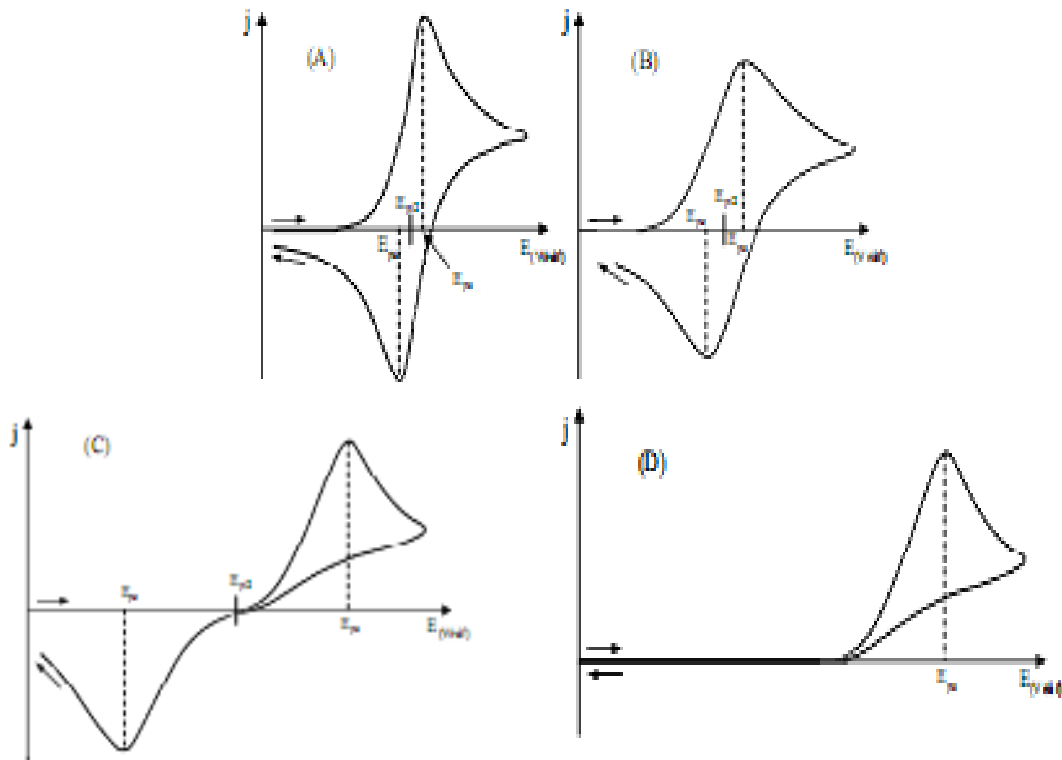
Dans la pratique, on peut obtenir plus d'informations sur le système électrochimique étudié à partir d'une seule expérience, en appliquant à l'électrode un balayage de potentiel variant avec le temps et en enregistrant directement la courbe  $I-E$  correspondante. Si le mode de balayage correspond à une variation linéaire de potentiel avec le temps et on enregistre le courant en fonction du potentiel alors : c'est la voltamétrie à balayage linéaire [5].

### III.2.2. 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 ( $E_{\text{supérieur}}$ ) et réalisé des oxydations, on inverse le sens de variation du potentiel effectue pour une exploration vers les potentiels cathodiques ( $E_{\text{inférieur}}$ ). On enregistre donc sur le voltamogramme les courbes de polarisations anodiques et cathodiques du système. Trois cas sont à considérer : les systèmes dits réversible, irréversible ou quasi-réversible. Sur la Figure 17 sont présentés les voltamogrammes cycliques caractéristiques de ces trois situations. 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 tridimensionnel  $[I, E, t(E(t))]$  (figure 16).



**Figure 13 :** Evolution du potentiel en fonction du temps en voltamétrie cyclique



**Figure 14 :** Voltamogrammes cycliques pour des systèmes : réversible (A), quasi réversible (B) et (C) et totalement irréversible (D)

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 pour acquérir des informations qualitatives sur les réactions électrochimiques 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. Elle a l'avantage de donner rapidement des informations sur le processus redox.

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 [6-10].

La voltamétrie cyclique, s'est surtout développée en tant que moyen d'étude des mécanismes des réactions d'oxydoréduction. 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 voltamogramme, les courbes d'oxydation et de réduction. En électrochimie, on utilise souvent l'équation de Nernst (1):

Les deux caractéristiques d'un voltamogramme 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 [11]:

$$I_p = KAn^{3/2}D^{1/2}V^{1/2}C \quad (7)$$

Avec K : coefficient numérique,

A : surface de l'électrode ( $\text{cm}^2$ ),

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

v: vitesse de balayage ( $\text{v}.\text{s}^{-1}$ ),

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

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 :

$$\Delta E_p = E_{Pa} - E_{Pc} = 0,06/n \quad (8)$$

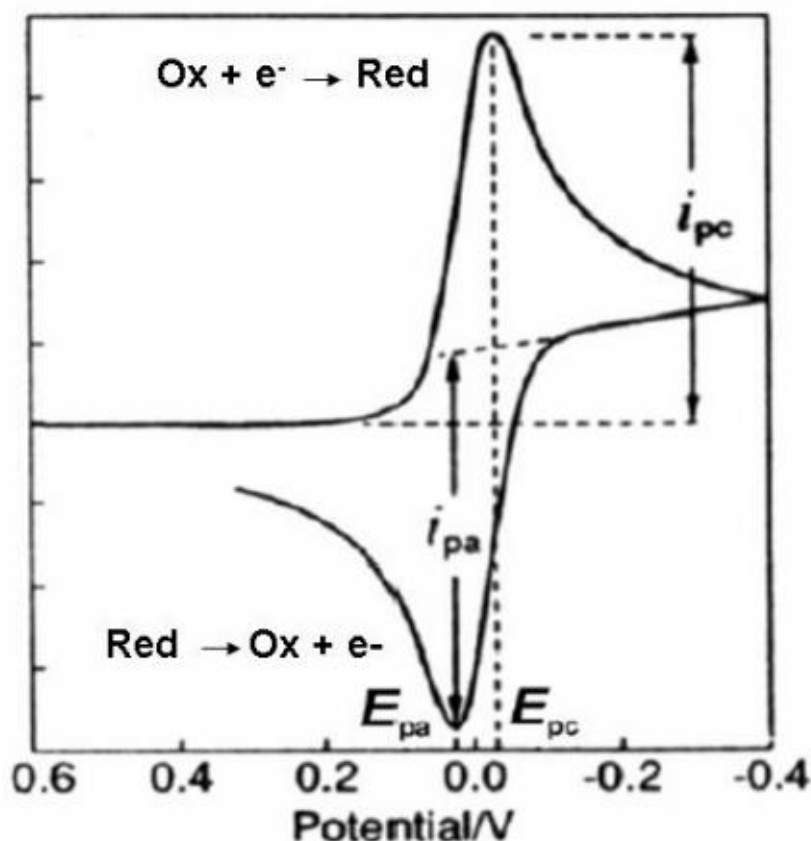
avec n nombre d'électrons mis en jeu.

Le potentiel standard pour un système réversible est donné par :

$$E^0 = (E_{Pa} + E_{Pc})/2 \quad (9)$$

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

Lors de l'application du potentiel, les espèces électroactives présentes à la surface de l'électrode s'oxydent (ou se réduisent) et l'intensité anodique (ou cathodique) augmente jusqu'à atteindre un maximum. Les courbes I-E ont donc la forme de pics (**Figure 18**). En effet, la concentration des espèces consommées à l'interface électrode / solution électrolytique diminue et, dans les conditions de diffusion linéaire semi-infinie, le courant après le pic diminue alors comme  $\frac{1}{(\pi t)^{1/2}}$  (loi de Cottrell). L'intensité du pic obtenu est proportionnelle à la concentration de l'espèce correspondante.



**Figure 15** : Voltamogramme cyclique enregistré pour un couple redox en solution.

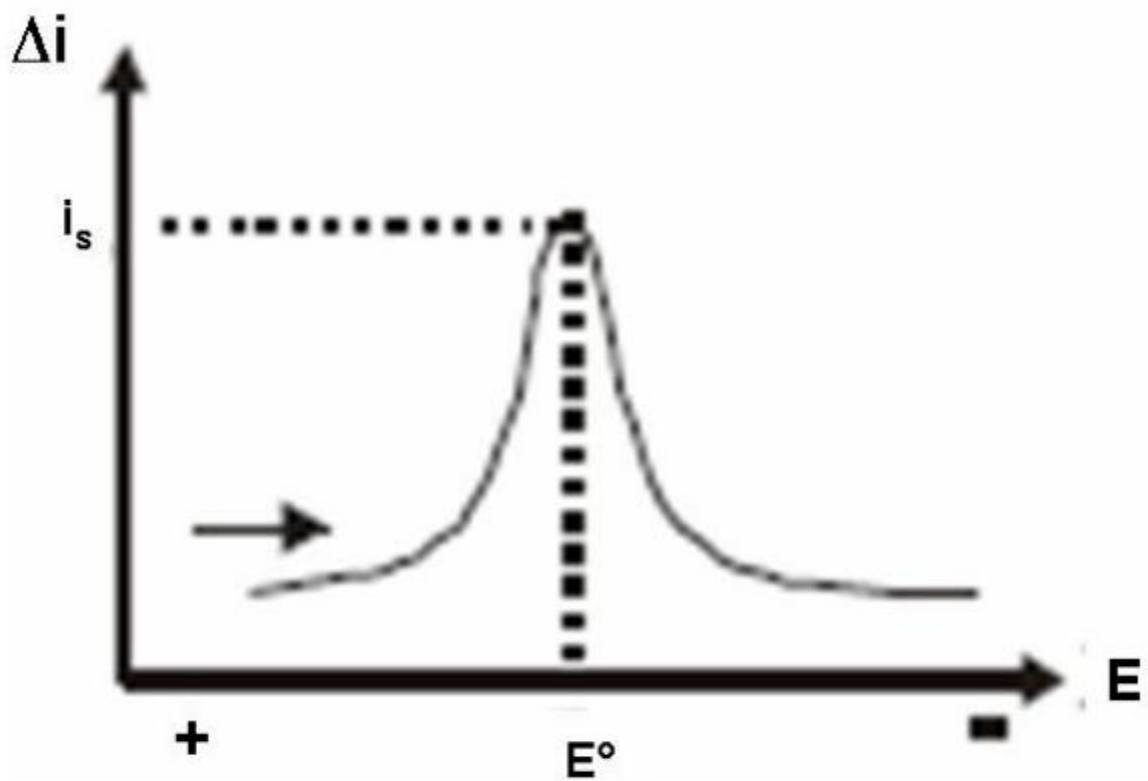
Par la suite, une réaction d'oxydation de type :  $\text{Red} \rightarrow \text{Ox} + n e^-$  est considérée, avec uniquement l'espèce Red présente en solution au début de l'expérience.

### III.2.3. Voltamétrie à onde carrée (Square wave voltametry : SWV)

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  $200 \text{ Hz}$ ) avec une rampe en escalier (figure 20). Le signal mesuré est la différence  $\Delta i$  entre les courants mesurés, à la fin de chaque pulse montant et descendant de l'onde carrée, (figure 20). Le pas de potentiel  $\Delta E_p$ , 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  $1600 \text{ mV s}^{-1}$ , et ainsi permet 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 carrée, 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  $1 \text{ v.s}^{-1}$ .



**Figure 16** : Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps.

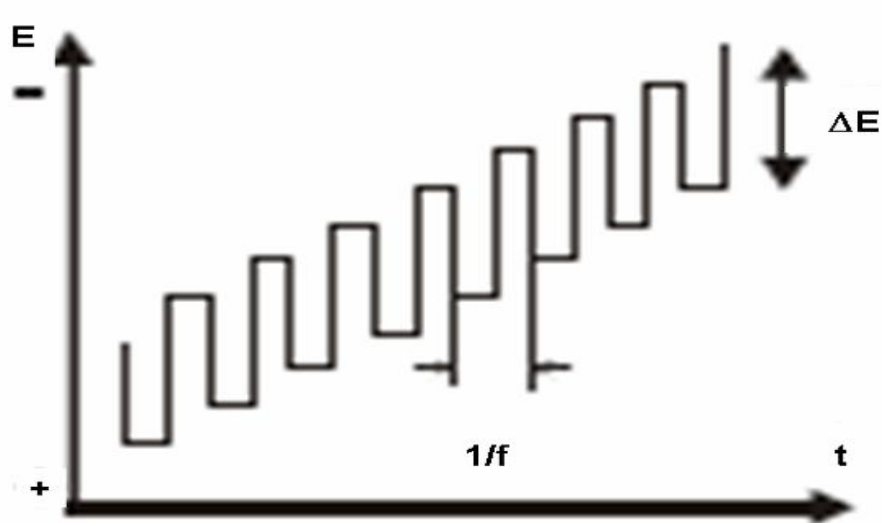


Figure 17 : Voltamogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.

## IV. Mesure de l'impédance électrochimique (EIS)

### IV.1. Principe de l'impédance

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode voltampérométrique qui se distingue des autres méthodes [12] en deux points.

- 1- L'impédance consiste à superposer au potentiel de l'électrode une tension sinusoïdale de faible amplitude (quelques mV).

$$E_t = E^0 + \Delta E \sin \omega t \quad (10)$$

Avec :

- $\omega = 2\pi f$  : fréquence angulaire où  $f$  est la fréquence en Hz
  - $E_0$  : potentiel d'équilibre
- 2- L'analyse de la réponse du courant ( $I_t$ ) qui se fait en fonction de la fréquence  $f$ .

$$I_t = I_0 + \Delta I \sin(\omega t - \varphi) \quad (11)$$

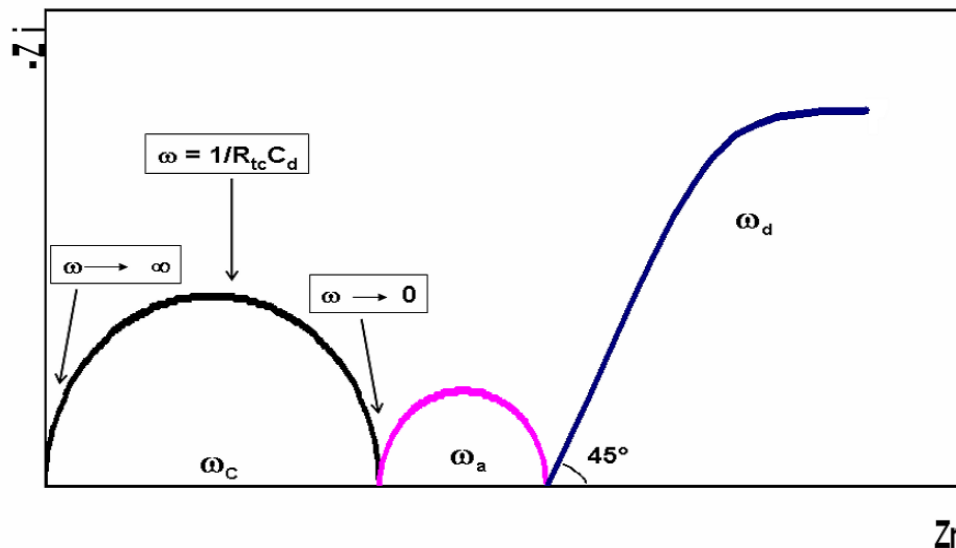
L'obtention des caractéristiques des systèmes étant basée sur l'analyse de la réponse (courant alternatif de faible amplitude),  $I_t = I_0 + \Delta I \sin(\omega t - \varphi)$  non plus en fonction du potentiel d'électrode, mais en fonction de la fréquence du signal alternatif d'excitation ce qui a 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 ( $I_0 = \text{constante}$ ).

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 21**) :



**Figure 21** : Représentation de la variation de l'impédance d'un système électrochimique en fonction de la pulsation  $\omega$ . Cas idéal où les pulsations  $\omega_c$ ,  $\omega_a$ ,  $\omega_d$  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  $E^\circ$  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.

La spectroscopie d'impédance comporte de nombreux avantages. Les plus importants sont :

- i) une habilité expérimentale à faire des mesures d'une grande précision,
- ii) une capacité à traiter les réponses théoriques avec des caractéristiques de courant potentiel linéaire,
- iii) une large gamme de fréquences (entre  $10^{-4} - 10^{+6}$  Hz) [13].

## IV.2. Description de l'impédance

D'un point de vue physique l'impédance ( $Z(\omega)$ ) est une résistance complexe, mesurée en ohms, qui apparaît lorsqu'un courant alternatif circule à travers un circuit composé de résistances, de capacités et d'inductances [12]. Dans ce cas, la loi d'ohm s'écrit :

$$\mathbf{E}_t = \mathbf{I}_t \times \mathbf{Z}(\omega) \quad (12)$$

L'impédance électrochimique «  $Z(\omega)$  » se calcule pour chaque fréquence et est un nombre complexe.

$$\mathbf{Z} = \mathbf{Z}_{re} + j\mathbf{Z}_{im} \quad \text{ou} \quad \mathbf{Z}(\omega) = \frac{\mathbf{E}_t}{\mathbf{I}_t} = |\mathbf{Z}| \exp j\varphi = \frac{\Delta E}{\Delta I} (\cos \varphi + j \sin \varphi) \quad (13)$$

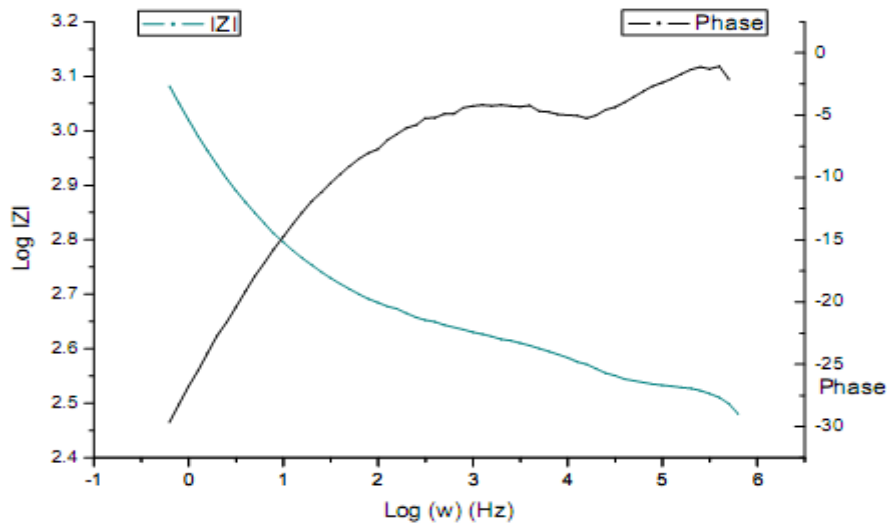
Avec :

$|\mathbf{Z}|$  : module de l'impédance

$\phi$ : angle de déphasage

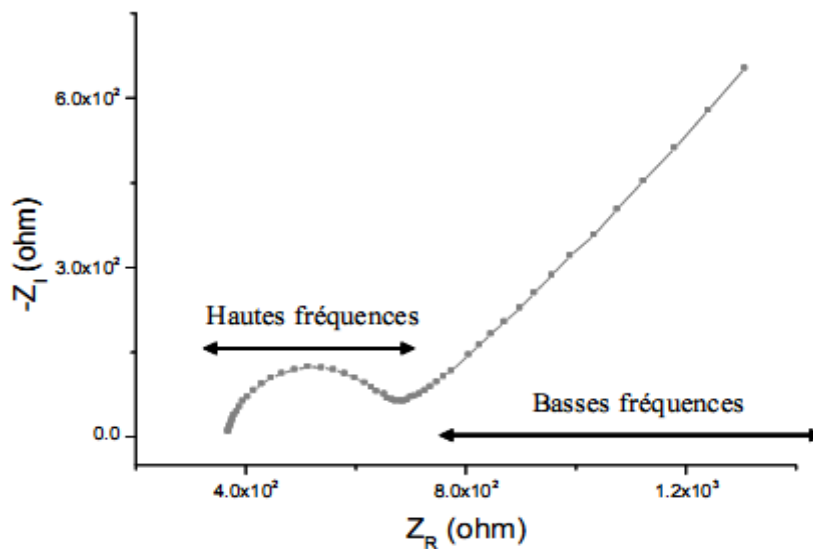
L'impédance complexe est couramment représentée selon deux modes différents :

- en mode Bode (**Figure 22**), le module  $|\mathbf{Z}|$  et la phase  $\phi$  sont tous les deux représentés en fonction du logarithme de la fréquence angulaire.



**Figure 22** : Diagramme de Bode qui représente log module et  $\phi$  en fonction de  $\log \omega$

- en mode Nyquist (**Figure 23**) qui est une représentation alternative de  $Z_{Re}$  (impédance réelle) en fonction de  $-Z_{Im}$  (impédance imaginaire) paramétrée en fréquence angulaire.



**Figure 183** : Diagramme de Nyquist représentant  $-Z_I$  en fonction de  $Z_R$

D'autres modes de représentations sont utilisés, comme l'admittance. De même que la conductance, qui a été créée afin de faciliter les calculs des circuits comportant des éléments purement résistifs en parallèle, l'admittance a été imaginée pour les circuits utilisant des impédances. L'admittance ( $Y$ ) est l'inverse de l'impédance et s'exprime en siemens (S).

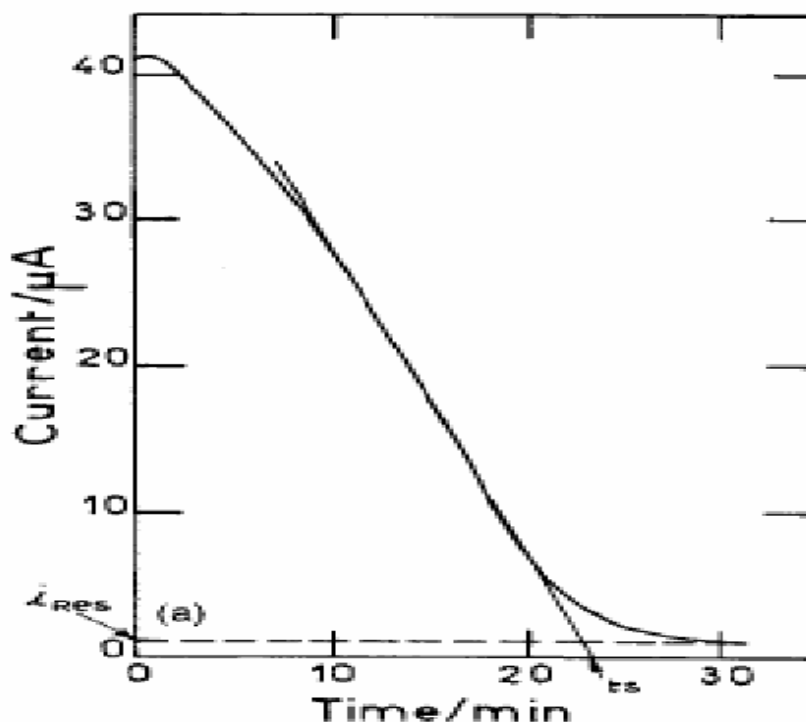
$$Y(\omega) = \frac{1}{Z(\omega)} \quad \text{et} \quad Z(\omega) = \frac{1}{Y(\omega)} \quad (14)$$

L'admittance est un nombre complexe qui s'écrit :  $Y = \frac{(Z_{re} - jZ_{im})}{(Z_{re}^2 + Z_{im}^2)}$  (15)

La spectroscopie d'impédance électrochimique permet de différencier les différents phénomènes qui peuvent avoir lieu dans une cellule électrochimique en fonction de la fréquence. Ainsi, les phénomènes rapides tels que les transferts d'électron se produisent à hautes fréquences, tandis que les phénomènes lents comme les transferts de masses et la diffusion se réalisent à basses fréquences (**Figure 23**).

## V. 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 24 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 24** : Chronoampérogramme typique ;  $i_{res}$  le courant résiduel [15]

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 :

$$i = K C(D/t)^{1/2} \quad (16)$$

Avec  $K$  : coefficient numérique,

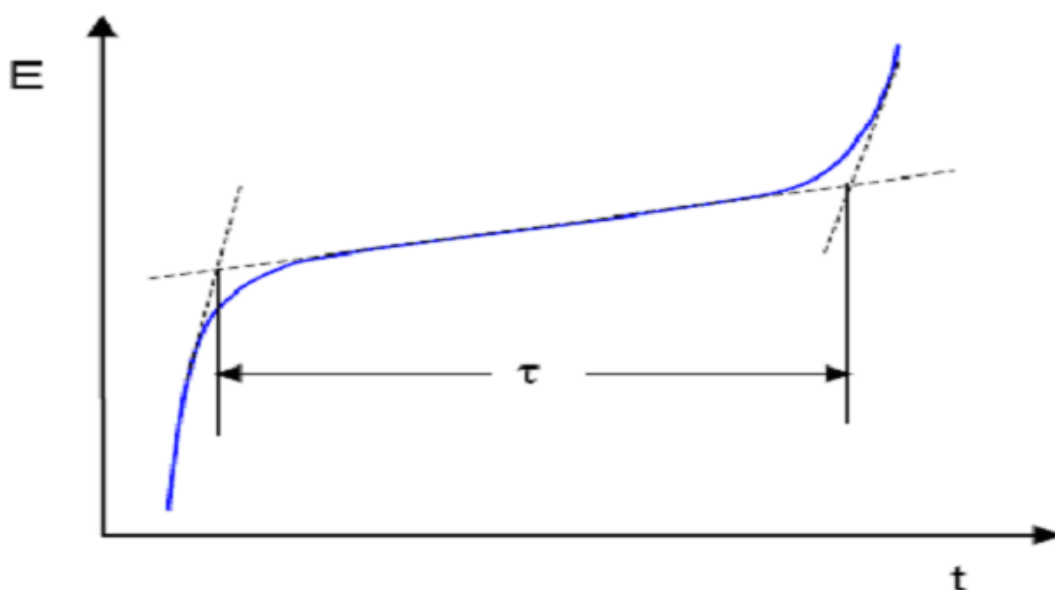
$D$  : coefficient de diffusion de l'espèce étudiée ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),

$C$  : 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 [16,17]. La mise sous tension d'électrode de travail crée un courant capacitif qui s'annule rapidement.

## VI. 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 25).



**Figure 25** : 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 électroactives 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  $\tau$ , on l'appelle temps de transition. Le temps  $\tau$  est relié à de la concentration et au coefficient de diffusion de l'espèce électroactive considérée par l'équation de Sand [17] :

$$i\tau^{1/2} = 85500nD^{1/2}AC \quad (17)$$

avec  $A$  : surface de l'électrode ( $\text{cm}^2$ ),

$D$  : 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.

Nous avons décrit quelques techniques d'analyses électrochimiques. Celles utilisées au cours de notre travail sont, la voltamétrie cyclique et la voltamétrie à onde carré.



## **VII. Techniques d'analyses de surface**

L'utilisation des techniques électrochimiques seules ne suffit pas à la compréhension des processus interfaciaux. Les techniques d'analyse de surfaces permettent d'accéder facilement à des informations complémentaires. L'étude de la structure cristalline et de la topographie des surfaces fait appel à différentes méthodes, certaines fournissent une information au niveau microscopique (microscopie électronique à balayage), d'autres renseignent à l'échelle atomique (microscopie à force atomique). Les phénomènes d'adsorption d'oxydation et de ségrégation modifient la composition chimique des surfaces qui diffèrent alors de celle de la masse. Les nouvelles propriétés des surfaces qui en résultent peuvent changer radicalement le comportement d'une pièce face aux agressions chimiques. Ainsi les méthodes de caractérisations chimiques des surfaces (comme la spectroscopie de photons électrons X) sont souvent indispensables pour étudier les processus de corrosion.

### **VII.1. Microscopie électronique par balayage (MEB)**

Le principe du MEB se base sur des interactions électrons-matière. Le principe du balayage consiste à explorer la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident. Les microscopes à balayage utilisent un faisceau très fin qui balaye point par point la surface de l'échantillon. La microscopie électronique à balayage (MEB) est la méthode la plus utilisée pour observer la topographie d'une surface en utilisant un faisceau d'électrons. Elle permet de donner la composition chimique de l'échantillon avec une limite de détection allant jusqu'au Bore. Le volume analysé est de l'ordre de  $\mu\text{m}^3$ .

L'interaction du faisceau d'électrons du microscope avec un solide, peut conduire à l'excitation des atomes constituant l'échantillon. Leur retour à l'état fondamental s'accompagne d'une libération d'énergie, avec production de rayons X secondaires caractéristiques des atomes des éléments excités. L'analyse des pics fournis par le spectromètre renseigne sur la composition de l'échantillon [19].

### **VI.2. 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  $15400\text{ cm}^{-1}$  et  $10\text{ cm}^{-1}$ . 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  $400\text{ cm}^{-1}$
- L'infrarouge moyen de  $400$  à  $5000\text{ cm}^{-1}$
- Le proche infrarouge de  $5000$  à  $12500\text{ cm}^{-1}$

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.

### **VII.3. Diffraction des rayons X (DRX)**

La diffraction par rayons X (EDX ou EDS: Energy Dispersive X-ray analysis or Spectroscopie) permet l'analyse élémentaire d'un échantillon. L'EDX fait partie intégrante du MEB. Suite à l'excitation des atomes présents dans le matériau par interaction avec les électrons incidents, des photons sont émis (désexcitation). Ces photons sont détectés par un détecteur « solide » semi-conducteur. Dans notre cas, c'est du silicium dopé au lithium. L'intensité du pic est proportionnelle à la quantité de photons émis et donc au nombre d'atomes. Il s'agit d'une analyse quantitative. Le calcul des concentrations est effectué à partir du principe d'une répartition homogène des particules dans le volume analysé.

### **VII.4. Microscopie électronique par Transmission (MET)**

Le microscope électronique par transmission est un microscope électronique permettant de visualiser des objets bien plus petits que des cellules.

Le microscope électronique par transmission (MET ou TEM en anglais) utilise un faisceau d'électrons à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée.

Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis, qui doit à la fois conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. Des

coupes très fines de l'échantillon sont réalisées à l'ultramicrotome (de 60 à 100 nanomètres). Des colorations aux métaux lourds sont également possibles pour augmenter les contrastes de structures particulières des échantillons, préalablement placées sur des grilles d'observation.

Si la préparation des échantillons est plus longue et plus contraignante que pour une microscopie optique, la résolution offre une vue incomparable des structures. La microscopie électronique par transmission permet de visualiser les organites intracellulaires, des virus, des cristaux.

## VII.5. 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 méso porosité. 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 :

$$St = 3.98 [1-P/P0] [Ades/Acal] Vcal$$

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

Ades : aire du pic de désorption

Acal : aire du pic de calibration

Vcal : volume de la cellule de calibration.

La surface spécifique est donnée par la formule :

$$S = St/M$$

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 bibliographiques**

- [1] A.J. Bard, L.R. Faulkner, "Electrochimie. Principes, Méthodes et Applications", Masson, Paris (1983).
- [2] Dini J.W ; électrodeposition , the materials science of coating and substrat, Noyes publications(1992), p.195.
- [3] V.G. Hambate, T.L. Ngono, H. Saadan, M. Ennachte, M. Khouili, A. Hafid, B. Loura, A. Chtaini, *Pharmaceutical analytica acta.*, 4(2013)10.
- [4] Girault H.H.Electrochimie : physique et analytique, Presses polytechnique et universitaires romandes, (2001).
- [5] Idrissi L., thèse (2006), Université Mohammed V, 146 p.
- [6] Kemula W., Kublik Z., Nature, 182 (1958) 793.
- [7] Nicholson R.S., Anal. Chem. 37 (1965) 667.
- [8] Bard A.J., Faulkner L.R., Electrochimie, principes, méthodes et applications, Masson, Paris, (1983).
- [9] Adams R.N., Electrochemistry at solid electrodes, M. Dekker, New York, (1969).
- [10] Nicholson R.S., Shain I., Anal. Chem., 36 (1964) 706.
- [11] Skladal P., Electroanalysis, 9 (1997) 745.
- [12] Tremillon B. (1993): Masson.
- [13] Bard, A. J. And Faulkner, L. R. Electrochemical methods : Fundamentals and applications.(2001): John Miley & sons, Inc.
- [14] Fernandez-Sanchez C., Mcneil C. J., And Rawson K. Trends in Analytical Chemistry, (2005). 24(1): p. 37-48.
- [15] Gabrielli C., Keddou M., Perrot H., Khalil A., Rosset R., Zidoune M., J. Appl. Electrochem., 26 (1996) 1125-1132.
- [16] Epstein B.D., Dalle-Molle E. J.S. Mattson, Carbon, 9 (1971) 609.
- [17] Snoeyink V.L., Weber W.J., Progr. Surface Membrane Sci., 5 (1972) 63.
- [18] Sand H.J.S., Phil. Mag., 1 (1901) 45.
- [19] Labjar N. ; thèse 2010, Université Mohammed V, P.57.

**Chapitre III :**  
**DÉTERMINATION BIOANALYTIQUE**  
**DES DENRÉES ALIMENTAIRES**

## Introduction

Dans la dernière décennie, les chercheurs manifestent un intérêt croissant pour l'utilisation des systèmes bioanalytiques comme des nouveaux outils pour l'évaluation de la capacité antioxydante. Parmi ceux-ci, nombreux sont les systèmes basés sur l'habilité des antioxydants à capter le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) (SO). Celui-ci est produit *in situ* via des réactions chimiques [1] ou biochimiques comme l'oxydation de la xanthine (XA) en acide urique (AU), catalysée par la xanthine oxydase (XOD) [2]. Ces systèmes sont soit à la base du cytochrome C (Cyt C) [3-5] soit de la superoxyde dismutase (SOD) [1,6]. Les deux enzymes acceptent comme substrat le SO, permettant soit la quantification directe [3-6], du radical soit la quantification indirecte à travers du  $H_2O_2$  produit dans cette réaction [7,8]. Ces biocapteurs exploitent inefficacement le système XA/XOD car la XOD n'est pas immobilisée mais utilisée libre dans le tampon de la mesure électrochimique.

Ce chapitre est dédié à la mise en œuvre d'un système, pratique et efficace, capable de régénérer des radicaux libres, *in situ*, dans la cellule électrochimique ce qui permet d'effectuer une étude analytique fiable, d'autant plus que les ROS sont très instables et réagissent rapidement. Cette méthode consiste à coupler un réacteur, sous forme d'une colonne remplie par de la silice sur laquelle nous avons fixé la xanthine oxydase, à un réacteur électrochimique d'analyse (Fig. 26).

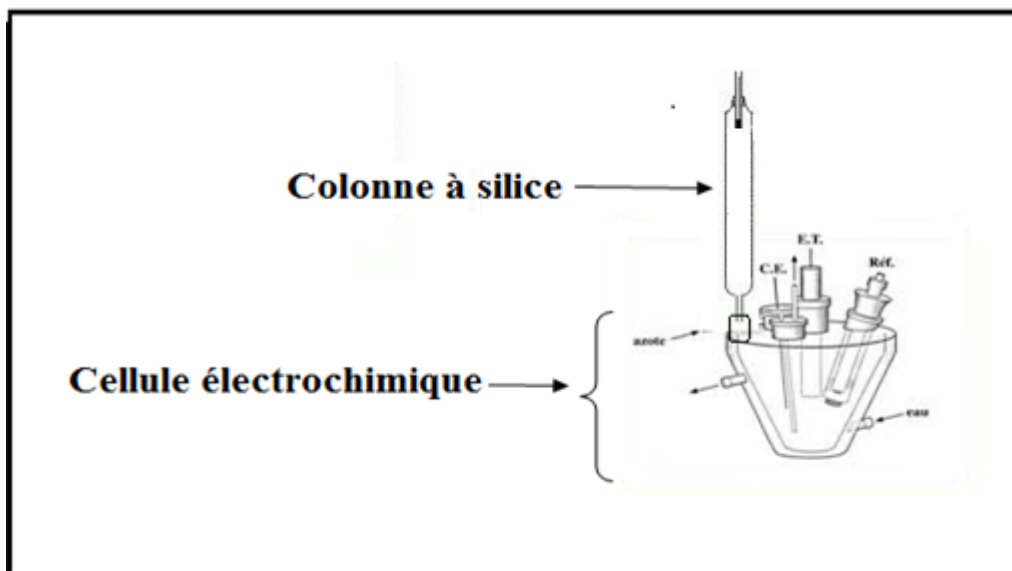
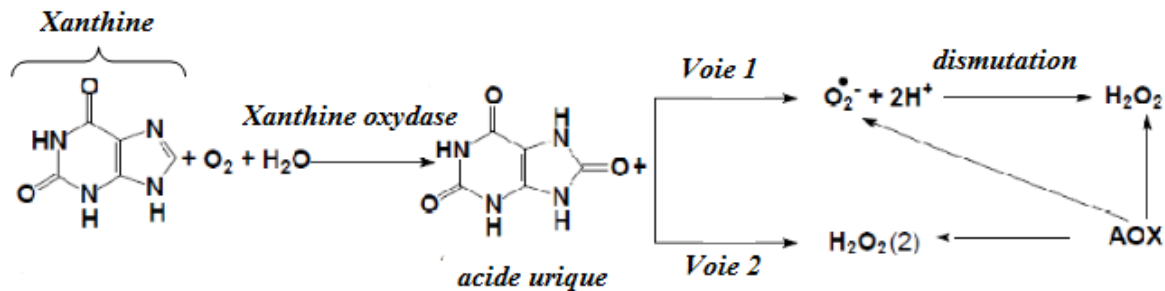


Figure 26 : Système bio électrochimique pour la détermination du pouvoir anti oxydant.

## I. Procédure

Une solution de xanthine est passée dans la colonne contenant la xanthine oxydase fixée sur la silice, il se produit alors une réaction enzymatique (réaction 1), dont l'acide urique et les radicaux libres,  $\text{SO}$  (radical superoxyde) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxyde d'hydrogène), constituent les produits principaux. Les radicaux  $\text{SO}$  se dismutent à leur tour et se transforment en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le peroxyde d'hydrogène formé est aussitôt analysé dans la cellule électrochimique, ce qui permet d'établir une courbe de calibration.

Dans un second lieu, une quantité bien déterminée de l'aliment à étudier est mélangée et mélangée avec la solution de xanthine, l'ensemble est passé dans la colonne, ce qui permet une réaction entre l'aliment et le peroxyde formé. Ensuite la quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  non réagit est analysée dans le réacteur électrochimique.



Réaction 1 : Production des radicaux libres.

## II. Réacteur électrochimique

Il s'agit d'une cuvette thermostatée d'une capacité de 200 ml, munie de trois électrodes :

- Une plaque de platine, qui joue le rôle de l'électrode auxiliaire ;
- Une électrode au calomel comme électrode de référence ;
- Une électrode de travail.

L'électrode de travail constitué l'armature la plus importante de la cellule électrochimique, elle est nécessaire à la réalisation de la réaction électrochimique de surface, ce qui permet l'analyse de l'eau oxygénée dans notre cas. C'est une électrode préparée au laboratoire, elle représente l'originalité de notre réacteur électrochimique. L'électrolyte utilisé est une solution 0.1M du tampon phosphate à pH 7.2, barbotée à l'argon pendant 10 minutes.

## II.1. Préparation de l'électrode de travail

L'électrode de travail choisie pour effectuer l'électroanalyse  $H_2O_2$  est une électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre. L'électrode à pâte de carbone est préparée en mélangeant la poudre de graphite à un liant non conducteur : la paraffine, dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. Par la suite, la pâte est insérée manuellement dans la cavité cylindrique du corps de l'électrode (surface géométrique d'environ  $0.1256 \text{ cm}^2$ ). Le contact électrique est établi avec une barre de carbone. La surface de cette électrode a été polie avec un papier (SiC) de grade 600, nettoyée par l'acétone pure et de l'eau bidistillée. Le dépôt du cuivre à la surface de l'électrode à pâte de carbone a été effectué par voie électrochimique, selon le procédé de la figure 27. L'anode est une plaque de platine de  $1 \text{ cm}^2$  de surface. Le courant continu (DC) appliqué par un galvanostat est maintenu constant au cours de la manipulation. Le dépôt du cuivre a été procédé sous 20 V pendant une heure.

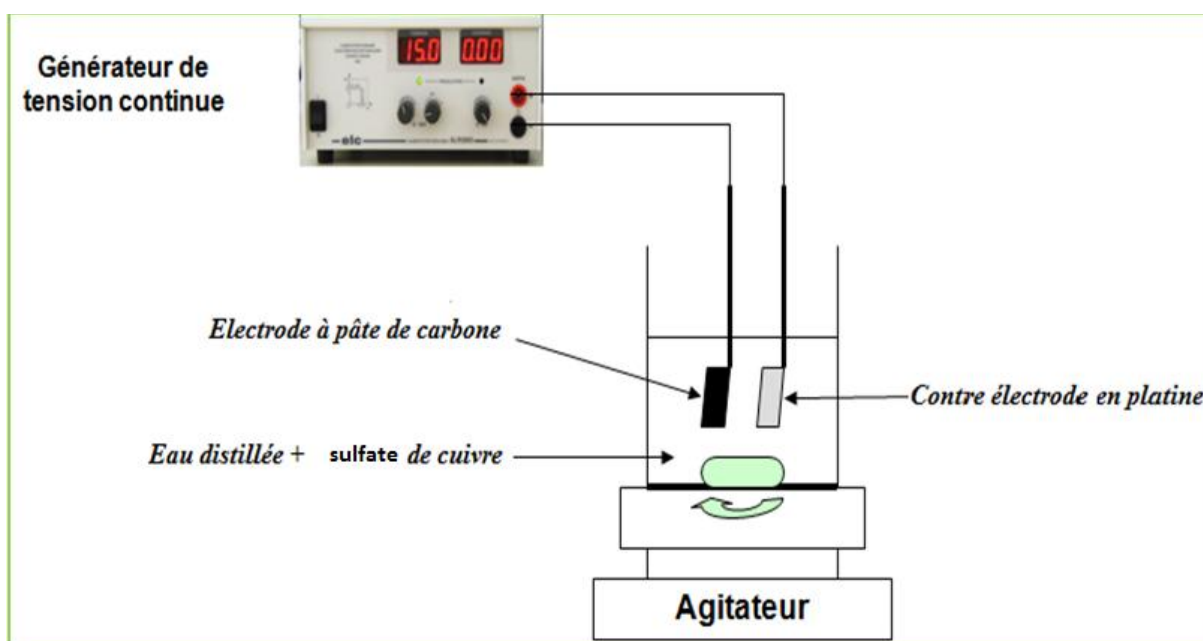


Figure 27 : Electro déposition du cuivre à la surface de l'électrode à pâte de carbone.

## II.2. Appareillages et réactifs

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 le tout connecté au réacteur électrochimique.



Les échantillons de thé de marque (MENARA) et le café de marque (SAMAR) ont été achetés dans un super marché de la place, l'ail a été acheté au marché et la pâte de carbone fournie par lorraine, référence 9900, français. L'eau bidistillée et déminéralisée a été utilisée tout au long de ce travail.

### III. Caractérisation de l'électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre (CGE-Cu)

#### III.1. Caractérisation électrochimique

Pour examiner le comportement de la couche de cuivre déposée sur le carbone graphite, nous avons enregistré les voltamogrammes cycliques relatifs aux deux électrodes étudiées (CGE et CGE-Cu) (Fig. 28). Nous constatons que l'allure des voltamogrammes est différente ce qui montre que la surface de l'électrode à pâte de carbone est belle et bien modifiée par le cuivre.

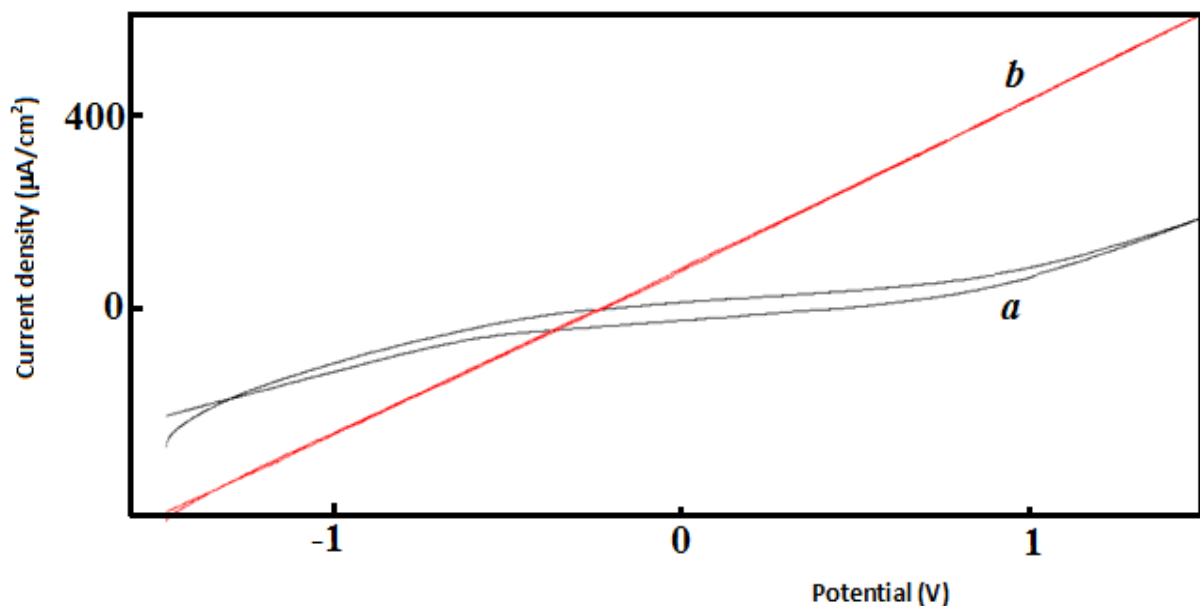
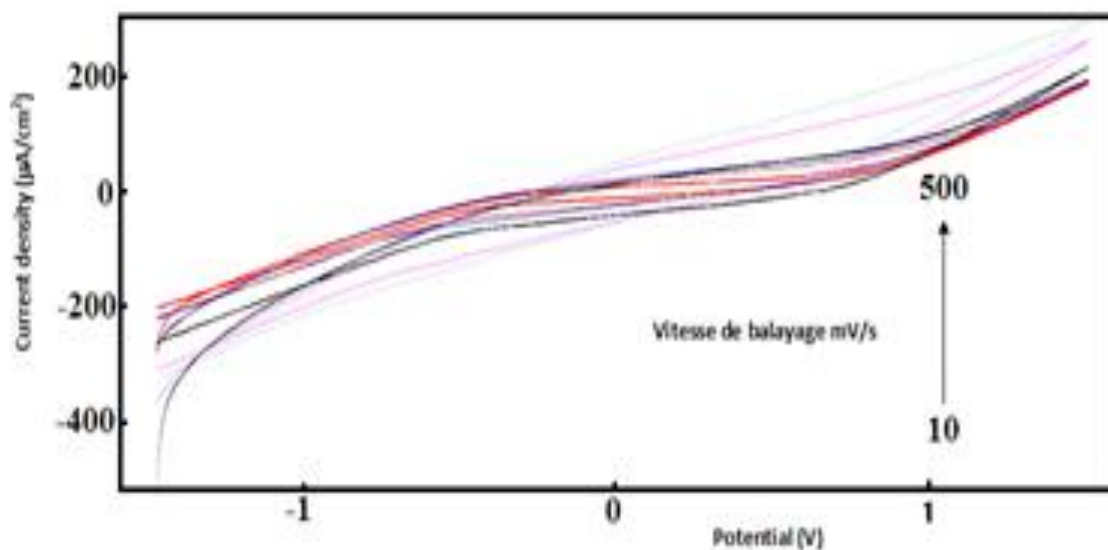


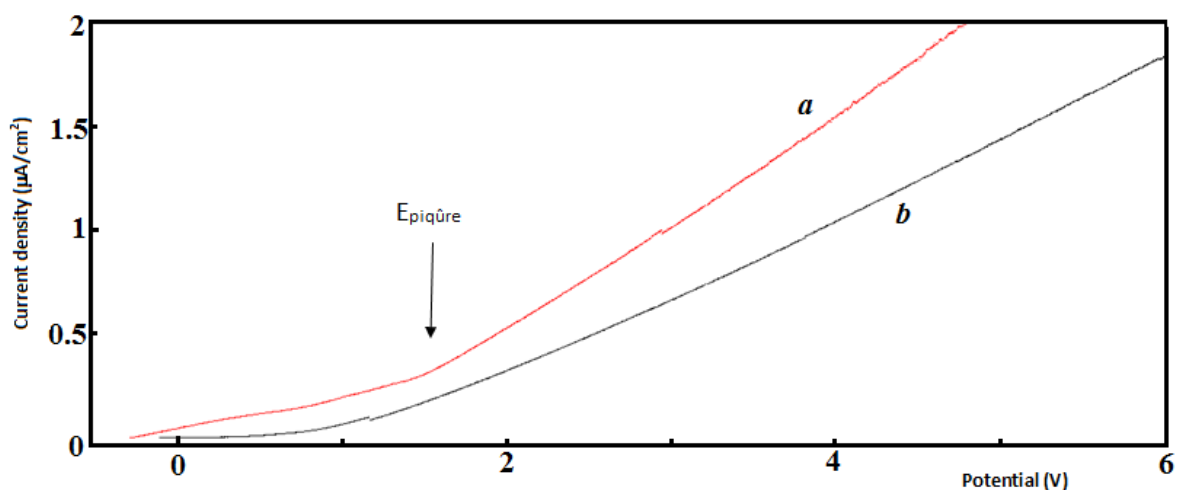
Figure 19 : Voltamogrammes enregistrés en milieu tampon pour les électrodes, a- CGE et b- CGE-Cu à la vitesse de balayage de 100mv/s.

La figure 29 montre, l'effet de la variation de la vitesse de balayage sur l'allure du voltamogramme, enregistré pour l'électrode à pâte de carbone graphite modifiée par le cuivre, nous constatons que les densités de courant augmentent avec la vitesse, ce qui laisse suggérer que les vitesses élevées nettoient la surface de l'électrode et la rendent plus active.



**Figure 29 : Effet de la vitesse de balayage sur l'allure du voltamogramme enregistré pour l'électrode CPE-Cu dans une solution de tampon phosphate 01M.**

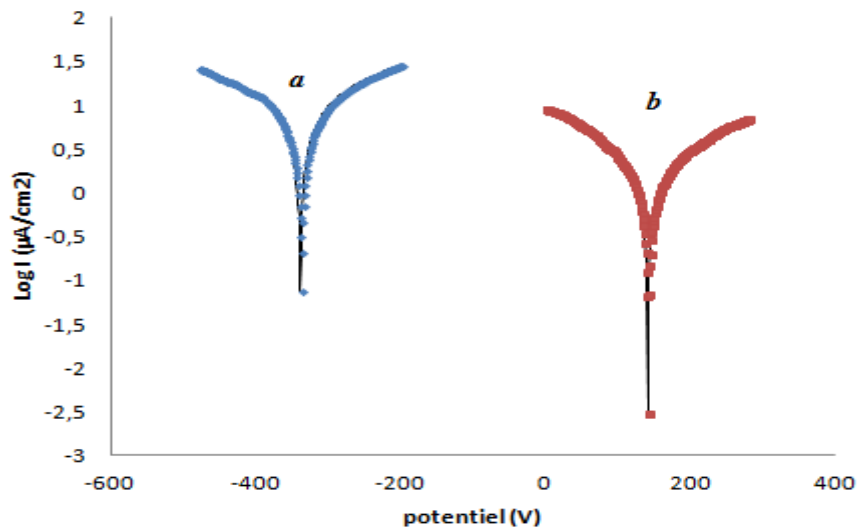
L'étude des risques de subir le phénomène de la corrosion par piqûre pour les deux électrodes étudiées (Fig. 30), montre que l'électrode modifiée est plus disposée à ce type de corrosion.



**Figure 30 : Etude de la corrosion par piqûre relative aux électrodes, a- CPE-Cu et b- CPE.**

La figure 31 illustre les courbes de polarisation enregistrées pour les électrodes CGE-Cu et CGE. Les paramètres de corrosion notamment le potentiel de la corrosion ( $E_{\text{corr}}$ ), la densité de courant de corrosion ( $J_{\text{corr}}$ ) et les constantes de Tafel ( $B_a$  et  $B_c$ ) obtenus à partir des courbes de Tafel sont regroupés dans le tableau 4. Nous constatons, à partir de ces résultats,

que le cuivre forme un film 10 fois moins résistant que la pâte de carbone, cependant l'électrode modifiée reste stable dans le milieu utilisé.



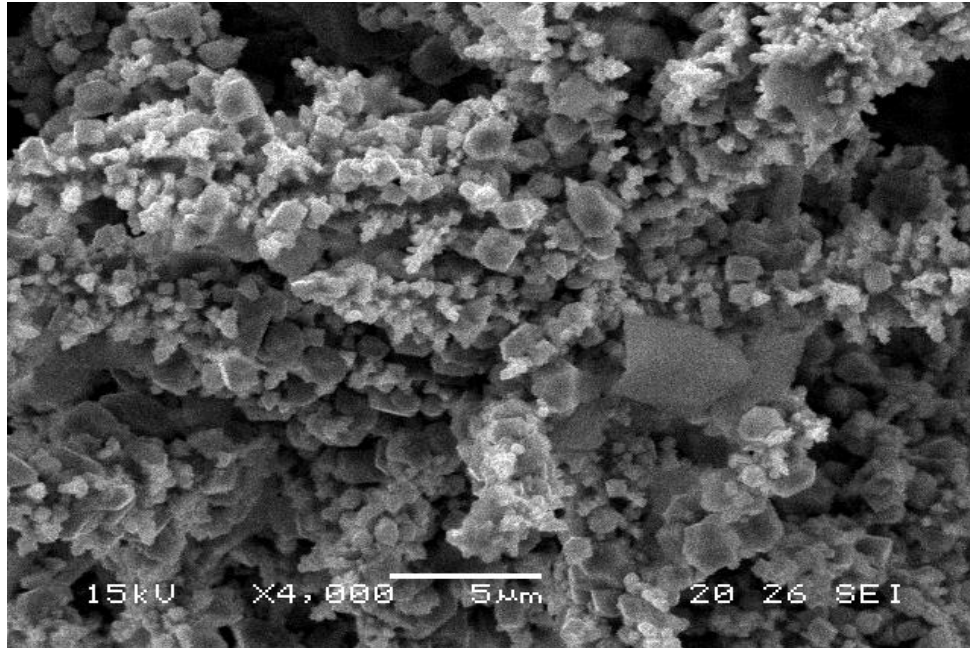
**Figure 31: Courbes de polarisation enregistrées pour les électrodes, a-pâte de carbone graphite, b- pâte de carbone graphite modifiée par le cuivre**

**Tableau 4 : Résumé des paramètres électrochimiques pour les électrodes étudiées**

<i>Electrodes</i>	<i>Pâte de carbone</i>	<i>Pâte de carbone modifiée par le cuivre</i>
$E (i=0)$ mv	-216.1	-258.8
$R_p$ (k $\Omega$ ·cm <sup>2</sup> )	14.94	2.76
$I_{lim}$ ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	1.4536	10.869
$B_a$ (mV/dec.)	183.6	205.6
$B_c$ (mV/dec.)	-161.1	-212.2

### III.2. Caractérisation morphologique de l'électrode CPE-Cu

Nous avons observé la morphologie de la couche de cuivre, déposée à la surface de l'électrode à pâte de carbone graphite, par microscopie électronique à balayage (Fig. 32). On note que la couche finale obtenue est plus dense et uniforme, la présence des pores joue un rôle important sur la réactivité de cette électrode.



**Figure 32 : Microscopie Electronique à Balayage de l'électrode à pâte de carbone Modifiée par le Cuivre.**

#### **IV. Réacteur bio analytique**

Le réacteur bio analytique est conçu de sorte à garantir la présence des radicaux libres dans la solution, par la minimisation au maximum du temps de repos des ROS. La colonne est couplée et liée directement à la cellule électrochimique, les radicaux formés sont aussitôt analysés.

La colonne est remplie par de la silice qui a subi un prétraitement selon le procédé suivant [9] :

##### ***Etape 1 : Fonctionnalisation de la silice par $NH_2$***

La silice a été mise en contact avec une solution de soude pendant 1 heure à 90 °C, sous agitation magnétique, après lavage avec l'acide sulfurique, la silice est mise en contact prolongé avec une solution d'alanine.

##### ***Etape 2 : Immobilisation de la xanthine oxydase sur la silice***

La silice activée par la fonction  $NH_2$  est mise en contact avec la solution de xanthine oxydase pendant 4 jours, l'immobilisation de l'enzyme est très lente mais suivi par la transformation de la couleur du substrat. La colonne est désormais prête pour les manipulations. Pour vérifier le succès de l'immobilisation, l'activité enzymatique de la

solution avant et après l'immobilisation peut être mesurée avec le protocole spectrophotométrique recommandé par le fournisseur de l'enzyme [10].

## **V. Détermination du pouvoir anti oxydant de l'ail**

### **V.1. Courbe de calibration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

L'échantillon réel (ail) a été dilué au 1 : 6 avec le tampon, les conditions d'expériences, en l'occurrence le débit de la solution de xanthine et sa concentration sont gardées fixes durant toutes les manipulations.

La courbe de calibration de l'électroanalyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été tracée selon le protocole suivant :

- Des concentrations différentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont ajoutées dans la cellule de mesures électrochimiques contenant la solution tampon,
- Après chaque ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous enregistrons le voltamogramme à onde carrée relatif à la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la surface de l'électrode de pâte de carbone graphite modifiée par le cuivre,
- On prélève la densité de courant correspondant au pic qui apparaît sur le voltamogramme.

Sur la figure 34 nous rapportons l'évolution de la variation de la densité de courant de réduction en fonction de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nous constatons que les densités de courant de réduction croient avec la concentration du peroxyde d'hydrogène (Figs. 34 et 35).

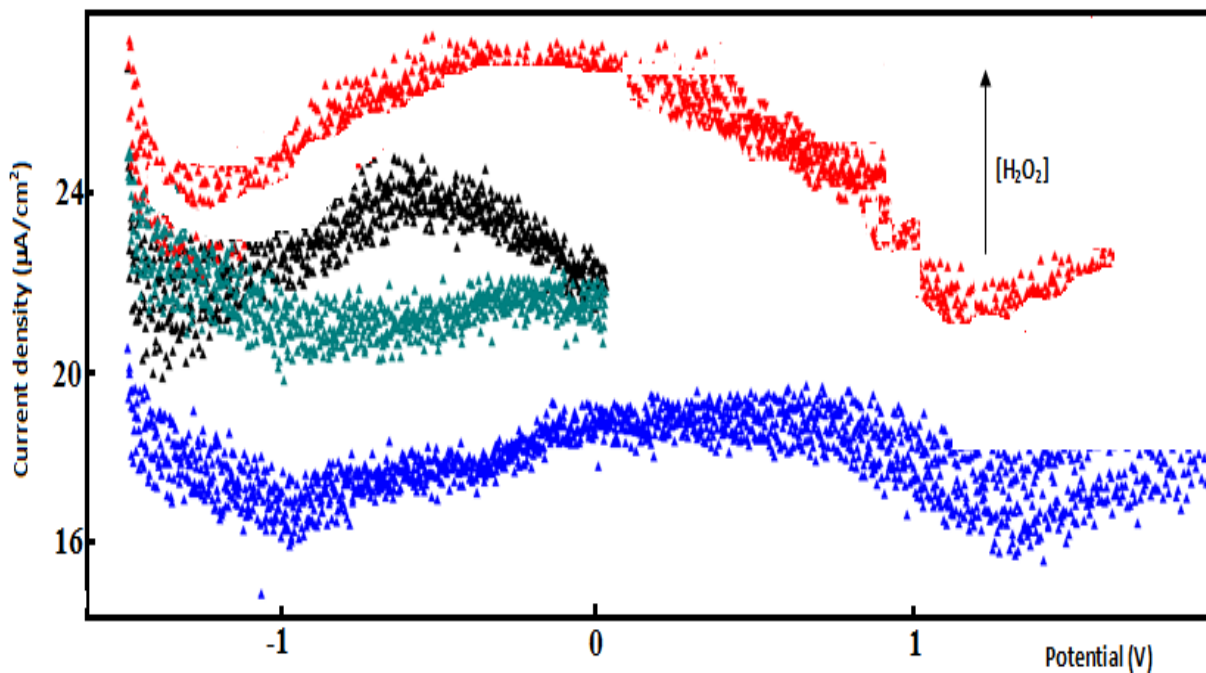


Figure 33 : Voltamogrammes à ondes carrées enregistrés pour CPE-Cu, en milieu tampon contenant le peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations.

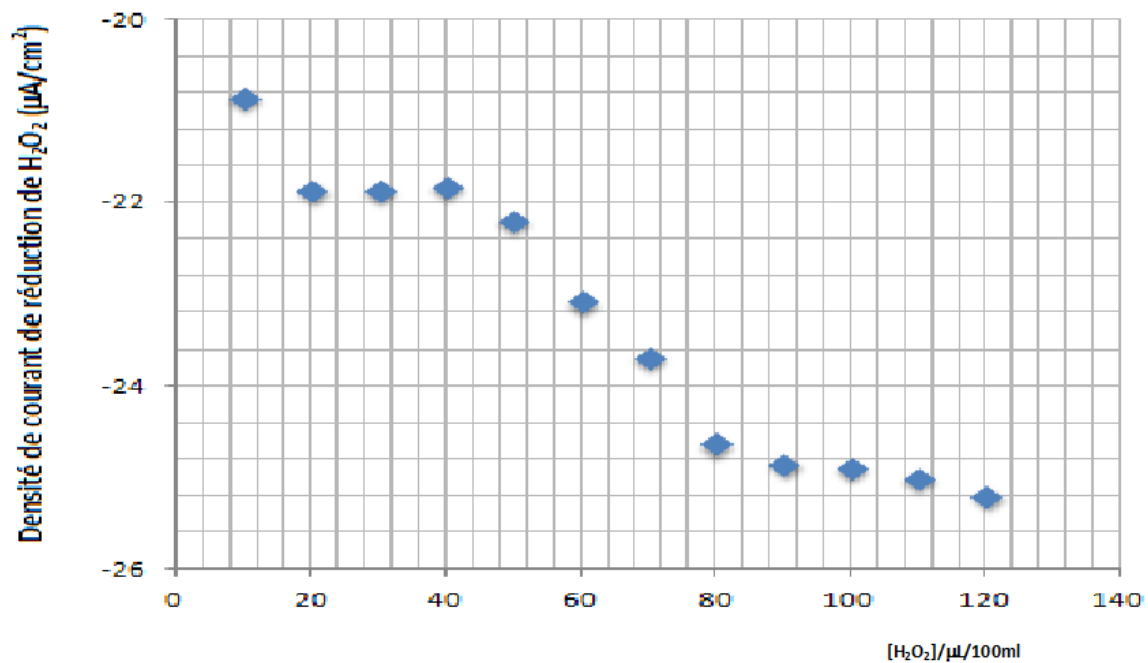


Figure 20 : Courbe de calibration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur CPE-Cu en milieu tampon phosphate.

## V.2. Inhibition de la réduction de $H_2O_2$ par l'ail

Dans le but d'inhiber l'effet nocif de  $H_2O_2$ , nous avons fait passer sur le réacteur bio analytique une solution constituée du mélange de la xanthine et un extrait à concentrations déterminées de l'ail, la solution récupérée dans la cellule de mesure est analysée par la réduction du peroxyde d'hydrogène par l'électrode CPE-Cu.

La figure 36 montre l'évolution du courant de réduction du peroxyde d'hydrogène, avec la concentration de l'ail. Nous constatons que, les densités de courant de réduction de  $H_2O_2$  baissent lorsque la concentration de l'ail croit, ce qui revient à dire que la concentration de  $H_2O_2$  baisse sous l'effet de l'ajout de l'ail, ou encore l'ail inhibe la réduction de  $H_2O_2$ . Nous constatons que pour inhiber totalement une quantité de 80  $\mu\text{L}/100\text{mL}$  de  $H_2O_2$ , nous avons besoin de 100  $\mu\text{L}/100\text{mL}$  d'ail.

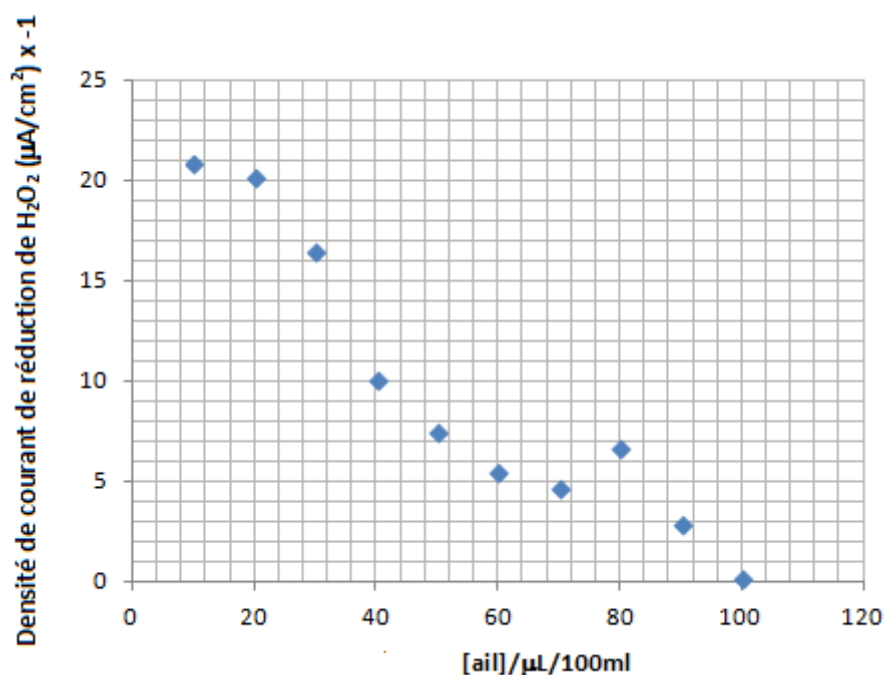


Figure 21 : Evolution de la densité de courant de réduction de 80  $\mu\text{L}/100\text{mL}$  de  $H_2O_2$  avec la concentration de l'ail.

Le pouvoir anti oxydant des aliments (PAO) est déterminé à partir de l'expression :

$$PAO(\%) = \frac{I_{pH_2O_2} - I_{pH_2O_2 + \text{denrée alimentaire}}}{I_{pH_2O_2}} \times 100$$

Avec  $I_{p, H_2O_2}$  est la densité de courant de réduction de  $H_2O_2$ , et  $I_{p, H_2O_2 + \text{denrée alimentaire}}$  est la densité de réduction de  $H_2O_2$  en présence de l'échantillon étudié.

Sur la figure 36, nous illustrons l'évolution du PAO de l'ail avec la concentration de  $H_2O_2$ . Nous constatons que la capacité anti oxydante de l'ail décroît avec l'ajout du peroxyde d'hydrogène.

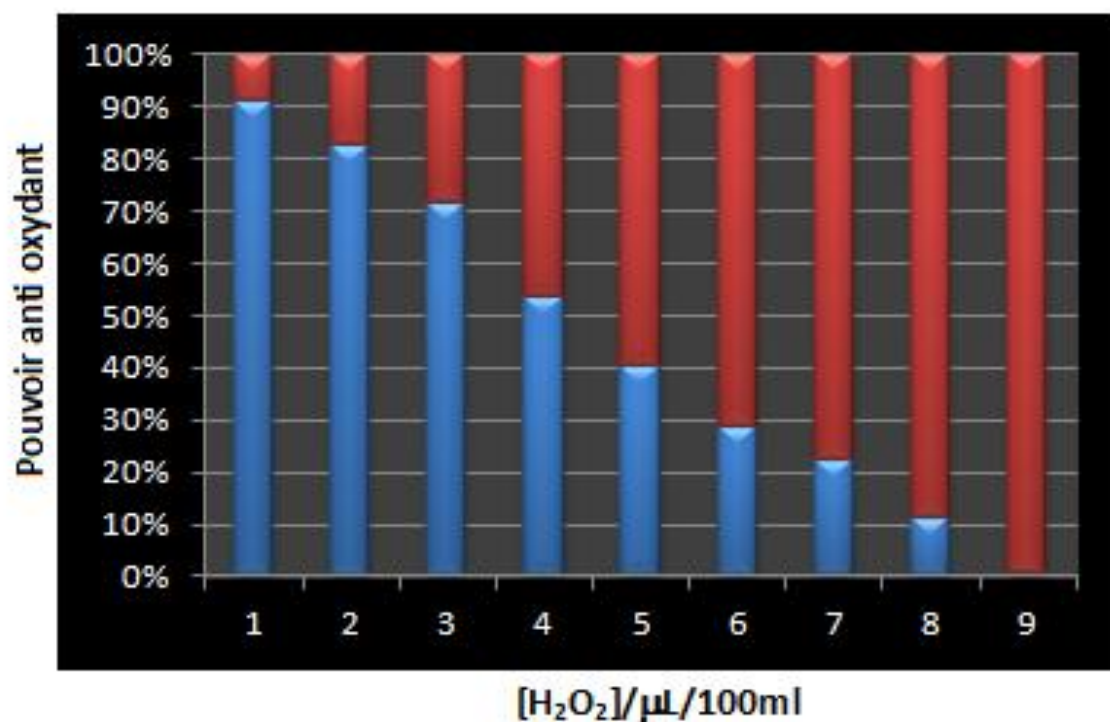


Figure 22 : Evolution du PAO de l'ail avec la concentration du peroxyde d'hydrogène



## VI. Détermination du pouvoir anti oxydant du thé vert

La figure 37 représente l'évolution de la densité de courant d'oxydation du thé avec la concentration, nous constatons que la capacité oxydante du thé croît avec la concentration du thé. Ce qui montre que la surface active de l'électrode de pâte de carbone modifiée par le cuivre est très importante.

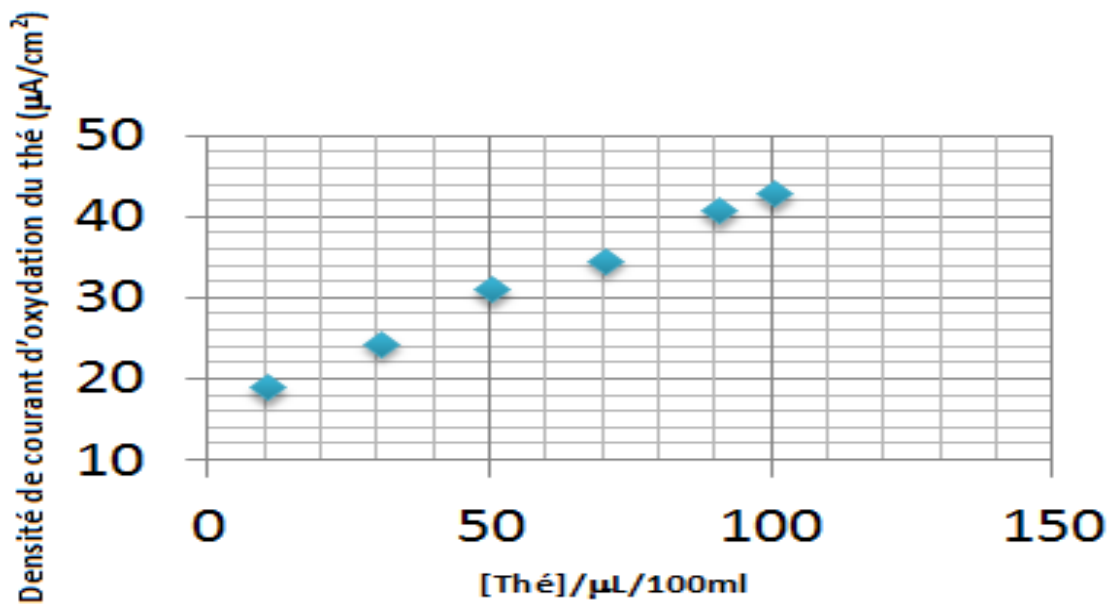


Figure 23 : Evolution de la densité de courant d'oxydation du thé avec la concentration

Les voltamogrammes à ondes carrées enregistrés pour CPE-Cu, illustrant l'effet de l'inhibition de la réduction du peroxyde d'hydrogène par le thé, sont donnés par la figure 38. La quantité de  $H_2O_2$  décroît rapidement en présence de thé. Nous pouvons expliquer ce phénomène par le fait que les molécules actives du thé sont plus mobiles que le peroxyde.

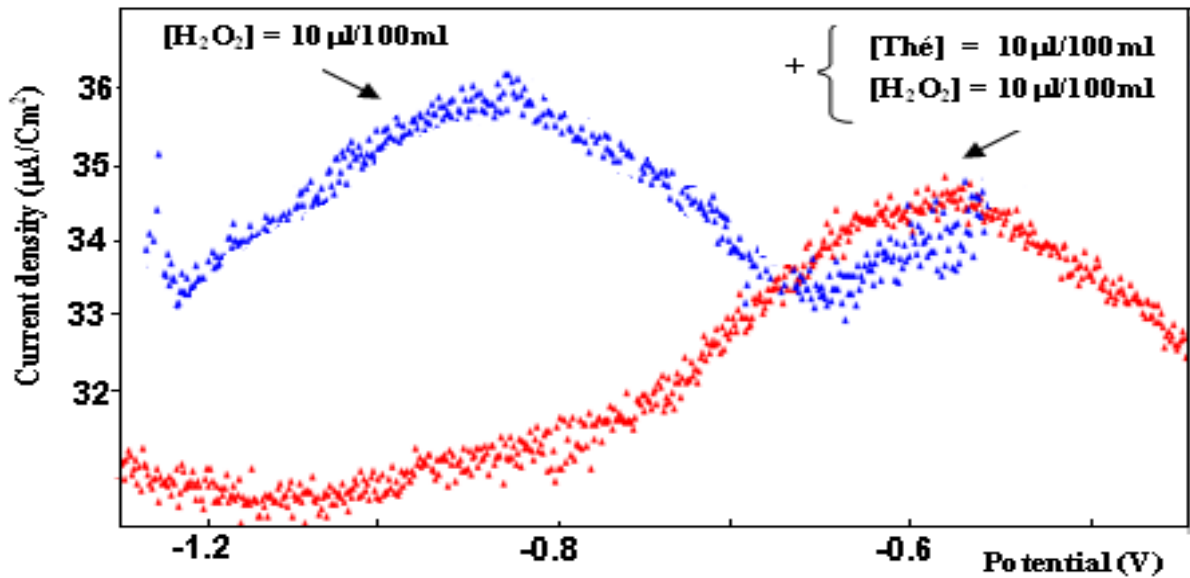


Figure 24 : Inhibition de la réduction de  $H_2O_2$  par le thé.

En fixant la concentration du thé, nous constatons que le PAO décroît avec l'ajout de  $H_2O_2$ . Ce qui suggère que la capacité anti oxydante du thé baisse en présence du peroxyde d'hydrogène (Fig. 39).

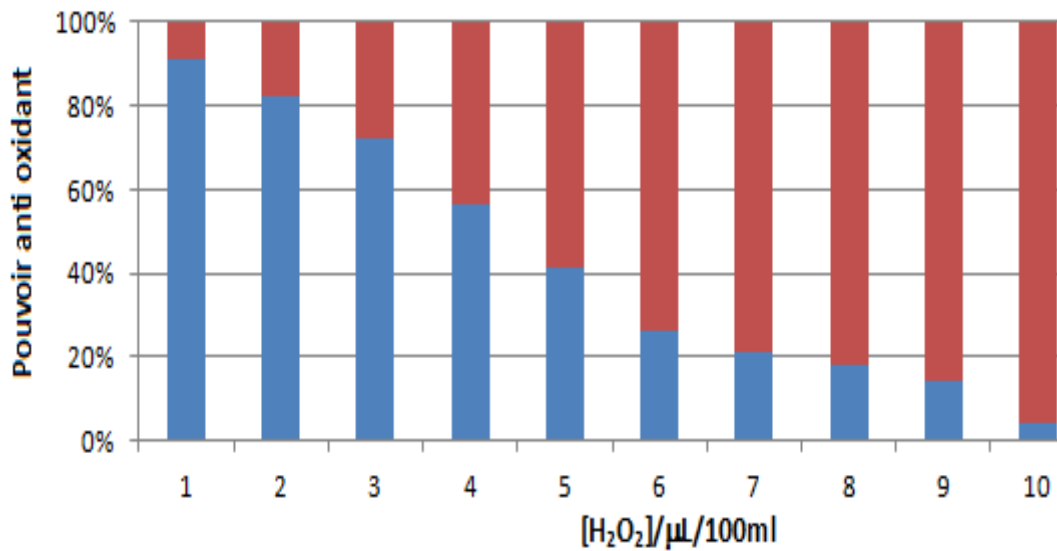
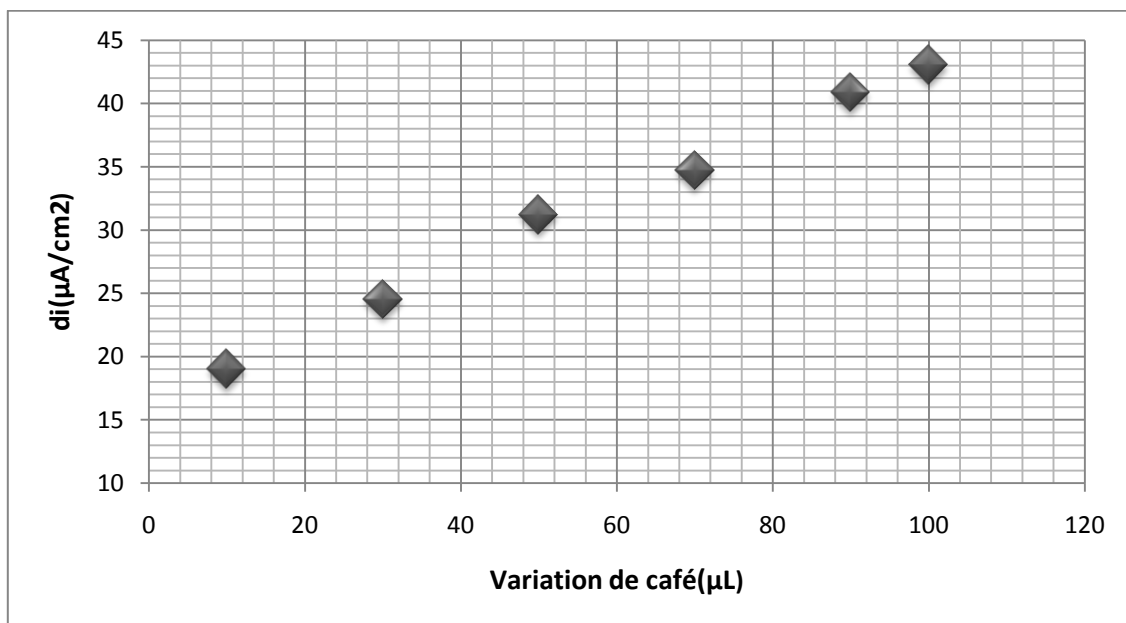


Figure 25 : Evolution du PAO du thé avec la concentration de  $H_2O_2$ .

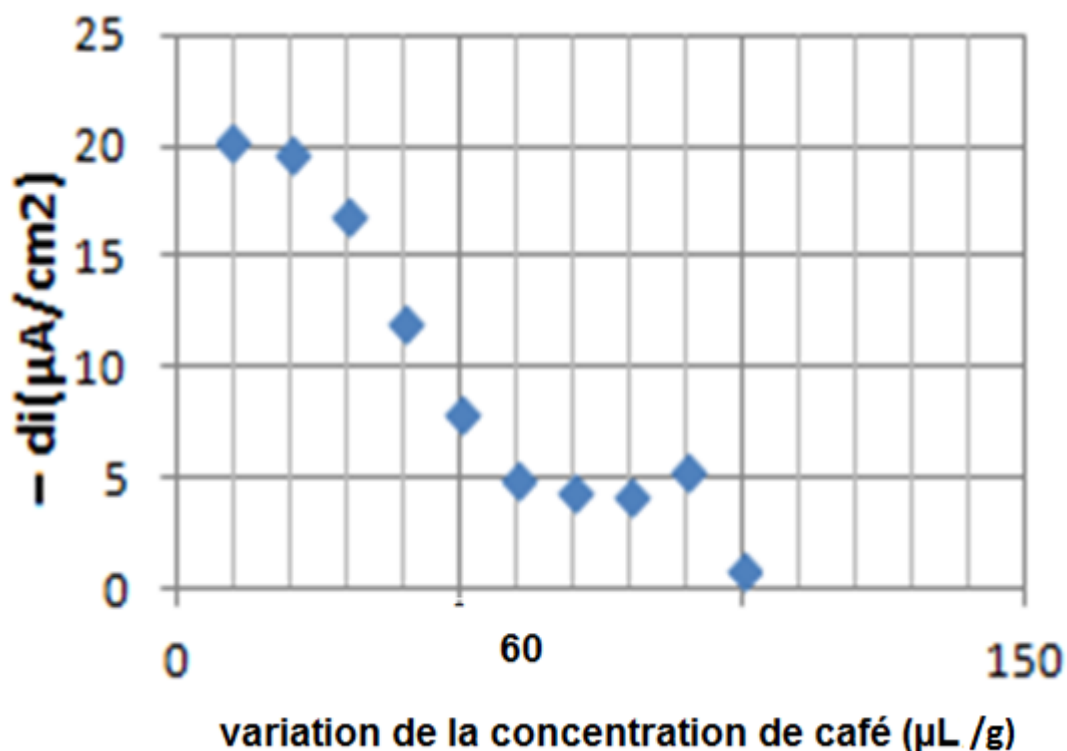
## VII. Détermination du pouvoir anti oxydant du café

La figure 40 illustre l'évolution de la densité de courant du pic attribué à l'oxydation du café, à la surface de l'électrode de pâte de carbone modifiée par le cuivre. Nous constatons que les densités de courant d'oxydation croissent avec la concentration du café dilué dans la solution tampon. Ces densités de courant sont presque identiques à celles obtenues pour le thé, nous pouvons affirmer que les deux boissons les plus utilisés présentent la même capacité oxydante.



**Figure 40 : Evolution de la capacité oxydante du café avec la concentration**

Afin d'étudier le comportement électrochimique du café envers la réduction de  $H_2O_2$ , nous avons fixé la concentration du peroxyde d'hydrogène à  $100 \mu\text{L}/100\text{mL}$ . La figure 41 montre l'effet de l'ajout du café sur  $H_2O_2$ , nous pouvons constater que les densités de courant de réduction baissent progressivement jusqu'au  $-5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  après l'ajout d'environ  $60 \mu\text{L}/\text{mL}$  de café, avec l'apparition d'un plateau, probablement en raison de la saturation de la surface d'électrode.



**Figure 26 : Evolution de la densité de courant de réduction de 100 μL/100mL de  $H_2O_2$  avec la concentration du café.**

Les voltamogrammes à ondes carrées types qui illustrent l'inhibition de la réduction du peroxyde d'hydrogène respectivement par le café et le thé, sont donnés par le graphe 42. Pour cette étude comparative nous avons utilisé les mêmes concentrations de thé et de café, les conditions expérimentales sont pratiquement identiques.

Les densités de courant de réduction du peroxyde d'hydrogène se décroissent, d'une façon remarquable, en présence du thé, ce qui laisse suggérer que le thé inhibe mieux la réduction de  $H_2O_2$ , que le café, ce résultat est confirmé par les valeurs du pouvoir anti oxydant calculées pour les deux boissons.

Pour le thé :

$$\frac{I_{H_2O_2} - I_{H_2O_2 \text{ thé}}}{I_{H_2O_2}} \times 100 = 13.15\%$$

Et pour le café :

$$\frac{I_{H_2O_2} - I_{H_2O_2 \text{ café}}}{I_{H_2O_2}} \times 100 = 6.6\%$$

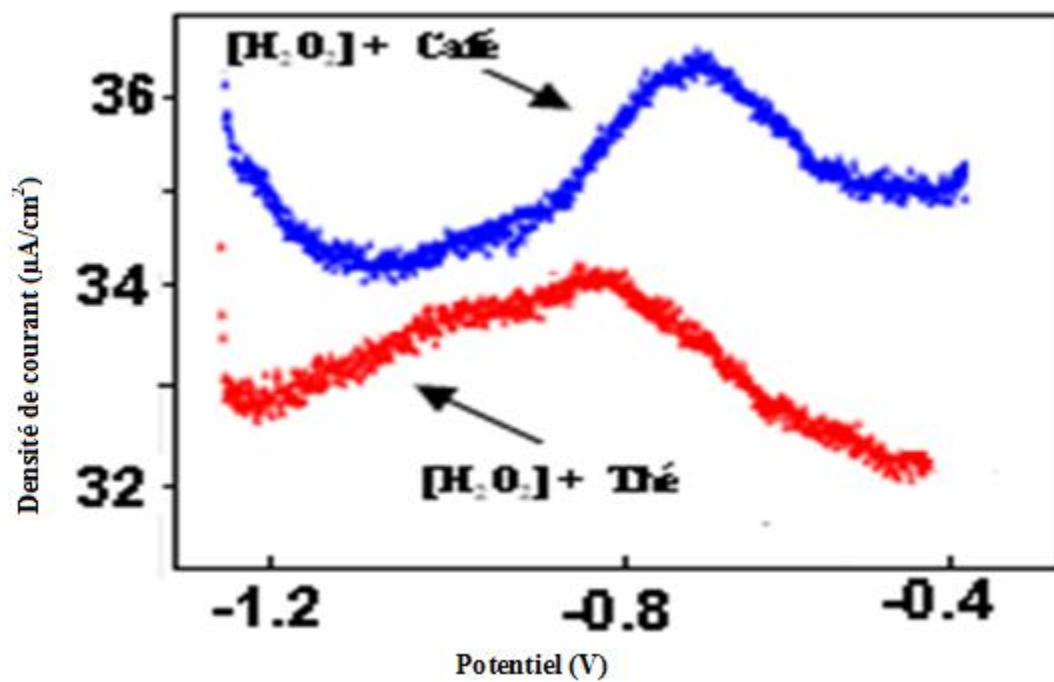


Figure 27 : Voltamogrammes à ondes carrées enregistrés pour l'électrode CPE-Cu en milieu tampon contenant le peroxyde d'hydrogène, le thé et/ou le café.

## Conclusion

L'électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre, est préparée par électrodéposition des ions  $\text{Cu}^{2+}$  sur le support carbone graphite, cette méthode a montré son efficacité pour l'obtention d'un film uniforme et rugueux.

L'électrode CPE-Cu a prouvé une efficacité remarquable vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène.

La capacité oxydante des denrées alimentaires étudiées, dissout dans la solution tampon, a été entreprit sur l'électrode CPE-Cu.

La méthode utilisée, qui consiste à coupler un réacteur bio analytique et un capteur électrochimique, a prouvé son efficacité pour l'étude ou la détermination des pouvoirs anti oxydant des denrées alimentaires.

Parmi les boissons les plus utilisées, le thé et le café, le thé présente des propriétés anti oxydantes plus importantes que le café.

## Références

- [1] Y. Tian, T. Okajima, F. Kitamura, T. Ohsaka, A SOD-based amperometric biosensor for superoxide ion, *J. Korean Electrochem. Soc.*, (2002), 5, 212.
- [2] I. Fridovich, Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, (1970), 245, 4053.
- [3] F. Lisdat, B. Ge, R. Rezek, E. Kozniowska, An electrochemical method for quantification of the radical scavenging activity of SOD, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, (1999), 365, 494.
- [4] S. Ignatov, D. Shishniashvili, B. Ge, F.W. Scheller, F. Lisdat, Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants, *Biosens. Bioelectron.*, (2002), 17, 191. 43
- [5] M. Beissenhirtz, F. Scheller, F. Lisdat, Immobilized Cytochrome c Sensor in Organic/Aqueous Media for the Characterization of Hydrophilic and Hydrophobic Antioxidants, *Electroanalysis*, (2003), 15, 1425.
- [6] E. Emregul, Development of a new biosensor for superoxide radicals, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2005), 383, 947.
- [7] L. Campanella, A. Bonnani, D. Bellantoni, G. Favero, 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.*, (2004), 36, 91.
- [8] S. Mesaros, Z. Vankova, A. Mesarosova, P. Tomcik, S. Grunfeld, Electrochemical determination of superoxid and nitric oxide generated from biological samples, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, (1998), 46, 33.
- [9] T. Richter, L.L. Schultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Bilitewski, D.J. Harrison., *Sens. Actuat. B*, 81(2002) 369.
- [10] Sigma. Ezymatic assay of peroxidase. 2009; Available from: [http://originwww.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme\\_Assay/p6140enz.Par.001.File.tmp/p6140enz.pdf](http://originwww.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p6140enz.Par.001.File.tmp/p6140enz.pdf).

**Chapitre IV :**  
**ÉVALUATION DU POUVOIR ANTI**  
**OXYDANT DES MOLÉCULES ORGANIQUES**  
**SYNTHÉTISÉES**

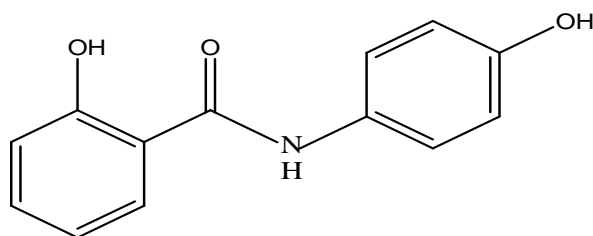


## Introduction

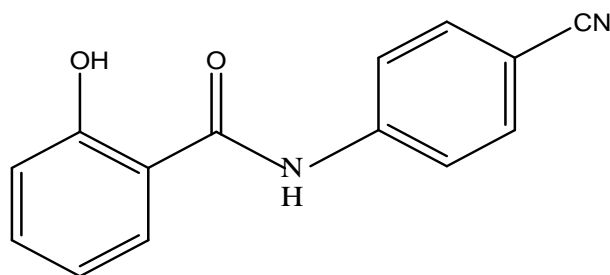
Les réactions d'oxydation observées dans les produits alimentaires, qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles [1-5], C'est pourquoi, de nombreuses recherches actuelles visent à découvrir ou inventer des moyens de prévention de ces oxydations, qui seraient efficaces, faciles à mettre en œuvre, nécessitant peu d'investissement et peu chers à l'utilisation tout en étant dépourvus d'effets préjudiciables sur les propriétés organoleptiques des produits alimentaires et sains [6-8]. L'antioxydant alimentaire idéal, et facilement incorporable et efficace à faible dose, est non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable. Résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini. Les molécules à bas potentiel standard ( $E^\circ$  ox/red) apte à ralentir, retarder ou prévenir les processus d'oxydation [9,10] sont en fait des agents de prévention ou de terminaison capables d'éviter ou de piéger les radicaux libres. L'action préventive bloque l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène ou en déviant de l'aliment des effets de lumière ou des rayonnements. En tant qu'agents de terminaison (piégeage de radicaux), les antioxydants transforment les radicaux en composés plus stables et bloquent la phase de propagation.

A la recherche des molécules organiques qui peuvent servir comme agent anti oxydant additif, nous avons procédé à la synthèse organique de quelques molécules, que nous estimons avoir des propriétés capables de piéger des radicaux libres et réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette étude permettra d'ouvrir de nouvelles perspectives d'application, notamment comme additifs alimentaires ou cosmétiques.

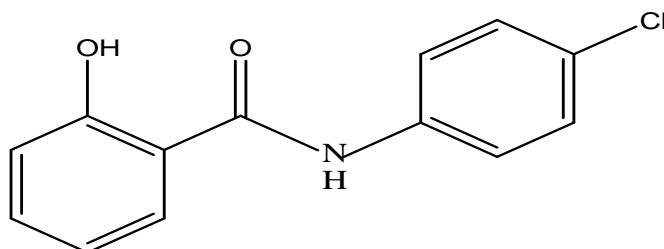
Les molécules synthétisées sont les suivantes :



**Molécule A : N-(4-hydroxyphényl)-2-hydroxybenzamide**



**Molécule B : N-(4-cyanophényl)-2-hydroxybenzamide**

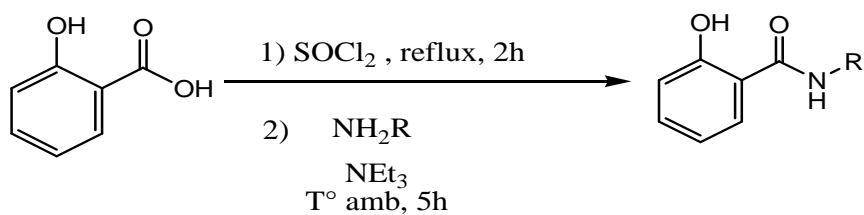


**Molécule C : N-(4-chlorophényl)-2-hydroxybenzamide**

Notons que ces molécules ne diffèrent que par la substitution des groupements, -CN, -Cl et -OH.

**Synthèse des molécules :**

Les molécules ont été synthétisées suivant le schéma réactionnel suivant et avec des bons rendements :



Les structures des produits synthétisés ont été identifiées par spectroscopie RMN ( $^1\text{H}$ ) (voir document en annexe).

## I. Etudes Electrochimiques

L'étude du comportement électrochimique de ces trois molécules, a été réalisée par un montage constitué par un potentiostat de type Voltalab 10, piloté par le logiciel Master 4. La cellule électrochimique est une cuvette thermostatée, de capacité d'environ 200 mL, menée de trois électrodes :

- Une électrode auxiliaire, il s'agit d'une plaque en platine (1 cm x 1 cm),
- Une électrode de référence, c'est l'électrode au Calomel,
- Une électrode de travail, c'est l'électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre.

Le milieu électrolytiques est constitué par une solution tampon phosphate, dont le pH est fixé à 7,2. Les méthodes électrochimiques utilisées sont choisies judicieusement, pour réaliser une étude électrochimique complète et rigoureuse, qui permet de mettre en évidence les réactions électrochimiques d'inhibition de la réduction du peroxyde d'hydrogène par les molécules proposées.

### I.1. Molécule A

La figure 44 montre l'évolution du voltamogramme cyclique, de l'électrode de pâte de carbone modifiée par le cuivre, par l'ajout de différentes concentrations de la solution contenant la molécule A. Nous constatons, l'augmentation des densités de courant d'oxydation du côté anodique et l'apparition d'un pic de réduction, dans le balayage dans le sens cathodique, au fur et à mesure que l'on enrichit le milieu en molécule A.

Ce comportement est confirmé par l'enregistrement des voltamogrammes à ondes carrées, dans les mêmes conditions, donné par la figure 44.

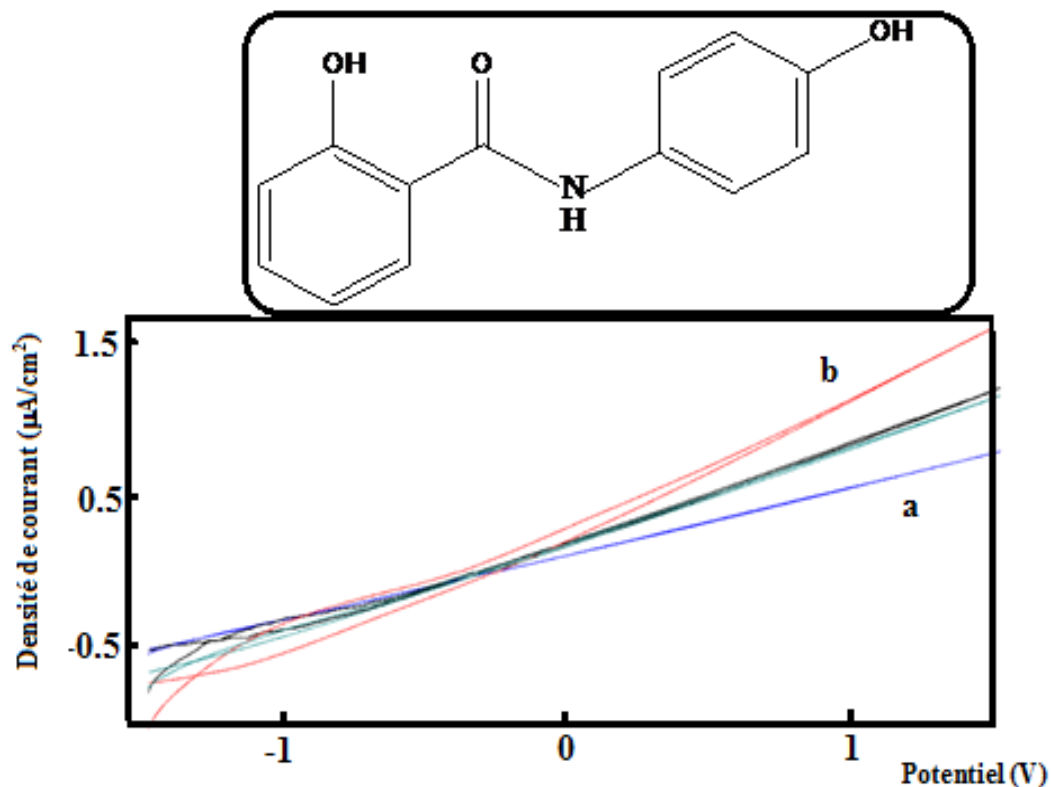


Figure 28 : Voltamogrammes cycliques enregistrés par l'ECG-Cu, a- en milieu tampon, b- en milieu tampon contenant la molécule A, à 100 mV/s.

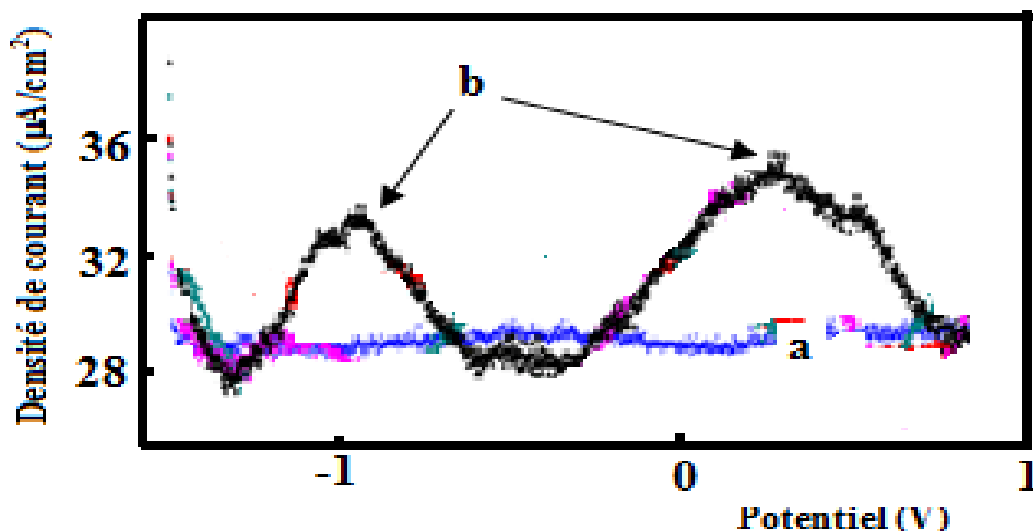


Figure 29 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon, b- en milieu tampon contenant la molécule A

Le voltamogramme à onde carrée, enregistré pour l'électrode ECG-Cu en milieu tampon (Fig. 44), ne présente aucun pic, une fois que l'on ajoute la molécule A dans le

milieu électrolytique, nous constatons l'apparition de deux pics bien définis (Fig. 45). Le premier à environ -1 V et qui peut être attribué à une réaction de réduction et le second vers 0.2 V qui correspond bien à une oxydation, probablement l'oxydation de la molécule A.

## I.2. Molécule B

Le même comportement est observé en présence de la molécule B dans le milieu, selon la figure 46, qui indique l'évolution du voltamogramme à onde carrée, enregistré pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon contenant la molécule B, on note la présence des deux pics électrochimiques mais à des potentiels légèrement déplacés vers les valeurs positives. Nous pouvons conclure que selon les données électrochimiques la substitution du groupe fonctionnel -OH par -CN n'a pas un effet remarquable sur le comportement.

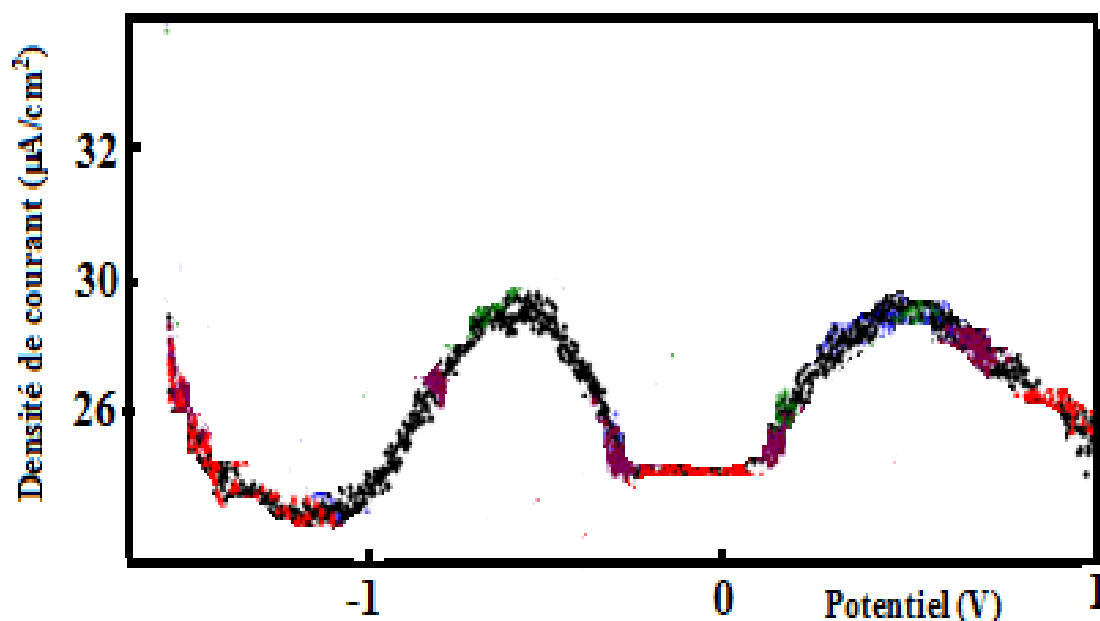


Figure 30 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon contenant la molécule B

### I.3. Molécule C

Le comportement électrochimique de la molécule C est décrit par la voltamétrie cyclique illustré par la figure 47, nous constatons que l'ajout de la molécule C dans le milieu entraîne l'augmentation des densités de courant mais aucun pic électrochimique n'est observé.

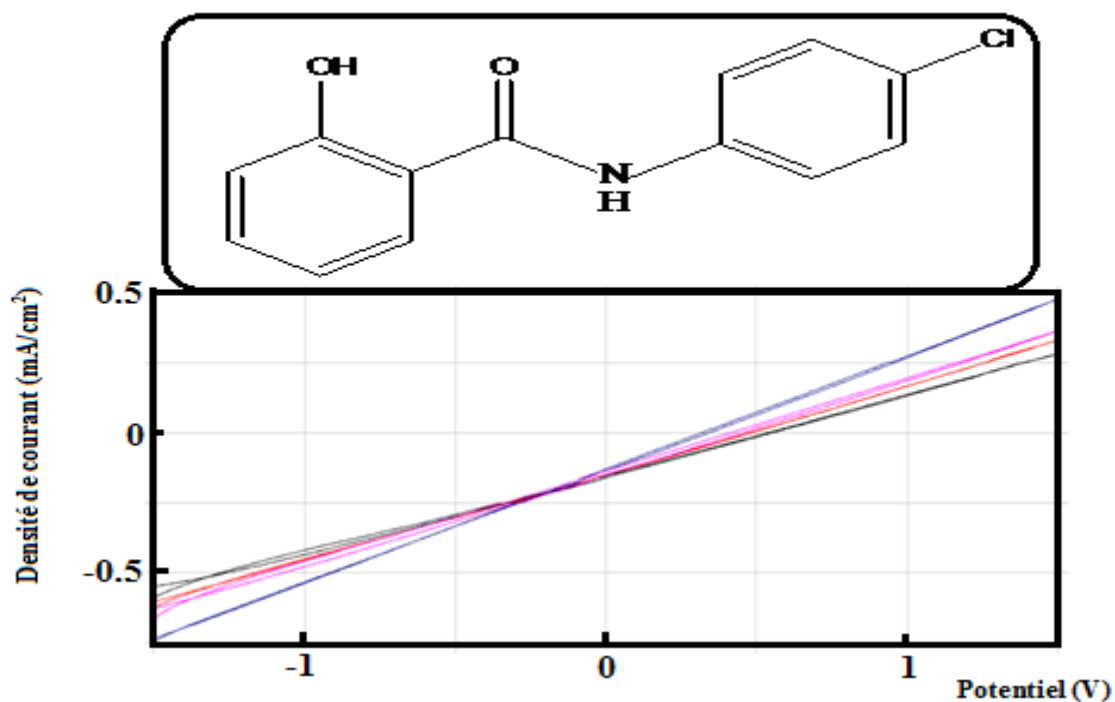


Figure 31 : Voltamogrammes cycliques enregistrés par l'ECG-Cu, en milieu tampon contenant la molécule C, à 100 mV/s.

### Conclusion

Nous pouvons conclure que le comportement électrochimique des trois molécules étudiées est pratiquement le même, aucun pic bien défini n'est observé en voltamétrie cyclique (Fig. 47), par contre la voltamétrie à onde carrée permet de distinguer deux pics électrochimiques (Fig. 48), le premier de réduction à potentiel négatif et le second est une d'oxydation vers environ 0.5 V.

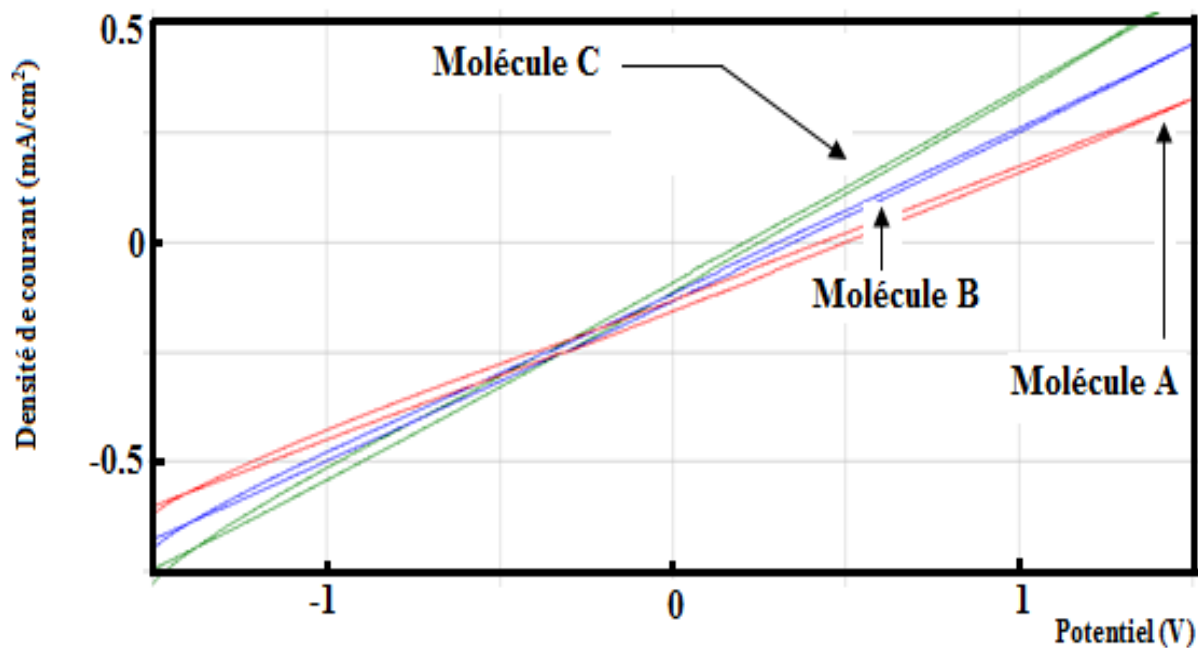


Figure 32 : Voltamogrammes cycliques enregistrés par l'ECG-Cu, en milieu tampon contenant, respectivement les molécules : A, B et C à 100 mV/s.

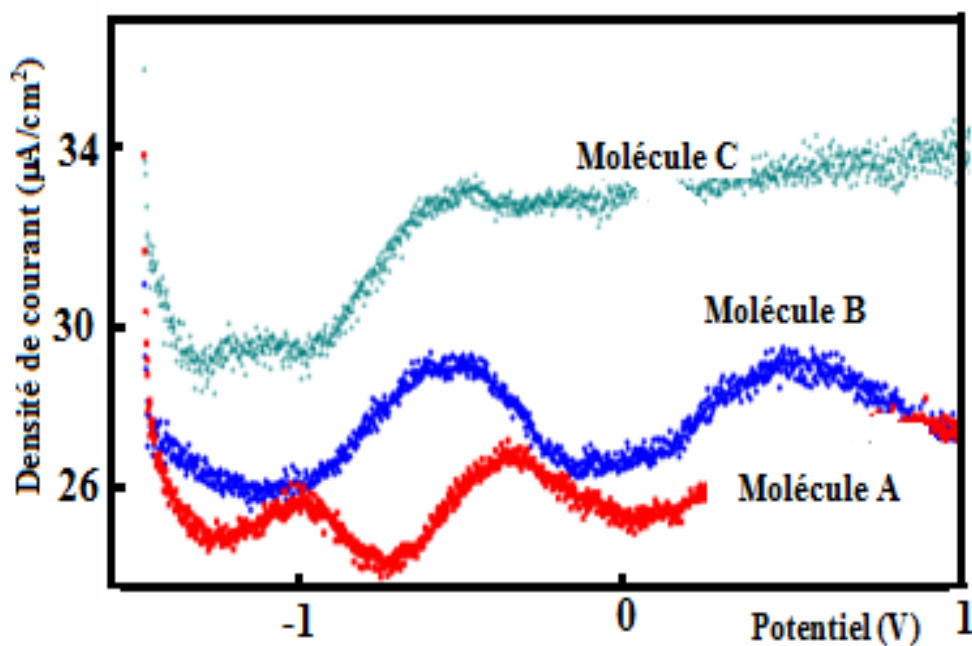


Figure 33 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon contenant, respectivement les molécules A, B et C.

## II. Pouvoir anti oxydant des molécules étudiées

### II.1. Molécule A

Les propriétés anti oxydantes des molécules préparées ont été investies par voltamétrie à onde carrée, par l'étude de l'inhibition de la réduction du peroxyde d'hydrogène. La procédure de la manipulation consiste à générer bio analytiquement dans la cellule électrochimique, une concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  proche de  $100 \mu\text{L}/100\text{mL}$  de solution tampon puis ajouter progressivement la solution de la molécule A et mesurer par voltamétrie à onde carrée la densité de réduction du peroxyde d'hydrogène sur l'électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre.

D'après la figure 50, nous constatons que l'ajout progressif de la solution contenant la molécule A, entraîne le décroissement de la densité de courant de réduction (en valeur absolue) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'inhibition totale de la réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène nécessite environ  $100 \mu\text{L}/100\text{mL}$  (Fig. 50), en milieu tampon.

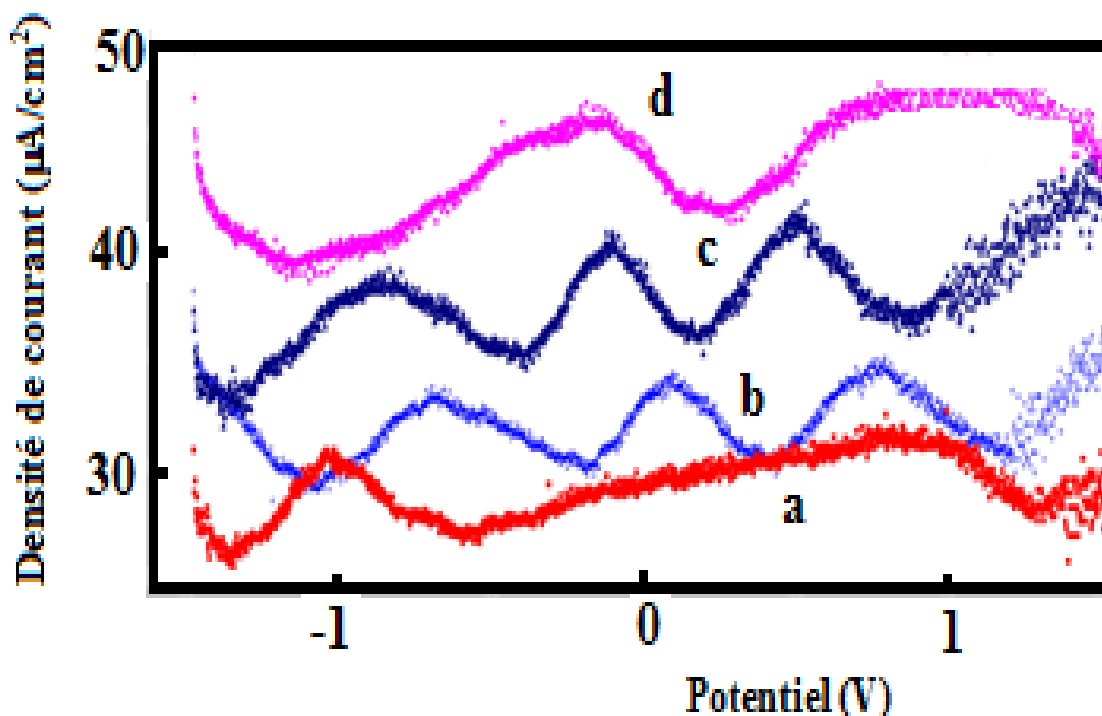
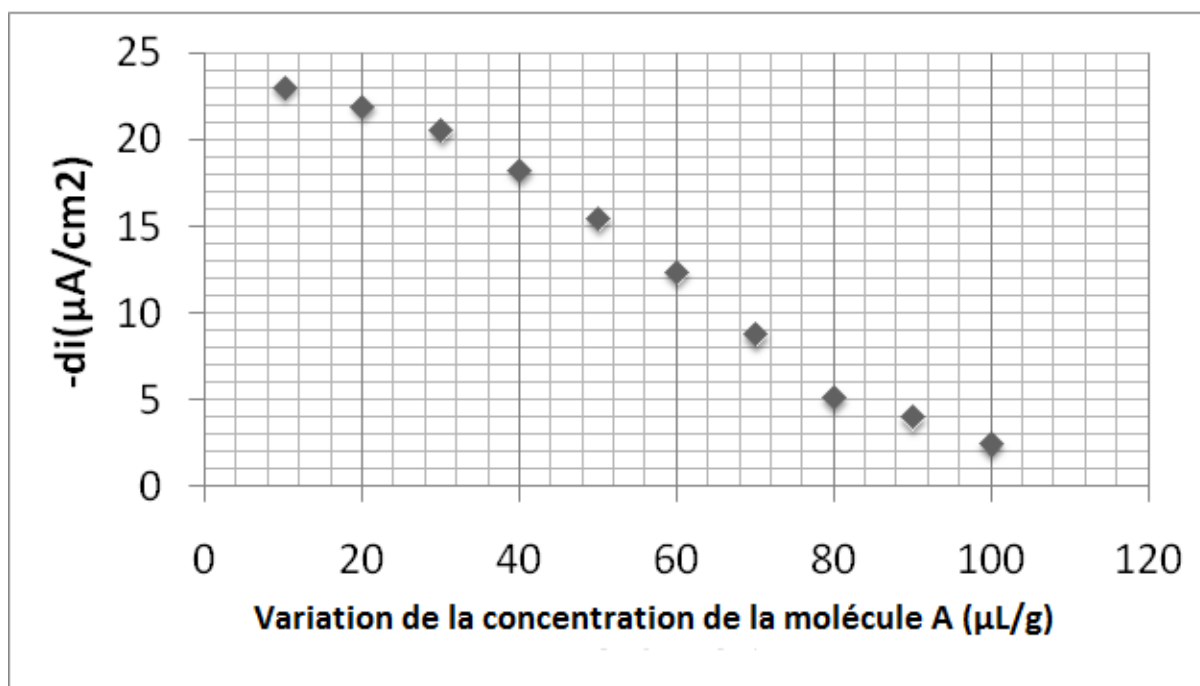


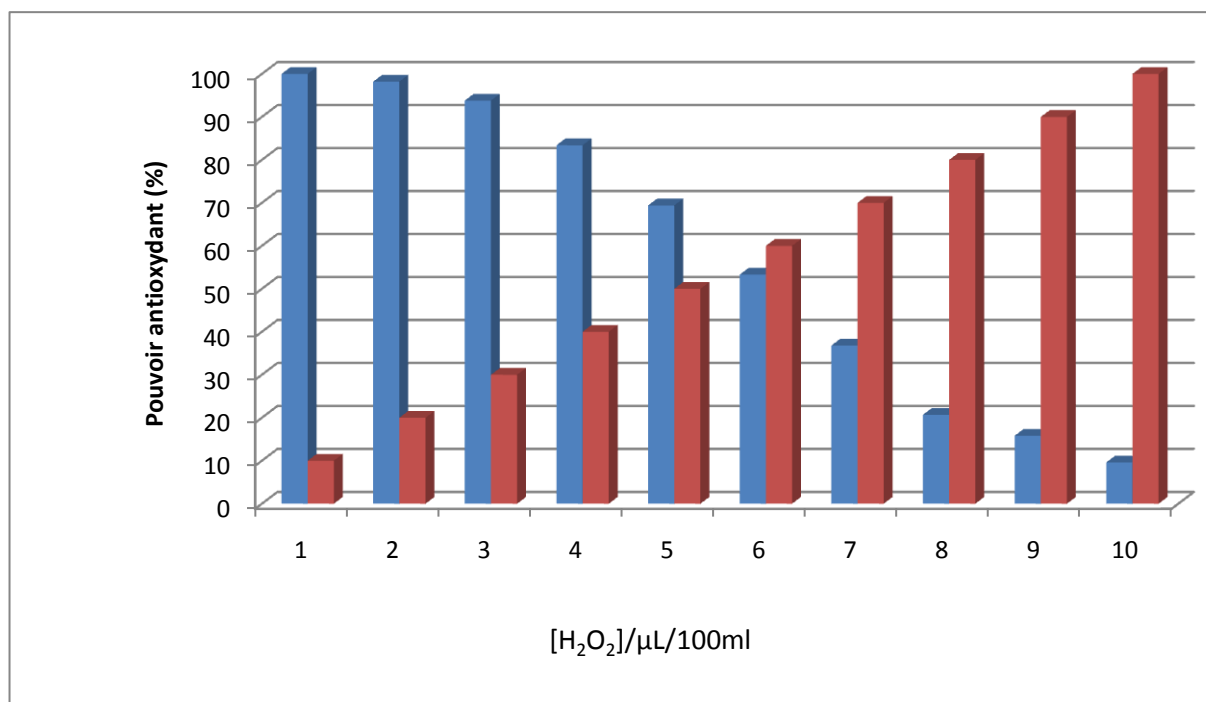
Figure 34 : Voltammogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode CGE-Cu, en milieu tampon, d- contenant  $100 \mu\text{L}/100 \text{mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , c- ajout de  $8 \mu\text{L}/100 \text{mL}$  de la molécule A, b- ajout de  $12 \mu\text{L}/100 \text{mL}$  et a- ajout de  $14 \mu\text{L}/100 \text{mL}$ .





**Figure 35 : Evolution de la densité de courant de réduction de  $H_2O_2$  avec la concentration de la molécule A.**

Pour étudier l'effet inverse, nous avons étudié l'inhibition de la capacité antioxydante de la molécule A par  $H_2O_2$ . Le peroxyde d'hydrogène formé dans la colonne à silice est ajouté à une solution du tampon phosphate contenant la molécule A, contenue dans la cellule électrochimique. Nous constatons que, le pouvoir antioxydant de la molécule A baisse en fonction de la quantité de  $H_2O_2$  versée (Fig. 51). En comparant les résultats obtenus, nous pouvons constater que l'inhibition de l'extrait de la molécule A par le peroxyde d'hydrogène est moins rapide que l'inhibition de  $H_2O_2$  par l'extrait de la molécule A.



**Figure 36 : Evolution du pouvoir anti oxydant de la molécule A par le peroxyde d'hydrogène**

## II.2. Molécule B

Les mêmes expériences ont été menées pour la molécule B, le comportement vis-à-vis, du peroxyde d'hydrogène est identique, la différence réside dans la vitesse de l'inhibition de l'extrait de la molécule étudiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et inversement. La figure 52 illustre l'évolution de la densité de courant de réduction du peroxyde d'hydrogène avec la concentration de l'extrait de la molécule B. Nous constatons que l'addition de 100μL de l'extrait de la molécule B inhibe complètement la réduction du peroxyde d'hydrogène.

Le pouvoir antioxydant de la molécule B réagit avec la quantité du peroxyde formée, sachant que dans la cellule électrochimique nous avons mis 100 μL/100mL de la molécule B (Fig. 53).

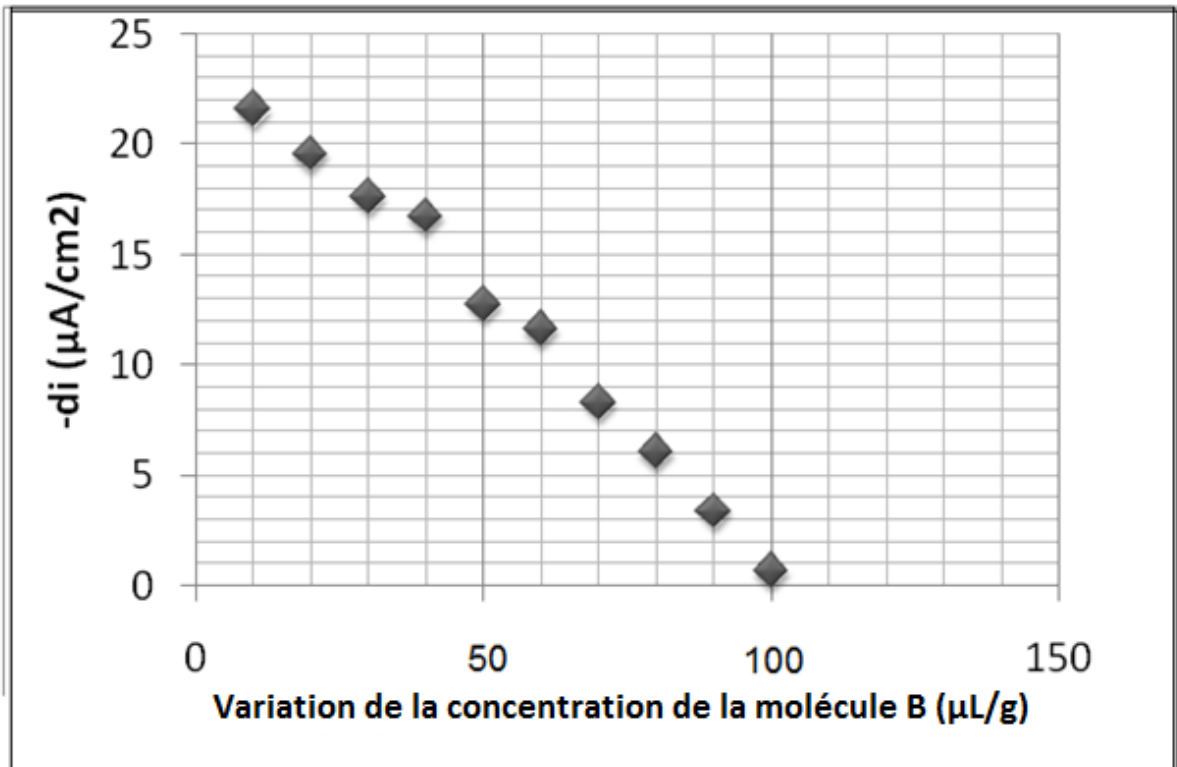


Figure 37 : Evolution de la densité de courant de réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'ajout de l'extrait de la molécule B

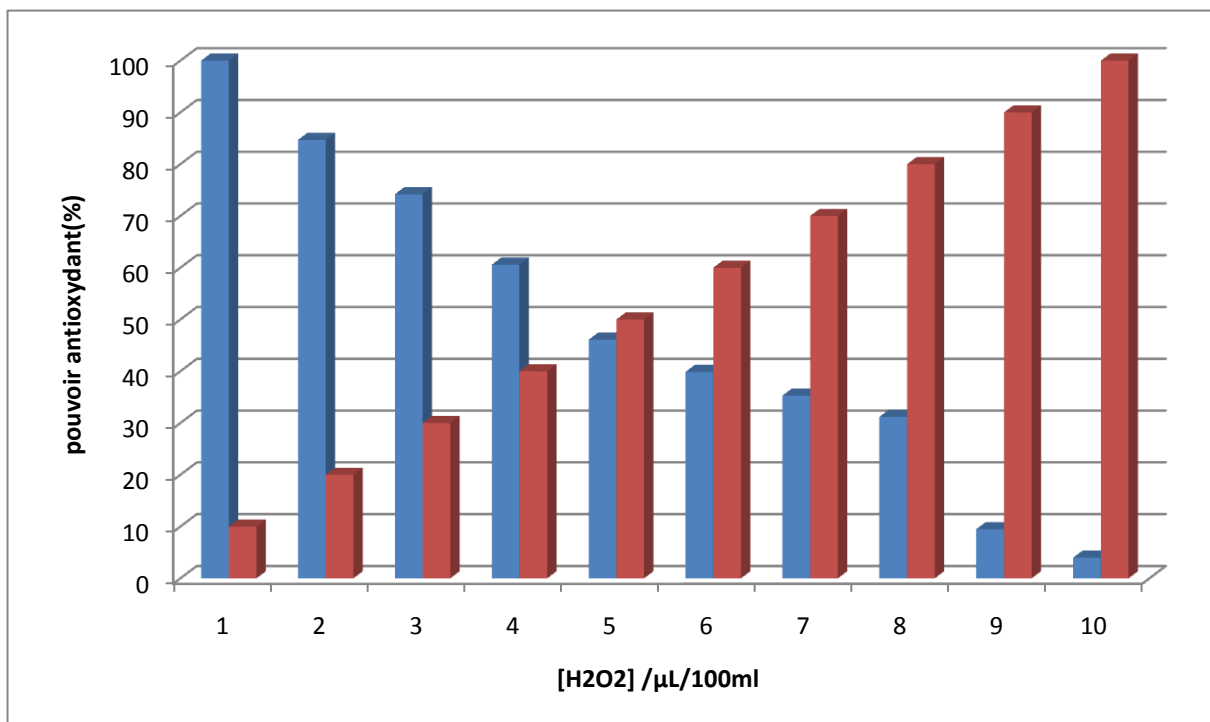


Figure 38 : Evolution du pouvoir antioxydant de la molécule B avec la concentration du peroxyde d'hydrogène.

### II.3. Molécule C

La molécule C permet d'entraîner aussi le décroissement du courant de réduction (Fig. 55). Nous pouvons dire que la substitution par le groupement  $-Cl$  ne modifie pas le caractère antioxydant de la molécule. Néanmoins il peut avoir un effet sur la vitesse de décroissement du pouvoir antioxydant (POA), cette hypothèse est vérifiée sur la figure 55, nous constatons que le POA est presque nul en présence de  $100 \mu\text{L}/100 \text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

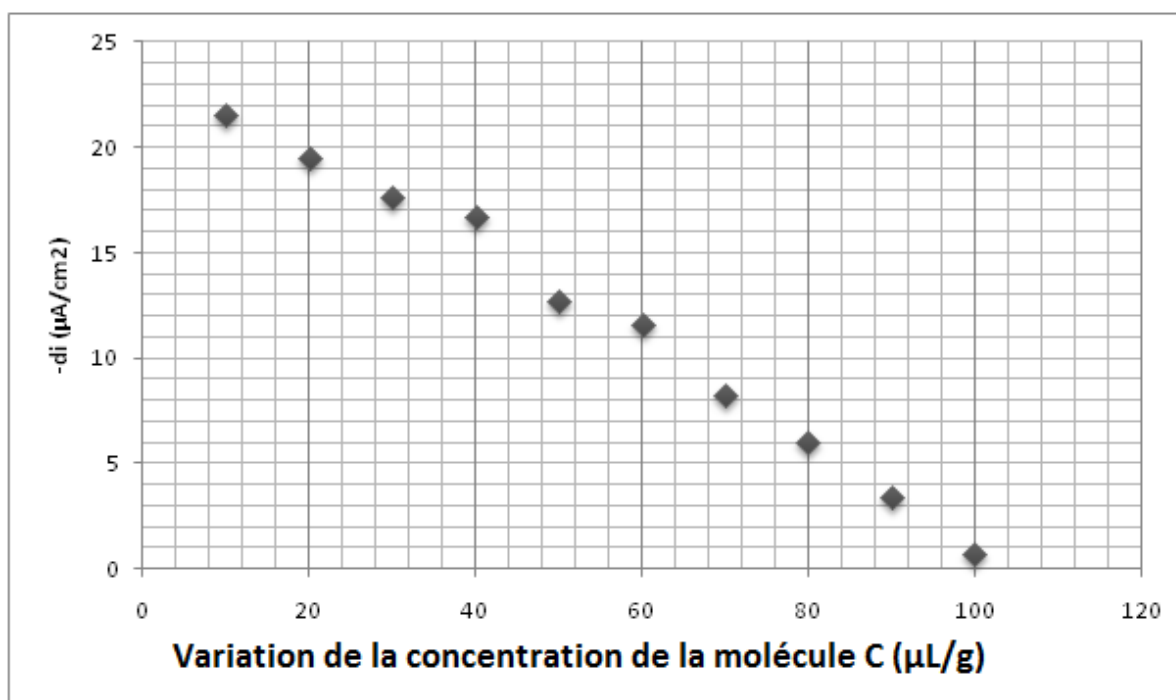
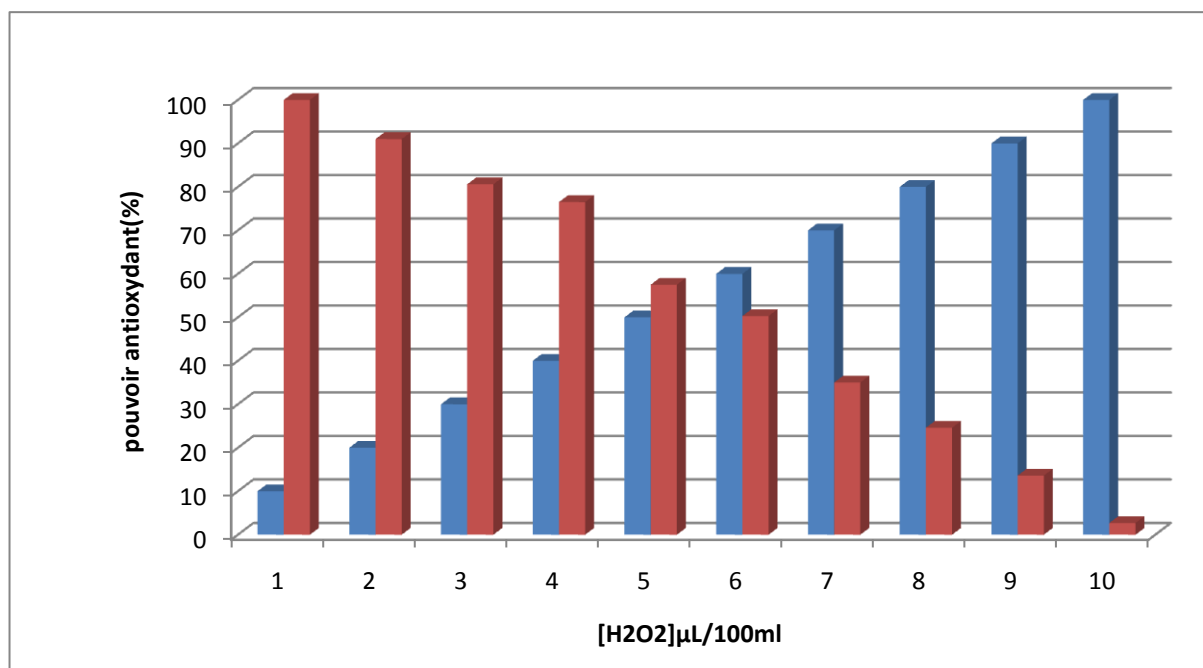


Figure 39 : Variation de la densité de courant de réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec la concentration de la molécule C



**Figure 40 : Evolution du pouvoir antioxydant de la molécule C avec la concentration du peroxyde d'hydrogène**

## Conclusion

Les trois molécules proposées présentent un pouvoir antioxydant vis-à-vis, du peroxyde d'hydrogène. Cette étude a pour objectif l'étude de l'éventuel variation du pouvoir antioxydant avec la substitution du radical -R par les groupements -OH, -CN et -Cl. Nous constatons qu'en présence de 100 μL/100mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution, le POA des molécules varie dans le sens suivant :

- **Pour des concentrations de la molécule ≤ 60 μL/100mL**

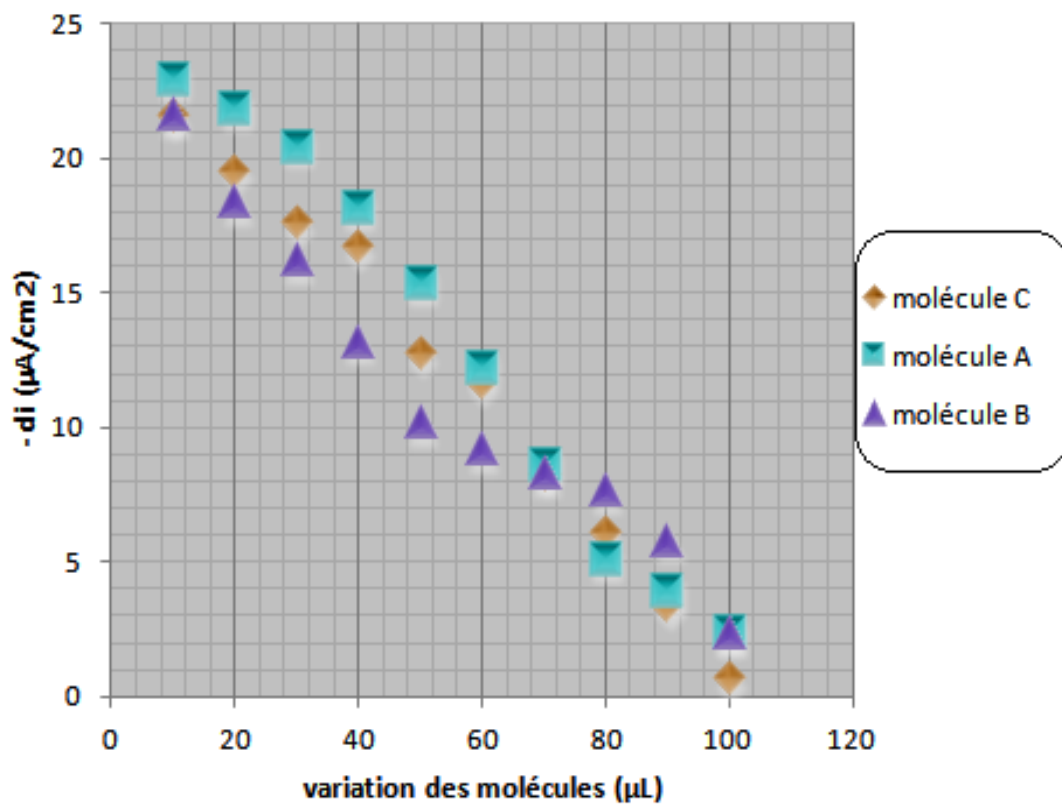
$$\text{POA (molécule B)} \geq \text{POA (molécule C)} \geq \text{POA (molécule A)}$$

- **Pour des concentrations de la molécule ≥ 60 μL/100mL**

$$\text{POA (molécule C)} \geq \text{POA (molécule A)} \geq \text{POA (molécule B)}$$

La substitution du groupement -R par la fonction -CN favorise le pouvoir antioxydant de la molécule de base, à faibles concentration du peroxyde d'hydrogène, par contre lorsque

le milieu contient une concentration très élevée de  $H_2O_2$ , la substitution par la fonction  $-Cl$  est souhaitée (Fig. 57).



**Figure 41 : Evolution du pouvoir antioxydant des trois molécules étudiées avec la concentration**

## Références

- [1] Ueda J. I., Shimazu Y., Ozawa T., Saito N. (1996). *Biochem. Biophys.* 333: 377-384
- [2] Svensson S. (1977)., *Chemical, and Biological Changes in Food Caused by Thermal.* T. Hoyem, O. Kvale (Eds.). London, Applied Science Publishers: 202-217.
- [3] Sayavedra-Soto L. A., Montgomery M. W. (1986). *J. Food Sci.* 51: 1531-1536
- Sapers G. M., Hicks K. B., Philips J. G., Garzarella L., Pondish D. L., Matulaitis R. M.,
- [4] McCormack T. J., Sondey S. M., Seib P. A., El-Ataway Y. S. (1989). *ascorbic acid.* *J. Food Sci.* 54: 997-1002, 1012.
- [5] Madhavi D. L., Salukhe D. K. (1996). *Technological, toxicological, and health perspectives.* D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe, Dekker: 267-360.
- [6] Sánchez-Moreno C. *Review. Food Sci Technol Int.* (2002); 8(3):121-137.
- [7] Shahidi, F., (2000). *Antioxidant in food and food antioxidants.* *Nahrung* 44, 158–163.
- [8] Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., (2009). *Revue de génie industriel* 4, 25–39.
- [9] Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G. (2000). *Food Chem. Toxicol.* 38: 801-809.
- [10] Cardey B., Enescu M. (2007). *J. Phys. Chem. A* 111: 673-678.

**Chapitre V :**  
**DÉVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF POUR**  
**LA RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE**  
**SPÉCIFIQUE EN DIAGNOSTIC CLINIQUE**



## Introduction

Dans ce chapitre nous présenterons une nouvelle génération d'électrodes, destinées à la reconnaissance moléculaire. Il s'agit des électrodes à pâte de carbone modifiée par une couche de molécules organiques.

La reconnaissance moléculaire est l'un des principes de base de toutes les formes de vie. Les processus de reconnaissance peuvent s'établir grâce à deux paramètres importants, un récepteur et un ligand, à travers des interactions spécifiques plus au moins fortes simultanées et particulièrement sélectives [1-4]. Les ligands et les récepteurs impliqués dans les interactions sont de natures diverses. Les dysfonctionnements des voies de communications engendrent, le plus souvent, des anomalies [5,6].

Le développement de la nanotechnologie a ouvert des nouvelles frontières pour étudier et comprendre les interactions biomoléculaires [7]. Celles-ci représentent un enjeu thérapeutique important. Les applications envisageables sont nombreuses particulièrement dans le domaine diagnostique, de la mise au point de nouvelles thérapies ou de nouveaux matériaux biocompatibles.

La détection de la reconnaissance moléculaire peut être contrôlée grâce à un récepteur bi fonctionnel constitué par l'association d'un site de complexation, pouvant interagir sélectivement avec un substrat cible, et une unité signalétique dont une propriété caractéristique pourra être perturbée par le phénomène de complexation [8,9]. Le phénomène de reconnaissance est donc lié à une modification mesurable d'une des propriétés physico-chimiques du récepteur [10,11]. Si l'ampleur de la modification est corrélée à la concentration en espèce cible, il est aussi possible d'en réaliser le dosage. Dans ce sens, l'électrochimie représente un outil de choix permettant d'analyser, d'orienter ou de contrôler les phénomènes de reconnaissance moléculaire. Il est en particulier possible de détecter et de quantifier les interactions entre un récepteur et un substrat via la modification de l'activité électrochimique d'un centre redox actif associé au récepteur

Dans cette étude nous cherchons à développer des molécules capables de chélater le Cuivre dans les hépatocytes, cellules de foie, ou le plomb chez l'être humain ou encore le cadmium.

En effet, chez l'homme, le foie est l'organe responsable de l'élimination du cuivre en excès dans l'organisme. Le Cu(I) entre dans les hépatocytes où il est pris en charge par l'ATPase-Cu(I) dite ATPase de Wilson qui excrète le Cu(I) vers le canalicule biliaire. La maladie de Wilson est due à un défaut dans le gène *ATP7B* de l'ATPase du même nom. Il en

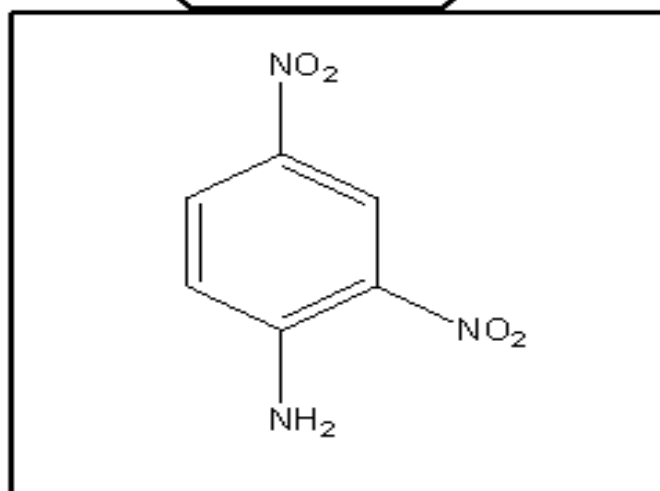
résulte une intoxication du malade par le Cu(I) qui s'accumule dans le foie et, en absence de diagnostic, elle peut engendrer des conséquences, le plus souvent, fatales [12-14]. Les traitements actuels visent essentiellement à diminuer l'absorption du cuivre contenu dans les aliments, mais ils peinent à mobiliser le cuivre stocké dans le foie.

Le plomb et le cadmium font partie des métaux lourds nuisibles pour la santé, un excès de ces métaux peut provoquer des maladies très graves [15,16]. La possibilité de développer des molécules organiques, non toxiques, représente une opportunité clinique capable de réduire la concentration de ces métaux dans le sang et le tissu.

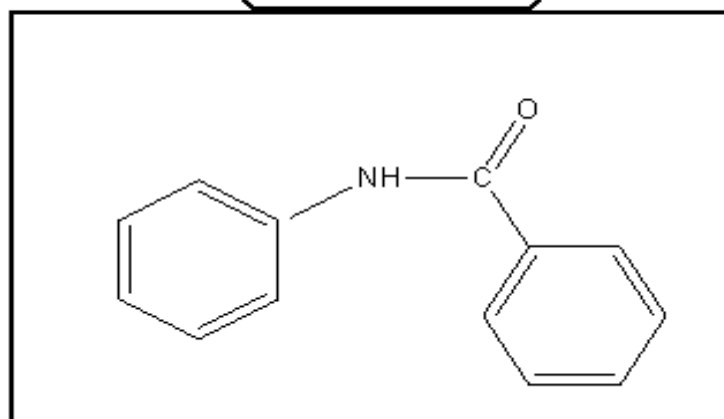
## **I. Molécules proposées pour la chélation des métaux lourds**

Les molécules synthétisées au laboratoire dédiées à ce travail, possèdent, toutes, une fonction prédisposées à la complexation des métaux, mais également ouvre la possibilité d'échanger un électron avec la pâte de carbone, ce qui facilite la formation d'un film organique auto assemblé [17]. La molécule A est destinée à chélater le plomb, alors que la molécule B servira à complexer le cadmium, par contre la molécule C chélatera le cuivre (Fig. 58).

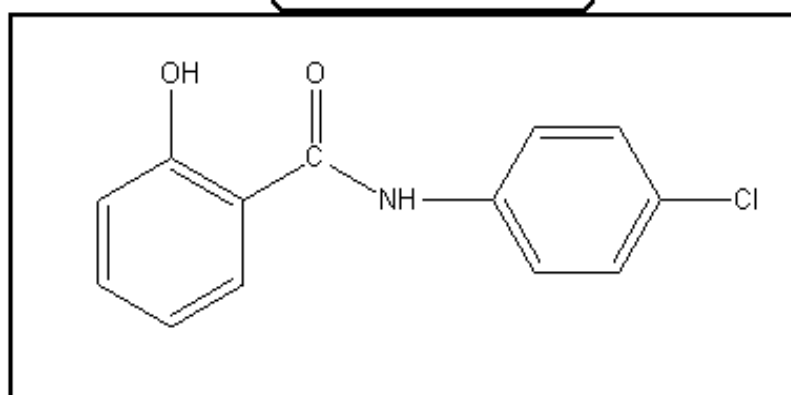
**Molécule A**



**Molécule B**



**Molécule C**



**Figure 42 : Structure des molécules utilisées comme chélateur.**

## II. Préparation de l'électrode

L'électrode de carbone a été préparée en mélangeant la poudre de carbone à un liant. Dans ce travail, nous avons utilisé la paraffine liquide, qui est un liant non conducteur. La pâte obtenue est mise en forme dans un corps d'électrode, la conductivité électrique est assurée par une tige de carbone. La modification de la surface a été effectuée par les molécules étudiées (Fig. 59).

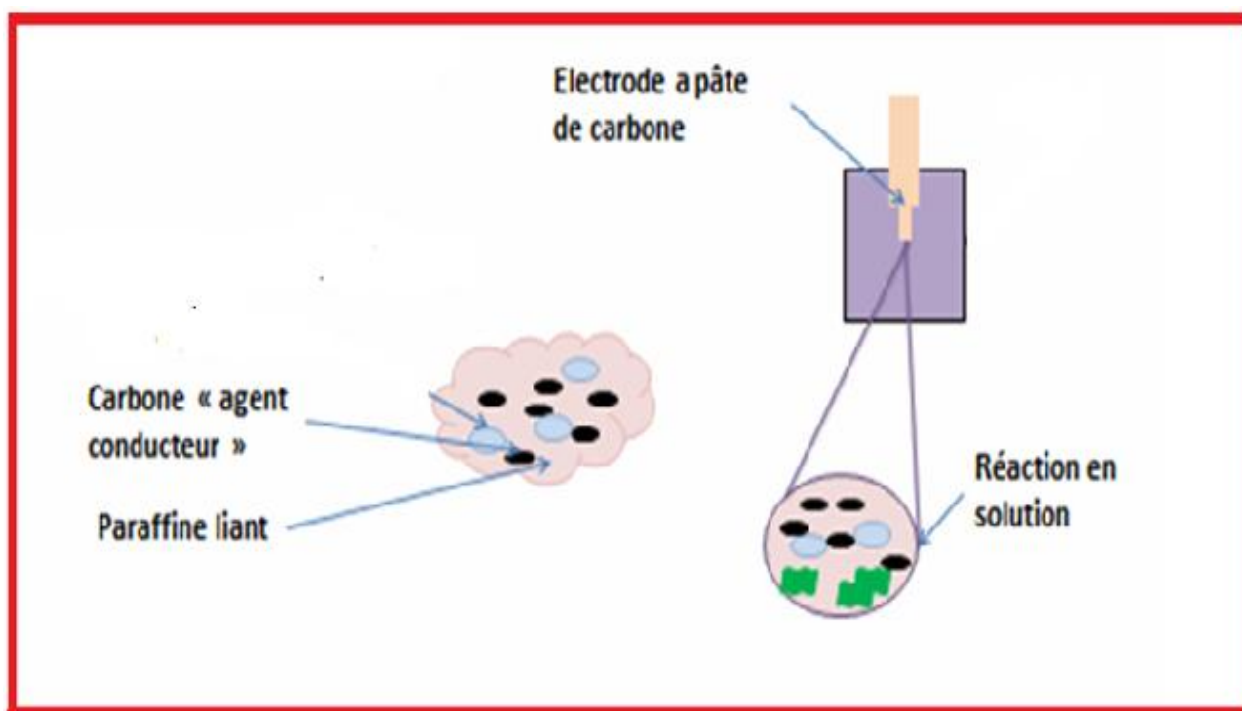
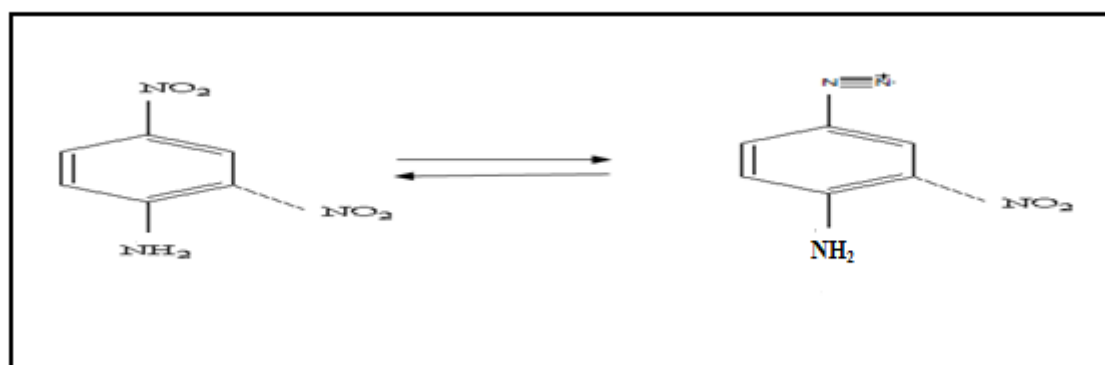
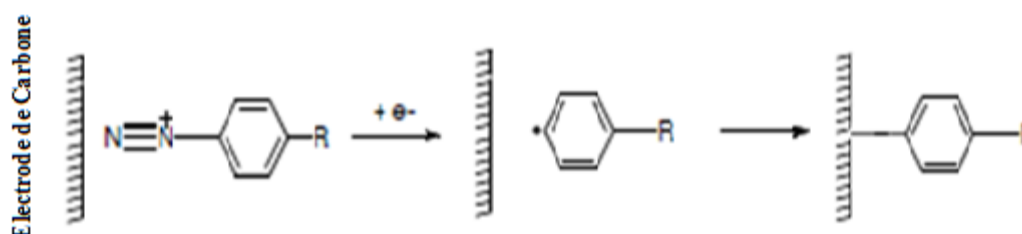


Figure 43 : Protocole de préparation de l'électrode à pâte de carbone modifiée.

Selon la littérature [18], la molécule A se réduit, *in situ*, dans la cellule électrochimique de mesure, et conduit à un diazonium selon la réaction suivante :

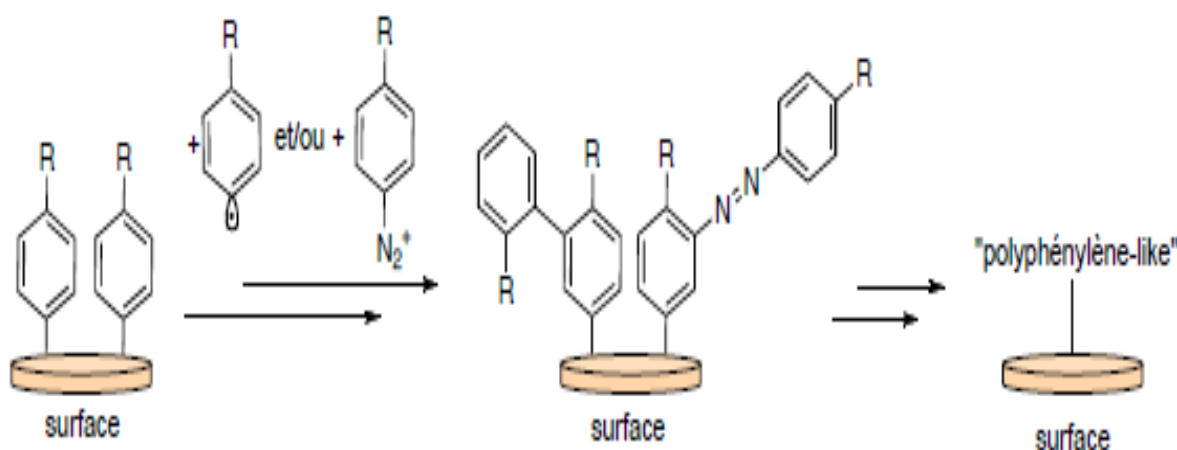


Ensuite, le diazonium formé échange un électron avec la surface de carbone et conduit à un radical aryle en libérant une molécule d'azote. Le mécanisme de modification de l'électrode de pâte de carbone est illustré par la figure 60.



**Figure 44 : Mécanisme de fixation de la molécule organique à la surface de l'électrode à pâte de carbone.**

Le radical aryle formé par la réduction du diazonium, se lie à la surface par engagement d'un électron par une liaison covalente [19,20]. Ensuite le radical aryle peut se greffer sur les premières molécules greffées à la surface, et conduit à une multicouche organique dont la structure ressemble à celle de la polyphénylène (Fig. 61).



**Figure 45 : Modification de la surface de l'électrode à pâte de carbone.**

Nous supposons que les molécules organiques (B) et (C) suivent le même mécanisme et conduisent à la formation d'une multicouche organique poreuse et rugueuse [21].

### III. Mesures électrochimiques

L'étude du comportement électrochimique a été investie par voltamétrie cyclique, par l'utilisation d'une cellule de mesure à trois électrodes, l'électrode à pâte de carbone modifiée, joue le rôle de l'électrode de travail.

La chélation des métaux a lieu en deux étapes, dans la première, l'électrode préparée est mise en contact direct avec une solution contenant l'espèce cible. Le temps de préconcentration adopté correspond à celui qui donne le meilleur résultat, dans ce travail,  $T_{\text{accumulation}} = 10 \text{ min.}$

Ensuite, l'électrode chargée par le cation complexé est transférée dans la cellule électrochimique, contenant la solution tampon phosphate barbotée à l'azote.

Les courbes de calibration sont déduites à partir des résultats de la voltamétrie à onde carrée, qui a les avantages suivants :

- Possibilité de la variation du potentiel à des vitesses élevées ;
- Amélioration de la sensibilité par l'augmentation du rapport courant faradique / courant capacitif ;
- Réduction du temps de mesure.

### IV. Comportement électrochimique des électrodes modifiées par les molécules proposées

Le voltamogramme cyclique enregistré par l'électrode de carbone modifiée par la molécule A est présenté par la figure 62. En comparant les deux voltamogrammes ; celui enregistré par l'électrode de carbone et celui obtenu à partir de l'électrode de carbone modifiée, nous constatons que l'allure a changé ce qui correspond en électrochimie à un changement de la morphologie de la surface. Les densités de courant électrique sont très faibles, probablement, en raison de la faible conductivité du film organique développé.

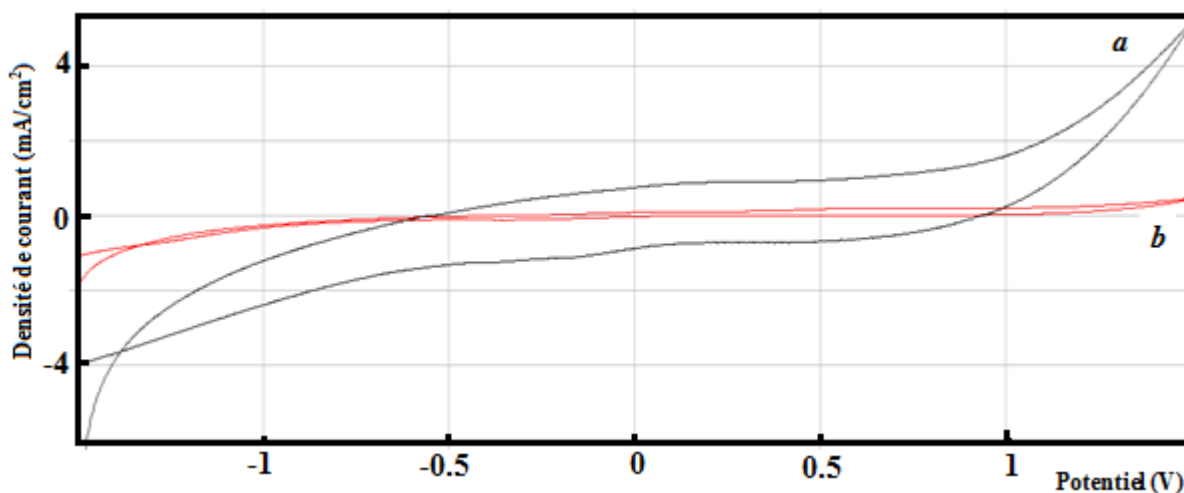


Figure 46 : Voltamogrammes enregistrés, respectivement, par l'électrode à pâte de carbone (a) et l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule (A), en milieu tampon à 100 mV/s.

Un comportement similaire a été observé par l'électrode modifiée par la molécule B, mais les densités de courant sont plus importantes et nous pouvons distinguer le comportement redox joué par la présence de la molécule B dans l'électrode (Fig. 63).

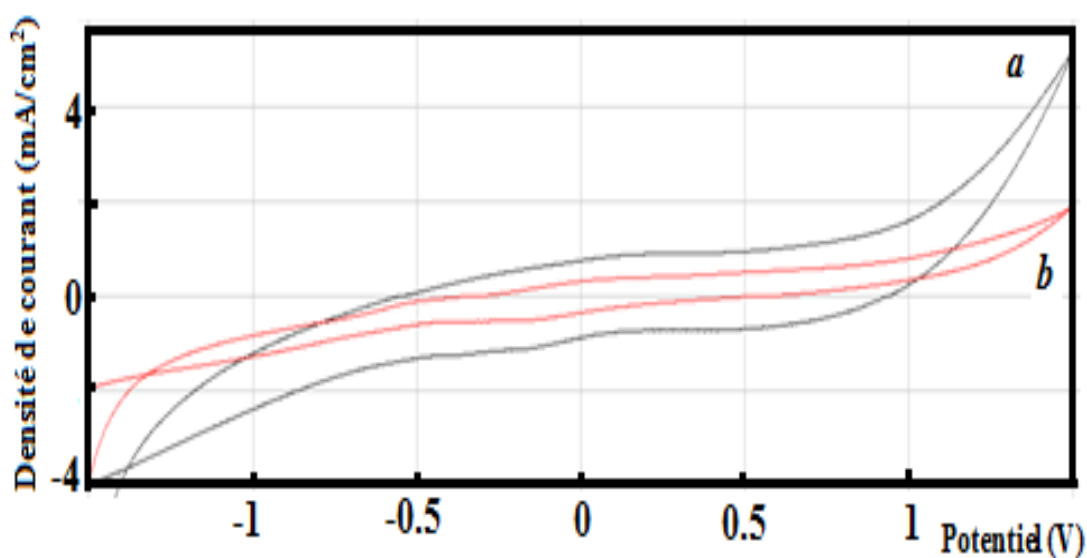


Figure 47 : Voltamogrammes enregistrés, respectivement, par l'électrode à pâte de carbone (a) et l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule (B), en milieu tampon à 100 mV/s.

La figure 64 illustre les voltamogrammes obtenus, respectivement, à partir de l'électrode de carbone (courbe a) et l'électrode de carbone modifiée par la molécule C.

Dans ce cas, nous pouvons distinguer deux pics électrochimiques, le premier dans le sens du balayage anodique à environ -0.1 V et le second dans la région cathodique vers -0.9 V, les deux pics sont assez éloignés ce qui laisse suggérer qu'ils ne correspondent pas à un système réversible.

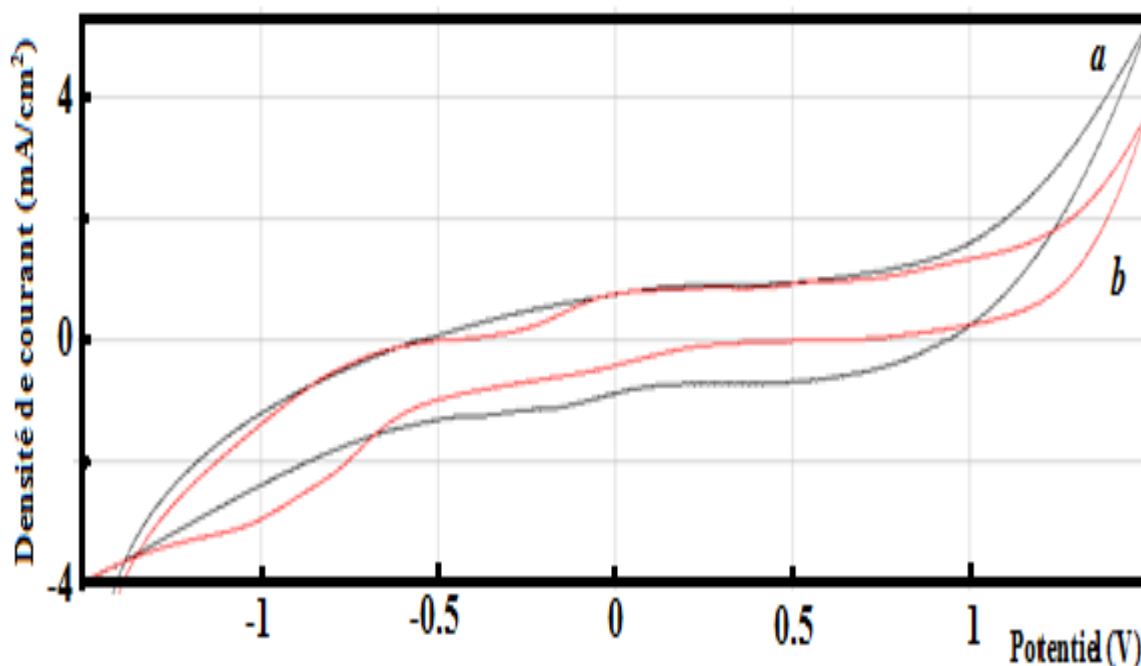


Figure 48 : Voltamogrammes enregistrés, respectivement, par l'électrode à pâte de carbone (a) et l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule (C), en milieu tampon à 100 mV/s.

## V. Etude électrochimique de la chélation des métaux

L'étude du phénomène de chélation des métaux a été entreprise par voltamétrie cyclique et voltamétrie à onde carrée. Sur la figure 65, nous présentons l'évolution du voltamogramme cyclique, enregistré par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule A. Ce voltamogramme montre un pic intense et bien défini, vers environ -0.25 V, ce pic qui pourra être attribué au relargage du cation par la matrice croit avec la concentration de  $Pb^{2+}$ .



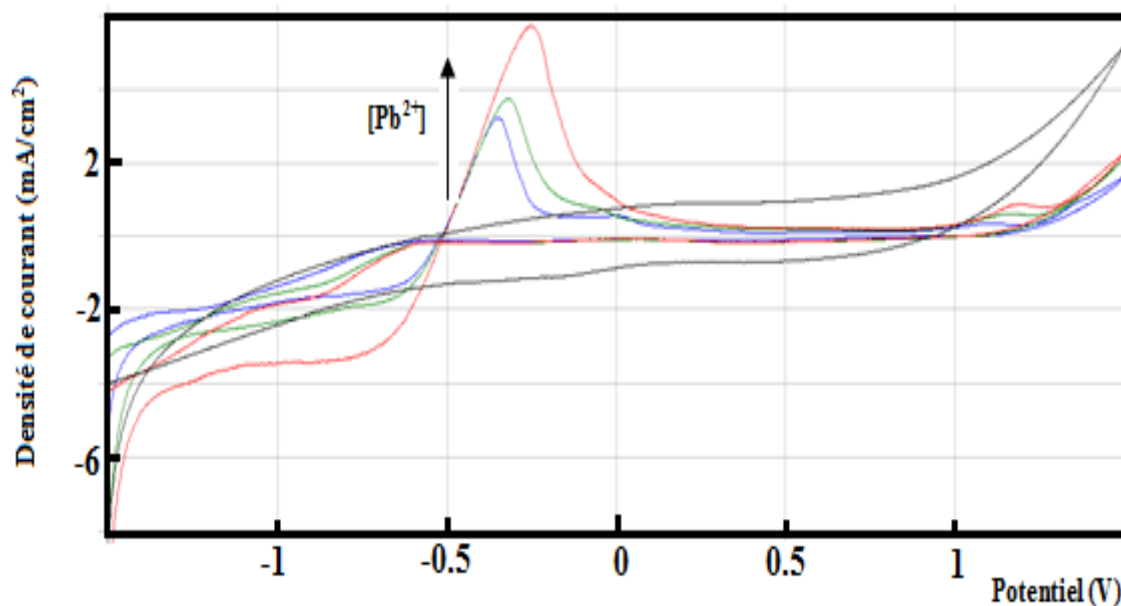


Figure 49 : Voltammogrammes enregistrés par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule A, en milieu tampon contenant le cation  $Pb^{2+}$ , à 100 mV/s.

La chélation du cadmium par le film organique, développé par la molécule B, suit le même processus que précédemment, le pic de relargage apparaît à environ -0.4 V. L'intensité du pic d'oxydation augmente avec la concentration de  $Cd^{2+}$  (Fig. 66).

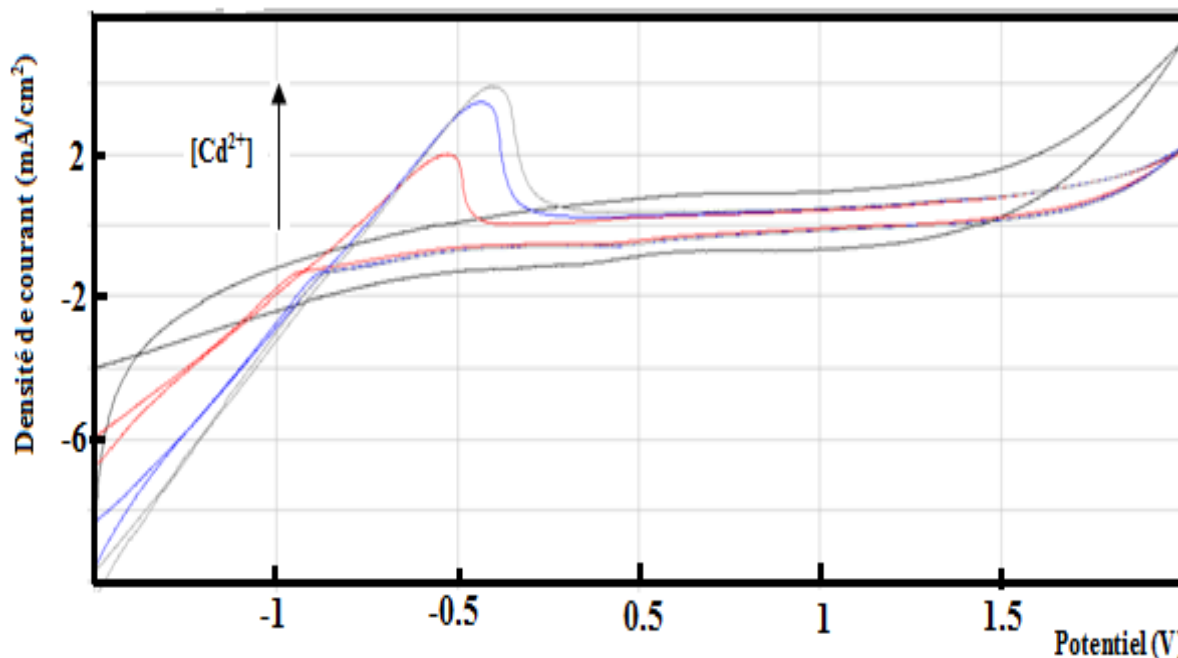
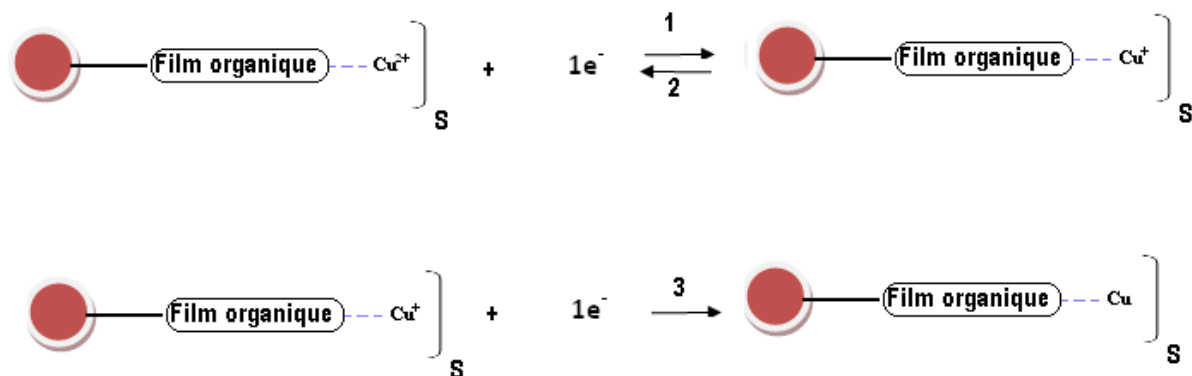


Figure 50 : Voltammogrammes enregistrés par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule B, en milieu tampon contenant le cation  $Cd^{2+}$ , à 100 mV/s.

La figure 67 montre les voltamogrammes cycliques enregistrés, pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film organique formé à partir de la molécule C. Ce voltamogramme montre deux pics d'oxydation, dans le sens du balayage anodique (pics 2 et 4), le premier à environ 0.34 V, et le second vers 0.7 V, lorsqu'on inverse le sens du balayage du potentiel nous rencontrons, également deux pics (1 et 3), qui correspondent à deux réactions de réduction successives, le premier est observé à environ -0.2 V et le second à -0.6 V. Les pics 1 et 2 sont assez voisins, ce qui laisse suggérer qu'ils correspondent au même système redox. Les intégrations des pics permettent de déterminer le nombre d'électrons engagé dans chaque réaction. Dans notre cas, les réactions correspondantes aux pics 1, 2 et 3 engagent un seul électron chacune, et l'intégration du pic 4 met en jeu 2 électrons, ce qui laisse penser au mécanisme suivant :



Le pic 4 correspond probablement au relargage du cuivre par la matrice organique, selon la réaction :



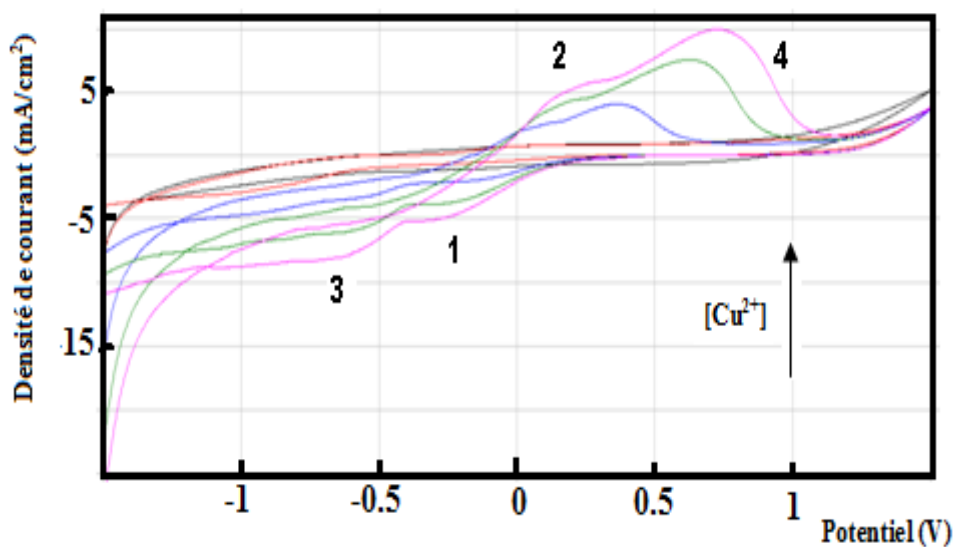


Figure 51 : Voltamogrammes enregistrés par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule C, en milieu tampon contenant le cation  $\text{Cu}^{2+}$ , à 100 mV/s.

L'analyse des métaux étudiés a été investie par voltamétrie à onde carrée (SQW). Dans le cas du  $\text{Pb}^{2+}$ , le SQW obtenu présente un pic (Fig. 67), bien défini vers environ -0.5 V, l'intensité de ce pic croît linéairement avec la concentration du plomb (Fig. 68).

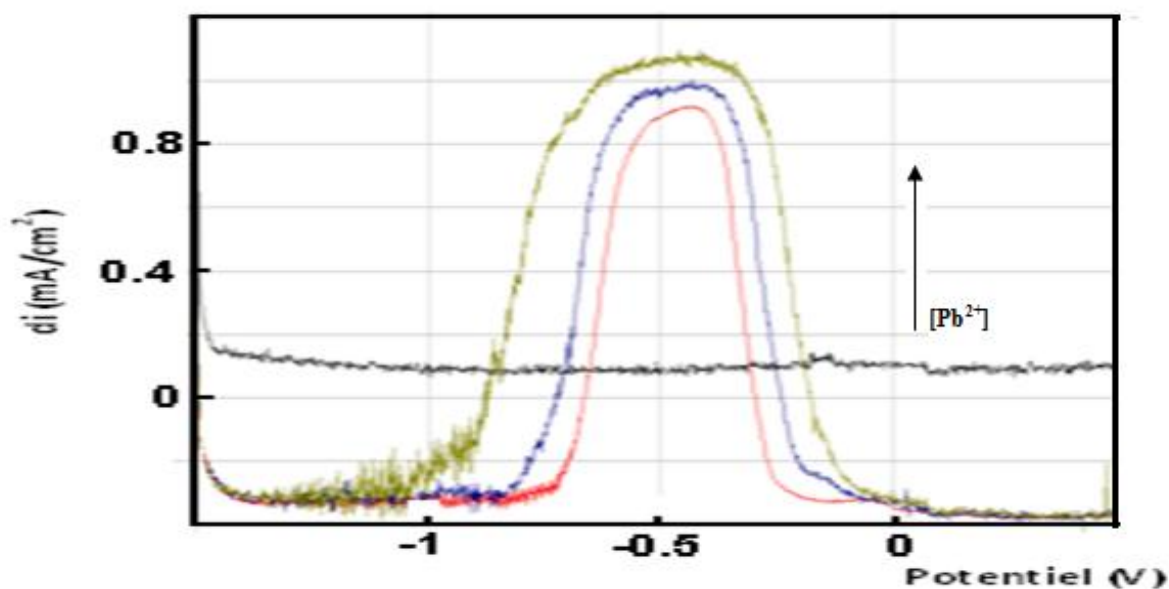
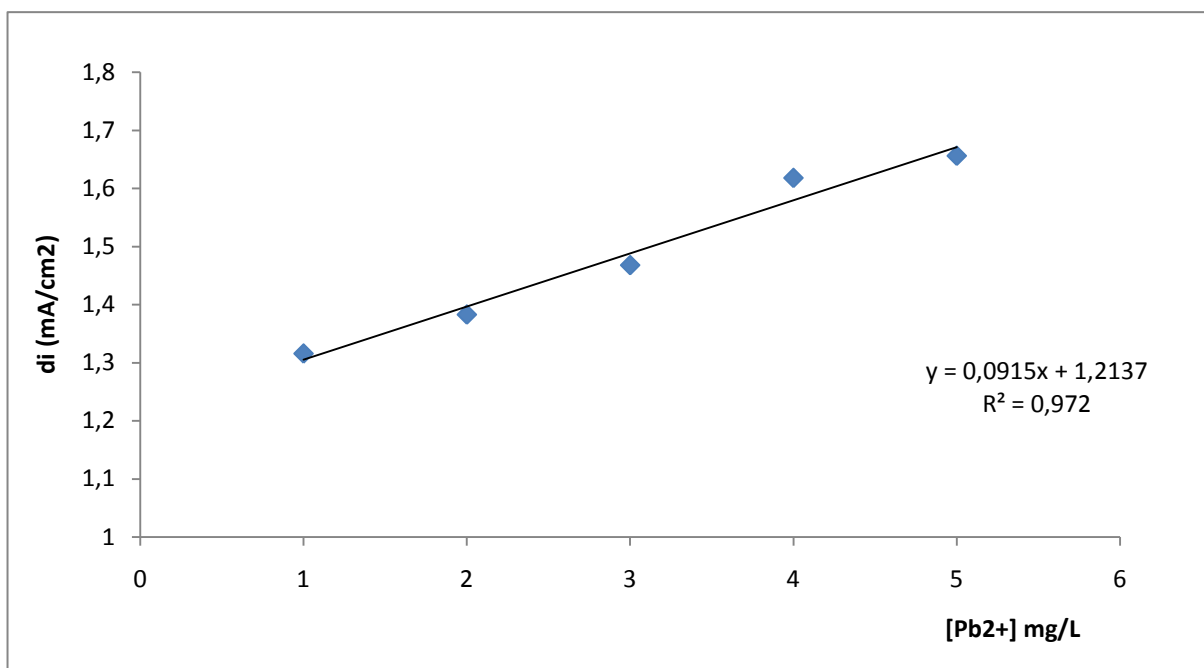
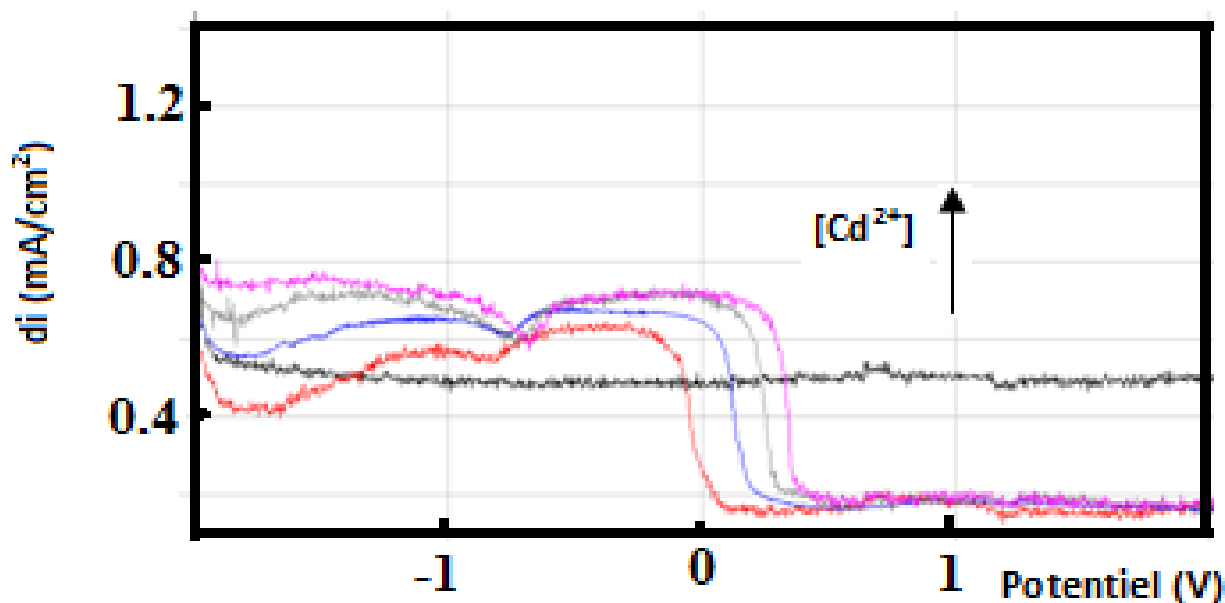


Figure 52 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film développé par la molécule A.

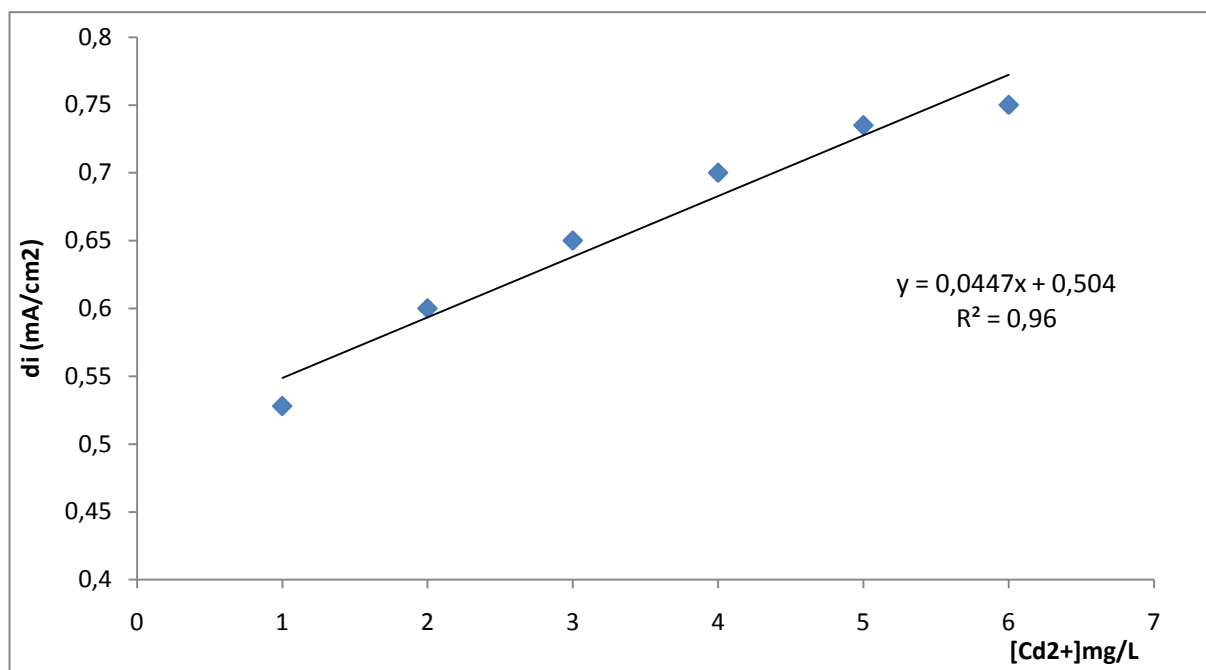


**Figure 53: Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation avec la concentration du Pb<sup>2+</sup>.**

Dans le cas de l'électroanalyse du cadmium, par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule B, nous constatons que le voltamogramme à onde carrée (Fig. 70) donne lieu à un pic, mal défini vers -0.2V. L'intensité de ce pic aplati augmente avec la concentration de l'ion Cd<sup>2+</sup>; nous avons réussi, quand même, à tracer une courbe de calibration (Fig. 70) qui correspond à cette évolution.

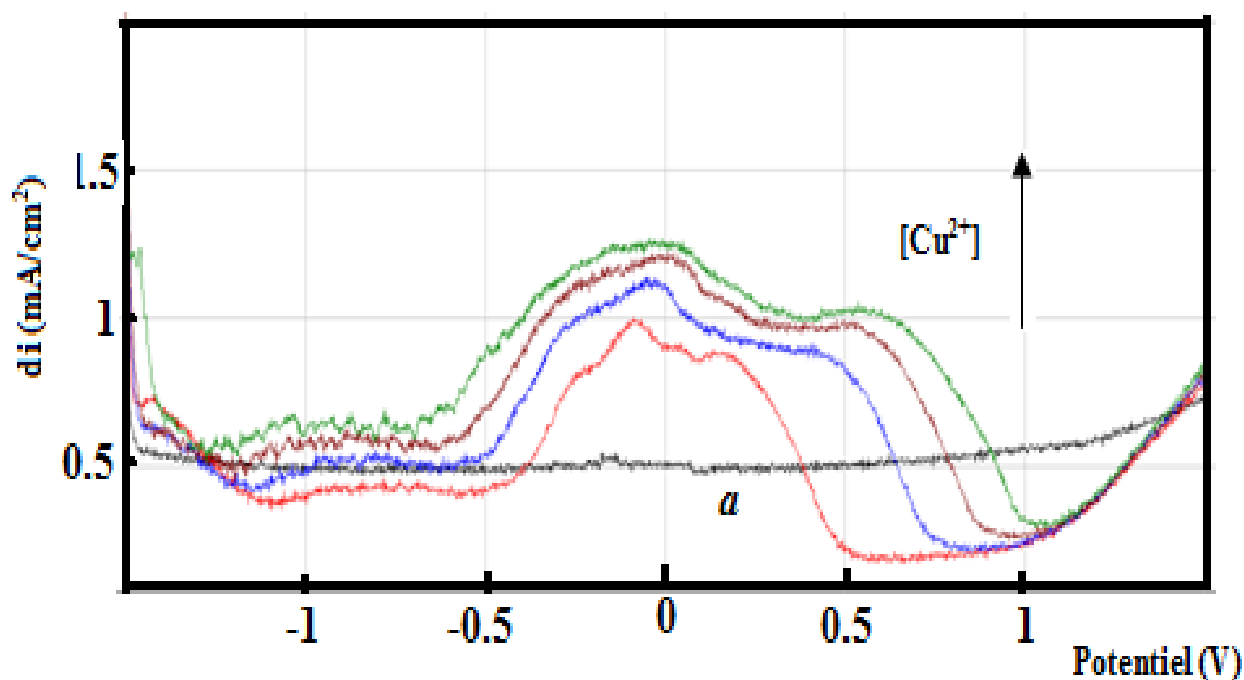


**Figure 54 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film développé par la molécule B.**

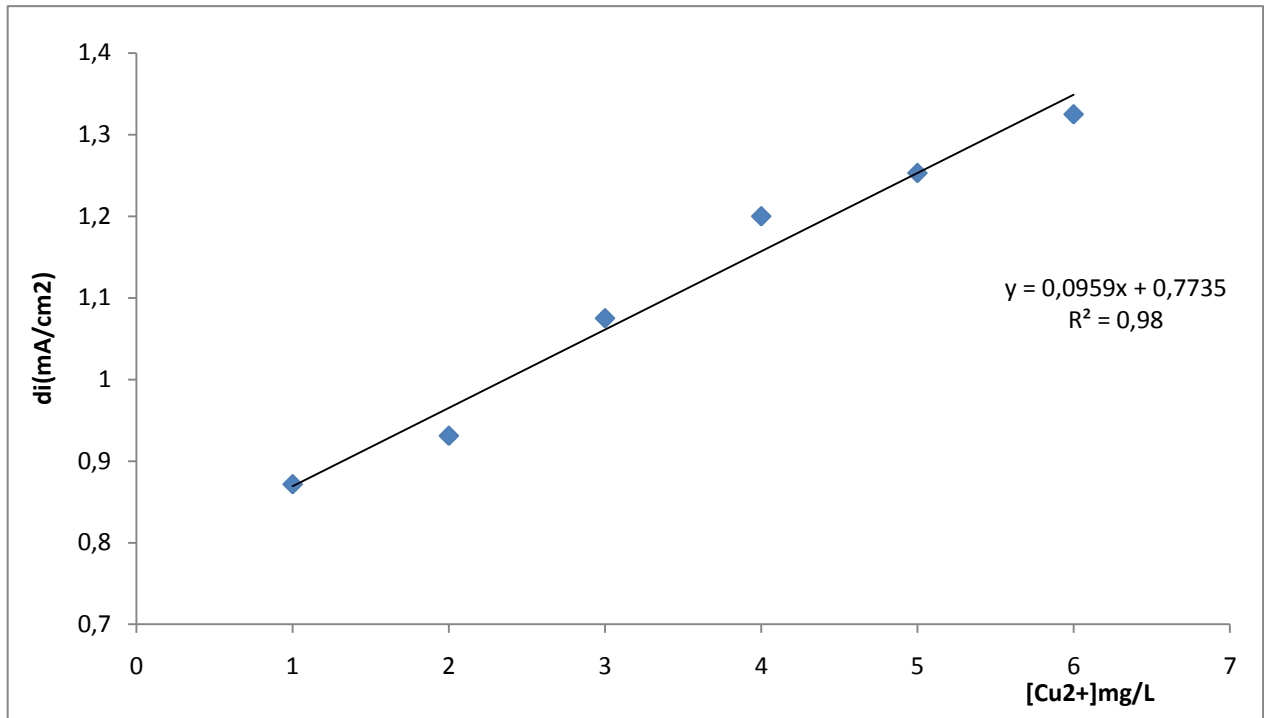


**Figure 70 : Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation avec la concentration du Cd<sup>2+</sup>.**

L'étude analytique du cuivre par l'électrode modifiée par la molécule C, est illustrée par la figure 71, nous constatons que les pics considérés sont, plus au moins, séparés ce qui permet de tracer une courbe de calibration relative à cette analyse (Fig. 72).



**Figure 55 : Voltamogrammes à onde carrée enregistrés pour l'électrode à pâte de carbone modifiée par le film développé par la molécule C. en milieu tampon.**



**Figure 56 : Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation avec la concentration du Cu<sup>2+</sup>.**

## VI. Paramètres de l'analyse

D'après Miller et Miller [22], la déviation standard du courant moyen (SD) mesuré au potentiel de la réduction des métaux lourds pour sept voltammogrammes de la solution vierge dans l'électrolyte pure peut être modélisée par l'équation:

$$SD = \frac{1}{(n-2)} \sum_{j=0}^n (i_j - I_j)^2 \quad (10)$$

Où  $i_j$  est la valeur expérimentale du courant calculé à la manipulation  $j$  et  $I_j$  est la valeur correspondante recalculée à la même concentration en utilisant l'équation de calibration.

La valeur de S.D. calculée a été utilisée pour la détermination de la détection limite (DL,  $3 \times S.D./\text{pente}$ ) et la quantification limite (QL,  $10 \times S.D./\text{pente}$ ).

De cette équation nous déduisons les valeurs suivantes :

**Tableau 5 : Electroanalyse du Cadmium**

Paramètres	Cd (II)
Equation	44,7 [Cd(II)]( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) + 0,504
R <sup>2</sup>	0,96
Pente ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	44,7
D.L ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$2,19.10^{-7}$
Q.L ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$7,3.10^{-7}$
S.D ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$7,3.10^{-8}$

**Tableau 6 : Electroanalyse du Cuivre**

Paramètres	Cu (II)
Equation	95,9 [Cu(II)]( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) + 0,7735
R <sup>2</sup>	0,98
Pente ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	95,9
D.L ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$1,253.10^{-8}$
Q.L ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$4,176.10^{-5}$
S.D ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$7,176.10^{-8}$

**Tableau 7 : Electroanalyse du Plomb**

Paramètres	Pb (II)
Equation	91,5 [Pb(II)]( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) + 1,2137
R <sup>2</sup>	0,972
Pente ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	91,5
D.L ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$5,02.10^{-7}$
Q.L ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$1,66.10^{-6}$
S.D ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$1,66.10^{-7}$

## Conclusion

Initialement, Les électrodes à pâte de carbone modifiée par les films organiques développés, respectivement, par les molécules synthétisées au laboratoire, A, B et C ont été caractérisées par voltamétrie cyclique. Un mécanisme de la formation, basée sur une étude bibliographique, a été proposé. Le pouvoir chélateur des électrodes préparées a été mesuré par l'analyse des métaux lourds étudiés. La voltamétrie à onde carrée a été investie dans l'électroanalyse ; et elle a prouvée une grande efficacité. Les limites de détection des métaux lourds par les électrodes proposées atteignent parfois  $10^{-8}$  mol/L.



## Références

- [1] Trippé, G. ; Le Derf, F. ; Lyskawa, J. ; Mazari, M. ; Roncali, J.; Gorgues, A. ; Levillain, E. ; Sallé, M., Chem. Eur.J., (2004), 10, 6497.
- [2] Lyskawa, J. ; Le Derf, F. ; Levillain, E. ; Mazari, M. ; Sallé, M. ; Dubois, L. ; Viel, P. ; Bureau, C. ; Palacin, S., J. Am. Chem. Soc., (2004), 126, 12194.
- [3] Zhao, B. T. ; Blesa, M. J. ; Mercier, N. ; Derf, F. ; Sallé, M., New J. Chem., (2005), 29, 1164.
- [4] Blesa, M. J. ; Zhao, B. T. ; Allain, M. ; Le Derf, F. ; Sallé, M. Chem Eur J, (2006), 12, 1906.
- [5] Saey D, Michaud A, Couillard A, Cote CH, Am J Respir Crit Care Med 2005;171(10):1109-1115.
- [6] Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, et al. Am J Respir Crit CareMed ( 2006); 173:1114-1121.
- [7] Decher, G.; Hong, J. D. Berichte der Bunsen-Gesellschaft 1991, 95, 1430-1434.
- [8] Ngono Thérèse Rosie Lauriane, Tarik Chelfi, Brahim Hach et al., Bulletin of the Catalysis Society of India, 9 (2010) 68-73.
- [9] Rafik Sadik, Ngono Thérèse Rosie Lauriane, et al, Bulletin of the Catalysis Society of India, 9 (2011) 30-35.
- [10] Tercier, M.-L. ; Buffle, J. ; Graziottin, F., Electroanalysis, 1998, 10, 355-63.
- [11] Rouessac, F. R. ; A. Rouessac, Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes, Dunod, Paris, (2000).
- [12] Frydman M, Bonne-Tamir B, Farrer LA , et al : Assignment of the gene for wilson disease to chromosome 13 : Linkage for esterase D locus. Proc Natl Acad Sci USA (1985); 82: 1819-21.
- [13] Petrukhin K, Fisher SG, Piratsun M, et al. Lapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. Nat Genet 1993; 5: 338-43.
- [14] Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I et al. The Wilson disease gene in a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nat genet 1993; 5 344-50.
- [15] P. Nguyen, P. Gomez-Elipse et I. Manners, Organometallic Polymers with Transition Metals in the Main Chain. Chem. Rev., 99(1999) 1515-48.
- [16] S. Barlow et D. O'Hare, Metal-Metal Interactions in Linked Metallocenes. Chem. Rev, 97(1997) 637-69.
- [17] Ferreyra, N.; Coche-Guerente, L.; Labbe, P. Electrochim. Acta (2004), 49, 477-484.

- [18] Allongue, P. ; Delamar, M. ; Desbat, B. ; Fagebaume, O. ; Hitmi, R. Pinson, J. ; Saveant, J.M. J.Am.Chem.Soc. 1997, 119, 201.
- [19] Bourdillon, C.; Delamar, M.; Demaille, C.; Hitmi, R.; Moiroux, J.; Pinson, J. J. Electroanal. Chem. (1992), 336, 113-123.
- [20] Bourdillon, C.; Demaille, C.; Gueris, J.; Moiroux, J.; Saveant, J. M. J. Am. Chem. Soc. (1993), 115, 12264-1.
- [21] J.C. Miller, J.N. Miller, Analyst, 113 (1988) 1351–1356.
- [22] Hambate.V.G, Ngono.T.L, Sâadane.H, Ennachete. M, Khouili. M, Hafid. A, Benoît. L, Chtaini. A, Pharamaceutical analytica acta, 4(2013)10.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

Les antioxydants, nouvelles molécules de grand intérêt du point de vue scientifique, que commercial de notre mode de vie moderne suscitent de nombreuses investigations, 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.

Dans ce travail, une méthode rapide simple et efficace a été développée pour l'évaluation des antioxydants utilisant des électrodes modifiées. 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 et voltamétrie à onde carrée. La structure et la morphologie des couches ont été examinées par microscopie électronique à balayage (MEB).

Nous avons mis sur pied au troisième chapitre, un système bioanalytique capable de produire des radicaux libres *in situ*, pour la détermination de la capacité antioxydante des denrées alimentaires, les denrées utilisées ici sont le café, le thé et l'ail à cause de leur grande consommation. De plus la préparation et la caractérisation des électrodes modifiées par le cuivre a été élaboré, la voltammétrie à onde carré a été utilisé comme méthode électrochimique au cours de cette analyse à cause de sa précision et de sa mise en œuvre :

- ✓ Elle a montré des pics de réduction très claire lors de la production des radicaux libres et lors de l'ajout de la denrée alimentaire dans le système bioanalytique.
- ✓ Une équation mathématique a été proposée pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des denrées alimentaires.
- ✓ Pour les échantillons de thé et de café utilisés au cours de cette étude, il en ressort que le thé a une capacité antioxydante élevée par rapport au café probablement dû aux composés phénoliques qu'il renferme au sein de sa structure.

Dans le quatrième chapitre, nous avons fait une étude comparative entre trois molécules synthétiques de vue thérapeutique sur leur capacité à inhiber l'effet des radicaux

libres par voie électrochimique. Nous avons remarqué que, les trois molécules ont la même structure et ne diffèrent que par les groupements (-OH, -CN, -Cl). Il apparaît alors que lors de l'ajout de ces trois molécules dans la solution électrolytique aucun pic n'est observé en voltamétrie cyclique. Par contre en voltamétrie à onde carré, il apparaît deux pics, un pic d'oxydation vers 0.5V et un pic de réduction dans le domaine de potentiel négatif. Les résultats obtenus par la suite lorsque les molécules sont mises en contact avec les radicaux libres, montrent que le pouvoir antioxydant (POA) évolue dans le sens :

✚ **Pour des concentrations de la molécule  $\leq 60\mu\text{L}/100\text{ml}$ ,**

POA (Molécule-CN) > POA (Molécule-Cl) > POA (Molécule-OH).

✚ **Pour des concentrations de la molécule  $\geq 60\mu\text{L}/100\text{ml}$ ,**

POA (Molécule-Cl) > POA (Molécule-OH) > POA (Molécule-CN).

Dans le dernier chapitre, nous avons préparé des électrodes à pâte de carbone modifiée par des molécules organiques synthétisés au sein de notre équipe de recherche, nous permettant d'étudier leur réactivité. Il en ressort que :

✓ Les molécules synthétisées possèdent toutes une fonction prédisposée à la complexation des métaux et il peut y avoir aussi possibilité d'échange d'électrons avec la pâte de carbone ;

✓ Un mécanisme a été proposé ;

✓ En plus, nous avons pu déterminer par une approche statistique les limites de détection et de quantifications des différents métaux.

# ANNEXES

## Annexe 1

### I. Listes de Publications Scientifiques :

- 1) **Ngono Thérèse Rosie Lauriane**, Tarik Chelfi, Brahim Hach, harouna Massai, Benguella Loura Benoit, Nour-eddine Benchat and Abdelilah CHTAINI. « Immobilization of organic compounds on and modified electrode ». Bulletin of the Catalysis Society of India, 9 (2010) 68-73.
- 2) Rafik Sadik, **Ngono Thérèse Rosie Lauriane**, Fadel Ouahiba, Rachida Najih, Nour-eddine Benchat and Abdelilah Chtaini. « *Electrochemical Study of Tin (II) -5-Methyl Imidazo [1, 2-a] Pyridine-2-Ethyl Carboxylate complex* ». Bulletin of the Catalysis Society of India, 9 (2011) 30-35.
- 3) Salah Eddine El Qouatli, **Ngono Thérèse Rosie**, Hambate Gomdje Valery, Hayat Oubenamar, Hind Hissou, Rachida Najih and Abdelilah Chtaini. « *Electrochemical Analysis of the antioxydant capacity of coffee* ». Bulletin of the Catalysis Society of India 10, 2011, 30.
- 4) Valery Hambate GOMDJE, **Thérèse Rosie Lauriane Ngono**, Salah Eddine ELQOUATLI, Rachida NAJIH, Abdelilah CHTAINI. « *Electroanalytical Determination of Lead with carbon Paste Modified steel electrode* ». Acta Technica Corviniensis-Bulletin of Engineering, 2013, 139-142.
- 5) Valery Hambate GOMDJE, **Thérèse Rosie Lauriane Ngono**, Hind Saâdane Madiha Ennachte Mostafa Khouili Abdrrafia Hafid Loura Benoît and Abdelilah Chtaini. « *Evaluation of Carbon Paste Electrodes Modified with Organic Molecules for the Analysis of Heavy Metals by Square Wave Voltammetry* ». Pharmaceutica Analytica Acta, (2013) 4 10 1000271.

## II. Listes des Communications orales et par affiche

### II.1. Communication orale

**Ngono Thérèse Rosie**, Hambate Gomdje Valery, Benoit Loura, Ahmed Barakat, Abdelilah Chtaini. « *Procédé bioanalytique pour la détermination du pouvoir antioxydant des denrées alimentaires* ». 7<sup>ème</sup> Edition des Journées Internationales des Géosciences et de l'Environnement du 13-15 Novembre 2013 à la FST Béni-Mellal (Maroc).

### II.2. Communications par affiche

1) **Ngono Thérèse Rosie Lauriane**, Salah Eddine ELQOUATLI, Abdelilah CHTAINI « *Préparation des électrodes d'argile et de phosphate naturel modifiées par des molécules organométalliques pour la détection de molécules impliquées dans le stress oxydant* ». Congrès Internationale de Cancerologie (CIC-2011) FST Béni-Mellal, 6-7 Mai 2011.

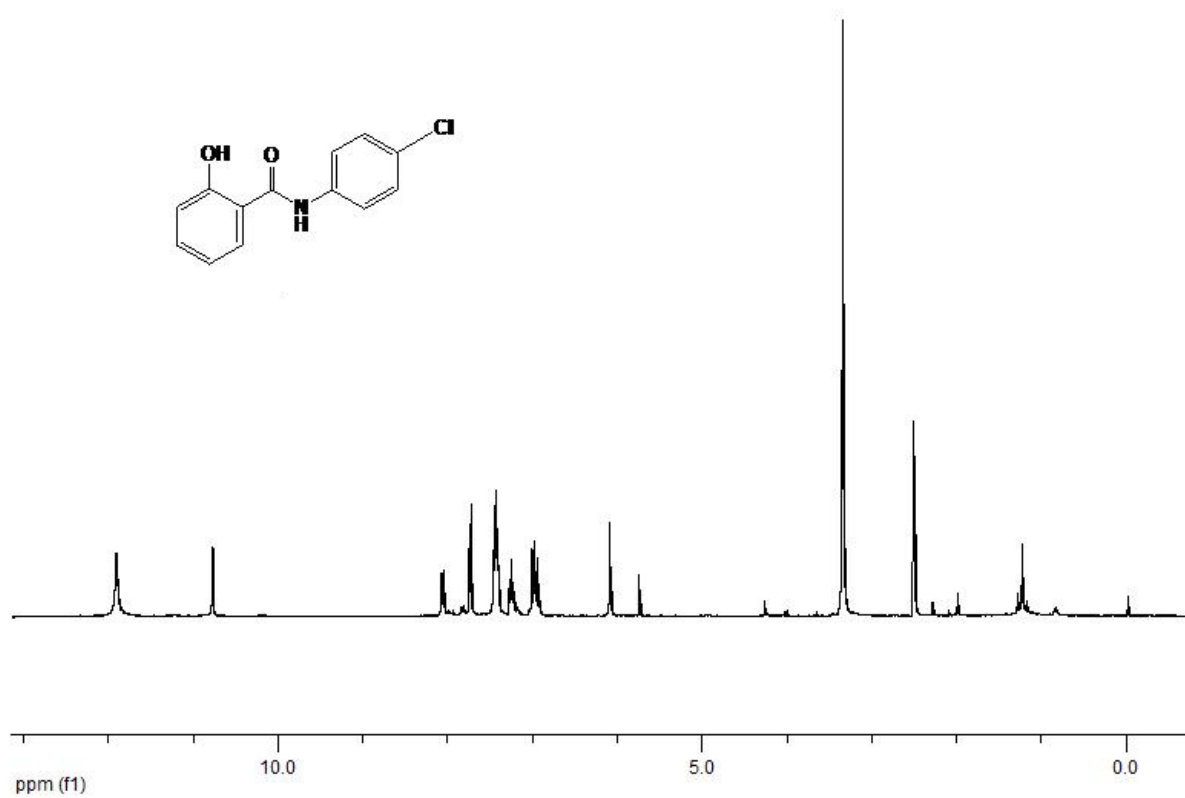
2) Salah Eddine ELQOUATLI, **Ngono Thérèse Rosie Lauriane**, Abdelilah CHTAINI. « *Capteurs électrochimiques au service de l'oncologie* ». Congrès Internationale de Cancerologie (CIC-2011) FST Béni-Mellal, 6-7 Mai 2011.

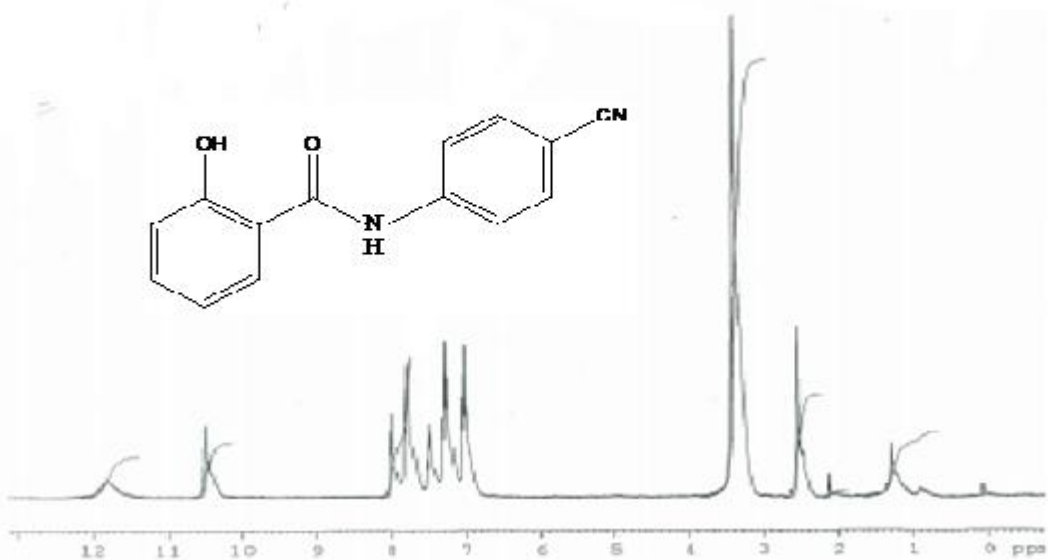
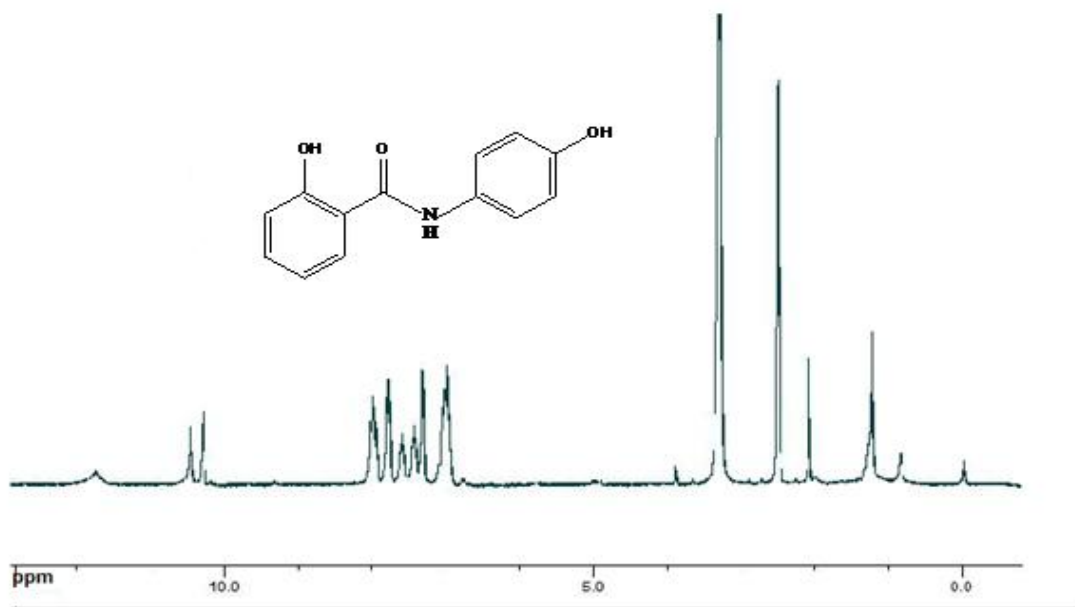
3) Valery Hambate GOMDJE, Salah Eddine ELQOUATLI, **Thérèse Rosie Lauriane Ngono**, Salah, Rachida NAJIH, Benoît Loura and Abdelilah CHTAINI. « *Preparation and Charaterization of carbon Modified steel electrode for detection of lead in blood and urines* ». Contribution to biomedicine. 1<sup>ère</sup> Edition Internationale de Chimie Médicinale à Béni-Mellal (Maroc). 24-25 Mai 2012.

4) A.Chtaini, H.V.Gomdje, S.El Qouatli, A.Sadiki, **Thérèse Rosie Lauriane Ngono**. « *Electrode de Carbone graphite modifiée par un polymère pour la détection de l'acide ascorbique* ». Deuxième Workshop de Chimie. Chimie Moléculaire et Perspectives. Du 28-29 Mai 2013 à Béni-Mellal (Maroc).



## Annexe 2 : Spectres RMN ( $^1\text{H}$ )





# TABLE DES MATIÈRES

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS .....	II
SOMMAIRE .....	V
RÉSUMÉ.....	XII
ABSTRACT .....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XIV
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	6
I. Le stress oxydant ou les conséquences d'un déséquilibre.....	7
I.1. Le paradoxe de l'oxygène.....	7
I.2. Les radicaux libres.....	9
I.2.1. Définition .....	9
I.2.2. Nature des radicaux libres.....	10
I.2.2.1. Les espèces libres dérivées de l'oxygène .....	10
I.2.2.1.a. Anion superoxyde : $O_2^-$ .....	10
I.2.2.1.b). Radical libre hydroxyle : $OH\bullet$ .....	11
I.2.2.1.c). L'oxygène singulet : $^1O_2$ .....	11
I.2.2.1.d). Le radical peroxyde : $H_2O_2$ .....	12
I.2.2.2. Les espèces réactives de l'azote (RNS) .....	12
I.3. Production des radicaux libres.....	13
I.3.1. Sources endogènes .....	13
I.3.2. Sources exogènes : agents physiques et chimiques .....	14
I.4. Rôle physiologique des radicaux libres .....	14
I.4.1. Rôle dans la phagocytose.....	15
I.4.2. Rôle dans la communication cellulaire .....	15
I.5. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres.....	15
I.5.1. Les lipides .....	15
I.5.2. Les protéines .....	16
I.5.3. Les glucides .....	17
I.5.4. L'ADN .....	17
I.5.4.1. Oxydation directe .....	17
I.5.4.2. Modification de base par fixation de produits secondaires de l'ADN .....	18
I.6. Les stress oxydant et les pathologies .....	19
I.6.1. L'ischémie-reperfusion .....	19

I.6.2. Les maladies neurodégénératives .....	19
I.6.3. Le cancer .....	20
I.6.4. L'âge .....	20
I.6.5. Le diabète .....	20
I.6.6. L'athérosclérose .....	20
II. Les systèmes de défenses : les molécules antioxydantes .....	21
II.1. Définition .....	21
II.2. Historique des antioxydants .....	21
II.3. Origine des antioxydants .....	22
II.4. Famille d'antioxydants .....	22
II.4.1. Les antioxydants enzymatiques .....	22
II.4.1.1. Superoxyde dismutase .....	23
II.4.1.2. Catalase .....	23
II.4.1.3. Glutathion peroxydase et réductase .....	24
II.4.1.4. les oligoéléments .....	24
II.4.2. Les antioxydants non enzymatiques ou moléculaires .....	25
II.4.2.1. Les antioxydants endogènes .....	25
II.4.2.1.1. Le Glutathion .....	25
II.4.2.1.2. L'acide urique .....	26
II.4.2.2. Les antioxydants exogènes .....	26
II.4.2.2.1. La vitamine E (ou $\alpha$ -tocophérol) .....	26
II.4.2.2.2. Vitamine C (acide ascorbique) .....	27
II.4.2.2.3. Vitamine A .....	28
II.4.3. les antioxydants synthétiques .....	28
II.4.4. les antioxydants phénoliques .....	29
II.4.4.1. Les antioxydants phénoliques naturels .....	29
II.4.4.1.1. Les flavonoïdes .....	29
II.4.4.1.2. Les non flavonoïdes .....	30
II.4.4.1.2.1. Les acides phénoliques .....	31
II.4.4.1.2.2. Les stilbènes .....	31
II.4.4.2. Les antioxydants phénoliques de synthèse .....	32
III. Généralités sur les denrées alimentaires .....	32
III.1. L'ail .....	32
III.1.1. Vertus et composition .....	33
III.2. Le café .....	34
III.2.1. Composition du café .....	35
III.3. Le thé .....	35
III.3.1. Composition du thé .....	35
III.3.2. L'activité antioxydante du thé .....	36
IV. Mode de détection et de conversion des substances chimiques par voie électrochimique .....	36
IV.1. Généralités sur les électrodes modifiées .....	36
IV.1.1. Modification de la surface des électrodes solides .....	39
IV.1.1.1. Modification covalente .....	39

IV.1.1.2. Modification par adsorption .....	39
IV.1.1.2.1. Adsorption physique .....	40
IV.1.1.2.2. Adsorption Chimique.....	40
IV.1.1.3. Modification par film polymérique ou modification multicouches .....	41
IV.1.2. Modification directe : les électrodes à pâte de carbone .....	42
IV.1.2.1. Electrodes à pâte de carbone à liant non conducteur.....	42
IV.1.2.2. Electrode à pâte de carbone à liant conducteur .....	43
IV.1.3. Les électrodes métalliques .....	43
IV.1.3.1. Electrodes à base des métaux purs .....	43
IV.1.3.2. Electrodes à base des métaux supportés ou additionnées.....	44
IV.1.4. Les électrodes non métalliques .....	45
IV.2. Application des électrodes modifiées dans l'agroalimentaire .....	45
IV.2.1. Méthodes d'analyse des antioxydants .....	45
IV.2. 1.1. Les méthodes spectrométriques et chromatographiques .....	45
IV.2.1.2. Les méthodes électrochimiques.....	47
IV.2.1.3. Biocapteurs .....	47
Conclusion.....	48
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	49
<b>Chapitre II : TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES .....</b>	<b>60</b>
I. Généralités.....	61
I.1. Interfaces à l'équilibre et loi de Nernst .....	61
II. L'Electrodéposition.....	63
II.1. Principe de l'électrodéposition.....	63
II.1.1. Généralités sur le cuivre .....	64
II.1.1.1 Description et propriétés de cuivre et ses alliages .....	64
II.1.1.2. Applications du cuivre et ses alliages .....	65
III. Voltamétrie .....	66
III.1. Composants et principes des techniques voltamétriques .....	66
III.2. Analyses voltamétriques .....	67
III.2.1. La voltamétrie linéaire .....	68
III.2.2. La voltametrie cyclique .....	68
III.2.3. Voltamétrie à onde carrée (Square wave voltametry : SWV).....	72
IV. Mesure de l'impédance électrochimique (EIS) .....	74
IV.1. Principe de l'impédance .....	74
IV.2. Description de l'impédance .....	76
V. Chronoampérométrie .....	78
VI. Chronopotentiométrie.....	79
VII. Techniques d'analyses de surface .....	81
VII.1. Microscopie électronique par balayage (MEB).....	81
VI.2. Spectrométrie infrarouge .....	81
VII.3. Diffraction des rayons X (DRX) .....	82
VII.4. Microscopie électronique par Transmission (MET) .....	82
VII.5. Surfaces spécifiques d'échanges (méthode BET).....	83

Références bibliographiques.....	84
----------------------------------	----

### **Chapitre III : DÉTERMINATION BIOANALYTIQUE DES DENRÉES**

<b>ALIMENTAIRES.....</b>	<b>85</b>
Introduction .....	86
I. Procédure.....	87
II. Réacteur électrochimique.....	87
II.1. Préparation de l'électrode de travail.....	88
II.2. Appareillages et réactifs .....	88
III. Caractérisation de l'électrode à pâte de carbone modifiée par le cuivre (CGE-Cu) .....	89
III.1. Caractérisation électrochimique.....	89
III.2. Caractérisation morphologique de l'électrode CPE-Cu.....	91
IV. Réacteur bio analytique .....	92
V. Détermination du pouvoir anti oxydant de l'ail.....	93
V.1. Courbe de calibration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	93
V.2. Inhibition de la réduction de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par l'ail.....	95
VI. Détermination du pouvoir anti oxydant du thé vert .....	97
VII. Détermination du pouvoir anti oxydant du café.....	99
Conclusion .....	102
Références .....	103

### **Chapitre IV : ÉVALUATION DU POUVOIR ANTI OXYDANT DES MOLÉCULES**

<b>ORGANIQUES SYNTHÉTISÉES .....</b>	<b>104</b>
Introduction .....	105
I. Etudes Electrochimiques .....	107
I.1. Molécule A .....	107
I.2. Molécule B .....	109
I.3. Molécule C .....	110
II. Pouvoir anti oxydant des molécules étudiées .....	112
II.1. Molécule A.....	112
II.2. Molécule B .....	114
II.3. Molécule C .....	116
Conclusion.....	117
Références .....	119

### **Chapitre V : DÉVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF POUR LA RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE EN DIAGNOSTIC CLINIQUE .....**

<b>.....</b>	<b>120</b>
Introduction .....	121
I. Molécules proposées pour la chélation des métaux lourds .....	122
II. Préparation de l'électrode .....	124
III. Mesures électrochimiques .....	126
IV. Comportement électrochimique des électrodes modifiées par les molécules proposées .....	126
V. Etude électrochimique de la chélation des métaux.....	128

<b>VI. Paramètres de l'analyse.....</b>	<b>134</b>
Conclusion.....	136
Références .....	137
<b>ANNEXES.....</b>	<b>142</b>
Annexe 1.....	143
II. Listes des Communications orales et par affiche.....	144
Annexe 2 : Spectres RMN ( <sup>1</sup> H) .....	145
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>147</b>