



UNIVERSITÉ SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



Centre d'Études Doctorales : Sciences et Techniques
Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé (RNES)

THÈSE

Présentée par

Amina AMLIL

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Physico-Chimie et Environnement

Spécialité : Chimie

***Contribution aux Développement de Capteurs Electrochimique pour la
Détection de Molécules Organiques et Dépollution Bactériologique***

Soutenue publiquement le **24/12/2019** devant la Commission d'Examen :

Abderrafia HAFID	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, FST Beni-Mellal	Président
Mohamed SAFI	Professeur, Université Hassan II, FST Mohammedia	Rapporteur
Rachid MAMOUNI	Professeur, Université Ibn Zohr, FS Agadir	Rapporteur
Amine MOUBARIK	Professeur Habilité, Université Sultan Moulay Slimane, FP Beni-Mellal	Rapporteur
Abdellatif ESSOUMHI	Professeur Habilité, Université Sultan Moulay Slimane, FP Beni-Mellal	Examineur
Hajiba OUCHETTO	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, FST Beni-Mellal	Examinatrice
Souad RABI	Professeur Habilité, Université Sultan Moulay Slimane, FST Beni-Mellal	Examinatrice
Mama El Rhazi	Professeur, Université Hassan II, FST Mohammedia	Examinatrice
Mostapha KHOULI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, FST Beni-Mellal	Directeur de thèse

A mes parents, qui sont toujours là pour moi...

A mes frères et sœur, Mohammed, Mustapha, Ali,
Youssef et Fatima-Zahra

A ma chère grand-mère, qui m'a toujours soutenu et qui
m'a facilité grandement la vie...

JE LEUR DEDIE CE TRAVAIL.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique et Analytique (LCOA), à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, sous la direction des professeurs Mostafa KHOULI et Abdelilah CHTAINI en collaboration avec l'Université d'Angers sous la direction des Professeurs Maxime PONTIE et Jean-Philippe BOUCHARA. Je tiens à leur adresser mes remerciements pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche (Equipe de Chimie Organique et Organométallique Appliquées, Laboratoire d'Electrochimie et des Matériaux Inorganiques (LEMI), Laboratoires de l'Environnement, de l'Energie, de l'Agroalimentaire et de la Valorisation des Ressources Marines (GEPEA) d'Angers et l'équipe du Groupe d'Etude des Interactions Hôtes Pathogènes (GEIHP) au CHU d'Angers).

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Mostafa KHOULI pour toute la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années de thèse. J'aimerais aussi le remercier pour l'intérêt qu'il a apporté à mes travaux et aussi pour tous les conseils, orientations et encouragements qu'il n'a cessés de me prodiguer tout au long de la réalisation de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent au Professeur Abdelilah CHTAINI qui sans lui ce travail n'aurait pas abouti. Il m'est difficile d'exprimer toute ma reconnaissance pour son permanent soutien, sa patience et surtout sa confiance dont il a toujours témoignée. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus grand respect.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Abderrafia HAFID, pour son aide précieuse, sa disponibilité permanente, sa gentillesse, ses qualités scientifiques et humaines et pour sa contribution à la réalisation de ce travail.

Je témoigner toute ma reconnaissance à mon co-encadrant 2014/2015 le Professeur Maxime PONTIE, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'il m'a fait vivre durant mes séjours de stage au sein des Laboratoires GEPEA et GEIHP à l'Université d'Angers.

Je remercie également toute l'équipe du Groupe d'Etude des Interactions Hôtes Pathogènes (GEIHP) au CHU d'Angers pour leur accueil, leur esprit d'équipe et en particulier le Professeur Jean-Philippe BOUCHARA et Mme Julia Bienvenu qui m'a beaucoup aidée dans la partie microbiologique

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres de jury pour avoir aimablement accepté de juger ce travail.

Enfin, je ne saurais oublier toutes les personnes avec qui j'ai partagé ces années de thèse au laboratoire de chimie organique et analytique: Sakina TOUZARA, Rajaa MAALLAH, Soufiane AKHRAMEZ, Jamila ZAITER, Hasna YASSINE, Jamila BOUALI, Hanane ACHIBAT, Hicham FADILI, qui m'ont encouragé, aidé et permis de réaliser ce travail dans une ambiance sympathique.

Enfin, j'exprime ma plus profonde gratitude à ma famille pour son soutien inconditionnel et indéfectible durant ces 6 années de thèse.

Résumé

L'intérêt porté aux capteurs ne cesse de croître, stimulé par leurs nombreuses applications, la modification d'électrode est à l'origine de l'intérêt qui a été porté à ces systèmes dès le début des années 80. L'originalité de ce travail est de mettre au point dans un premier temps, un biocapteur à *Scedosporium* pour la dépollution des eaux contaminées par les résidus médicamenteux (para-aminophénol par exemple) et d'élaborer des capteurs électrochimiques permettant d'évaluer les performances épuratoires de ce bioréacteur. Par la suite nous avons procédé à la l'étude du pouvoir anti-oxydant, des molécules hétérocycliques, avant et après la nitration par bismuth penta-hydraté ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Les résultats expérimentaux électrochimique et biologique ont abouti aux mêmes déductions, la nitration désactive le pouvoir anti-oxydant des molécules étudiées.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aussi à l'étude de la détection des *staphylococcus aureus* dans des solutions. Cette étude a été réalisée par l'utilisation des techniques électrochimique, la voltammétrie cyclique et à ondes carrées. Le matériel (carbone graphite) utilisé dans ce travail a prouvé une grande efficacité comme support pour étudier le comportement électrochimique des bactéries à la surface de l'électrode. En effet, celle-ci a été modifiée par l'amoxicilline et cette interaction a été d'un apport significatif pour atteindre notre objectif. Cette molécule jouant le rôle de bio-récepteur à la surface des électrodes synthétisées a été d'une bonne sensibilité aux bactéries à l'étude. Les résultats obtenus nous montrent que les électrodes élaborées sont particulièrement capables de détecter le *Staphylococcus aureus* à de faibles densités optiques.

Mots clés : Electrodes modifiées, capteur électrochimique, para-amoniphénol, amoxicilline, champignon *Scedosporium dehoogii*, bactéries (*Staphylococcus aureus*), antioxydant, Voltammétrie cyclique et Voltammétrie à ondes carrées.

Abstract

Interest in sensors continues to grow, stimulated by their many applications, electrode modification is at the origin of the interest that has been brought to these systems since the early 80s. The originality of this work is to develop, initially, a *Scedosporium* biosensor for the depollution of water contaminated by drug residues (para-aminophenol for example) and to develop electrochemical sensors to evaluate the purification performance of this bioreactor. Subsequently we proceeded to the study of the antioxidant power, heterocyclic molecules, before and after nitration by penta-hydrated bismuth ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Experimental electrochemical and biological results have led to the same deductions, nitration deactivates the antioxidant power of the molecules studied.

In this work, we are also interested in the study of the detection of *Staphylococcus aureus* in solutions. This study was performed using electrochemical techniques, cyclic voltammetry and square waves. The material (graphite carbon) used in this work has proved highly effective as a support for studying the electrochemical behavior of bacteria on the surface of the electrode. Indeed, this one was modified by amoxicillin and this interaction was of a significant contribution to reach our objective. This molecule acting as a bio-receptor on the surface of the synthesized electrodes was of good sensitivity to the bacteria under study. The results obtained show that the elaborated electrodes are particularly capable of detecting *Staphylococcus aureus* at low optical densities.

Key words: Modified electrodes, electrochemical sensor, para-aminophenol, amoxicillin, *Scedosporium dehoogii* fungus, bacteria (*Staphylococcus aureus*), antioxidant, cyclic voltammetry and Square wave voltammetry.

Liste des abréviations

ADN	:	Acide Désoxyribo Nucléique
Ag/AgCl	:	Argent/chlorure d'argent
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNr	:	Acide ribonucléique ribosomique
As	:	Arsenic
CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
CMR	:	Cancérogène, Mutagène et Repro-toxique
DPPH	:	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
ECS	:	Electrode au calomel saturé
ECS	:	Electrode au Calomel Saturée
ECV	:	Electrode en Carbone Vitreux
ELISA	:	Dosage immuno-enzymatique
ENH	:	Electrode normale à hydrogène
EPC	:	Electrode à Pâte de Carbone
ERO	:	Espèces Réactives Oxygénées
ETM	:	Eléments-Traces Métalliques
HRP	:	Horseradish peroxydase
HSAIV	:	Staphylococcus aureus à sensibilité intermédiaire hétéro-résistant à la vancomycine
LB	:	Langmuir-Blodgett
MEB	:	Microscope électronique à balayage
MPT	:	Methyl-parathion
PAP	:	Para-aminophénol
PBS	:	Le tampon phosphate salin
PCR	:	Réaction en chaîne par polymérase
PCT	:	Paracétamol
PLP	:	Protéines Liant les Pénicillines
QCM-D	:	Microbalance en cristal de quartz avec un suivi de dissipation
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
SAIV	:	Staphylococcus aureus à sensibilité intermédiaire à la vancomycine
SARM	:	Staphylococcus Aureus résistant à la méthicilline
SARV	:	Staphylococcus aureus résistant à la vancomycine
SASM	:	Staphylococcus Aureus sensible à la méthicilline
SASM	:	Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline
SDH	:	Scedosporium dehoogii
SEA	:	Surface électro-active
SIE	:	Spectroscopie d'impédance électrochimique
SOD	:	Superoxyde Dismutase
STEP	:	Stations d'épuration
SWV	:	Square wave voltammetry
TSST-1	:	Choc toxique de syndrome toxine-1
VC	:	Voltammétrie Cyclique
VOC	:	Voltammétrie à Onde Carrée
YPDA	:	Extract-Peptide-Dextrose Agar

Sommaire

Introduction générale	1
CHAPITRE I : Bibliographie Générale	3
Introduction	4
I. Principe et théorie de l'électrochimie	5
I-1. Electrodes	5
I-2. Grandeurs caractéristiques.....	6
I.2.1. Caractéristiques courant-potentiel à une électrode solide ^[1-3]	6
I.2.1. Principe de la production des réactions électrochimiques	6
I.2.2. Charge	9
I.2.3. Courant.....	9
I-3. Solutions	9
I-4. Mode de transport.....	10
I.4.1. Migration	10
I.4.2. Convection.....	10
I.4.3. Diffusion	10
I-5. Thermodynamique et cinétique	11
I.5.1. Equations cinétiques	11
I.5.1.1. Définition de la vitesse	11
I.5.1.2. Loi de vitesse ou loi cinétique	12
I.5.2. Détermination de l'ordre d'une réaction.....	13
I.5.2.1. Méthode intégrale pour un seul réactif	13
I.5.2.2. Méthode du temps de demi réaction pour un réactif	13
I-6. Cellule électrochimique	13
I-7. Electrode à pâte de carbone modifiée.....	14
I.7.1. Noir de carbone	14
I-8. Capteurs électrochimiques.....	16
I.8.1. Généralités sur les capteurs	16
I.8.1.1. Définition.....	16
I.8.2. Exemples de capteurs électrochimiques pour la détection des bactéries.....	20
II. Caractérisations électrochimiques	23
II.1. Voltammétrie ou voltampérométrie.....	23
II.2. Voltammétrie à balayage linéaire	25
II.2.1. Cyclovoltammétrie	26
II.2.2. Voltammétrie à vague carrée.....	32
Conclusion.....	33
Références	34
CHAPITRE II : Suivi Par Des Capteurs Electrochimiques De La Biodegradation Du Para-Aminophenol Par Un Champignon Filamenteux, Scedosporium Dehoogii	37
Introduction	38
I. Etude bibliographique.....	39
I.1. Les Micropolluants.....	39

I.1.1. Les micropolluants organiques	39
a. Paracétamol PCT	39
a. Synthèse de la molécule de Paracétamol	40
b. Effets du Paracétamol sur les êtres vivants	42
c. Effets néfastes du Paracétamol sur l'environnement.....	43
d. Le para-aminophénol (PAP).....	43
b. Les micropolluants inorganiques.....	44
a. Origine et toxicité des métaux lourds.....	44
b. Les rejets des métaux lourds dans l'eau.....	45
c. Effet sur la santé humaine	45
I.2. Scenedosporium dehoogii (SDH).....	46
I.3. Les techniques de dépollution	46
II. Matériels et méthodes.....	46
II.1. Electrodes de travail.....	46
II.1.1. L'électrode à pâte de carbone EPC et l'électrode de carbone vitreux	46
a. L'électrode à Carbone Vitreux (ECV)	47
b. L'électrode à Pâte de Carbone (EPC)	47
II.1.2. Méthodes électrochimiques d'analyse	48
II.2. Le dispositif de l'analyse électrochimique et les électrodes testées	48
II.2.1. Dispositif électrochimique	48
II.2.2. Culture de la souche de Scenedosporium Dehoogii en milieu liquide avec le PAP	49
III. Résultats et discussions	51
III.1. Etudes de la cinétique de transfert d'électron avec l'ECV et l'EPC pour le PAP.....	51
III.1.1. Comparaison de la réponse électrochimique de l'ECV et l'EPC pour le PAP	51
III.1.2. Etude de la cinétique du transfert d'électron pour l'oxydation du PAP sur les électrodes EPC et ECV	54
III.2. Calibration des électrodes EPC et ECV par la technique VOC selon la méthode de l'étalonnage externe	56
III.3. Etalonnage de l'électrode ECV par la technique VC selon la méthode de l'étalonnage externe.....	57
III.4. Détermination d'une concentration inconnue de PAP par la technique VOC selon la méthode des ajouts dosés	58
III.5. Cinétique de biodégradation	60
Conclusion.....	61
Références	62
CHAPITRE III : Etudes Electrochimiques Et Activité Antioxydante Des Systèmes Hétérocycliques Nitrés	
Introduction	
I. Etude bibliographique.....	65
I-1. La nitration des molécules organiques.....	65
I-2. Oxydants et antioxydants	67
I.2.1. Les radicaux libres.....	67
I.2.2. Les antioxydants	67
I.2.3. Les antioxydants enzymatiques	68

I.2.4. Les antioxydants non enzymatiques	68
II. Matériels et méthodes	69
II.1. Méthodes synthétiques générales.....	69
II.2. Matériels et méthodes électrochimiques	70
II.2.1. Elaboration de l'EPC.....	70
II.2.2. Dispositif électrochimique	70
II.3. Méthodes analytiques utilisées pour évaluer l'activité antioxydant	71
II.3.1. Méthode du radical libre DPPH	71
II.3.2. Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	72
III. Résultats et discussions	73
III.1. Synthèse des molécules organiques nitrées	73
III.1.1. Réaction de nitration du méthoxy-naphtalène par le nitrate de bismuth penta-hydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	73
III.1.2. Interprétation RMN ^1H et ^{13}C des produits 1.a, 1.b et 1.c	74
III.1.3. Réaction de nitration du naphtalène-2-ol par bismuth penta-hydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).....	75
III.1.4. Interprétation RMN ^1H et ^{13}C du produit 2'	75
III.2. Caractérisation électrochimique des molécules nitrées	75
III.2.1. Caractérisation électrochimique de la molécule mère 1 avant sa nitration	76
III.2.2. Caractérisation électrochimique des molécules nitrées produites de la molécule mère 1	77
a) Caractérisation électrochimique de 7-méthoxy-1-nitronaphtalène 1.a.....	77
b) Caractérisation électrochimique de 2-méthoxy-6-nitronaphtalène 1.b.....	78
c) Caractérisation électrochimique de 2-méthoxy-1-nitronaphtalène 1.c.....	79
III.2.3. Caractérisation électrochimique de la molécule nitrée produite 2' et de la molécule mère 2	80
a) Caractérisation électrochimique de naphtalène-2-ol 2	80
b) Caractérisation électrochimique de 1,6-dinitronaphtalène-2-ol 2'	80
III.2.4. Caractérisation électrochimique de l'acide ascorbique.....	82
III.3. Etude biologique des composés aromatiques nitrés	83
III.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	83
Conclusion.....	87
CHAPITRE IV : Interaction Entre l'Electrode De Pâte De Carbone, l'Amoxicilline Et Les Bactéries	91
Introduction	92
I. Etude bibliographique.....	94
I-1. Staphylococcus Aureus (bactérie)	94
I.1.1. Agent infectieux	94
a. Synonyme ou renvoi.....	94
b. Caractéristiques	94
I.1.2. Détermination du risque	95
a- Pathogénicité et toxicité.....	95
b- Epidémiologie.....	95
c- Gamme d'hôtes.....	96

d- Dose infectieuse.....	96
e- Mode de transmission.....	96
f- Période d'incubation	96
g- Transmissibilité	96
I.1.3. Dissémination	96
I.1.4. Viabilité et stabilité.....	97
I.1.5. Premiers soins et aspects médicaux.....	98
I-2. Amoxicilline	99
I.2.1. Découverte des β -lactamines et développement de l'amoxicilline	99
I.2.2. Structure et propriétés physico-chimiques	100
a. Structure	100
b. Ionisation.....	101
c. Hydrosolubilité et liposolubilité.....	101
d. Stabilité en milieu acide.....	102
I.2.3. Propriétés biologiques de l'amoxicilline	102
a. Structure et polymérisation du peptidoglycane	102
b. Mécanisme d'action des antibiotiques de type bêta-lactamine.....	103
I.2.4. Principe	104
I.2.5. Déroulement	104
II. Matériels et méthodes.....	107
II.1. Préparation des électrodes.....	107
II.1.1. Elaboration de l'électrode de pâte de carbone (EPC)	107
II.1.2. Caractérisation électrochimique	108
a. Description du dispositif expérimental	108
b. Etude électrochimique de l'électrode mère.....	109
II.2. Modification des électrodes mères par l'amoxicilline	109
II.2.1. Amoxil.....	109
II.2.2. Modification des électrodes par adsorption	109
II.2.3 Modification de l'électrode par mélange avec l'amoxicilline	110
II.3. Etude électrochimique de l'électrode modifiée par l'amoxicilline aux différents temps de pré-concentration et par mélange.....	110
II.4. Caractérisation des électrodes modifiées en présence des bactéries.....	110
II.4.1 Culture des bactéries	110
II.4.2 Etudes électrochimiques des électrodes modifiées (adsorption et mélange) en présence des bactéries	112
II.4.2.1 Etude de l'effet du temps de contact avec les bactéries	112
II.4.2.2 Etude de l'effet de la concentration de l'amoxicilline	112
II.4.2.3 Etude de l'effet de la densité optique des bactéries	112
II.4.2.4 Etude de la durée de détection des bactéries	112
II.4.2.5 Etude de l'effet du pH	113
II.4.2.6 Etude de la reproductibilité du résultat des électrodes	113
III. Résultats et discussions	113
III.1. Electrode de pâte da carbone modifiée par adsorption.....	113

III.1.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline.....	113
a. Caractérisation électrochimique	113
b. Caractérisation physique.....	115
III.1.2. Caractérisations électrochimiques de EPC/AMX ads. en présence des Staphylococcus aureus	116
III.1.2.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	116
III.1.2.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	118
III.1.2.3. Etude électrochimique de EPC/AMX ads. en fonction du temps de contact avec la bactérie	119
a. Caractérisation par la voltammétrie cyclique.....	120
b. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées.....	120
d. Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie	122
e. Courbes de polarisation.....	123
III.1.2.4. Comparaison du comportement électrochimique et physique de EPC/AMX ads. avant et après le temps de contact avec la bactérie.....	125
III.1.2.5. Etude électrochimique de l'effet de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads. sur les bactéries.....	126
a. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées	126
b. Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline	127
c. Densité optique en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads.	127
III.1.2.6. Etude de l'effet de la densité optique (DO) de la bactérie sur EPC/AMX ads.....	128
a. Caractérisation par la voltammétrie cyclique	128
b. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées	129
d. Détermination de la limite de détection et de quantification de EPC/AMX ads.	130
III.1.2.7. Détermination de la durée de la détection des bactéries par EPC/AMX ads....	131
III.1.2.8. Etude de l'effet du pH.....	132
III.1.2.8. Reproductibilité des résultats de EPC/AMX ads.	133
III.2. Electrode de pâte de carbone modifiée par mélange	133
III.2.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline.....	133
a. Caractérisation physique de l'électrode obtenue	133
b. Caractérisation électrochimique	134
III.2.2. Etude de EPC/AMX mél. en fonction du temps de contact avec la bactérie.....	135
a. Caractérisation électrochimique de EPC/AMX mél. en fonction du temps de contact avec les bactéries.....	135
c. Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX mél. avec la bactérie	137
d. Comparaison du comportement physique et électrochimique de EPC/AMX mél. avant et après le contact avec la bactérie	138
e. Comparaison des données de la densité optique de EPC/AMX ads. et EPC/AMX mél.....	140

f. Effet du pH sur EPC/AMX mél. en présence des bactéries	140
Conclusion.....	141
Références	142
Conclusion générale	148
Perspectives	150

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La protection de l'eau de surface comme source pour la production d'eau potable est devenu une préoccupation majeure pour les pouvoirs publics, les instances, les organismes nationaux et internationaux. De plus en plus, une attention croissante est portée sur la présence de micropolluants émergents (les hydrocarbures, composés phénoliques, solvants chlorés, pesticides, résidus médicamenteux, etc.) dans l'environnement. Parmi ces contaminants, résidus médicamenteux trouvent une place très importante dans la nature et surtout dans les stations d'épuration. Ces dernières ne sont pas toujours à mesure de traiter ce type de pollution car les résidus médicamenteux se dégradent très facilement et génèrent parfois de sous-produit plus toxique que les molécules de départ.

Parmi les agents pathogènes diffusés dans les sources d'eau, les agents pathogènes entériques sont les plus fréquemment rencontrés. En conséquence, les sources de pollution fécale dans les eaux consacrées à l'activité humaine doivent être strictement contrôlés. La détection et la détermination immédiate des bactéries sont nécessaires pour le diagnostic précis de la maladie et le traitement efficace de l'infection. Plusieurs procédés d'identification des bactéries sont disponibles. Les méthodes traditionnelles sont basées sur l'identification phénotypique de l'agent pathogène en utilisant la coloration, la culture et les méthodes biochimiques Gram. Cependant, ces procédés présentent certains inconvénients tels que leur utilisation limitée des micro-organismes cultivés in vitro, ou la diversité des souches qui ne possèdent pas nécessairement les mêmes caractéristiques biochimiques, ce qui rend l'analyse difficile. Face à cette situation, il est nécessaire d'envisager des techniques de détection et de traitements fiables, moins coûteux et simples à mettre au point. Une recherche sérieuse a mis l'accent sur les méthodes d'analyse électrochimiques, qui offrent une grande sensibilité ainsi qu'un coût réduit et un temps limité.

Les biocapteurs électrochimiques présentent de nombreux avantages par rapport aux autres biocapteurs, tels que:

- Ils sont très fiables, reproductibles et présentent une linéarité élevée sur une large gamme de concentrations, ils ne nécessitent aucun traitement préalable de la substance à analyser.

-Ils peuvent offrir des avantages de faibles limites de détection, et une bonne stabilité.

Les hétérocycles azotés forment un groupe d'importance majeur en chimie organique du fait de leur réactivité d'une part et de leur présence dans un grand nombre de molécules d'origine naturelle et synthétique d'autre part. En effet, ils jouent un rôle important dans divers domaines (pharmacie, médecine, biologie, agronomie). Dans ce travail une étude adressée à la préparation des composés susceptibles d'avoir des propriétés biologiques et / ou pharmacologiques potentielles à été réalisé.

Dans le cadre de ce travail, nous avons élaboré des capteurs électrochimiques : Deux types d'électrode à pâte de carbone (EPC) et une électrode en carbone vitreux (ECV), avec trois potentiostat différentes.

Le rapport de cette thèse comporte quatre chapitres :

- Le premier chapitre consiste en une mise au point bibliographique, sur les électrodes modifiées et non modifiées, dispositif expérimental ainsi que les méthodes et les techniques utiles pour l'étude électrochimique.
- Le deuxième chapitre présente l'étude de la cinétiques de la biodégradation du para-aminophénol (PAP) par un micro-organisme *Scedosporium dehoogii* (SDH) ayant un rôle épuratoire mettant en jeu des mécanismes biochimiques permettant d'aller jusqu'à la minéralisation totale ou partielle du PAP.
- Tandis que le troisième chapitre est consacré à la nitration des composés aromatiques par le nitrate de bismuth pentahydraté ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) suivie d'une étude électrochimique et des tests de l'activité antioxydante de ces composés nitrés
- L'objectif du dernier chapitre était d'étudier les propriétés électrochimiques de *Staphylococcus aureus* sur une électrode à pâte de carbone non modifiée et modifiée par un antibiotique (Amoxicilline).

CHAPITRE I : Bibliographie Générale

Introduction

Les raisons pour lesquelles on effectue des mesures de nature électrochimique sur les systèmes chimiques sont très variées.

On peut rechercher des données thermodynamiques sur une réaction, on peut vouloir générer une espèce intermédiaire telle qu'un ion radical et étudier sa vitesse de disparition ou ses propriétés spectroscopiques, on peut encore désirer analyser une solution en déterminant les concentrations de traces de cations métalliques ou de substances organiques.

Dans ces exemples, les méthodes électrochimiques sont utilisées comme outils pour l'étude des systèmes chimiques. De nombreuses méthodes électrochimiques ont été mises au point pour l'ensemble de ces centres d'intérêt. Leur utilisation réclame d'avoir compris les principes fondamentaux des réactions électrochimiques et les propriétés électriques des interfaces électrodes-solution.

Dans cette partie nous introduirons d'abord les termes et les concepts utilisés pour décrire les réactions aux électrodes.

I. Principe et théorie de l'électrochimie

I-1. Electrodes

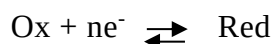
Lors d'une réaction électrochimique, deux demi-réactions se produisent à deux électrodes différentes. La demi-réaction d'oxydation a lieu à l'anode tandis que la demi-réaction de réduction se produit à la cathode. En chimie électroanalytique, une électrode alterne souvent en étant l'anode puis la cathode. Ainsi, les termes « anode » et « cathode » sont des appellations peu usitées. En effet, il y a une électrode où les espèces chimiques qui nous intéressent (analytes) réagissent, qui est nommée l'électrode de travail. De plus, comme il n'est pas possible de mesurer le potentiel électrique d'une seule électrode, une seconde électrode est utilisée pour mesurer la tension (différence de potentiels) entre l'électrode de travail et cette électrode. Cette seconde électrode est appelée électrode de référence. L'électrode de référence est une demi-cellule, d'un système dont le potentiel doit être connu et constant. Le potentiel d'une électrode particulière (demi-cellule) a été assigné arbitrairement à une valeur de zéro volt à toutes températures. Cette électrode est l'électrode normale à hydrogène (ENH). Il n'est cependant pas pratique de l'utiliser comme électrode de référence et deux autres électrodes sont couramment usitées, l'électrode au calomel saturé (ECS) et l'électrode d'argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl). Ces deux électrodes utilisent des solides et des solutions ioniques (généralement saturées). L'électrode au calomel saturée est constituée de mercure liquide dans une solution saturée de chlorure de mercure (I) (calomel) et de chlorure de potassium et elle est connectée à la solution à analyser par un pont salin. Cette électrode a été largement utilisée parce qu'elle est facile à préparer et disponible dans le commerce. Toutefois, cette électrode est de moins en moins usitée en raison des problèmes de toxicité du mercure. L'électrode d'argent/chlorure d'argent se compose d'un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent et immergé dans une solution saturée de chlorure de potassium. L'électrode est reliée à la solution étudiée par un pont salin. Le potentiel de cette électrode est de +0,210 V par rapport à ENH (avec une solution 3M de KCl). L'électrode de référence utilisée lors des expériences au cours de cette thèse est une électrode Ag/AgCl. Ainsi afin d'alléger l'écriture, les potentiels pourront être mentionnés en volts (V) au lieu de volts versus Ag/AgCl (V vs. Ag/AgCl).

I-2. Grandeurs caractéristiques

I.2.1. Caractéristiques courant-potentiel à une électrode solide ^[1-3]

I.2.1. Principe de la production des réactions électrochimiques

Considérons une solution contenant le couple oxydoréducteur Ox/Red tel que :



En électrochimie, le potentiel reflète la force à laquelle les électrons se déplacent entre les électrodes et il est lié à l'énergie libre de la réaction globale. Le potentiel dépend pour une réaction spécifique, des concentrations (ou plus précisément des activités), des produits et des réactifs et de la température selon l'équation de Nernst :

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \quad (\text{I. 1})$$

E : Le potentiel expérimental mesuré (V)

E° : Le potentiel standard de la réaction (V)

R : La constante des gaz parfaits ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T : La température (K)

n : Le nombre d'électrons transférés lors de la réaction (sans unité)

F : La constante de Faraday (96485 C mol^{-1})

a_{ox} : L'activité de la forme oxydée de l'analyte (sans unité)

a_{red} : L'activité de la forme réduite de l'analyte (sans unité)

Soit à 25°C , avec E en volts :

$$E = E^\circ + \frac{0,058}{n} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \quad (\text{I. 2})$$

Si d'autres espèces (telles que les ions H^+) participent à la réaction, leurs activités doivent également être incluses dans l'équation pour le calcul du potentiel.

Si, tout en envisageant de faire varier les concentrations des substances électro-actives, on peut admettre que la force ionique va rester pratiquement inchangée, on peut alors appliquer la loi de Nernst en l'écrivant comme si les constituants en solution se comportaient idéalement, permettant de faire intervenir leur concentration à la place de leur activité. La constante qui regroupe le potentiel normal vrai et le terme comprenant les

coefficients d'activité (terme qui reste invariable dans la mesure où la force ionique est constante) est appelée potentiel normal apparent (ou formel) et est désignée par le symbole E° . La relation de Nernst s'écrit alors :

$$E = E^\circ + \frac{0,058}{n} \lg \frac{C_{Ox}^{sol}}{C_{Red}^{sol}} \quad (I.3)$$

Avec C_{Ox}^{sol} et C_{Red}^{sol} concentrations des espèces Ox et Red en solution.

Lorsqu'une électrode solide constituée d'un conducteur métallique inattaquable est plongée dans la solution contenant le couple Ox/Red, celle-ci prend le potentiel d'équilibre précédemment calculé que nous notons :

$$E_{eq} = E^\circ + \frac{0,058}{n} \lg \frac{C_{Ox}^{sol}}{C_{Red}^{sol}} \quad (I.4)$$

Ce potentiel peut être déterminé expérimentalement en mesurant la différence de potentiel ΔE entre cette électrode et une électrode de référence (E_{ref}), c'est-à-dire une électrode dont le potentiel est constant et indépendant du milieu dans lequel elle est plongée:

$$\Delta E = E_{eq} - E_{ref}. \quad (I.5)$$

La production d'une réaction électrochimique nécessite la réalisation de conditions rendant le potentiel d'électrode différent du potentiel d'équilibre, c'est-à-dire l'établissement d'un surpotentiel (ou surtension) d'électrode $\eta = E - E_{eq} \neq 0$. Cela provoque une évolution du système oxydoréducteur (plus ou moins rapide) tendant au rétablissement d'un nouvel état d'équilibre. L'imposition de $E \neq E_{eq}$ oblige la composition de la solution à se modifier au contact de l'électrode. On définit alors C_{Ox}^* et C_{Red}^* , les concentrations respectives de Ox et Red à la surface de l'électrode (à l'endroit où a lieu la réaction électrochimique).

- **si $\eta > 0$** , la solution dans laquelle baigne l'électrode va tendre à prendre le potentiel E imposé et le rapport des concentrations des espèces Ox et Red au contact de l'électrode C_{Ox}^*/C_{Red}^* va augmenter puisque une partie du réducteur passe à l'état oxydé par la réaction d'oxydation $Red - ne^- \rightarrow Ox$; cela se réalise par le transfert d'électrons dans le sens solution $\rightarrow$ électrode, qui est alors appelée **anode** ;

- **si $\eta < 0$** , la solution dans laquelle baigne l'électrode va tendre à prendre le potentiel

E imposé et le rapport des concentrations des espèces Ox et Red au contact de l'électrode C_{Ox}^*/C_{Red}^* va diminuer, puisque une partie de l'oxydant va se réduire selon $Ox + ne^- \rightarrow Red$; les électrons sont apportés par l'électrode (vers la solution), alors appelée **cathode**.

En résumé, lorsque l'on porte à un potentiel $E \neq E_{eq}$ quelconque une électrode plongeant dans une solution contenant un couple oxydo-réducteur, elle est traversée par un courant, dont le sens dépend de la valeur du potentiel imposé (par rapport à E_{ref}). Ainsi, le potentiel d'électrode E , ou plus exactement le surpotentiel η apparaît comme étant le facteur de production des réactions électrochimiques.

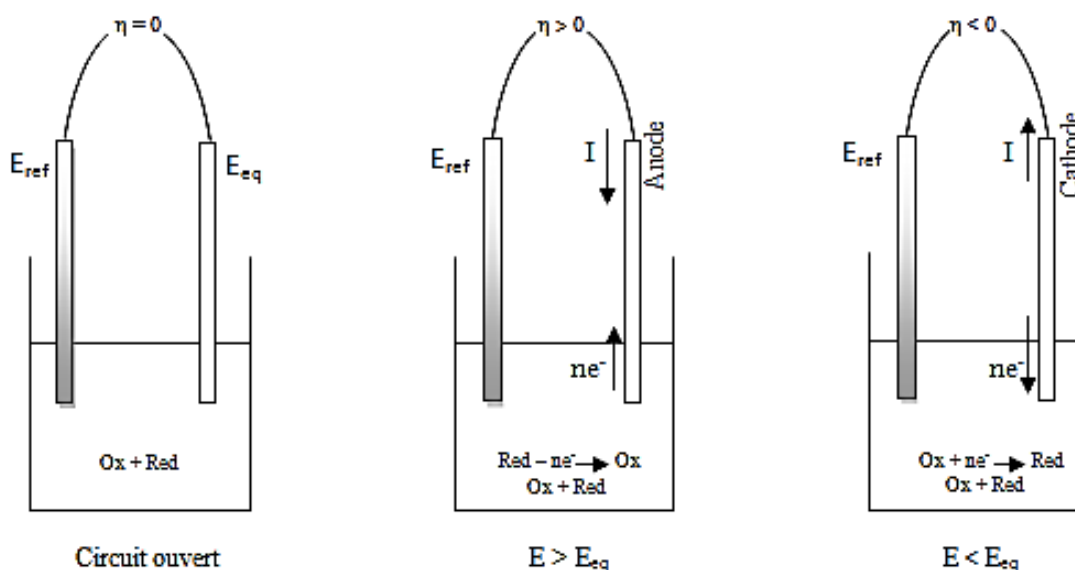


Figure I-1 : Sens du courant suivant la valeur de la différence de potentiel appliquée à l'électrode indicatrice

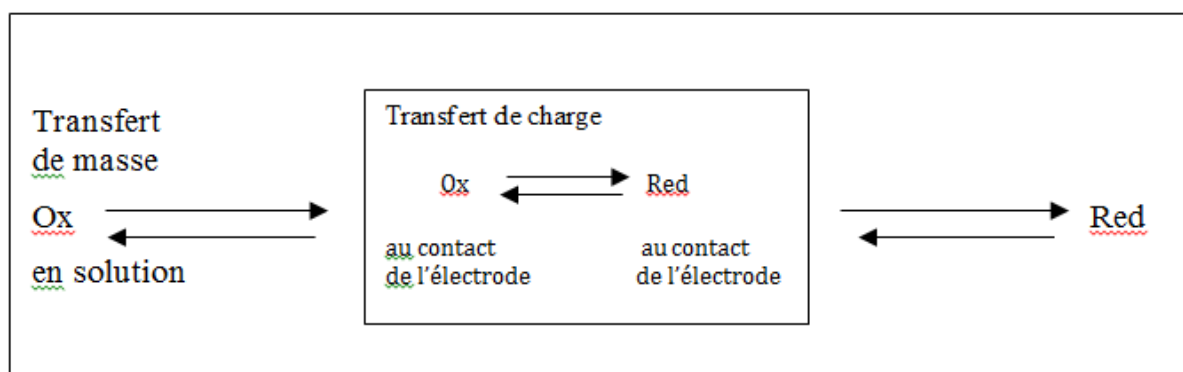


Figure I-2 : Décomposition des différentes étapes de la réaction électrochimique

Si nous considérons le cas d'un système simple $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$ dont l'oxydant et le réducteur ne diffèrent que par n électrons et sont tous les deux solubles dans le milieu considéré, et sachant que le transfert des électrons se fait nécessairement lorsque l'espèce Ox

ou Red est au voisinage de l'électrode, la réaction électrochimique globale se décompose alors comme indiqué sur la figure I-2.

Pour établir la relation entre le courant I , le potentiel E et les concentrations de Ox et Red en solution ($C_{\text{Ox}}^*/C_{\text{Red}}^*$), nous analysons successivement les paramètres qui régissent le transfert électronique (de charge) et le transport de masse.

I.2.2. Charge

La charge correspond à une mesure du nombre d'électrons. La constante de Faraday (en coulombs par mole, $C. \text{mol}^{-1}$), représente la charge électrique par mole d'électrons et vaut $F = 96485 C. \text{mol}^{-1}$.

I.2.3. Courant

Le courant reflète la vitesse à laquelle se déplacent les électrons, il est exprimé en ampères (A) ou en coulombs par seconde ($C.s^{-1}$). Le courant est proportionnel à la vitesse instantanée de la réaction électrochimique. Il existe de nombreux facteurs qui influent sur la vitesse de réaction et notamment la surface électro-active (SEA) de l'électrode, la concentration des réactifs, la température, la viscosité de la solution et le potentiel appliqué.

Le courant mesuré lors d'une mesure électrochimique peut provenir de la réaction d'oxydoréduction (courant faradique) et/ou d'un courant de fond. Ce courant de fond peut être dû à l'électrolyse des impuretés, à l'électrolyse du solvant, à l'électrolyse du matériau à la surface de l'électrode et au courant capacitif. L'électrolyse du solvant et l'électrolyse de l'électrode peuvent être minimisées ou éliminées en travaillant uniquement à des potentiels dans lesquels ces réactions ne se produisent pas de façon significative. Cette gamme de potentiels est appelée la fenêtre de potentiel. Le courant capacitif est quant à lui dû à l'interface électrode-solution qui se comporte comme un condensateur électrique en stockant une charge. La solution utilisée a donc une importance lors d'une mesure électrochimique.

I-3. Solutions

Afin de minimiser le courant capacitif, la solution utilisée lors de la réaction électrochimique doit être ioniquement conductrice de sorte qu'un excès de charge ne

s'accumule pas au niveau des électrodes. L'eau pure n'est pas suffisamment conductrice et les analytes lorsqu'ils sont ioniques sont souvent à des concentrations trop faibles pour être suffisamment conducteurs. La solution est donc habituellement conductrice grâce à l'addition d'ions en solution qui n'affectent pas la mesure (appelée électrolyte). La concentration de l'électrolyte est généralement supérieure à celle de l'analyte et elle est de l'ordre de 0,1 M. Une concentration élevée de l'électrolyte permet également de maintenir une force ionique élevée et constante de la solution malgré de petites variations de concentration en analyte lors de la réaction électrochimique. L'activité de l'analyte est ainsi proportionnelle à la concentration pour que le potentiel dépende directement de la concentration. Il est important de choisir un électrolyte qui n'interfère pas avec la mesure. Dans notre cas, nous avons fait les mesures dans une solution de chlorure de sodium (NaCl).

I-4. Mode de transport

Pour qu'une réaction électrochimique, localisée à la surface de contact entre l'électrolyte et l'électrode, puisse se poursuivre, il faut que la substance électro-active mise en jeu continue à être présente à cette surface. Cette condition implique que l'espèce Ox ou Red (dissoute en solution) arrive à la surface de l'électrode par transport au sein de l'électrolyte. Il nous faut connaître donc le flux ϕ de substance (nombre de moles arrivant à l'électrode et en partant, par unité de temps) sachant que les flux de Ox et de Red sont opposés puisque l'un se transforme en l'autre (ou inversement).

En général, il est nécessaire de considérer trois modes de transport de matière :

I.4.1. Migration

Elle correspond au mouvement, d'une espèce chargée sous l'influence d'un champ électrique. La grande concentration en électrolyte rend ce mode de transport peu important.

I.4.2. Convection

Elle se réfère à une agitation ou à un transport hydrodynamique. Il est difficile de déterminer le taux de convection ou de le maintenir constant. Ainsi, la majorité des techniques électrochimiques nécessitent une solution au repos.

I.4.3. Diffusion

Elle provient du mouvement d'une espèce dans un gradient de concentration. La

plupart des mesures électrochimiques sont basées sur l'hypothèse d'un contrôle du système par diffusion. Dans certains cas, la substance à analyser est fortement attirée vers l'électrode et elle s'adsorbe à la surface de l'électrode. Les molécules adsorbées ne montrent pas d'effet de transport de masse. De nombreux analytes peuvent à la fois diffuser et adsorber.

I-5. Thermodynamique et cinétique

Le potentiel est lié à la fois à la concentration et à l'énergie potentielle intrinsèque, des réactifs des produits, sa mesure rend compte principalement d'un aspect thermodynamique. En revanche, le courant mesure le taux instantané de réaction et représente donc une mesure cinétique. Comme le taux de réaction dépend de la concentration des espèces, le courant peut être utilisé pour déterminer la concentration des espèces en solution. Ceci à condition que les autres facteurs affectent le taux de réaction soit maintenus constant. Ces facteurs sont par exemple la température ou le mécanisme réactionnel mais ils peuvent également être d'origine électrochimique. En effet, toutes les réactions électrochimiques se produisent à la surface de l'électrode donc le taux de réaction est fonction de la surface spécifique de l'électrode. En augmentant la surface, il peut y avoir plus d'analyte qui réagit à un instant donné et le courant augmente alors proportionnellement. En outre, la substance à analyser doit atteindre la surface de l'électrode donc le taux de réaction (ou le courant) dépend de la vitesse à laquelle l'analyte peut atteindre la surface de l'électrode. Une réaction qui est chimiquement rapide et pour laquelle le mode de transport est l'étape limitante est appelée réversible. Au contraire, lorsque l'étape limitante est une étape dans le mécanisme réactionnel (telle que le transfert d'électrons), alors la réaction est irréversible. La réversibilité électrochimique se réfère à la cinétique du processus et ne doit pas être confondue avec la réversibilité thermodynamique ou chimique qui fait référence à la capacité des produits à redevenir des réactifs.

I.5.1. Equations cinétiques

I.5.1.1. Définition de la vitesse

La cinétique chimique a pour objet d'étudier la vitesse de formation, de proposer des mécanismes, donc de définir des chemins réactionnels. La cinétique commence par la cinétique empirique, c'est à dire la détermination des relations algébriques entre la concentration et le temps.

I.5.1.2. Loi de vitesse ou loi cinétique

➤ Cinétique d'ordre 0

$A \rightarrow \text{produits}$ (un seul réactif)

Définition de la vitesse : $V = -d[A]/dt$

Loi de la vitesse : $V = k[A]^0 = k$ indépendant de la concentration

Equation cinétique : $-(d[A]/dt) = k$

Loi de vitesse intégrée : $\int d[A] = -\int k \cdot dt$ et $[A] = -kt + \text{cte}$ si $t = 0$ $\text{cte} = [A]_0$ d'où $[A] = [A]_0 - kt$; si $t = t_{1/2} = \text{demi-vie}$ $[A]_0/2 = [A]_0 - kt_{1/2}$

L'intégration entre 0 et t donne : $[A]_t = [A]_0 - kt$ (t = temps)

où $[A]_0$ est la concentration de A au temps $t = 0$

$[A]_t$ est la concentration de A au temps t.

La constante k est mesurée en $[\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}]$ ou M.s^{-1} .

Une réaction d'ordre zéro est caractérisée par une dépendance linéaire de la concentration: $[A]$ en fonction du temps.

➤ Premier ordre :

$A \rightarrow \text{produits}$ (un seul réactif)

Définition de la vitesse : $V = -(d[A]/dt)$

Loi de la vitesse : $V = k[A]^1$

Loi de vitesse intégrée : $\int_{[A]_0}^{[A]} d[A] / [A] = - \int_0^t k \cdot dt$ d'où $\ln([A]/[A]_0) = -kt$

$[A] = [A]_0 \exp(-kt)$

La constante k est mesurée en $[\text{s}^{-1}]$.

Ainsi une réaction de premier ordre est caractérisée par une dépendance linéaire de $\ln[A]$ en fonction du temps.

➤ Deuxième ordre :

$A \rightarrow \text{produits}$ (un seul réactif)

Définition de la vitesse : $V = -(d[A]/dt)$

Loi de la vitesse : $V = k[A]^2$

Loi de vitesse intégrée : $\int_{[A]_0}^{[A]} -d[A] / [A]^2 = \int_0^t k \cdot dt$ d'où $1/[A] = 1/[A]_0 + kt$

La constante est mesurée en $[\text{mol}^{-1}.\text{l.s}^{-1}]$ ou $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Une réaction de deuxième ordre est caractérisée par une dépendance linéaire de $1/[A]$ en fonction du temps.

I.5.2. Détermination de l'ordre d'une réaction

I.5.2.1.Méthode intégrale pour un seul réactif

Si $[A] = f(t)$ ou $\ln[A] = f(t)$ ou $1/[A] = f(t)$ est une droite, alors l'ordre global de la réaction est respectivement 0, 1 ou 2.

I.5.2.2.Méthode du temps de demi réaction pour un réactif

si $t_{1/2}$ proportionnel à $[A]_0$	ordre = 0 et $t_{1/2} = [A]_0/(2k)$
si $t_{1/2}$ est indépendant de la concentration	ordre = 1 et $t_{1/2} = \ln 2/k$
si $t_{1/2}$ est inversement proportionnel à $[A]_0$	ordre = 2 et $t_{1/2} = 1/(k.[A]_0)$

I-6. Cellule électrochimique

D'après la loi d'Ohm ($E = R \times i$), les variations de courant affectent le potentiel. Ainsi, les techniques pour lesquelles il y a une variation de courant nécessitent une configuration à trois électrodes. Les trois électrodes sont l'électrode de travail, l'électrode de référence et la contre-électrode (ou électrode auxiliaire).

Le potentiel est fixé entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Le courant issu de la réaction électrochimique est quant à lui mesuré entre l'électrode de travail et la contre-électrode.

L'électrode de travail est l'électrode où les analytes réagissent et la demi-réaction d'intérêt se produit. Le transfert d'électron dû à la réaction se déroule à la surface de l'électrode de travail.

L'électrode de référence dont le potentiel est constant et connu, permet ainsi de contrôler le potentiel à l'électrode de travail.

La seconde demi-réaction se produit à la contre-électrode et le courant issu de la réaction globale est mesuré entre l'électrode de travail et la contre-électrode. La réaction qui se produit à la contre-électrode ne doit pas être déterminante, elle ne doit pas régir le courant global. Ainsi, la contre-électrode doit avoir une grande surface (de sorte que le

courant ne soit pas limité par sa surface) et elle doit être suffisamment éloignée de l'électrode de travail pour que la réaction à la contre-électrode n'interfère pas avec la réaction se produisant à l'électrode de travail. Habituellement, un fil de platine est utilisé en tant que contre-électrode.

Le potentiostat permet de réguler la tension entre l'électrode de travail et la contre-électrode de manière à maintenir constante la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.

I-7. Electrode à pâte de carbone modifiée

I.7.1.Noir de carbone

Le carbone est un matériau non métallique existant sous les formes cristallines (graphite, diamant) ou amorphes (charbon, noir de carbone). Les propriétés physiques du carbone varient considérablement avec sa forme allotropique. Par exemple, le diamant, l'un des matériaux les plus durs, est transparent, et caractérisé par une très forte conductivité thermique et une très faible conductivité électrique. A l'inverse, le graphite est opaque et est très bon conducteur électrique ^[4]. Chimiquement, le carbone peut se trouver sous forme inorganique, comme dans les calcaires ^[5], mais il est surtout l'élément de base de près de dix millions de composés organiques ^[6]. En effet, étant tétravalent, il peut se lier à d'autres atomes via trois types de liaisons différentes selon l'hybridation des orbitales atomiques ^[4]. Le type de liaison entre les atomes permet d'expliquer un certain nombre de propriétés physico-chimiques des matériaux. Ainsi la double liaison (hybridation sp^2), par la délocalisation des électrons π , est responsable de la couleur noire et surtout de la conductivité électrique du graphène ^[7,8], une propriété particulièrement recherchée dans les matériaux nanocomposites. Parmi les formes allotropiques amorphes du carbone, on trouve le noir de carbone. Il s'agit d'un terme générique désignant la substance granuleuse réalisée à partir de la combustion d'hydrocarbures (huiles aromatiques) ou leur décomposition (acétylène) ^[9]. Celles-ci produisent une fumée noire contenant de très fines particules de carbone pouvant être séparées des gaz de combustion pour former une poudre légère et noire (Figure I-10). Le noir de carbone est l'un des produits chimiques les plus stables et est utilisé principalement pour le renforcement du caoutchouc. C'est l'industrie du pneu qui consomme 70% des 10 millions de tonnes de noir de carbone produites par an ^[10].

La structure amorphe du noir de carbone, dépendant de la manière dont le matériau est synthétisé, permet la coexistence des formes sp^1 , sp^2 et sp^3 (Figure I-3) mais peut également contenir quelques impuretés ^[9,11]. La forme sp^2 , la plus stable d'un point de vue thermodynamique (à température ambiante), représente ainsi 80% des liaisons présentes dans le noir de carbone, ce qui le rend électriquement conducteur. C'est pourquoi le noir de carbone est largement utilisé comme charge conductrice pour polymères nanocomposites ^[12].

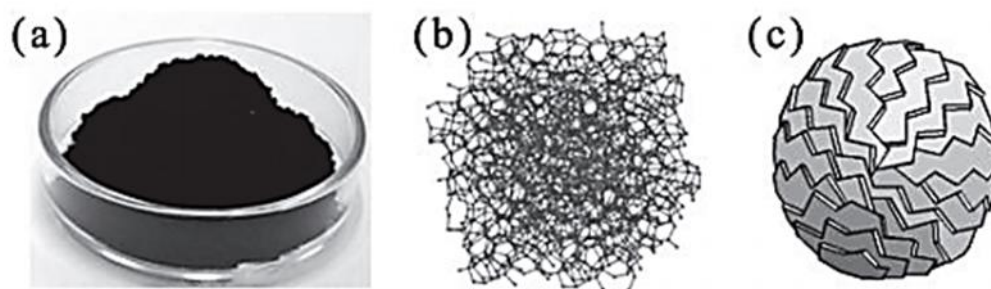


Figure I-3 : Aspect (a), structure chimique (b) et représentation schématique d'une particule (c) de noir de carbone.

Le noir de carbone est composé de particules nanométriques (10-50nm) formées d'un ensemble de couches de graphène (plan graphitique) désordonnées ^[4]. Ceci confère aux particules une conductivité électrique particulièrement élevée en dépit de la présence de discontinuités (dus à des atomes de carbone sp^3). Les particules s'assemblant très rapidement en grappes pendant la synthèse, certaines couches de graphène sont étendues sur plusieurs particules adjacentes et assurent ainsi une conductivité élevée entre les particules d'un même ensemble. On parle alors d'agrégats mesurant typiquement de 100 à 500 nm ^[13]. Le noir de carbone utilisé ici pour la préparation du cPDMS est le Vulcain® XC-72R produit par Cabot Corporation. Il est largement utilisé pour le dopage de matériaux polymères ^[12,14]. L'examen (Figure I-4) du Vulcain® XC-72R au microscope électronique à balayage (MEB) révèle une composition en particules de taille comprise entre 20 nm et 60 nm et d'agrégats supérieurs à 100 nm ^[13].

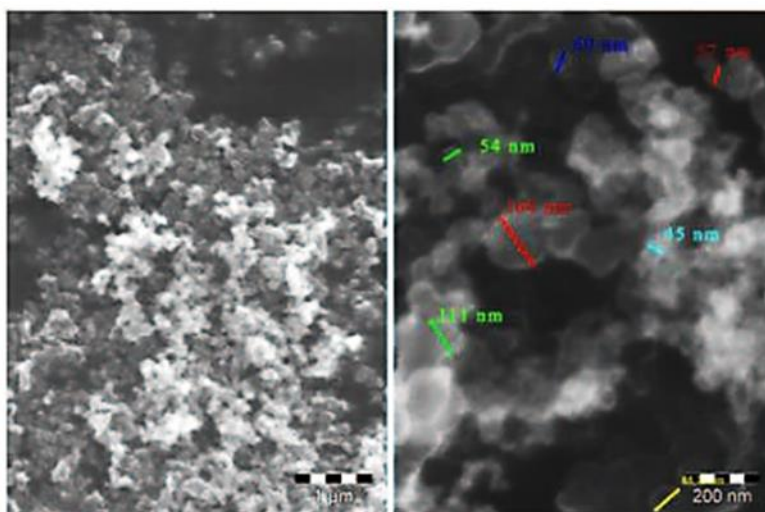


Figure I-4 : Observations MEB du noir de carbone (Vulcain XC72) mettant en évidence les dimensions des particules de noir de carbone ainsi que la formation d'agrégats.

I-8. Capteurs électrochimiques

Au cours des dernières décennies, les progrès considérables des techniques mises en jeu dans des domaines aussi variés que la médecine et la biologie clinique, l'agro-alimentaire ou le contrôle de la qualité de notre environnement (surveillance des rejets industriels ou domestiques) ont nécessité la mise au point de méthodes analytiques de plus en plus précises et sélectives. Les capteurs électrochimiques constituent sans doute l'alternative la plus séduisante pour proposer des systèmes simples, fiables, rapides et sélectifs de détection. Dans la première partie sur les capteurs électrochimiques, nous essayerons de donner un aperçu général sur les capteurs, plus particulièrement leur définition, les paramètres qui les caractérisent, ... Alors dans la deuxième partie nous présenterons les types de capteurs électrochimiques.

I.8.1. Généralités sur les capteurs

I.8.1.1. Définition

Un capteur est un organe de prélèvement d'informations (ou un dispositif électronique) qui élabore à partir d'une grandeur physique, chimique, biologique (information entrante) une autre grandeur physique de nature différente (la plus part du temps, électrique). Cette grandeur (signal exploitable), représentative de la grandeur prélevée, est utilisable à des fins de mesure ou de commande ^[15].

I.8.1.2. Constitution d'un capteur

Certains capteurs sont des capteurs dits « composites », c'est-à-dire composés de 2 parties ayant un rôle bien défini :

- **Corps d'épreuve** : C'est un élément qui réagit sélectivement aux variations de la grandeur à mesurer. Il a pour rôle de transformer cette grandeur en une autre grandeur physique dite mesurable.
- **Elément de transduction** : C'est un élément sensible lié au corps d'épreuve. Il traduit les réactions du corps d'épreuve en une grandeur physique exploitable (le plus souvent électrique constituant le signal de sortie)^[15]

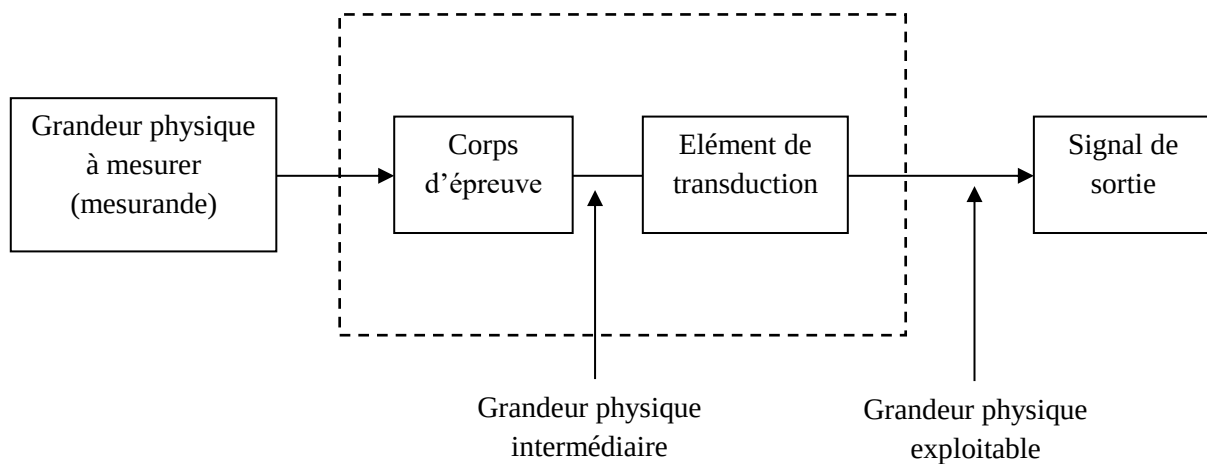


Figure I-5 : Schéma de principe d'un capteur ^[16]

I.8.1.3. Qualité d'un capteur

Les qualités d'un capteur par rapport à la nature à mesurer et aux conditions de mesure sont appréciées en déterminant leur résolution, leur fidélité, leur sensibilité et leur sélectivité. (Figure I-6)

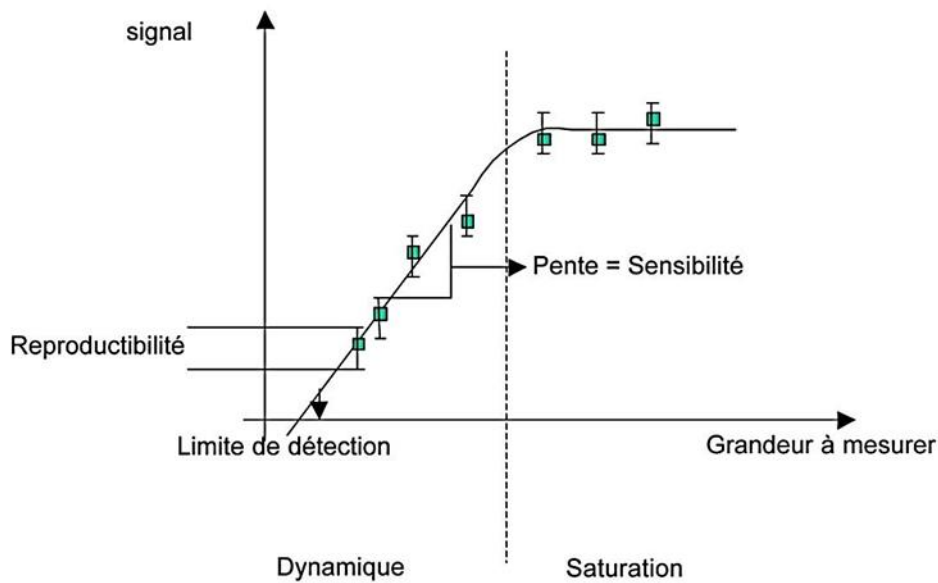


Figure I-6 : Schéma idéal de la réponse d'un capteur

Les termes sont définis dans le paragraphe suivant ^[17].

➤ **Résolution :**

Plus petit incrément de la valeur mesurée qui puisse être significativement mesuré par le capteur.

➤ **Reproductibilité :**

Ce paramètre est probablement le plus important, tant pour les capteurs physiques que chimiques. C'est l'aptitude d'un capteur à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines lors de l'application répétée d'un même signal d'entrée.

➤ **Sensibilité :**

Ce paramètre caractérise l'aptitude du capteur à détecter la plus petite variation de la grandeur à mesurer. Il est calculé par le quotient de l'accroissement de la réponse d'un instrument de mesure par l'accroissement correspondant du signal d'entrée.

➤ **Sélectivité :**

C'est la capacité du capteur à ne mesurer qu'une seule grandeur dans le milieu où il est utilisé ou en d'autres termes, d'être le plus insensible aux grandeurs d'influence, grandeurs qui ne font pas l'objet de la mesure, mais influent sur la sortie du capteur.

➤ **Limite de détection :**

C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, et qui sort significativement du bruit de fond.

➤ **Réponse du capteur ou dynamique :**

C'est la zone qui représente le domaine de réponse du capteur avant saturation.

I.8.1.4. Grandeurs d'influence

Les grandeurs d'influence sont des grandeurs étrangères qui, selon leur nature et leur importance, peuvent provoquer des perturbations sur le capteur. C'est donc une cause d'erreurs agissant sur le signal de sortie. Les principales grandeurs d'influence sont :

- la température qui modifie les caractéristiques électriques, mécaniques et dimensionnelles des composants du capteur ;
- La pression, l'accélération et les vibrations susceptibles de créer dans certains éléments constitutifs du capteur des déformations et des contraintes qui altèrent la réponse ;
- L'humidité à laquelle certaines propriétés électriques comme la constante diélectrique ou la résistivité peuvent être sensibles et qui risque de dégrader l'isolation électrique entre composants du capteur ou entre le capteur et son environnement ;
- Les champs magnétiques variables ou statiques ; les premiers créent des f.é.m. d'induction qui se superposent au signal utile, les seconds peuvent modifier une propriété électrique ;
- La tension d'alimentation. ^[18]

I.8.1.5. Classification des capteurs

La classification se fait à partir :

- du mesurande qu'ils traduisent (capteur de température, de pression, ...) ;
- de leur rôle dans un processus industriel (contrôle de produits finis, de sécurité,...) ;
- du signal qu'ils fournissent (capteur analogique, capteur logique, capteurs digitaux) ;
- de leur principe de traduction du mesurande (capteur résistif, à effet Hall,...) ;
- de leur principe de fonctionnement : Les capteurs fonctionnent selon deux principes de base suivant l'origine du signal électrique de sortie. On distingue

- ✓ *Capteur actif* : Dans ce cas, la sortie du capteur est équivalente à un générateur. C'est un dipôle actif qui peut être du type courant, tension ou charge. Les principes physiques mis en jeu sont présentés ci-dessous.

Tableau I-1 : Principes physiques d'un capteur actif

Mesurande	Grandeur de sortie
Température	Tension
Flux optique	Courant
Force, pression, accélération	Charge
Position	Tension
Vitesse	Tension

- ✓ *Capteur passif* : Il s'agit d'impédance dont l'un des paramètres déterminants est sensible à la mesurande ^[19]. Le capteur se comporte en sortie comme un dipôle passif qui peut être résistif, capacitif ou inductif. Le tableau ci-dessous résume en fonction de la caractéristique électrique de la grandeur de sortie.

Tableau I-2 : Caractéristique électrique de la grandeur de sortie

Mesurande	Grandeur de sortie	Matériaux
Température	Résistivité	Platine, nickel, cuivre, semi-conducteur
Très basse température	Constante diélectrique	Verre
Flux optique	Résistivité	Semi-conducteur
Déformation	Résistivité	Alliage nickel
	Perméabilité magnétique	Alliage ferromagnétiques
Position	Résistivité	Magnétorésistances
Humidité	Résistivité	Chlorure de lithium

I.8.2.Exemples de capteurs électrochimiques pour la détection des bactéries

Il y a un besoin pressant de développer des méthodes rapides pour la détection et l'identification microbiennes pour les spécimens des patients. Actuellement, il s'écoule 48 à 72 h entre la collection de spécimen et la livraison du rapport de microbiologie. Ce retard encourage des médecins à choisir la thérapie antibiotique "empiriquement" basée sur la nature de l'infection et des données des antibiotiques mais sans informations directes sur le microbe

pathogène réel causant l'infection du patient. Le développement de la technologie pour les systèmes bactériens rapides, précis, et rentables de détection révolutionnerait le diagnostic, la prévention, et le traitement des maladies infectieuses. Pour certains scénarios cliniques, tels que le diagnostic de l'infection d'appareil urinaire, les biodétecteurs qui détectent directement des cibles d'acide nucléique auraient des avantages distincts.

Halford et al. ont décrit une méthode de dosage de capteur électrochimique pour la détection et l'identification rapide de bactéries ^[20]. L'essai comporte une matrice de capteurs fonctionnalisés avec de l'ADN d'oligonucléotides, sondes de capture pour des séquences spécifiques d'espèces d'ARN ribosomique (ARNr).

Cette méthode est basée sur hybridation sandwich de capture et de détection des sondes avec cible ARN ribosomal (ARNr). La sonde de capture est fixée à la surface du capteur, tandis que la sonde de détection est liée à horseradish peroxydase (HRP). Quand un substrat tel que le 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) est ajouté à une électrode avec des complexes de capture-cible-détecteur lié à sa surface, le substrat est oxydée par le HRP et réduit par l'électrode de travail. Ce cycle redox conduit au mouvement d'électrons du substrat de l'électrode à la HRP, produisant le flux de courant dans l'électrode.

L'abondance de l'ARNr dans les cellules bactériennes prévoit une limite de sensibilité aussi basse que 250 bactéries par millilitre, sans la nécessité d'amplification de la cible ^[21]. L'ARNr bactérien contient des séquences spécifiques d'espèces uniques qui sont accessibles à l'hybridation avec des sondes d'ADN. En conséquence, un ensemble de capteurs électrochimiques peut être utilisé pour identifier des bactéries inconnues, où chaque capteur est fonctionnalisé avec une sonde de capture spécifique d'espèce différente.

Face au besoin pressant de développement et d'application des technologies pour la détection rapide des microbes pathogènes bactériens dans les spécimens cliniques, Mayank Patel et al. ont élaboré des biocapteurs électrochimiques d'ADN ^[22]. Ces biocapteurs ont la capacité de détection rapide, sensible, et sont d'ordre-spécifique des acides nucléiques. Ces chercheurs ont développé une analyse électrochimique de sonde pour l'identification des microbes pathogènes bactériens en employant les sondes spécifiques à l'espèce pour l'ARNr 16S ^[23-25]. L'amplitude du courant de la sonde est proportionnelle à la densité des complexes cible-sonde à la surface de celle-ci et à la concentration bactérienne dans le spécimen ^[25,26].

La détection bactérienne de microbe pathogène employant les biodétecteurs électrochimiques a été démontrée en utilisant une variété d'approches ^[27]. Dans chaque approche, un processus biologique d'identification est lié à un capteur d'électrode. Par exemple, les sondes de glucose utilisent des électrodes imbibées des enzymes, telles que l'oxydase de glucose, pour coupler l'oxydation du glucose à un écoulement de courant mesurable ^[28]. La simplicité et la basse alimentation électrique de tels dispositifs ont permis le marketing de fabrication et de masse des sondes de glucose de sang en tant que dispositifs compacts, peu coûteux, tenus dans la main ^[29]. En raison de leur vitesse, sensibilité, exactitude, et polyvalence, des sondes électrochimiques sont maintenant largement répandues dans des départements de secours pour mesurer des gaz de sang, des concentrations en électrolyte, et une variété d'autres caractéristiques de substrat ^[30]. Récemment, une variété d'approches ont été avec succès démontrées pour la détection électrochimique des molécules de cible d'acide nucléique ^[31,32]. Ces approches lient ADN-ADN ou les événements d'hybridation d'ADN-ARN au rendement courant au moyen des sondes d'oligonucléotide immobilisées sur une électrode. Les analyses de détection d'acide nucléique impliquant l'amplification des signaux d'hybridation par des molécules de traceur d'enzymes ont le potentiel pour la détection ultrasensible ^[33]. Chaque molécule d'enzymes capturée (c'est-à-dire, événement liant) produit des milliers de produits discernables. Le signal courant est proportionnel à la quantité de l'enzyme liée (et par conséquent à la concentration en analyte dans l'échantillon).

L'équipe de l'université de George Washington a développé et testé avec succès une nouvelle méthode permettant de détecter les bactéries dans les plaies ^[34]: un capteur ou sonde électrochimique identifie ici les molécules produites par la bactérie *Pseudomonas*, un agent nosocomial courant. Ce développement, présenté dans la revue *Wound Repair et Régénération* pourraient permettre de réduire la résistance bactérienne aux médicaments, d'accélérer la cicatrisation, d'améliorer les résultats pour les patients, bref, de permettre des économies sur les dépenses de soins croissantes liées aux plaies chroniques.

En moins d'une minute, la nouvelle méthode permet une détection bactérienne rapide, à comparer aux 24 heures habituelles nécessaires à l'incubation avant analyse. Elle est basée sur une stratégie de détection électrochimique, précisément un capteur électrochimique peu coûteux et jetable, avec pyocyanine, permettant d'identifier les molécules produites par la bactérie *Pseudomonas*, un agent infectieux courant de plaies chroniques. Dans cette étude,

cette sonde a permis d'identifier la présence de la bactérie à 71% et son absence, correctement à 57%.

Un bactériophage lytique structurellement transformée ayant un large spectre d'hôte des souches de *Staphylococcus aureus* et des perles pénicilline-liantes de latex conjuguées par anticorps spécifique de protéine (PBP) ont été utilisées pour créer un biocapteur ^[35] conçu pour la discrimination de *Staphylococcus Aureus* résistant à la méthicilline ^[36,37](SARM) et sensible à la méthicilline (SASM). Les bactériophages lytiques ont été transformés en sphéroïdes bactériophages par exposition à l'interface eau-chloroforme. Des monocouches sphéroïdes bactériophages ont été transférées sur des sondes par la technique de Langmuir-Blodgett (LB) ^[38]. Les biocapteurs créés ont été examinés par une microbalance en cristal de quartz avec un suivi de dissipation (QCM-D) pour évaluer les interactions bactéries-bactériophages.

Ainsi les biocapteurs conçus pour détecter et identifier le SARM, ont un dispositif à deux étapes. La première étape utilise la monocouche sphéroïdes bactériophages en tant que sonde de détection, tandis que la seconde étape utilise la PBP. Lorsque les signaux reçus des deux étapes sont positifs, cela indique la détection spécifique de SARM.

Les sphéroïdes bactériophages et bactériophages peuvent être employés pour le criblage et la désinfection des bactéries résistantes antibiotiques. D'autres applications peuvent inclure l'utilisation sur des biodétecteurs, la thérapie de bactériophage, et des surfaces antimicrobiennes.

II. Caractérisations électrochimiques

II.1. Voltammétrie ou voltampérométrie

Le principe général de la voltampérométrie est l'obtention d'une réponse (le courant) du système soumis à une perturbation (le potentiel) responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant une exploration par imposition et variation progressive du potentiel d'électrode (balayage de potentiel) ^[39].

Dans ce qui suit, afin d'analyser les caractéristiques expérimentales obtenues sur nos systèmes, nous rappellerons simplement les expressions donnant les courants en régime de diffusion pure dans les trois cas qu'il est possible de rencontrer suivant les conditions

opératoires que nous adopterons : système rapide, lent et quasi-rapide.

- Système rapide

Dans le cas d'un système rapide Ox/Red, la loi simplifiée de Nernst suffit à expliquer les différents phénomènes. Le profil de concentration est donné par l'équation et, après intégration, la densité de courant suit la loi suivante :

$$j = -nFC_{ox}^{sol} (\pi D_{ox})^{\frac{1}{2}} \left(\frac{nF}{RT} v \right)^{\frac{1}{2}} \chi(\sigma t) \quad (II-1)$$

Où $\chi(\sigma.t)$ est une fonction de E, calculée numériquement pour certaines valeurs de $(E-E_{1/2})$ et $\sigma = \frac{nF}{RT} v$ avec $E_{1/2}$ le potentiel de demi-vague telle que représentait sur la figure II-7. La densité de courant j sera exprimée en A/cm² si D est exprimé en cm²/s, v en V/s et la concentration c en mol/cm³, à 25°C.

Ainsi, lors du balayage du potentiel pour le tracé du voltampérogramme, on observe d'abord une croissance du courant lorsque la réaction électrochimique commence à se produire (ceci correspond à l'accélération du processus par accroissement du surpotentiel), puis une décroissance lorsque le ralentissement dû au phénomène de diffusion devient prépondérant.

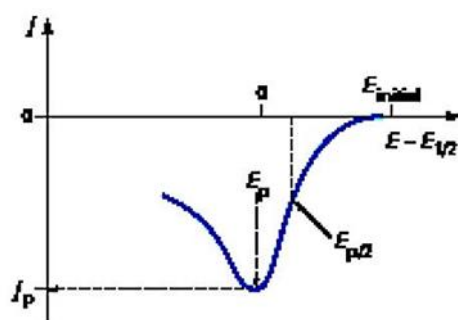


Figure I-7 : Courbe courant-potentiel théorique pour une réaction rapide $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$ en régime de diffusion pure ^[40].

- Système lent

Dans le cas d'un système lent, au lieu de la relation de Nernst, pour prendre en compte les vitesses réactionnelles à la surface des électrodes, on utilise la relation de Butler-Vohner et si le système est vraiment lent, on peut prendre l'approximation de Tafel. Après intégration nous obtenons l'équation suivante ^[41-43] :

$$j = -nFC_{ox}^{sol}(\pi D_{ox})^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\alpha nF}{RT} v \right)^{\frac{1}{2}} \chi \left(\frac{\alpha nF}{RT} \sigma t \right) \quad (II.2)$$

- Système quasi-rapide

Dans le cas d'un système quasi-rapide, il est nécessaire de prendre en compte la relation inverse et donc de prendre en compte la relation de Butler-Volmer complète. Les développements théoriques ont été développés par plusieurs auteurs ^[43, 44]. Rappelons que le courant est donné par la relation :

$$j = -nFC_{ox}^{sol} D_{ox}^{\frac{1}{2}} \left(\frac{nF}{RT} v \right)^{\frac{1}{2}} \psi(E) \quad (II.3)$$

Où ψ est une fonction tabulée pour différentes valeurs de $(E - E_{1/2})$.

A partir de ces expressions, on constate que, suivant la vitesse de balayage que l'on adopte pour appliquer les potentiels, on se trouve dans un système ou dans un autre. Il sera donc important dans le tracé des voltampérogrammes expérimentaux de bien appréhender ce paramètre de vitesse.

II.2. Voltammétrie à balayage linéaire

La voltammétrie ou voltampérométrie est un ensemble de techniques pour lesquelles le potentiel est contrôlé et le courant est mesuré. Lors d'une voltammétrie à balayage linéaire, le courant est mesuré pendant que le potentiel appliqué est varié à vitesse constante. La vitesse à laquelle le potentiel change est appelée vitesse de balayage (v). La courbe de la variation du courant en fonction du potentiel est appelée voltammogramme. Les voltammogrammes sont tracés avec des valeurs positives de potentiel sur la droite de l'axe des abscisses. Les courants sont quant à eux représentés graphiquement sur l'axe des ordonnées avec des valeurs positives pour les courants dus à l'oxydation et des valeurs négatives pour les courants dus à la réduction. Le balayage est initialisé à un potentiel auquel il n'y a aucune réaction (potentiel de circuit ouvert). Ce potentiel de circuit ouvert peut être mesuré grâce au potentiostat utilisé lors de nos mesures.

La voltammétrie à balayage linéaire est utilisée pour mesurer le courant de pic i_p (le courant maximum), le potentiel de pic E_p correspondant au potentiel du courant de pic et le potentiel de demi-pic $E_{1/2}$ qui est le potentiel auquel le courant est égal à la moitié du courant

de pic. Le potentiel de pic est caractéristique de la réaction d'oxydoréduction et du système étudié. La valeur du courant de pic dépend de plusieurs facteurs, y compris la concentration de l'analyte, la cinétique de transfert d'électrons et le transport de masse de l'analyte. Dans un système où la diffusion est le seul mode de transport de masse (diffusion contrôlée) et la cinétique de transfert d'électrons est rapide (réaction réversible), l'équation de Randles-Sevcik permet de calculer le courant de pic :

$$i_p = 0,4463 \times nFAC^* \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{II. 4})$$

- où :
- i_p : le courant de pic (A)
 - n : le nombre d'électrons transférés lors de la réaction (sans unité)
 - F : la constante de Faraday ($9,65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)
 - A : la surface de l'électrode (cm^2)
 - C^* : la concentration de l'analyte dans la solution (mol cm^{-3})
 - v : la vitesse de balayage (V s^{-1})
 - D : le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
 - R : la constante des gaz parfaits ($8,31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
 - T : la température (K)

Et si la solution est à température ambiante (25°C) alors la relation peut s'écrire :

$$i_p = 2,69 \times 10^5 \times n^{3/2} AD^{1/2} v^{1/2} C^* \quad (\text{II. 5})$$

Notons que le courant est dépendant de la concentration de l'analyte au sein de la solution et non de la concentration à la surface de l'électrode ce qui permet de pouvoir utiliser le courant de pic pour des mesures quantitatives de l'analyte en solution.

II.2.1.. Cyclovoltammétrie

La Voltammétrie cyclique est la technique la plus utilisée pour acquérir des informations qualitatives sur les réactions électrochimiques. Cela revient à sa capacité de fournir rapidement des informations considérables sur les processus redox, la cinétique de réactions de transfert d'électrons hétérogènes, la réversibilité du système électrochimique étudié et sur les réactions chimiques couplées ou encore des procédés d'adsorption. La voltammétrie cyclique est souvent la première expérience réalisée dans

l'étude électroanalytique. En particulier, elle offre une localisation rapide des potentiels redox des espèces électroactives, et l'évaluation convenable de l'effet des milieux sur le processus d'oxydo-réduction. ^[45]

Son principe est basé sur la mesure du courant d'électrolyse traversant l'électrode de travail à laquelle est appliqué un balayage de potentiel, de forme triangulaire (Figure 8), dont la valeur varie linéairement au cours du temps entre une borne inférieure et une borne supérieure (équation II.6).

$$E = E_i \pm rt \quad (\text{II.6})$$

E_i est le potentiel initial (V), le plus souvent égal au potentiel à courant nul, r est la vitesse de balayage des potentiels (V.s^{-1}), maintenue constante au cours du tracé d'une courbe, et t le temps d'électrolyse (s).

L'allure des courbes intensité-potentiel obtenues permet de distinguer les différents systèmes redox selon qu'ils sont réversibles, quasi-réversibles ou irréversibles. ^[45-47]

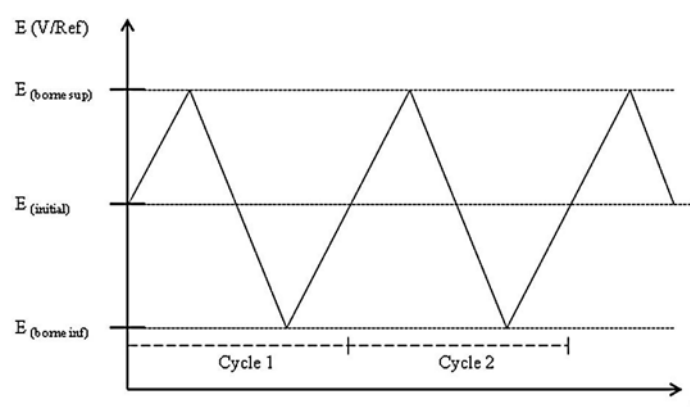
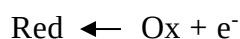
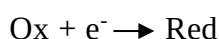


Figure I-8 : Rampe de potentiel en voltammétrie cyclique

- **Système réversible**

Considérons une solution électrolytique contenant une espèce réduite, pouvant être oxydée à l'électrode lors d'une réaction électrochimique échangeant n électrons. Un système est dit réversible (ou Nernstien) lorsque l'espèce oxydée formée peut subir consécutivement la réaction inverse de réduction.



Ce cas est possible lorsque la cinétique de transfert de charge est très rapide. Le rapport des concentrations des formes oxydée et réduite vérifie alors la loi de Nernst (équation II.7). L'allure du voltammogramme cyclique obtenu est présentée sur la Figure 9.

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}^*}{C_{red}^*} \quad (II.7)$$

avec

E^o le potentiel standard du couple redox considéré (V) F est la constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹),

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

T la température (K),

n le nombre d'électrons échangés,

C_{ox}^* et C_{red}^* la concentration de l'espèce oxydée et réduite en solution (mol.cm⁻³).

Les activités chimiques sont assimilées aux concentrations en espèces oxydées et réduites : $a_{ox} = C_{ox}^*$ et $a_{red} = C_{red}^*$

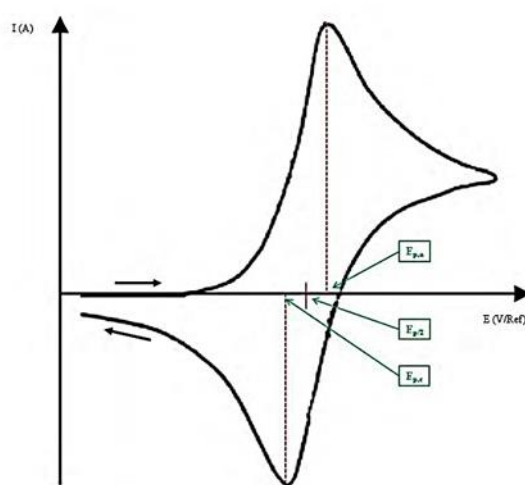


Figure I-9 : Voltammogramme cyclique d'un système réversible, $E_{p,a}$ et $E_{p,c}$ sont les potentiels de pics anodique et cathodique respectivement et $E_{p/2}$ le potentiel de demi-vague [48].

Dans le cas d'une espèce en solution, la valeur du courant de pic i_p (A) est donnée par la relation (équation II.8).

$$i_p = 0,4463 \left(\frac{P^3}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} S n^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} C^* r^{\frac{1}{2}} \quad (II.8)$$

soit à 25°C (équation II.9) :

$$i_p = (2,69.10^5) S n^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} C^* r^{\frac{1}{2}} \quad (\text{II.9})$$

où S la surface de l'électrode (cm^2), D le coefficient de diffusion de l'espèce ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) et C^* la concentration de l'espèce en solution (mol.cm^{-3}).

L'équation II.9 est connue sous le nom d'équation de Randles-Sevcik [49,50]. Elle permet notamment de déterminer le coefficient de diffusion D de l'espèce électroactive en faisant varier la vitesse de balayage pour une même concentration en espèce redox.

Dans le cas où l'espèce est adsorbée à la surface de l'électrode, l'intensité du courant de pic est donnée par la relation (équation II.10) :

$$i_p = \frac{n^2 P^2}{4RT} r S^* \quad (\text{II. 10})$$

Avec S^* la concentration surfacique de l'espèce (mol.cm^{-2})

L'examen de la variation de i_p en fonction de la vitesse de balayage des potentiel r permet alors de préciser si la vitesse de la réaction est limitée par la diffusion de l'espèce en solution (i_p proportionnel à $r^{1/2}$) ou par la quantité d'espèce adsorbée (i_p proportionnel à r).

Le potentiel de pic observé pour une réaction électrochimique est indépendant de la vitesse de balayage, que l'espèce soit en solution (équation II.11) ou adsorbée à l'électrode (équation II.12):

$$E_p = E_{p/2} + 1,109 \frac{RT}{nF} \quad (\text{II.11})$$

$$E_p = E^o + \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \left(\frac{b_o}{b_r} \right) \quad (\text{II.12})$$

avec $b_j = \beta_j S_{j,s} (\text{mol.cm}^{-2})$, β_j étant le paramètre d'équilibre dans un isotherme d'adsorption pour l'espèce j (sans unité) et $S_{j,s}$ la concentration surfacique à saturation (mol.cm^{-2}).

- **Système irréversible**

Un système est dit irréversible lorsque le produit formé à l'électrode lors du balayage des potentiels ne peut être consommé via la réaction électrochimique inverse. Un exemple d'une réaction d'oxydation irréversible est représenté par le voltammogramme cyclique de la Figure I-10.

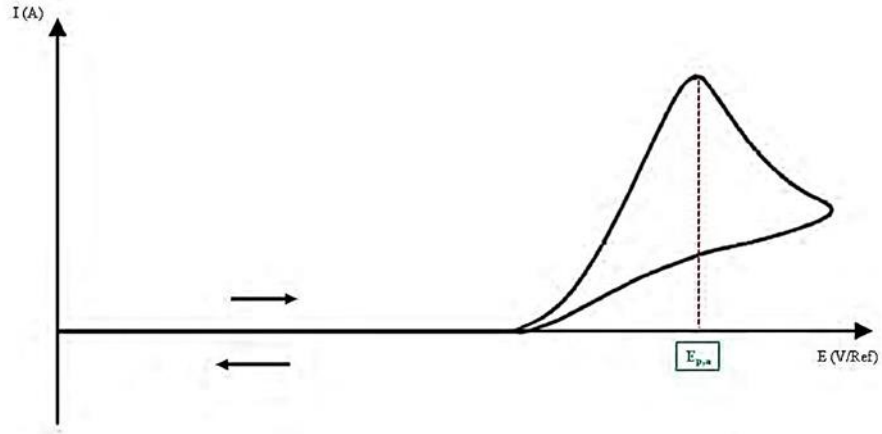


Figure I-10 : Voltammogramme cyclique d'une réaction d'oxydation irréversible ^[48].

Le transfert électronique hétérogène est lent et le rapport des concentrations des formes oxydée et réduite ne respecte plus la loi de Nernst. Dans le cas d'une espèce en solution, l'intensité de pic s'écrit (équation II.13)

$$i_p = 0,4958F \left(\frac{nF}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} n^{\frac{3}{2}} S D^{\frac{1}{2}} C^* r^{\frac{1}{2}} \quad (\text{II.13})$$

soit, à 25°C (équation II.14) :

$$i_p = (2,99 \cdot 10^5) \alpha^{1/2} n^{\frac{3}{2}} S D^{\frac{1}{2}} C^* r^{\frac{1}{2}} \quad (\text{II.14})$$

avec α le coefficient de transfert anodique.

Le potentiel de pic observé ($E_{p,a}$) est fonction de la vitesse de balayage des potentiels, selon la relation de Nicholson et Shain (équation II.15) :

$$E_p = E^o - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,78 + \ln \left(\frac{D^{\frac{1}{2}}}{k^o} \right) + \ln \left(\frac{\alpha n F r}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (\text{II.15})$$

Avec k la constante de vitesse hétérogène standard (cm.s^{-1})

L'adsorption de l'espèce électro-active à la surface de l'électrode induit une autre expression de l'intensité du courant de pic (équation II.16) :

$$i_p = \frac{\alpha n F^2 r S^*}{2,718 RT} \quad (\text{II.16})$$

Le potentiel de pic observé varie dans ce cas avec la vitesse de balayage des potentiels

selon la relation (II.17) :

$$E_p = E^o + \frac{RT}{\alpha n F} \ln \left(\frac{RT}{\alpha n F} \frac{k^o}{r} \right) \quad (\text{II. 17})$$

- **Système quasi-réversible**

En 1955 Matsuda et Ayabe ont introduit le terme de système « quasi-réversible » ^[51]. Leurs recherches ont montré que malgré un coefficient de transfert électronique faible, la réaction inverse doit être considérée. L'allure du voltammogramme cyclique résultant est présentée sur la Figure I.11.

Les équations relatives à ce système sont beaucoup plus complexes que celles associées aux deux précédents systèmes. La forme du pic dépend de la vitesse de transfert électronique et d'un paramètre adimensionnel Λ (équation II. 18).

$$\Lambda = \frac{k^o}{\left(D_{ox}^{(1-\alpha)} - D_{red}^{\alpha} \frac{F}{RT} r \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{II. 18})$$

avec D_{ox} et D_{red} les coefficients de diffusion respectivement de l'oxydant et du réducteur ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$).

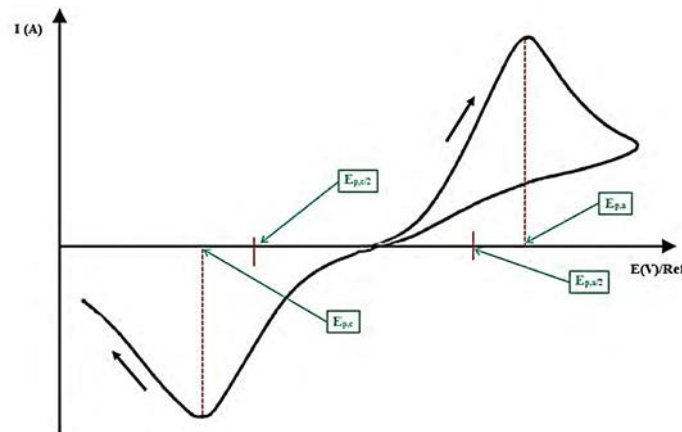


Figure I.11 : Voltammogramme cyclique d'un système quasi-réversible, $E_{p,a/2}$ et $E_{p,c/2}$ sont les potentiels de demi-vague respectivement anodique et cathodique ^[48].

Dans le cas où Λ est supérieur à 15, le système électrochimique s'apparente à un système rapide et les équations correspondantes (équations II.7 à II.11) sont applicables.

Lorsque Λ est inférieur $10^{-2(1+\alpha)}$, le transfert électronique hétérogène constitue l'étape

limitant la vitesse de la réaction ; le système est alors assimilable à un système irréversible (équations II.12 à II.16). Enfin, le système quasi-réversible correspond à des valeurs de Λ intermédiaires, pour lequel le transfert de charge et le transport en solution ont des cinétiques de même ordre.

II.2.2. Voltammétrie à vague carrée

La voltammétrie à vague carrée (ou SWV pour l'anglais square wave voltammetry) utilise des impulsions rectangulaires de potentiel d'amplitude constante et de durée égale à la moitié de la période de la « vague ». La hauteur de l'impulsion de la vague ou amplitude est notée A . La hauteur du pas de potentiel qui correspond à la différence de hauteur entre deux impulsions consécutives s'écrit $3E$. Le courant est mesuré à la fin de l'impulsion (I_1) et avant l'impulsion suivante (I_2). Sur la figure 12, nous pouvons voir comment varie le potentiel en fonction du temps lors d'une voltammétrie à vague carrée. De manière générale, la différence $\Delta I = I_1 - I_2$ est tracée en fonction de $E + A/2$, où E est le potentiel du début de la vague [52, 53].

Un exemple est représenté sur la figure I-13.

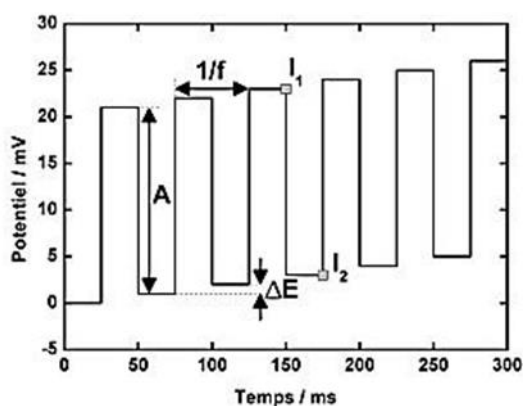


Figure I-12 : Variation du potentiel au cours du temps lors d'une voltammétrie à vague carrée

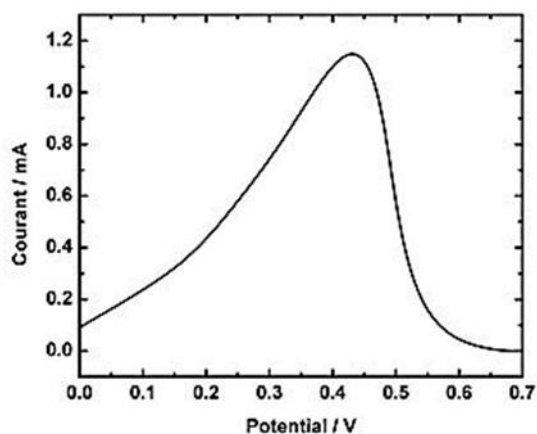


Figure I-13 : Réponse en courant en fonction du potentiel lors d'une voltammétrie à vague carrée

Il est possible de faire varier plusieurs paramètres pour une mesure de voltammétrie à vague carrée. Tout d'abord, il faut fixer les potentiels de bornes comme pour la cyclovoltammétrie. Ensuite, il faut optimiser les paramètres de vague, l'amplitude A , le pas de potentiel ΔE et la fréquence de la vague f . L'exemple de réponse en courant de la figure 13 a été réalisé avec une électrode de papier carbone recouvert de nanotubes de

carbone et d'un dépôt d'or par ablation laser (dépôt de 10000 tirs sous vide). Les paramètres d'échantillonnage lors de la voltammétrie à vague carrée sont une amplitude de 20 mV, un pas de potentiel de 1 mV et une fréquence de 20 Hz.

Pour la voltammétrie à vague carrée, c'est la différence entre I_1 et I_2 qui est tracée en fonction du potentiel afin de s'affranchir du courant capacitif dû à la double couche électrode-solution. De plus, la voltammétrie à vague carrée est une technique électrochimique qui peut être utilisée dans le cas où des espèces chimiques possèdent des potentiels d'oxydation proches. Les pics d'oxydation peuvent être séparés et il est alors possible de mesurer les concentrations de chaque espèce. Cette méthode possède donc l'avantage de séparer les pics d'oxydation et d'être relativement rapide par rapport à la cyclo-voltammétrie classique mais il peut être assez long et difficile d'optimiser les paramètres de mesure pour obtenir un bon signal.

Conclusion

Cette étude bibliographique a permis de comprendre les principes de fonctionnement à la surface des électrodes.

La maîtrise de ces différentes méthodes développées dans cette partie est un préalable pour la compréhension des phénomènes chimiques et électrochimiques que nous observerons à l'interface électrode/solution.

Dans les chapitres suivants, nous aborderons les méthodes et techniques utilisées dans ce travail en vue de l'étude des capteurs électrochimiques élaborés.

Références

- [1] B. Trémillons « Electrochimie analytique et réaction en solution » Masson, Tome 2, 1993
- [2] F. Bedioui « Voltampérométrie, théorie et mise en œuvre expérimentale » Technique de l'ingénieur, réf p 2126 (1999)
- [3] F. Bedioui, S Griveau. «Voltampérométrie, phénomènes couplés au transfert électronique » Technique de l'ingénieur, réf P :2127 (2008)/
- [4] H. Pierson, Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes. 1994.
- [5] G. L. Miessler and D. A. Tarr. Inorganic Chemistry (3rd Edition). Prentice Hall, 2003, p.720.
- [6] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, Organic Chemistry. OUP Oxford, 2001.
- [7] R. L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry.," Chemical reviews, vol. 108, no. 7, pp. 2646-87, Jul. 2008.
- [8] S. Stankovich et al., "Graphene-based composite materials.," Nature, vol. 442, no. 7100, pp. 282-6, Jul. 2006.
- [9] "Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc," in International Agency for research on Cancer, 2010.
- [10] E. L. Crump, "Economic Impact Analysis For the Proposed Carbon Black Manufacturing NESHAP Prepared by:" U.S. Environmental Protection Agency, no. May, 2000.
- [11] D. Pantea, "Electrical conductivity of thermal carbon blacks Influence of surface chemistry," *Carbon*, **2001**, 39, 1147-1158.
- [12] J.-C. Huang, "Carbon black filled conducting polymers and polymer blends," *Advances in Polymer Technology*, **2002**, 21, 299-313.
- [13] J. Liang and Q. Yang, "Aggregate structure and percolation behavior in polymer/carbon black conductive composites," *Journal of Applied Physics*, vol. 102, no. 8, p. 083508, Oct. 2007.
- [14] G. Y. Yu, W. X. Chen, Y. F. Zheng, J. Zhao, X. Li, and Z. D. Xu, "Synthesis of Ru/carbon nanocomposites by polyol process for electrochemical supercapacitor electrodes," *Materials Letters*, vol. 60, no. 20, pp. 2453-2456, 2006.
- [15] S. Poujouly IUT CACHAN/Module 2-Capteurs : Capteurs-présentation
- [16] S. Helali, Conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impédancemétriques, thèses de doctorat de L'école Centrale de Lyon, N° d'ordre : 2005-49.
- [17] P. Fabry, J. Fouletier; Microcapteur chimiques et biologiques, application en milieu liquide; Lavoisier. 2003
- [18] G. Hasch, Les capteurs en instrumentation industrielle
- [19] G. Toulminet, Généralités sur la chaîne d'acquisition des données et sur les capteurs (chapitre 1), 2002-2003
- [20] C. Halford, V. Gau, B. Churchill, M., Haake. Bacterial Detection & Identification Using Electrochemical Sensors. *J. Vis. Exp.* (74), e4282, doi:10.3791/4282 (2013).

- [21] J. Wu, S. Campuzano, C. Halford, D. A. Haake, J. Wang. Ternary Surface Monolayers for Ultrasensitive (Zeptomole) Amperometric Detection of Nucleic Acid Hybridization without Signal Amplification. *Anal. Chem.* **82**, 8830-8837 (2010).
- [22] M. Patel, R. Gonzalez, C. Halford, M. A. Lewinski, E. M. Landaw, B. M. Churchill, and D. A. Haake Target-Specific Capture Enhances Sensitivity of Electrochemical Detection of Bacterial Pathogens. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec; 49(12): 4293–4296.
- [23] V. Gau et al. 2005. Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. *Methods* 37:73–83
- [24] J. C. Liao et al. Use of electrochemical DNA biosensors for rapid molecular identification of uropathogens in clinical urine specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2006**. 44:561–570
- [25] J. C. Liao et al. 2007. Development of an advanced electrochemical DNA biosensor for bacterial pathogen detection. *J. Mol. Diagn.* 9:158–168.
- [26] M. Mastali et al. 2008. Optimal probe length and target location for electrochemical detection of selected uropathogens at ambient temperature. *J. Clin. Microbiol.* 46:2707–2716.
- [27] A. K. Deisingh, and M. Thompson. 2004. Biosensors for the detection of bacteria. *Can. J. Microbiol.* 5069-77.
- [28] Wang, J. 1999. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1947-53.
- [29] J. D. Newman, and A. P. Turner. 2005. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.* 202435-2453.
- [30] K. A. Erickson, and P. Wilding. 1993. Evaluation of a novel point-of-care system, the i-STAT portable clinical analyzer. *Clin. Chem.* 39283-287.
- [31] T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton. 2003. Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.* 211192-1199.
- [32] J. Wang. 2006. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* 211887-1892.
- [33] N. J. Ronkainen-Matsuno, J. H. Thomas, H. B. Halsall, and W. R. Heineman. 2002. Electrochemical immunoassay moving into the fast lane. *Trends Anal. Chem.* 21213-225.
- [34] H.J. Sismaet, A. Banerjee, S. McNish, Y. Choi, M. Torralba, S. Lucas, A. Chan, V.K. Shanmugam, E.D. Goluch. Electrochemical detection of Pseudomonas in wound exudate samples from patients with chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2016 Jan 27. doi: 10.1111/wrr.12414.
- [35] Guntupalli, R., Sorokulova, I., Olsen, E., Globa, L., Pustovyy, O., Vodyanoy, V. Biosensor for Detection of Antibiotic Resistant Staphylococcus Bacteria. *J. Vis. Exp.* (75), e50474, doi:10.3791/50474 (2013).
- [36] Guntupalli, R., Sorokulova, I., Krumnow, A., Pustovyy, O., Olsen, E., Vodyanoy, V. Real-time optical detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using lytic phage probes. *Biosens. Bioelectron.* 24, 151-154 (2008).

- [37] Guntupalli, R., Sorokulova, I., et al. Detection and identification of methicillin resistant and sensitive strains of *Staphylococcus aureus* using tandem measurements. *J. Microbiol. Methods.* 90, 182-191 (2012).
- [38] Guntupalli, R., Sorokulova, I., Long, R., Olsen, E., Neely, W., Vodyanoy, V. Phage Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces.* 82, 182-189 (2011).
- [39] F. Bedioui (1999), Voltampérométrie sur électrode solide. Introduction, *Technique de l'ingénieur.*
- [40] F. Bedioui « Voltampérométrie. Théorie et mise en œuvre expérimentale, technique de l'ingénieur, réf : P2126, 2008
- [41] A. Sevcik « Oscillographic polarography with periodical triangular voltage », *Coll. Czech. Chem. Com* 13, 1948, Pages 349
- [42] R.S. Nicholson, I. Shain « Theory of stationary electrode polarography », *Anal. Chem.* 36, 1964, Page 706
- [43] W.H. Reinmuth «Nerst-controlled currents in hanging-drop polarography », *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1957, Page 494
- [44] H. Matsuda, Y. Ayabe « Zur theorie der Randles-Sevcikschen Kathodenstrahl-polarographie », *Zeit Elektrochem.* 59 1955. Pages 494
- [45] G. A. Mabbott, An introduction to Cyclic voltammetry. *J Chem. Educ.* 60, (1983), 697.
- [46] P. T. Kissinger and W. R. Heineman, Cyclic voltammetry. *J Chem. Educ.* 60, (1983), 702.
- [47] D. H. Evans, K. M. O'Connell, R. A. Petersen and M. J. Kelly. Cyclic voltammetry. *J Chem. Educ.*, 60 (1983) 290.
- [48] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.*, Masson, (1982).
- [49] J. E. B. Randles, Cathode-ray polarograph. II. Current-voltage curves., *Trans. Faraday Soc.* 44, (1948), 327.
- [50] A. Sevcik, Oscillographic polarography with periodical triangular voltage. *Collect. Czech.Chem. Commun.*, 13 (1948) 349.
- [51] H. Matsuda and Y. Ayabe, The theory of the cathode-ray polarography of Randles-Sevcik, *Z. Elektrochem.*, 59 (1955) 494.
- [52] T. Otake, M. Tabuchi, T. Sato, H. Susaki, T. Korenaga (2001), *Analytical Sciences*, 17: 535.
- [53] P.T. Kissinger, W. R. Heinemann (1984), *Laboratory techniques in electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York.

CHAPITRE II : Suivi Par Des Capteurs
Electrochimiques De La Biodegradation Du Para-
Aminophenol Par Un Champignon Filamenteux,
Scedosporium Dehoogii

Introduction

Cette partie relate les travaux menés aux laboratoires GEPEA/GEIHP de l'Université d'Angers en France et dédiés à l'analyse des micropolluants organiques par des capteurs électrochimiques. Et réalisés en février 2015 dans le cadre d'un court séjour de recherche. Elle complète des travaux menés au laboratoire organique et électrochimique de l'Université de Beni-Mellal au Maroc.

Dans le cadre de ce travail, nous avons élaboré des capteurs électrochimiques (Electrode en Carbone Vitreux (ECV), et Electrode à Pâte de Carbone (EPC)) afin d'évaluer les paramètres cinétiques de la biodégradation du para-aminophénol (PAP) par un micro-organisme *Scedosporium dehoogii* (SDH) ayant un rôle épuratoire mettant en jeu des mécanismes biochimiques permettant d'aller jusqu'à la minéralisation totale ou partielle du PAP.

- ✓ Le premier chapitre de cette partie est consacré à une étude bibliographique.
- ✓ Le deuxième chapitre présente les matériels et méthodes électrochimiques et biologiques utilisés dans le chapitre trois.
- ✓ Et le dernier chapitre étudie dans un premier temps la rapidité du transfert d'électrons dans le processus d'oxydation électrochimique du PAP par VC, avec ECV et EPC. Puis dans un second temps, nous avons suivi électrochimiquement la biodégradation du PAP par le micro-organisme SDH, avec l'électrode ECV en utilisant la technique de la Voltammétrie à Onde Carrée (VOC).

I. Etude bibliographique

I.1. Les Micropolluants

Un micropolluant est une substance polluante qui est susceptible d'avoir un effet néfaste sur l'environnement, même à des concentrations infimes, de l'ordre du $\mu\text{g/l}$ ou du mg/l . Il existe 3 catégories de micropolluants ^[1]:

- ✓ Organiques : composés principalement de carbone et d'hydrogène, ils proviennent généralement de synthèses industrielles (ex.: pesticides, cosmétiques, médicaments).
- ✓ Inorganiques : composés à base de métaux ou de métalloïdes, ils proviennent du trafic routier et de la construction (ex. : Cadmium, Chrome, Cuivre).
- ✓ Organo-métalliques : composés combinant un métal et un composé organique, c'est un intermédiaire entre les deux catégories précédentes (ex. : organo-étains).

I.1.1. Les micropolluants organiques

Les micropolluants organiques sont des substances synthétiques qui se trouvent dans pratiquement tous les produits utilisés au quotidien. Ils sont susceptibles, parfois, à des concentrations très faibles, d'avoir déjà des effets néfastes sur l'être humain et l'environnement. Leur présence dans les milieux naturels n'est pas nouvelle, mais a été mise en évidence par le développement récent de méthodes analytiques, qui en ont grandement facilité la détection ces dernières années. Les micropolluants que l'on trouve dans les eaux proviennent, d'une part, de la mobilisation de produits phytosanitaires utilisés en agriculture intensive, d'autre part des rejets des stations d'épuration (STEP) qui contiennent des résidus médicamenteux. Parmi les micropolluants qu'on retrouve dans les STEP, les résidus médicamenteux sont très peu dégradés ou partiellement dégradés.

a. Paracétamol PCT

Le Paracétamol ou acétaminophène est un analgésique très largement utilisé. Il s'agit d'une drogue relativement sûre si la toxicité a été observée avec des doses très élevées. Pur, le paracétamol est un solide cristallin blanc qui fond à 169°C . Il est peu soluble dans l'eau froide à l'eau chaude, mais cette solubilité est d'environ $5\text{g}/100\text{ml}$. Il est très soluble dans l'éthanol ($14\text{g}/100\text{ml}$).

L'acétaminophène, est un composé ayant des propriétés analgésiques, qui est régulièrement utilisé pour soulager les maux de tête, maux de dos, l'arthrite et la douleur postopératoire. Le composé est efficace pour réduire la fièvre associée à des infections bactériennes et virales [2]. Par conséquent, il est indispensable de développer un système fiable et technique sensible pour la détermination de l'acétaminophène dans une variété de matrices.

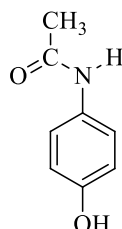


Figure II-1 : Le Paracétamol PCT

Ces propriétés physico-chimiques sont consignées dans le tableau 1.

Tableau II-1 : propriétés physico-chimique du PCT

Formule brute	C ₈ H ₉ NO ₂
Masse molaire	151,2 g/ mol
Point de fusion	168-172°C
Solubilité	14 g/L à 20°C
pKa	9,5
log Kow	0,49
Koc	< 200 g/cm ³
Longueur d'onde (λ)	240 nm

a. Synthèse de la molécule de Paracétamol

Le paracétamol est une amide aromatique acylé qui était utilisé pour la première fois dans la médecine par Joseph Von Mering en 1893, il a été utilisé comme analgésique comme médicaments pour plus de 50 ans, et est accepté comme un médicament efficace pour soulager la douleur et de la fièvre chez les adultes et les enfants [3].

En outre, le para-aminophénol, produit de dégradation hydrolytique de paracétamol, et peut être présent dans des préparations pharmaceutiques comme intermédiaire de synthèse ou comme un produit de dégradation du paracétamol qui peut causer de graves effets de néphrotoxicité et tétrageniques [4,5].

La préparation de l'acétaminophène (paracétamol) comprend le traitement d'une amine avec un anhydride d'acide pour former un amide. Dans ce cas, le para-aminophénol, l'amine est traitée avec l'anhydride acétique pour former l'acétaminophène.

Au laboratoire, le paracétamol est facilement préparé par le phénol nitré avec le nitrate de sodium, en séparant le para-nitrophénol désiré du dérivé ortho-et en réduisant le groupe nitro avec le borohydrure de sodium. La résultante para-aminophenol est alors acétylée avec l'anhydride acétique. Dans cette réaction, le phénol est activé fortement, ainsi la réaction exige des conditions seulement légères (cf. la nitration de benzène). Le processus industriel est analogue, mais l'hydrogénation est utilisée au lieu de la réduction du borohydrure de sodium.

L'acétaminophène solide brut contient des impuretés sombres effectuées le long de la para- aminophénol de départ. Ces impuretés, qui sont des colorants de structure inconnue, sont formées à partir de l'oxydation du phénol de départ. Alors que la quantité de l'impureté des colorants est petite, elle est suffisamment intense pour donner de la couleur à l'acétaminophène brut. La plupart des impuretés de couleur est détruit en chauffant le produit brut avec du dithionite de sodium (Hydrosulfite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Le dithionite réduit les doubles liaisons dans le colorant pour produire des substances incolores. L'acétaminophène est alors recueilli à l'aide d'un entonnoir.

Il est en outre purifié par une technique de cristallisation en utilisant un micro-Tube de Craig.

L'anhydride acétique peut causer une irritation des tissus, en particulier dans la partie nasale. Éviter de respirer les vapeurs et éviter tout contact avec la peau et les yeux. Le para-aminophénol est un irritant pour la peau et est toxique.

Les solutions aqueuses obtenues à partir des opérations de filtration peuvent être diluées avec de l'eau. L'équation de synthèse est illustrée ci-dessous :

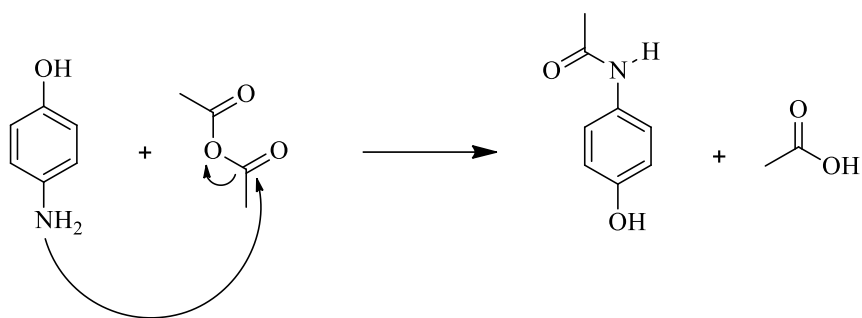


Schéma II-1 : Equation de la synthèse organique du PCT

b. Effets du Paracétamol sur les êtres vivants

L'acétaminophène (paracétamol) est un analgésique contre la fièvre, médicament similaire en vigueur à l'aspirine. Il s'agit d'un ingrédient actif dans de nombreux médicaments en vente libre, y compris le Tylenol et le Midol. Introduit dans les années 1900.

Le paracétamol est une substance extrêmement toxique pour les chats qui ne doivent en absorber dans aucun cas. La toxicité apparaît pour des doses journalières aussi faibles que 10 mg/kg ^[6]. Les symptômes initiaux sont le vomissement, la salivation et la décoloration de la langue et des gencives. Au bout de deux jours, les dommages corporels sont évidents et apparaît une jaunisse. Contrairement à ce qui se passe chez l'homme, ce ne sont pas les dommages hépatiques qui causent la mort mais c'est la production de méthémoglobine et le corps de Heinz dans les globules rouges qui empêche le transport de l'oxygène dans le sang, provoquant une mort par asphyxie. Des traitements efficaces sont possibles pour les faibles doses mais ils doivent être administrés très rapidement.

Pour les chiens, le paracétamol est un antalgique utile avec un bon résultat en matière d'efficacité, qui cause moins d'ulcères gastriques que les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Mais il ne doit être administré que sur les conseils d'un vétérinaire. En effet, le surdosage, potentiellement mortel, est rapidement atteint même avec des faibles doses. L'hépatotoxicité peut survenir à partir de 100 mg/kg et une méthémoglobinémie à partir de 200 mg/kg ^[6].

Le paracétamol est létal pour certains serpents et son utilisation dans le but de contrôler la prolifération du serpent brun arboricole (*Boiga irregularis*) dans l'île de Guam à l'aide de fausses souris imprégnées a été validée lors d'une étude ^[7].

c. Effets néfastes du Paracétamol sur l'environnement

La source principale de médicaments dans l'environnement est le résultat de l'utilisation par le patient et du traitement des rejets domestiques et hospitaliers dans les stations d'épuration. L'eau de surface est sans doute le milieu environnemental le plus concerné et aussi le plus étudié, avec des niveaux de concentration qui peuvent aller du mg/l jusqu'à quelques µg/l, mais la présence de médicaments a également été déterminée dans les eaux souterraines, ainsi que dans des eaux de boisson ^[8].

Les sols peuvent être contaminés par les déjections des animaux traités par des médicaments vétérinaires directement dans les prairies mais aussi par l'épandage sur les champs des boues des stations d'épuration ou des fumiers et purins produits dans les étables. Les résidus médicamenteux pourraient ainsi entrer dans la chaîne alimentaire.

Malgré les faibles concentrations observées, le rejet en continu de médicaments dans le milieu aquatique et le caractère diffus de cette émission confèrent à ces molécules un caractère de pseudo-persistant. Les préoccupations majeures concernent donc actuellement les éventuels impacts sur les écosystèmes et sur la santé humaine. Le débat sur ce sujet reste par contre encore assez controversé.

Les produits pharmaceutiques sont présents dans l'environnement en mélange avec d'autres contaminants chimiques. L'état des connaissances actuelles ne nous permet pas encore d'estimer le risque cumulé du « cocktail » de contaminants chimiques.

D'après une étude ^[9], le paracétamol pourrait se transformer en produit toxique, lorsque les usines de traitement des eaux usées utilisent le procédé de javellisation. Le paracétamol se transformerait, sous l'action de l'ion hypochlorite ClO^- , en *N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine et en 1,4-benzoquinone. La première molécule est toxique pour le foie tandis que la seconde est suspectée d'être génotoxique et mutagène. Des études supplémentaires doivent être effectuées pour savoir quelle est la concentration de ces substances à la sortie des eaux usées et pour connaître la persistance de ces produits dans l'environnement.

d. Le para-aminophénol (PAP)

L'hydrolyse directe du PCT forme le para-aminophénol qui est le principal métabolite et dont l'oxydation conduit aux quinones (laboratoire Rhône-Poulenc Rorer GmbH cologne, 1997) suivant le schéma 3.

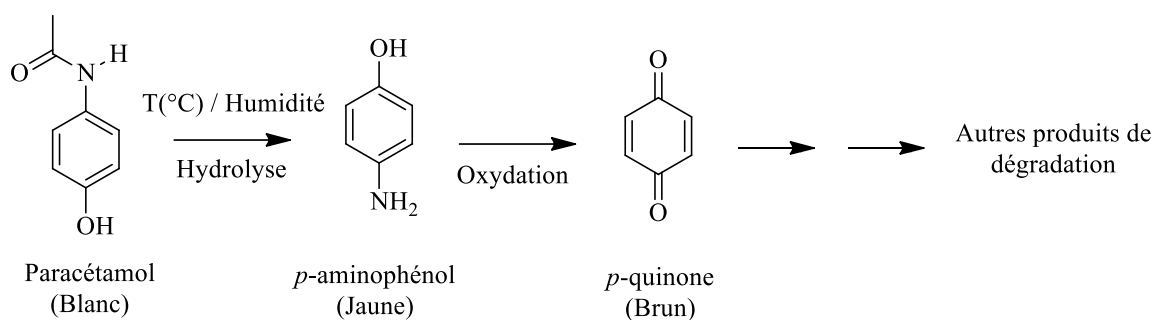


Schéma II-2 : Equation de l'hydrolyse du PCT et l'oxydation du PAP

Le para-aminophénol est identifié comme un CMR (cancérogène, mutagène et repro-toxique), il est nocif par inhalation, par ingestion, par contact avec la peau et les yeux et très toxique pour les organismes aquatiques.

b. Les micropolluants inorganiques

a. Origine et toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds présentent un risque de toxicité via leur accumulation dans le sol, dans les eaux, et par la suite, dans la chaîne alimentaire. Ils peuvent pénétrer dans l'organisme par ingestion mais également par inhalation. C'est pourquoi leurs émissions atmosphériques font notamment l'objet d'un suivi. Ce sont des éléments métalliques de masse volumique élevée (supérieure à 5 g/cm³)^[10] (Cuivre, plomb, mercure, cadmium, etc.) présents naturellement mais en quantités très faibles dans les sols, l'eau et l'air. Par extension, d'autres éléments toxiques sont rattachés à cette catégorie comme le zinc ou l'arsenic.

Les ETM (éléments-traces métalliques) sous forme d'émissions atmosphériques sont souvent liés aux particules ou poussières (majoritairement associés aux particules fines), à l'exception du mercure, qui est principalement gazeux^[11]. Les neuf métaux lourds qui font l'objet d'un inventaire officiel en wallonie sont l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le sélénium (Se) et le zinc (Zn). Ceux-ci sont présents dans l'eau, l'air et le sol. Comme tous les minerais, ils sont présents dans les roches. Ces réserves naturelles ne constituent pas en elles-mêmes de danger à proprement parler. L'exploitation des gisements, l'érosion, les prélèvements d'eau ou les éruptions volcaniques, vont répandre des traces de ces éléments dans l'environnement. Ils peuvent alors devenir toxiques s'ils se retrouvent en quantités suffisantes dans les organismes vivants.

b. Les rejets des métaux lourds dans l'eau

Les éléments traces, présents sous une forme particulière dans les sols, apparaissent sous l'effet de l'érosion. Le ruissellement sur les surfaces imperméables ainsi que les sources anthropiques s'ajoutent à ces sources naturelles liées à l'érosion. Outre que les phénomènes naturels, l'activité humaine, même si elle ne crée pas de métaux lourds, participe à leur diffusion dans l'environnement. De fait de leurs propriétés physicochimiques intéressantes (thermiques, électriques, mécaniques, catalytiques, etc...) les métaux lourds sont très largement utilisés. L'industrie métallurgique et minière est la principale source d'émission humaine, le plomb étant présent dans les déchets d'exploitation. On peut citer également la présence de plomb dans les batteries automobiles. Les rejets atmosphériques sont responsables de la quasi-totalité des métaux, mercure, cadmium, arsenic, chrome, plomb.

c. Effet sur la santé humaine

Le plomb peut se retrouver dans l'eau et les sols lors de la corrosion des tuyauteries en plomb des systèmes de transport d'eau et lors de l'usure des peintures au plomb. Ainsi les soudures au plomb utilisées dans la fabrication des boîtes de conserve peuvent également contaminer les aliments ^[12]. Le plomb ne peut être détruit, il peut seulement changer de forme. C'est un élément toxique par inhalation et ingestion: saturnisme, toxique pour les organismes vivants (plantes etc.), perturbe la photosynthèse et d'autres mécanismes du métabolisme. Il a des effets toxiques sur le système nerveux central et périphérique. Les enfants exposés de manière prolongée à de faibles doses de plomb peuvent développer le saturnisme (maladie caractérisée par divers troubles : croissance, développement du système nerveux central, développement intellectuel et comportement). Chez les adultes, à fortes doses, celui-ci peut induire des troubles de la reproduction, des insuffisances rénales, et des encéphalopathies.

Le cadmium est connu depuis les années du 2ème siècle. Très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques) ^[13], le cadmium est l'un des rares éléments n'ayant aucune fonction connue dans le corps humain ou chez l'animal. Il faut éviter son contact avec des aliments. Chez l'homme, il provoque notamment des problèmes rénaux et l'augmentation de la tension.

Une exposition de courte durée à des fortes concentrations de poussières ou de fumées, de composés de cadmium est irritante pour les cellules des systèmes respiratoires et gastro-intestinaux ^[14]. Une exposition de courte durée à des concentrations de cadmium supérieures aux concentrations maximales recommandées peut causer des nausées, des vomissements, de la diarrhée, des crampes musculaires, de la salivation, des troubles sensoriels, des lésions hépatiques, des convulsions, un état de choc et de l'insuffisance rénale. Lors d'une exposition prolongée à des concentrations supérieures aux limites recommandées, le cadmium peut entraîner de l'emphysème, des dommages aux reins et au foie et le ramollissement des os.

I.2. *Scedosporium dehoogii* (SDH)

C'est un champignon filamenteux très fréquent dans l'environnement. et non pathogène. Sous sa forme *Scedosporium apiospermum* il est toxique pour des patients atteints de la mucoviscidose. La mucoviscidose est une maladie héréditaire très répandue. Elle provoque des sécrétions anormalement visqueuses et adhésives qui touchent principalement l'appareil respiratoire et le tube digestif ^[15].

Dans ce travail, le champignon non pathogène a été testé pour la dégradation du PAP sur gélose et en milieu liquide. Le suivi de la biodégradation du PAP est effectué par une analyse électrochimique quotidienne, des échantillons composés du milieu de culture de SDH, le PAP (avec une concentration bien déterminée le 1^{er} jour d'analyse), et le champignon SDH.

I.3. Les techniques de dépollution

Au cours des dernières décennies, les progrès considérables des techniques mises en jeu dans des domaines aussi variés que la médecine et la biologie clinique, l'agro-alimentaire ou le contrôle de la qualité de notre environnement (surveillance des rejets industriels ou domestiques) ont nécessité la mise au point de méthodes analytiques de plus en plus précises et sélectives. Les biocapteurs constituent sans doute l'alternative la plus séduisante pour proposer des systèmes simples, fiables, rapides et sélectifs de détection.

II. Matériels et méthodes

II.1. Electrodes de travail

II.1.1. L'électrode à pâte de carbone EPC et l'électrode de carbone vitreux

Pour cette étude on a commencé le travail avec deux électrodes différentes, l'EPC et l'ECV. Par comparaison de leur comportement électrochimique vis-à-vis du PAP, une seule électrode va être sélectionnée pour compléter le travail dans le milieu biologique.

Tableau II-2 : Propriétés des ECV ^[16] et EPC. ^[17]

Electrode	ECV	EPC
Propriétés	•bonne conductivité électrique •large fenêtre de potentiel •surface renouvelable et reproductible	•simples à réaliser •adaptés pour la préparation d'une électrode modifiée avec des additifs •capteurs très sélectifs à la fois pour l'électrochimie organique et inorganique

a. L'électrode à Carbone Vitreux (ECV)

L'Electrode de Carbone Vitreux est une électrode commercialisée à base de carbone vitreux qui est un matériau plus dur que le platine ou l'or.



Figure II-1 : L'électrode de Carbone Vitreux

L'ECV passe par un protocole de polissage avant chaque utilisation, le tableau suivant précise les différentes étapes du protocole.

Tableau II-3: Protocole de polissage de l'ECV	
Polissage	Tapis avec Al_2O_3 1 μm 5 min
Rinçage	Bain ultrason 5 min dans l'eau distillé
Polissage	Tapis avec Al_2O_3 0,5 μm 5 min
Rinçage	Bain ultrason 5 min dans l'eau distillé

b. L'électrode à Pâte de Carbone (EPC)

L'Electrode à Pâte de Carbone est préparée en mélangeant la poudre de carbone (Fig. II-2) avec quelques gouttes d'huile de paraffine et éthanol absolu, 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. ^[18]



Figure II-2 : Electrode à pate de carbone

II.1.2. Méthodes électrochimiques d'analyse

Les techniques électrochimiques sont des outils d'analyse classique très utiles en chimie analytique pour leurs facilités d'emploi (elles utilisent un seul instrument de mesure le potentiostat PG580), leur précision et la fiabilité des mesures qu'elles permettent d'effectuer. Sensibles et sélectives, elles peuvent servir à la détermination de plusieurs éléments dans la même matrice, ainsi elles peuvent être employées à la détection des pesticides, des métaux lourds et des résidus médicamenteux dans l'environnement.

Suivant la nature des espèces électro-actives et le type d'informations recherchées au cours d'une analyse, on peut faire appel à une méthode électrochimique appropriée. Ce travail ayant porté sur l'analyse des résidus médicamenteux à l'état de trace, les méthodes électrochimiques impulsionnelles d'analyse sont à ces effets les plus indiqués. Cette partie ne constitue pas une description exhaustive des méthodes électrochimiques existantes mais se focalise sur celles utilisées dans le cadre de ce travail : la Voltammétrie Cyclique (CV), et la Voltammétrie à Ondes Carrées (VOC).

II.2. Le dispositif de l'analyse électrochimique et les électrodes testées

II.2.1. Dispositif électrochimique

Le dispositif électrochimique utilisé dans ce travail est représenté par la figure 3.

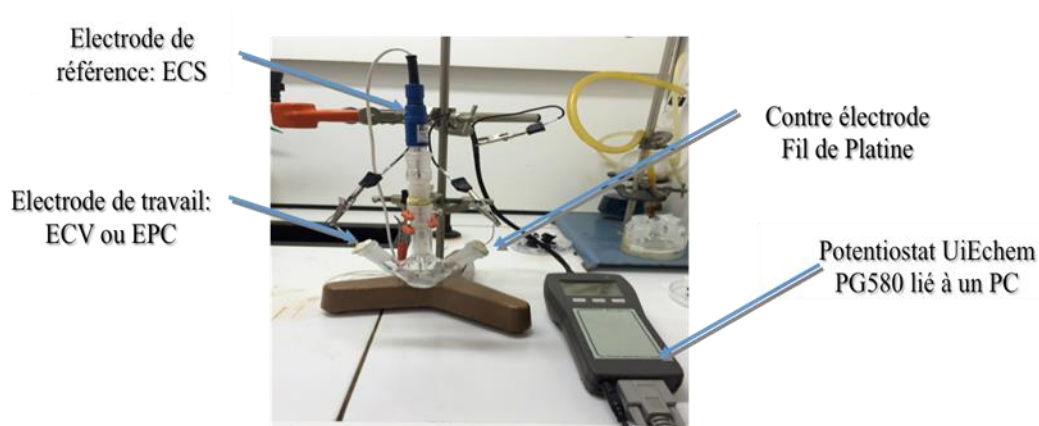


Figure II-3 : Dispositif électrochimique à 3 électrodes avec le potentiostat

Il s'agit d'un montage électrochimique classique à 3 électrodes (Figure II-3) :

- une électrode de Platine (Pt), la contre électrode,
- une électrode de référence au Calomel saturée (ECS),
- une électrode de travail : soit l'ECV soit les électrodes EPC

Les deux techniques électrochimiques utilisées sont :

- La Voltammétrie Cyclique (VC)
- La Voltammétrie à Ondes Carrées (VOC).

Les paramètres d'utilisation sont consignés dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Paramètres de la VOC et de la VC utilisés

Paramètres/Techniques	VOC	VC
Incrément de potentiel (mV)	8	-
Fréquence (Hz)	50	-
Hauteur de pulse (mV)	99	-
Vitesse de balayage (mV/s)	100	100

II.2.2. Culture de la souche de *Scedosporium Dehoogii* en milieu liquide avec le PAP

La culture du champignon SDH est réalisée en quatre étapes :

Etape 1 : Préparation du milieu de culture liquide Scedo-Select avec le PAP.

- préparation de 900 ml du milieu basal.
- stérilisation du milieu à l'autoclave pendant 20 min à 115 °C.
- préparation de 90 ml d'une solution du PAP de 0,9g/l.
- stérilisation de la solution à l'autoclave pendant 20 min à 115 °C.
- prélèvement de 180 ml du milieu basal (le blanc).
- ajouter 80 mL de la solution de PAP dans 720 ml du milieu basal.
- Homogénéisation.

Composition du milieu basal

- 5 g (NH₄)₂SO₄
- 1,25 g KH₂PO₄
- 0,625 g MgSO₄
- 8 mg Benonyl

- 2 mg Dichloran
- 0,5 g Chloramphénicol
- 0,01 g Fer
- 900 ml d'eau

Etape 2 : Culture de la souche *Scedosporium dehoogii*

- préparation de 200 ml de milieu YPDA
- stérilisation à l'autoclave pendant 20 min à 115 °C
- coulage des boîtes (10 boîtes)
- repiquer les souches (6 colonies par boîte)
- incubation à l'étuve à 37 °C/7 jours
- mesure de l'augmentation de diamètres des souches



Figure II-4 : Culture du SDH sur YPDA

Etape 3 : Préparation de l'inoculum

- raclage des colonies sur YPDA en eau distillée stérile
- rincer les boîtes avec de l'eau distillée stérile
- la suspension obtenue est filtrée pour séparer les spores et les filaments
- comptage des spores de la suspension fongique avec un microscope optique ($2,58 \cdot 10^6$ Sp/ml)

Des images de SDH ont été par microscopie électronique à balayage à deux agrandissements :

- Image à droite * 1000
- Image à gauche *5000

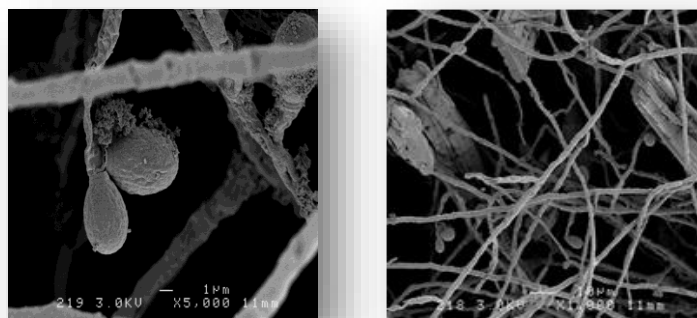


Figure II-5 : *Scedosporium dehoogii* par MEB

Etape 4 : Ensemencement du milieu de culture liquide

- verser la suspension fongique dans les 800 ml de milieu de culture avec le PAP
- répartition en ErlemMeyer de 150 ml stériles, à raison d'avoir 50 ml du milieu avec 10^6 Sp/Erlemmeyer.
- incubation sous agitation à 37 °C à l'étuve pendant 12 jours.
- faire des mesures électrochimiques tous les jours à partir du quatrième jour (prendre un Erlemeyer pour chaque jour).



Figure II-6: La suspension fongique dans des erlenmeyers de 50 ml en contact avec du PAP sous agitation à 37 °C

III. Résultats et discussions

III.1. Etudes de la cinétique de transfert d'électron avec l'ECV et l'EPC pour le PAP

III.1.1. Comparaison de la réponse électrochimique de l'ECV et l'EPC pour le PAP

Les voltamogrammes cycliques des figures II-8 et II-9 montrent les réponses électrochimiques de l'ECV et l'EPC dans le milieu tampon PBS en présence du PAP. La figure II-10 est une superposition des deux VC de l'ECV et l'EPC.

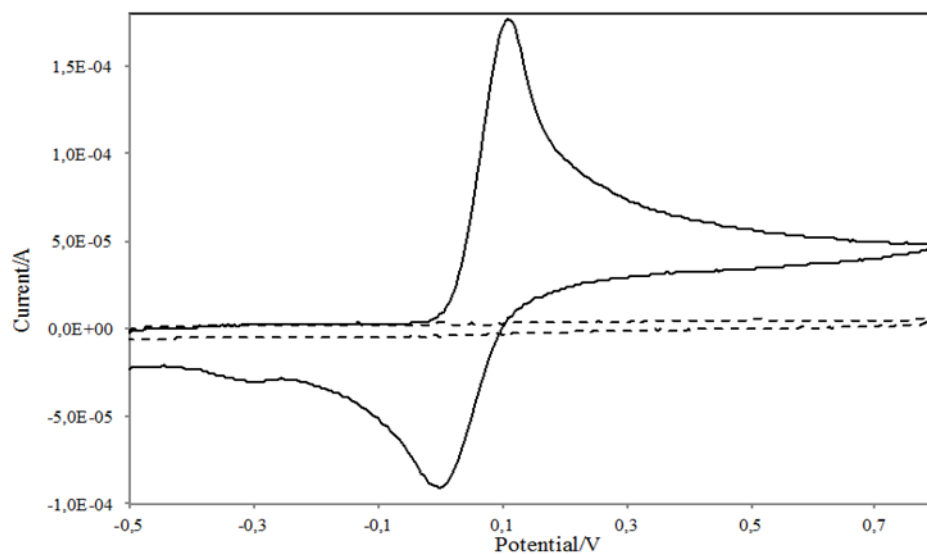


Figure II-8: Courbe de voltammétrie cyclique de 0,5g/L de PAP dans 0,1 M de PBS (pH=7,4), avec une vitesse de balayage de 100mV/s, obtenue par ECV

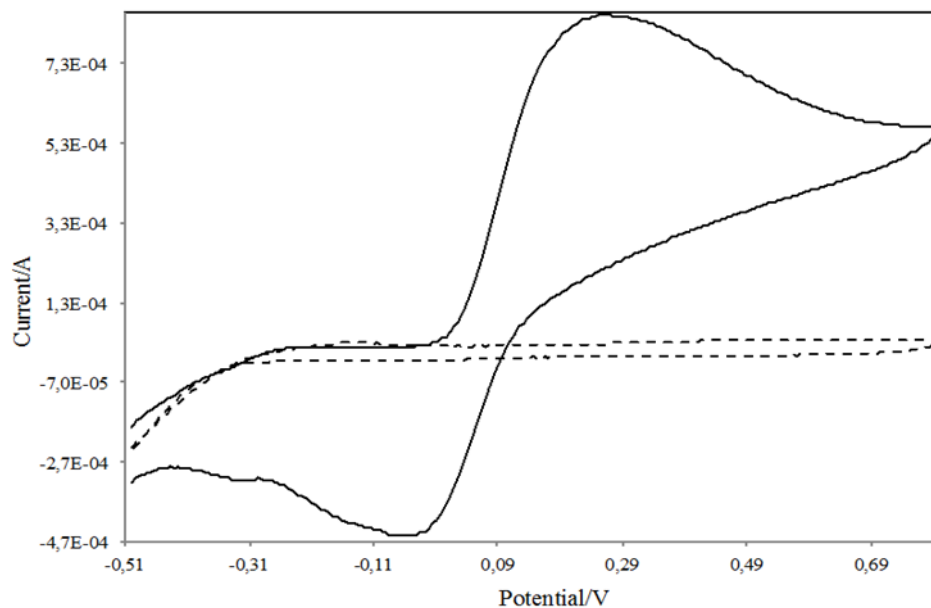


Figure II-9: Courbe de voltammétrie cyclique de 0,5g/L de PAP dans 0,1 M de PBS (pH=7,4), avec une vitesse de balayage de 100mV/s, obtenue par EPC

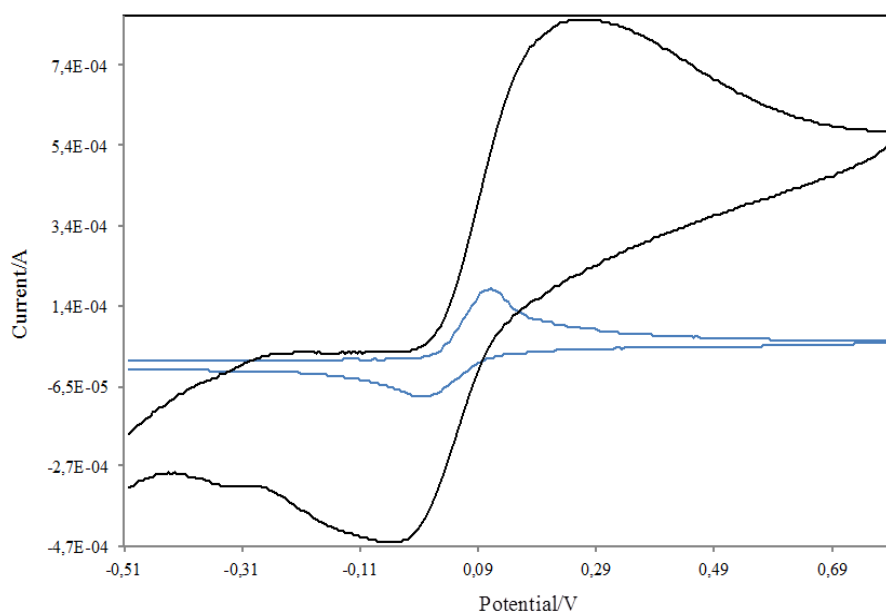


Figure II-10: Superposition de la courbe du VC de l'ECV (bleu) et la courbe du VC de l'EPC (noir)

Par comparaison des courbes du VC de l'ECV et l'EPC sur la figure II-10, on remarque que le pic d'oxydation du PAP de l'EPC est plus intense par rapport à celui de l'ECV et ceci est dû à la grande surface géométrique de l'EPC. Par contre le pic de l'ECV est plus étroit, ce qui permet d'avoir une valeur plus précise de l'intensité du pic. On observe aussi que le pic d'oxydation du PAP apparaît à des valeurs différentes de potentiel :

- $E_{p(\text{ECV})} = 0,1093 \text{ V}$.

- $E_{p(\text{EPC})} = 0,2480 \text{ V}$.

Dans les deux cas, les pics d'oxydation et de réduction sont superposables, ce qui confirme que la réaction d'oxydo-réduction est réversible.

La réaction redox mise en jeu est la suivante :

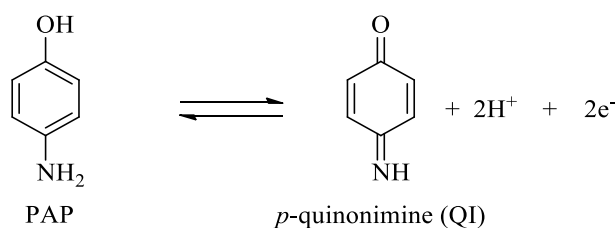


Schéma II-4 : Réaction d'oxydo-réduction du PAP

III.1.2. Etude de la cinétique du transfert d'électron pour l'oxydation du PAP sur les électrodes EPC et ECV

Les voltammogrammes sur les figures 11 et 12 présentent une superposition des VC à des vitesses de balayage allant de 100 à 700mV/s pour les deux électrodes, l'ECV et l'EPC.

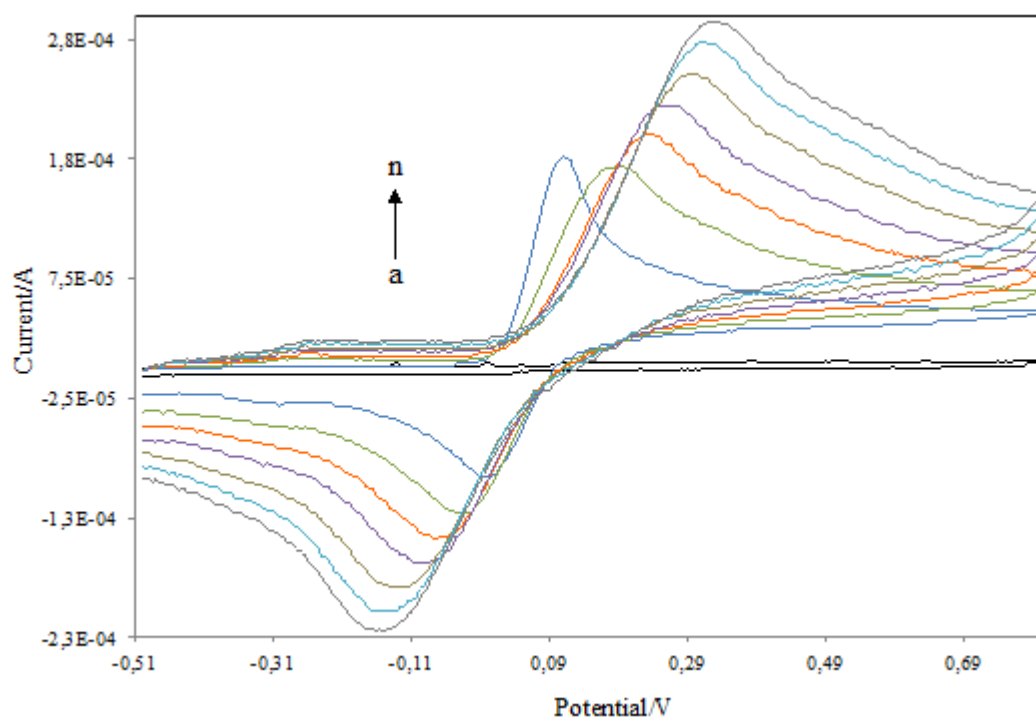


Figure II-11 : Réponse voltammétrique du pic de détection du PAP de (a) à (n): 100, 200, 300, 400, 500, 600 et 700mV/s. Conditions expérimentales : Potentiel de -0,5 mV à 0,8 mV ; obtenues par ECV

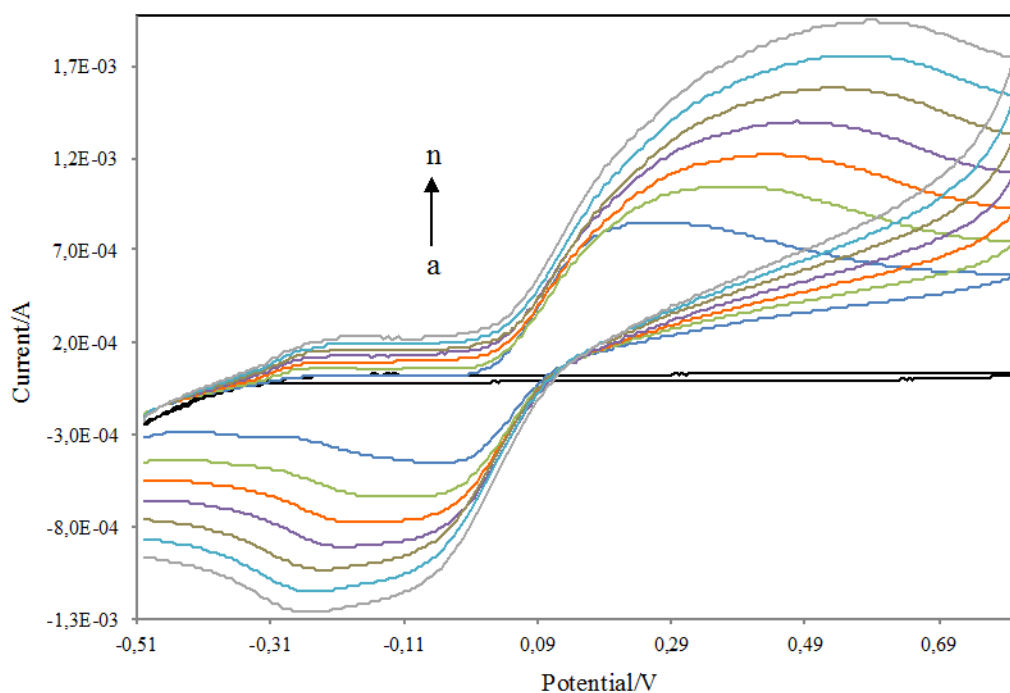


Figure II-12 : Réponse voltammétrique du pic de détection du PAP de (a) à (n): 100, 200, 300, 400, 500, 600 et 700mV/s. Conditions expérimentales : Potentiel de -0,5 mV à 0,8 mV ; obtenues par EPC

Le tableau II-5 regroupe l'ensemble des résultats obtenus de la cinétique de transfert d'e- pour le PAP.

Tableau II-5 : *Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de l'étude de la cinétique du transfert d'électron*

Critères	ECV	EPC
$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 56,5/n$	110,84	325,40
E_{pa} et E_{pc} dépendent de V	+	+
$E_p = f(\log V_b)$	-	-
$I_{pa}/I_{pc} = 1$	-	-
$I_p = f(\sqrt{V})$	-	-
Cinétique du système	Quasi-rapide	Quasi-rapide

Il ressort du tableau II-5 que le système redox QI/PAP est quasi-rapide pour les deux électrodes testées : ECV et EPC.

D'autre part si on compare les $\Delta E_p = (E_{pa} - E_{pc})$, on observe que : $\Delta E_p \text{ (EPC)} \gg \Delta E_p \text{ (ECV)}$, et on peut dire que l'ECV est plus rapide que l'EPC.

III.2. Calibration des électrodes EPC et ECV par la technique VOC selon la méthode de l'étalonnage externe

Les voltammogrammes ci-dessous présentent les VOC obtenus par l'ECV et l'EPC à différentes concentrations du PAP dans le milieu de culture Scedo-Select. Il y a une contrainte imposée par les biologistes, c'est qu'il faut commencer par une concentration initiale de PAP= 0,9 g/l.

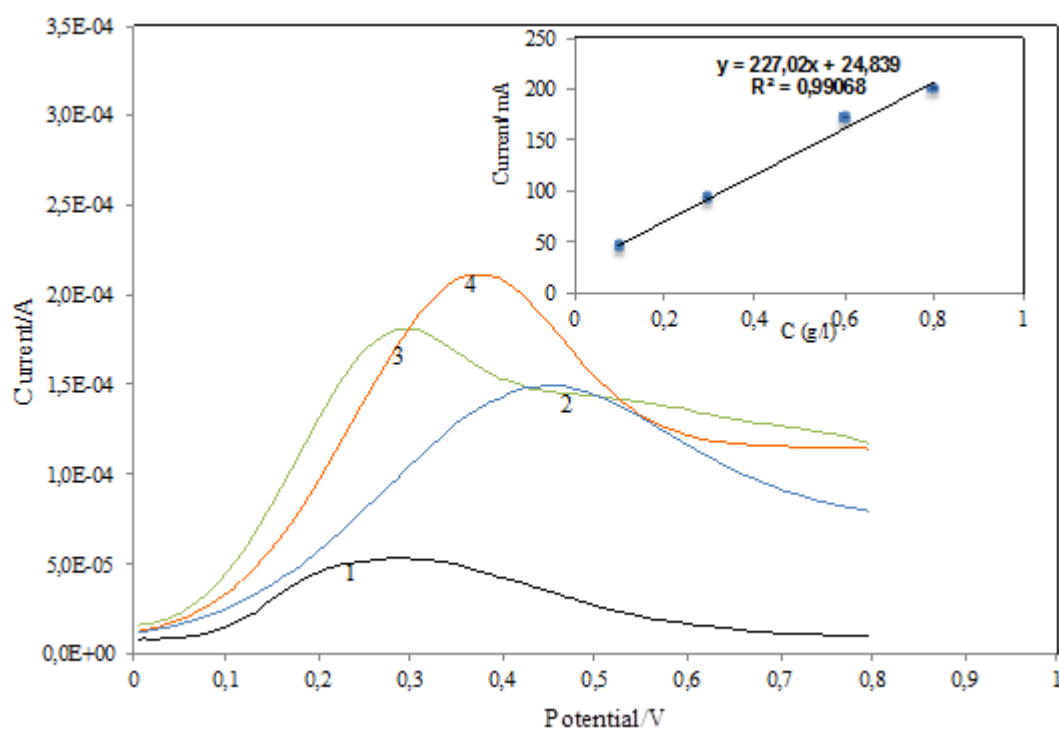


Figure II-13: Réponse voltammétrique du pic de détection du PAP de 0,1(1), 0,3(2), 0,6(3) et 0,8g/L (4) du PAP Conditions expérimentales : $f=50\text{Hz}$, Hauteur du pulse=99mV et Incrément de potentiel=8mV; obtenues par ECV

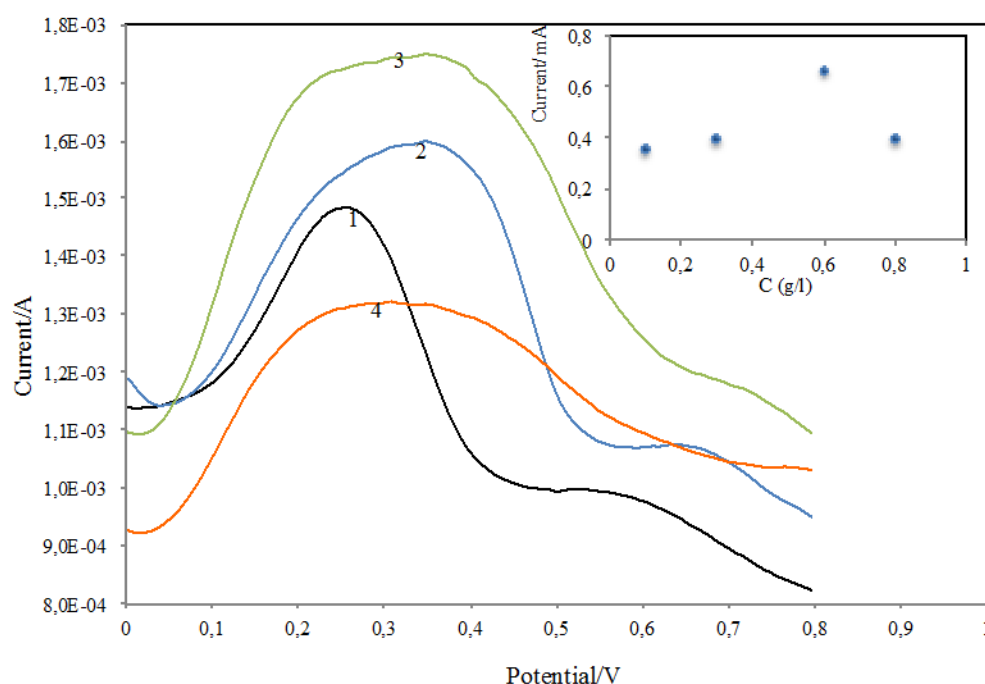


Figure II-14: Réponse voltammétrique du pic de détection du PAP de 0,1(1), 0,3(2), 0,6(3) et 0,8g/l (4) du PAP. Conditions expérimentales : $f=50\text{Hz}$, Hauteur du pulse=99mV et Incrément de potentiel=8mV ; obtenues par EPC

On observe un problème d'empoisonnement pour l'EPC à partir de 600 mg/l, ce qui n'est pas le cas pour l'ECV. Ceci confirme que l'ECV est mieux adaptée aux « fortes » concentrations imposées par les essais biologiques.

III.3. Etalonnage de l'électrode ECV par la technique VC selon la méthode de l'étalonnage externe

L'étalonnage externe est une technique permettant d'avoir une droite de calibration de notre électrode ECV, à partir duquel on peut déterminer les concentrations du PAP inconnu de nos échantillons journaliers. La figure II-15 présente une superposition des cycles voltammétriques (aller uniquement) obtenus à des concentrations de PAP allant de 0,1 g/l jusqu'à 1g/l avec un pas de 0,1 g/l.

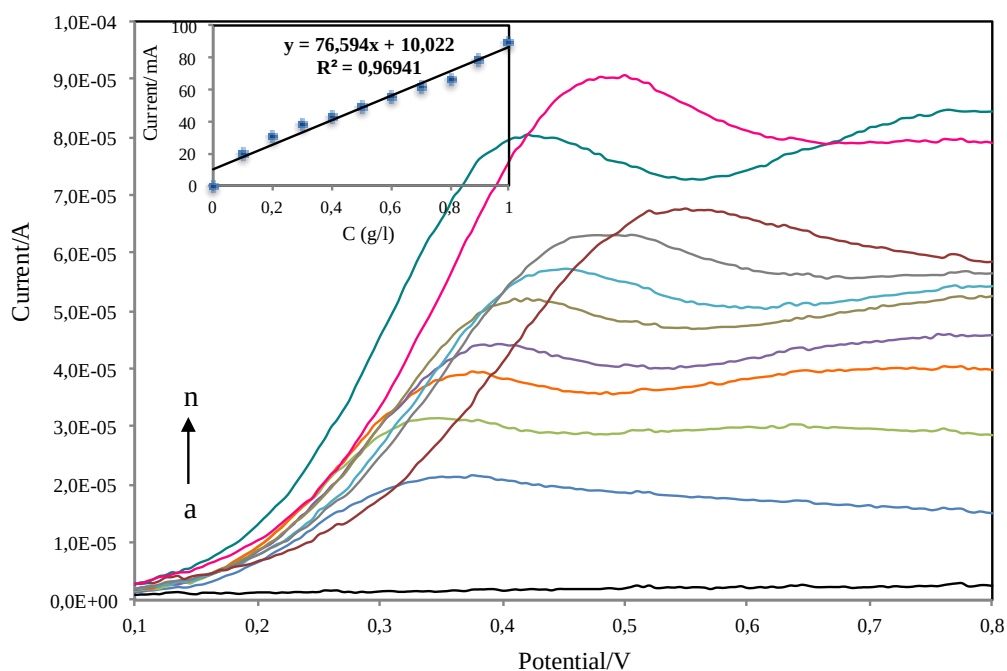


Figure II-15 : - Réponse voltammétrique VC (aller uniquement) du pic de détection du PAP de (a) à (n): 0,1; 0,2 ; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 et 1 g/l du PAP. Conditions expérimentales : Potentiel de - 0,5 V à 0,8 V/ECS vitesse de balayage 100mV/s.

- Droite de calibration de L'ECV, $I_{pic}=f([PAP])$.

On observe une très bonne linéarité entre l'intensité du courant du pic de l'ECV et la concentration du PAP dans le domaine des concentrations testées avec la technique VC, sans polissage, en suivant la méthode de l'étalonnage externe.

III.4. Détermination d'une concentration inconnue de PAP par la technique VOC selon la méthode des ajouts dosés

Cette partie a comme objectif, la détermination de la concentration inconnue de PAP de l'échantillon J₁₁ (jour N° 11).

Dans l'étalonnage par ajouts dosés, on réalise la gamme d'étalonnage directement dans l'échantillon à doser, on procède donc par des analyses successives du même échantillon : d'abord sans ajout, puis après un premier ajout d'une quantité connue du composé à doser, puis ainsi de suite jusqu'à faire plusieurs ajouts successifs afin d'être en capacité de tracer ensuite la droite d'étalonnage. Il faut bien sûr tenir compte de l'augmentation du volume d'échantillon au fur et à mesure des ajouts pour calculer les concentrations réelles dans l'échantillon après ajouts.

La figure ci-dessous présente les résultats de l'étalonnage par ajouts dosés appliqué sur l'échantillon **j₁₁**.

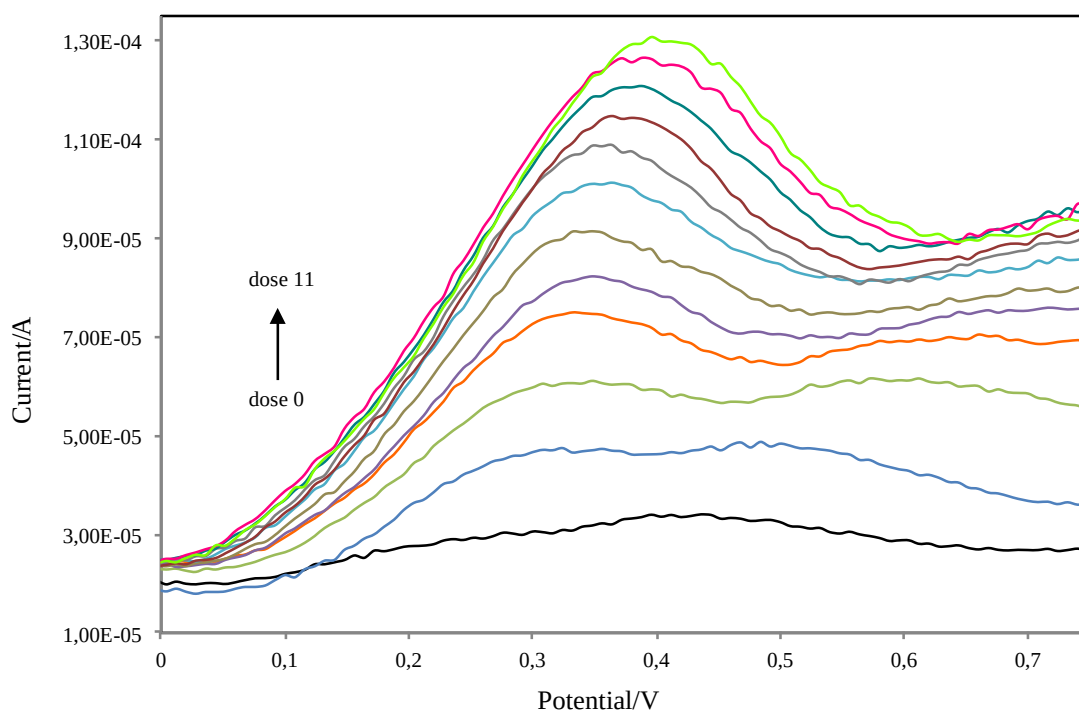


Figure II-16 : Superposition des courbes de VOC de l'ECV de la dose 0 jusqu'à la dose 11 du PAP.
Conditions expérimentales : $f=50\text{Hz}$, Hauteur du pulse= 99mV et Incrément de potentiel= 8mV .

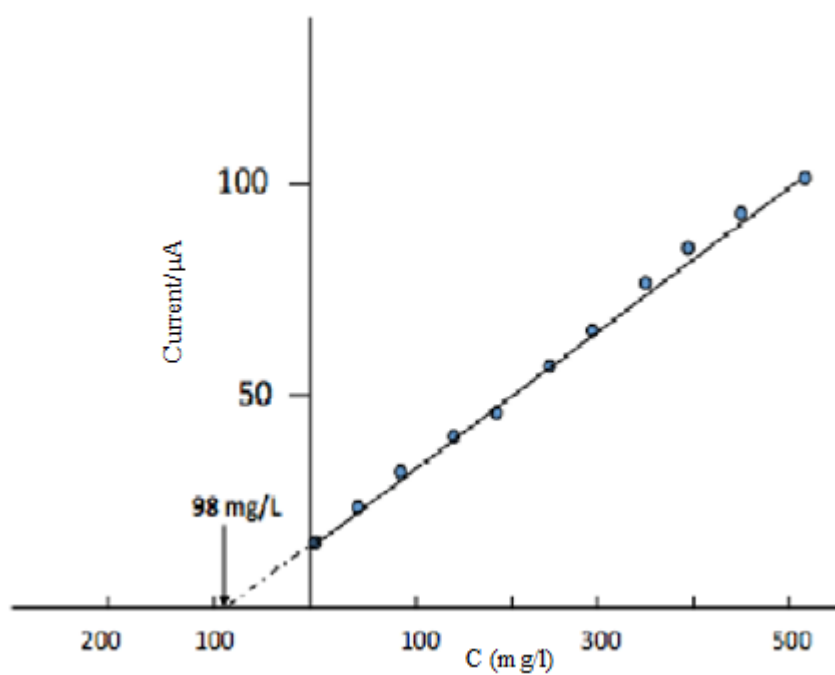


Figure II-17 : Droite de calibration de L'ECV, $I_{\text{pic}}=f([PAP])$.

D'après la courbe d'étalonnage ci-dessus, la concentration initiale du PAP trouvée dans l'échantillon J₁₁ est : [PAP] = 98mg/l.

III.5. Cinétique de biodégradation

Le suivi de la biodégradation du PAP par la souche *Scedosporium Dehoogii* est réalisé par l'ECV en suivant la méthode de l'étalonnage externe.

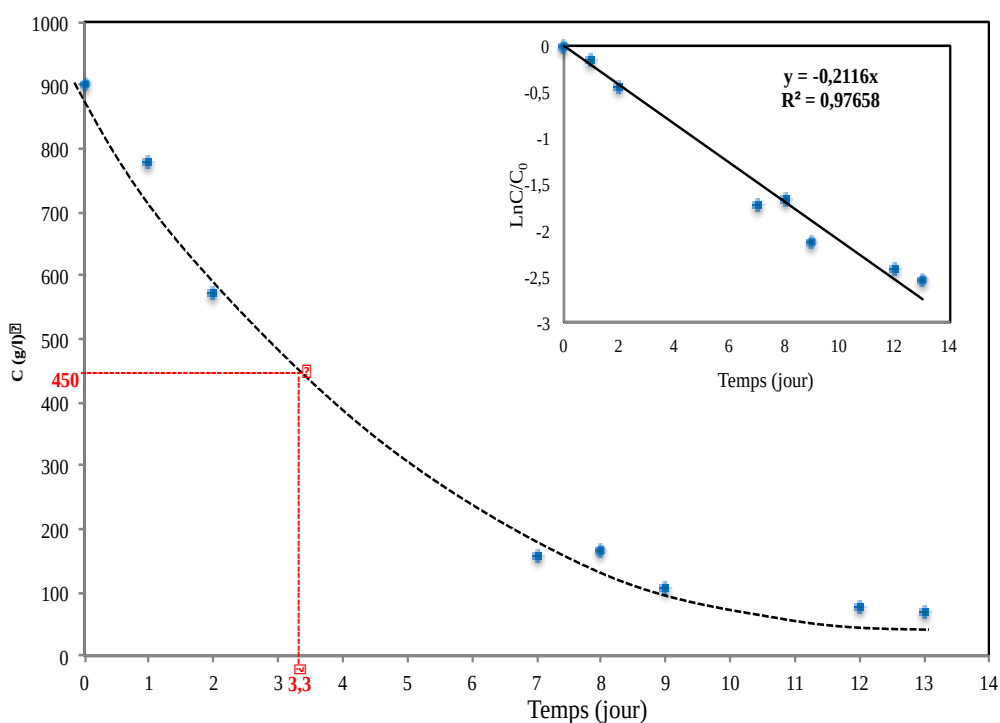


Figure II-18 : Suivi de la cinétique de biodégradation du PAP par scedosporium dehoogii au cours du temps à une température de 37°C et modélisation cinétique

Selon la figure II-18 on remarque que la concentration du PAP diminue avec le temps, ce qui prouve l'efficacité du champignon SDH pour la biodégradation du PAP.

D'après loi de la vitesse intégrée: $\ln([A]/[A]^0) = -kt$, la cinétique mise en évidence est d'ordre 1, pour le PAP la constante cinétique à 37°C est de $K = 0,21 \text{ j}^{-1}$ et son temps de demi-vie est de 3,3 jours.

Conclusion

Ce travail a permis d'une part de sélectionner une électrode parmi deux capables de faire le suivi de la biodégradation du PAP électrochimiquement. Cette électrode est l'ECV qui a prouvé une bonne adaptation dans le domaine de concentration étudié, notamment au début des tests avec 0,9 g/l de PAP.

D'autre part, de valider l'efficacité du champignon *Scedosporium dehoogii* pour l'épuration des solutions contaminées par le PAP.

De plus, pour le suivi de la cinétique de la biodégradation du PAP, on a mis en œuvre deux techniques électrochimiques, la VC et la VOC et avec deux méthodes d'étalonnage : l'étalonnage externe et l'étalonnage interne. Les résultats d'études ont montré que la méthode d'analyse la plus fiable est la VC par étalonnage externe en utilisant l'ECV.

L'EPC non modifiée n'a pas réussi à suivre la cinétique de la biodégradation à cause de son problème d'empoisonnement (ou passivation) au-delà de 0,6 g/l.

La biodégradation du PAP par *Scedosporium dehoogii* obéit à une cinétique du premier ordre (k (37°C) = 0,21 j⁻¹ et $t_{1/2}$ = 3,3 jours).

Références

- [1] N. Chèvre, S. Erkman. (2011). Alerte aux micropolluants : Pesticides, biocides, détergents, médicaments et autres substances chimiques dans l'environnement.
- [2] P. Fanjul-Bolado, P.J. Lamas-Ardisana, D. Hernandez-Santos, A. Costa-Garcia . *Anal Chim. Acta* (2009) 638:133.
- [3] H. Xiong, H. Xu, L. Wang, S. Wang. *Microchim. Acta*. (2009), 167:129.
- [4] J. Forshed, F.O. Andersson, and S. P. Jacobsson. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29. (2002), 495.
- [5] A. Yesilada, H. Erdogan, and M. Ertan, *Anal. Lett.* 24 (1991) 129.
- [6] I. Touitou. Pharmacologie. Masson, Paris, 8è édition, (1997).
- [7] J .Johnston, P. Savarie, T .Primus, J.Eisemann, J .Hurley, D .Kohler, *Environ. Sci. Technol*, vol. 36, no 17, (2002), p. 3827' 33.
- [8] A. Claude, R.L. Alexandre. Les médicaments : nouveaux contaminants de l'environnement, Risques et santé vol 5, n°4 (2006) p.320-324
- [9] Environmental science & technology. ISSN 0013-936X. *Environmental science and technology*, vol. 40, n°2, (2006) p. 516-522.
- [10] C. Baird, Environmental Chemistry, W.H. Freeman and company, New York, (1995).
- [11] S.E. Manahan. *Environmental Chemistry*, 6ème édition, Lewis Publishers, (1994).
- [12] J.S. Meyer. *Marine Environ. Res*, 53 (2002) 423.
- [13] N. Ghosh. *Biomed Environ. Sci.*, 5(3) (1992) 236.
- [14] D. Purves. *Wakeman, Elsevier*.
- [15] A. Rougeron. (2013). Distribution dans la mucoviscidose et écologie des différentes espèces du complexe *Scedosporium apiospermum*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, France.
- [16] M.Pontie, G. Thouand, F. De Nardi, I. Tapsoba, S. Lherbette, Antipassivatingelectrochemical process of glassy carbon electrod to the oxidation of nitrophenol compounds, *Electroanalysis*, (2011), 1579-1584.
- [17] M.A El Mhammedi, M. Bakasse, A. Chtaini, *Electroanalysis*, 19 (16) (2007) 1727-1733
- [18] A. Zarouali, S. El Qouatli, A. Bellochou, M. Boulghalat, A.Gamouh, R. Najih, A. Chtaini, Electrochemical Study of the Capacity of *Moringa Oleifera* to Chelate p-Aminophenol, (2015), 15 (5), 0975-5888.

CHAPITRE III : Etudes Electrochimiques Et Activité Antioxydante Des Systèmes Hétérocycliques Nitrés

Introduction

Cette partie a été réalisée au Laboratoire de Chimie Organique et Analytique et au laboratoire d'électrochimie moléculaire et matériaux inorganiques en collaboration avec l'équipe d'Oncologie Expérimentale et de Substances Naturelles, Immuno-pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, à l'Université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal.

Le chapitre est constitué de trois volets.

- La synthèse organique des molécules hétérocycliques nitrée à partir du méthoxy-naphtalène **1** et le naphthalen-2-ol **2**, en employant le nitrate de bismuth penthydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$).
- L'analyse électrochimique des molécules nitrées produites, ainsi que les molécules mères. L'électrode choisie, dans notre cas, est l'électrode à pâte de carbone CPE. Cette électrode n'est pas jetable, n'est pas couteuse et se caractérise par un renouvellement immédiat de sa surface, ce qui permet de résoudre le problème de la passivation rencontré au niveau des autres électrodes.
- Après l'analyse électrochimique des molécules nitrées, une étude biologique a été réalisée. Dans cette partie on a effectué une analyse de l'activité anti-oxydante des molécules mères et des molécules organiques nitrées, afin de comparer l'effet de la nitration sur le pouvoir anti-oxydant.

I. Etude bibliographique

I-1. La nitration des molécules organiques

La nitration est importante pour deux raisons: premièrement, parce que c'est le procédé le plus général pour la préparation de composés nitrés aromatiques; deuxièmement, à cause du rôle qu'elle a joué dans le développement de la chimie organique. Elle présente un intérêt en raison de ses propres caractéristiques en tant que substitution électrophile.

La première nitration à signaler était celle du benzène qui est découvert en 1825. En 1834, Mitscherlich prépara le nitrobenzène en traitant le benzène par l'acide nitrique fumant.^[1]

L'acide sulfurique était un composant utile car il élimine l'eau qui autrement diluerait l'acide nitrique. Les nitrations par l'acide mixte ont été utilisées pour la première fois à l'échelle industrielle par Mansfield en 1847.^[2]

La nitration est l'une des réactions les plus anciennes et les plus importantes dans la synthèse organique. C'est une réaction clé pour la production de colorants, de matières plastiques et des réactifs chimique de base.^[3] La nitration classique est généralement réalisée en milieu fortement acide, tel que l'acide nitrique et l'acide sulfurique concentré.^[3,4] Cette méthode est associée à de nombreux inconvénients, qui sont dus à une perte excessive d'acide. Cette perte est nuisible à l'environnement, en outre son traitement est difficile, avec un coût exorbitant.

A cause de ces problèmes associés aux acides mixtes, des méthodes alternatives ont fait l'objet de recherches. Dans ce cas, divers agents de nitration ont été étudiés dans des différentes conditions.^[5]

La plupart de ces agents présentent des inconvénients, comme la régiosélectivité de la nitration et l'oxydation de substrats compétitifs.^[6] Par conséquent, il existe un besoin pour le développement de nouvelles méthodes de nitration des composés aromatiques. Dans ce travail, nous présentons un protocole efficace et facile à utiliser pour la nitration des aromatiques. Ceci est réalisé en présence du nitrate de bismuth ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), qui est un réactif largement utilisé dans la synthèse organique. Il est mieux connu comme un oxydant polyvalent ^[7,8]. En plus, il est employé comme acide faible de Lewis dans diverses transformations, et souvent sous irradiation micro-ondes.^[9] Malgré une large application dans

la synthèse organique, l'utilité de nitrate de bismuth, comme un agent de nitration, est relativement inexploré et peut-être sous-estimé.

Des études antérieures ont montré que le nitrate de bismuth ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) est efficace pour la nitration des composés phénoliques en présence d'un acide de Lewis, dans des solvants organiques et sous irradiation micro-onde. ^[10] D'autres auteurs ont étudiés la nitration d'arènes en présence de nitrate de bismuth et d'un catalyseur comme la silice. En outre, les conditions opératoires utilisant la silice avec l'acide sulfurique, et la silice dans le THF comme solvant sous micro-onde, ont été décrites dans la littérature. ^[11, 12]

De notre part, nous avons employé le nitrate de bismuth penthydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), en présence de la silice. Dans ce cas, plusieurs essais ont été effectués sur le 2-méthoxynaphtalène **1**, tout en faisant varier les quantités des réactifs (voir tableau 1). Tous les produits nitrés ont été caractérisés par les méthodes spectroscopiques usuelles (spectrométrie de la masse et de la RMN ^1H , ^{13}C).

Plusieurs chercheurs ont montrés l'utilité de la détection des produits organiques nitrés par des méthodes physico-chimiques. Dans la littérature, les électrodes de carbone vitreux ECV et microélectrode à fibre de carbone CFME, représente les principaux capteurs électrochimiques utilisés dans les analyses de suivi de ces composés nitrés, tels que le Methyl-parathion (MPT), para-nitrophenol (PNP) et o-nitrophenol (o-NP). Ce choix est dû à leurs qualités de sélectivité, efficacité, stabilité et reproductibilité. ^[13-15]

Afin d'augmenter la sensibilité de détection des composés nitrés, une modification de la surface des électrodes citées ci-dessus a été effectué. Pourtant un problème d'empoisonnement de l'électrode est survenu, à une concentration donnée des micropolluants, qui représente la limite de détection des électrodes utilisées. Ce problème est résolu par l'électrode de type EPC, dont la surface est effaçable, ce qui permet le renouvellement de l'électrode après chaque manipulation.

Les sites actifs sont à leur tour renouvelés.

I-2.Oxydants et antioxydants

I.2.1. Les radicaux libres

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 apparier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur) ^[16,17].

En 1954, Gilbert et Gerschman désignent pour la première fois les radicaux libres comme responsables de processus de dégradation au sein des cellules biologiques ^[18]. Peu après, Harman montre la participation des radicaux libres dans des événements physiologiques majeurs, particulièrement au cours du processus du vieillissement ^[19,20]. 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_2O_2), le peroxynitrite ($ONOO^-$) ou l'acide hypochloreux ($HClO$).

I.2.2. Les antioxydants

L'activité antioxydante définit la capacité d'un organisme à se protéger contre les radicaux libres.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques.

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. Les systèmes antioxydants peuvent être divisés en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques.

I.2.3. Les antioxydants enzymatiques

Les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des espèces réactives oxygénées (ERO). Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux vital (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ERO, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser.

La superoxyde dismutase (SOD) est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée.^[21] L'absence de cette enzyme peut être létale.

La catalase est une enzyme qui contient du fer. Elle est concentrée dans le foie.^[22] Elle réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène et de l'eau et leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier.^[23]

I.2.4. Les antioxydants non enzymatiques

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les exogènes (vitamines, oligoéléments, ou antioxydants de synthèse). Parmi les antioxydants apportés par l'alimentation on retrouve la vitamine E, une substance liposoluble, antioxydant majeure, qui agit par rupture de la réaction en chaîne (peroxydation lipidique) au niveau des membranes cellulaires.^[24] D'autres vitamines jouent un rôle d'agents réducteurs : la vitamine C^[25] ainsi que le β - Carotène précurseur de la vitamine A et qui a les mêmes fonctions que la vitamine E.^[26] Les micronutriments sont aussi des éléments indispensables à l'activité d'enzymes antioxydantes tels que les superoxydes dismutases pour lesquels le zinc joue un rôle structurale et le cuivre un rôle antioxydant.^[27]

II. Matériels et méthodes

II.1. Méthodes synthétiques générales

Tous les réactifs ont été achetés à des fournisseurs commerciaux et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisés sur un appareil de type « AVANCE 300MHz de BRUKER ». (CNRST RABAT)

Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en partie par million (ppm) par rapport aux références internes appropriées à chaque type de solvant:

✓ Pour le proton: Au tétraméthylsilane pris comme référence interne pour les spectres effectués dans le chloroforme deutéré (CDCl_3).

Signal du solvant résiduel (2,50 ppm) dans le DMSO-d_6 .

✓ Pour le carbone: CDCl_3 (raie centrale à 77,16 ppm).

DMSO-d_6 (raie centrale à 39,52 ppm).

Les constantes de couplages (J) sont exprimées en Hertz (Hz) et la multiplicité est représentée de manière suivante: singulet (**s**), doublet (**d**), doublet dédoublé (**dd**), triplet (**t**), quadruplet (**q**), multiplet (**m**), singulet large (**br**).

Les points de fusion non corrigés, sont pris au banc Kofler ou dans un tube capillaire au moyen d'un appareil Buchi.

La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été effectuée sur des plaques commerciales de silice (aluminium recouvert d'une couche de silice de 0,2 mm d'épaisseur et contenant un indicateur fluorescent sensible aux UV ayant une longueur d'onde de 254 nm).

La révélation se réalise au moyen d'une lampe ultra-violet à 254 et 365 nm puis par le diiode.

Les solvants des réactions utilisés sont de qualité analytique, sauf les solvants de la chromatographie sur colonne (hexane et acétate d'éthyle) sont distillés par une distillation simple.

Le chauffage des mélanges réactionnels s'effectue à l'aide d'un bain de sable.

II.2. Matériels et méthodes électrochimiques

II.2.1. Elaboration de l'EPC.

L'EPC utilisé dans ce chapitre est une électrode à pâte de carbone de surface renouvelable, elle a plusieurs avantages par rapport à celles exploitées durant les études expérimentaux du 2^{ème} et 4^{ème} partie.

- Utilisation immédiate après fabrication (Temps de séchage inutile vu la mode de préparation de la pâte de carbone).
- Utilisation multiple jusqu'à 30 électrodes (le renouvellement de la surface et effectué en marquant trois traits sur une feuille blanche).

L'EPC a été élaboré selon le protocole suivant : La poudre de carbone graphite a été mélangée avec l'huile de paraffine à des proportions antérieurement définies, la pâte obtenue est insérée dans la cavité de l'électrode de $0,126 \text{ cm}^2$ de section, une tige de carbone est utilisée pour assurer la conduction électrique.



Figure III-1 : Electrode à pâte de carbone de surface renouvelable

II.2.2. Dispositif électrochimique

Les techniques électrochimiques sont des outils d'analyse classiques très utiles en chimie analytique pour leurs facilités d'emploi. Dans la présente étude, nous avons utilisé comme appareil de mesure, un potentiostat Palemsens Em-Stat (figure III-2). Ce potentiostat est relié à une cellule électrochimique constituée de trois électrodes : électrode de référence (ECS), électrode de travail (EPC) et la contre électrode (fil de platine).

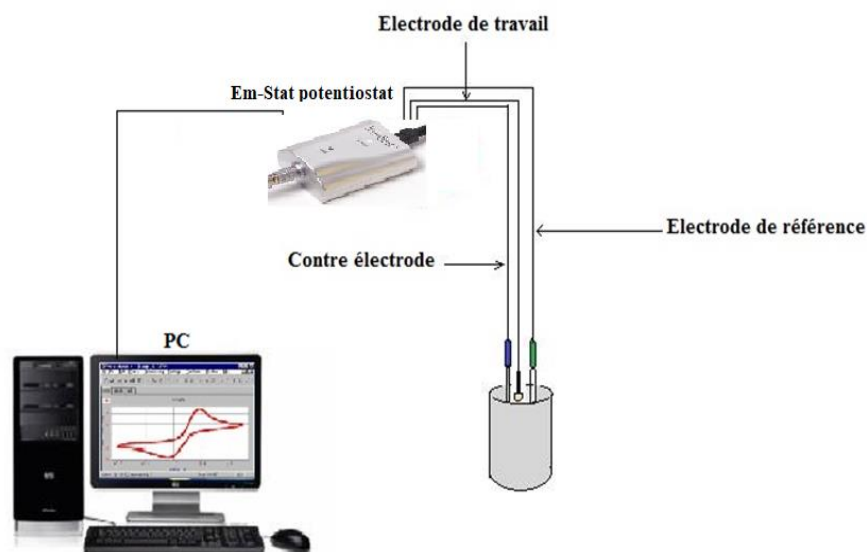


Figure III-2 : Dispositif électrochimique à trois électrodes avec le potentiostat

Cet appareil donne des résultats fiables, précis et sélectifs. Il peut servir à la détermination de plusieurs éléments dans la même matrice, ainsi il peut être employé pour la détection des pesticides, des métaux lourds et des résidus médicamenteux dans l'environnement.

Suivant la nature des espèces électro-actives et le type d'informations recherchées au cours d'une analyse, on peut faire appel à une méthode électrochimique appropriée. La méthode électrochimique utilisée pour ce travail est la Voltammétrie Cyclique (VC).

II.3. Méthodes analytiques utilisées pour évaluer l'activité antioxydant

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante. Les méthodes les plus utilisées généralement pour déterminer la capacité antioxydante sont divisées en deux groupes importants: Méthode du radical libre DPPH et méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

II.3.1. Méthode du radical libre DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques.^[28,29] Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Schéma

1). DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

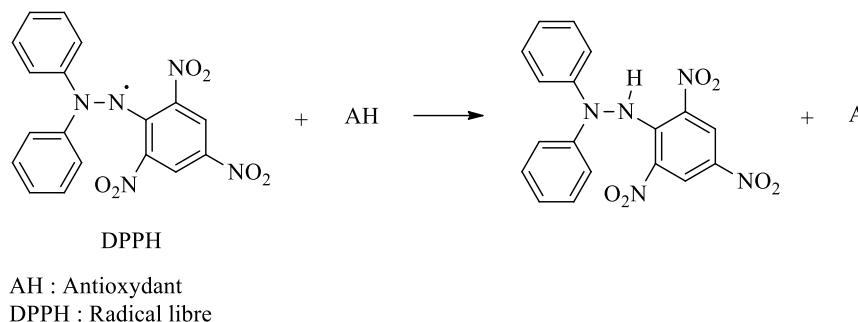


Schéma III-1 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Plus le composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène plus il est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est inversement proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration nécessaire d'un composé pour faire disparaître de 50% le DPPH à l'équilibre est connue comme la IC₅₀. De point de vue méthodologique, le test du DPPH présente l'avantage d'être rapide et reproductible.

Le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant les groupements SH, NH ou OH. Il s'effectue à température ambiante et permet ainsi d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

II.3.2.Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité anti-oxydante. La réduction du Fe³⁺ est souvent employée pour étudier la capacité d'une substance à donner les électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action anti-oxydante.^[30] Le pouvoir réducteur est basé sur la transformation de Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺ en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des électrons. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

III. Résultats et discussions

III.1. Synthèse des molécules organiques nitrées

III.1.1. Réaction de nitration du méthoxy-naphtalène par le nitrate de bismuth penta-hydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Le 2-méthoxynaphtalène (0,5 g, 3,164 mmol) et la silice (500 mg) ont été ajoutés à une suspension, dans du CH_2Cl_2 (20 ml), de 1,2 équivalents de nitrate de bismuth penta-hydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (1,84 g ; 3,797 mmol). Le mélange a été chauffé à reflux pendant 6 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange réactionnel a été filtré et lavé avec du CH_2Cl_2 , le filtrat obtenu a été concentré, et le résidu résultant a été purifié par chromatographie sur colonne en utilisant EtOAc-hexane (1: 9 v / v). Les produits ont été obtenus (**1.a**, **1.b** et **1.c**) avec un rendement global de 99 %.

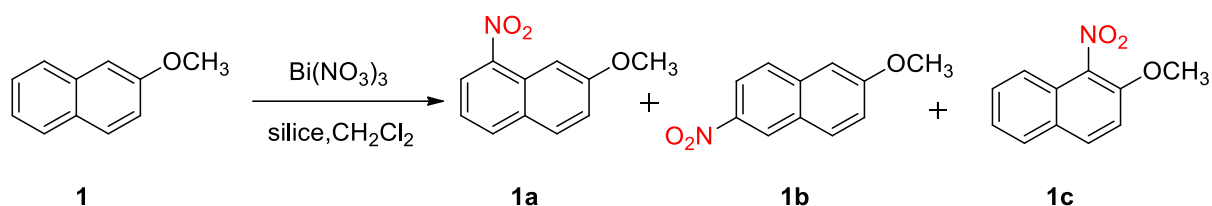


Schéma III-2 : Réaction de nitration du méthoxynaphtalène par le nitrate de bismuth penta-hydraté ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Tableau III-1 : Différents essais de nitration de 2-méthoxynaphtalène par différentes quantités de ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) .

Entrée	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (éqv)	Silice (éqv)	Temps	Rdt%(1a/1b/1c)
1	0,5	1	6h	12/14/57
2	0,95	1	6h	10/9/80
3	1,2	1	6h	7/18/74
4	2	1	4h	12/11/64
5	3	1	4h	11/9/48

Les résultats montrent que la nitration de 2-méthoxynaphtalène a donné 3 produits nitrés avec des rendements variables.

Les analyses spectrales confirment que nous obtenons les mêmes produits nitrés indépendamment de la quantité du réactif utilisé. L'augmentation du nombre d'équivalent de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ conduit à une diminution du temps et du rendement de la réaction. Nous avons aussi constaté que la quantité de réactif n'a aucune influence sur la régiosélectivité des réactions.

Par la suite, nous avons tenté la technique d'irradiation micro-ondes et celle du tube scellé pour améliorer les conditions opératoires et conforter les résultats déjà constatés dans le cas d'un chauffage conventionnel, nous avons obtenu les mêmes résultats sauf que la réaction sous irradiations micro-ondes nécessite des temps de réaction plus courts que ceux obtenus dans le cas de l'utilisation de chauffage conventionnel.

III.1.2. Interprétation RMN ^1H et ^{13}C des produits 1.a, 1.b et 1.c

7-Methoxy-1-nitronaphtalène 1.a: Rendement: 7%; poudre jaune ; mp 64-66 °C; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm) 8,35-8,24 (m, 2H , Ar-H), 8.07 (d, 1H, Ar-H, $J=9\text{Hz}$), 7,79 (d, 1H , Ar-H, $J=2,4\text{Hz}$), 7,52 (t, 1H, Ar-H, $J=7,8\text{Hz}$), 7,36 (dd, 1H, Ar-H, $J=9\text{Hz}$, $J=2,4\text{Hz}$), 3,90 (s, 3H, OCH_3); NMR ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm) 160,6, 145,1, 135,4, 131,2, 130,1, 126,3, 125,6, 122,7, 120,3, 101,6, 55,8.

2-Méthoxy-6-nitronaphtalène 1.b: Rendement: 18 %; poudre jaune ; mp 130-132°C; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8.89 (d, 1H, Ar-H), 8.17 (dd, 2H, Ar-H, $J=9\text{Hz}$, $J=2.4\text{Hz}$) ; 8.00(d, 1H, Ar-H, $J=9.3\text{Hz}$) ; 7.51 (d, 1H, Ar-H , $J=2.4\text{Hz}$) ; 7.34 (dd, 1H, Ar-H , $J=9.3\text{Hz}$, $J=2.7\text{Hz}$); 3.92 (s, 3H, OCH_3); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm) 160.9, 143.6, 138.1, 132.3, 128.7, 127.2, 125.0, 121.2, 120.1, 106.8, 56.1.

2-Méthoxy-1-nitronaphtalène 1.c: Rendement: 74%; poudre jaune cristalline (ref Acta Cryst E); mp 110-112°C; ^1H RMN (300 MHz, DMSO): δ (ppm) 8.20 (d, 1H, Ar-H, $J=9\text{Hz}$), 8.02 (d, 1H, Ar-H, $J=8,4\text{Hz}$), 7.71-7.47 (m, 4H, Ar-H), 4.01 (s, 3H, OCH_3); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MH): δ (ppm) 148.7, 133.1, 129.9, 128.8, 128.0, 125.6, 125.0, 119.8, 114.5, 57.6.

III.1.3. Réaction de nitration du naphthalen-2-ol par bismuth penta-hydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Le 2-naphthol (0,5 g; 3,37 mmol) et le gel de silice (500 mg) ont été ajoutés à une suspension de nitrate de bismuth pentahydrate (1,2 eq) (1,96 g ; 4,044 mmol). , dans du CH_2Cl_2 . Le mélange a été chauffé à reflux pendant 24h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange réactionnel a été filtré et lavé avec du CH_2Cl_2 , le filtrat obtenu a été concentré, et le résidu résultant a été purifié par chromatographie sur colonne en utilisant EtOAc-hexane (1: 9 v / v).

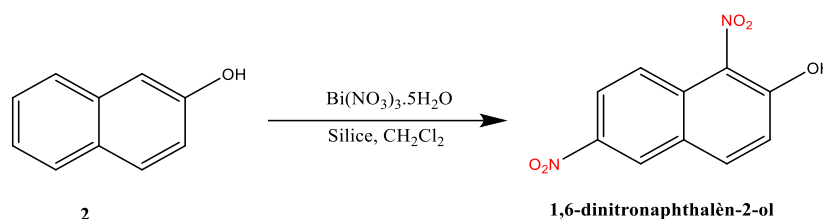


Schéma III-3 : Réaction de nitration du naphthalen-2-ol par le nitrate de bismuth penta-hydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

III.1.4. Interprétation RMN ^1H et ^{13}C du produit 2'

1,6-Dinitronaphthalen-2-ol: Rendement : 87 % ; solide orange ; mp 200-202°C; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ (ppm) 14,01 (s, 1H, OH); 9,1 (s, 1H, Ar-H) ; 8,42-8,24 (m, 2H, Ar-H,) ; 7,65 (d, 1H, Ar-H, $J = 9,3\text{Hz}$) ; 7,48 (d, 1H, Ar-H, $J = 9\text{ Hz}$). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75, 5 MHz): δ (ppm) 151,9; 143,9; 135,4; 133,5; 128,7; 125,7(2C); 122,8; 121,7; 121,2.

III.2. Caractérisation électrochimique des molécules nitrées

La caractérisation électrochimique des molécules préparées a été effectuée en deux étapes :

- *Caractérisation de la molécule mère avant sa nitration.*
- *Caractérisation des molécules produites après la nitration de la molécule mère.*

La nitration du méthoxynaphthalène a produit trois molécules qui se différencient par la position du groupement NO_2 .

- *1.a : Le groupement nitro NO_2 est en position 4.*
- *1.b : Le groupement nitro NO_2 est en position 6.*
- *1.c : Le NO_2 groupement nitro est en position 2.*

Les études électrochimiques ont été investies par voltammétrie cyclique (CV), dans une solution tampon acétique de pH= 5,2, à température ambiante et sans agitation.

La concentration détectée de ces molécules, est estimée à $8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ dans un volume de 40 ml du tampon acétique.

III.2.1. Caractérisation électrochimique de la molécule mère 1 avant sa nitration

Comme vu auparavant, l'électrode utilisée pour cette étude est l'électrode à pâte de carbone EPC, elle a été caractérisée électrochimiquement avant et après l'ajout de la molécule dans le milieu électrolytique.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure III-3.

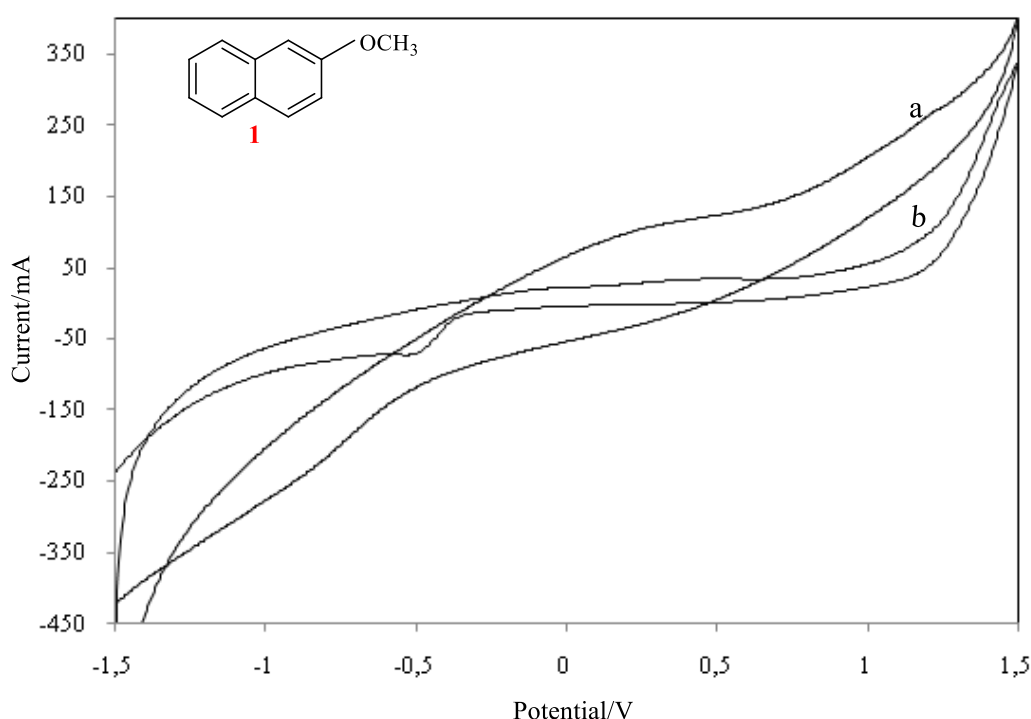


Figure III-3: Voltammogramme enregistré pour l'électrode CPE en milieu tampon acétique (1:1) avant (a) et après l'ajout du méthoxynaphthalène ($8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) (b), pH=5,2 et $V_b=100 \text{ mV s}^{-1}$.

La présence du méthoxynaphthalène dans le milieu est caractérisée par l'apparition d'un pic de réduction vers environ -0.5V, ce pic isolé correspond à la réduction irréversible du méthoxynaphthalène.

III.2.2. Caractérisation électrochimique des molécules nitrées produites de la molécule mère 1

a) Caractérisation électrochimique de 7-méthoxy-1-nitronaphtalène 1.a

La molécule **1.a** a été mélangée avec la pâte de carbone sous forme de poudre, l'électrode obtenue est introduite dans la cellule de mesure contenant la solution tampon.

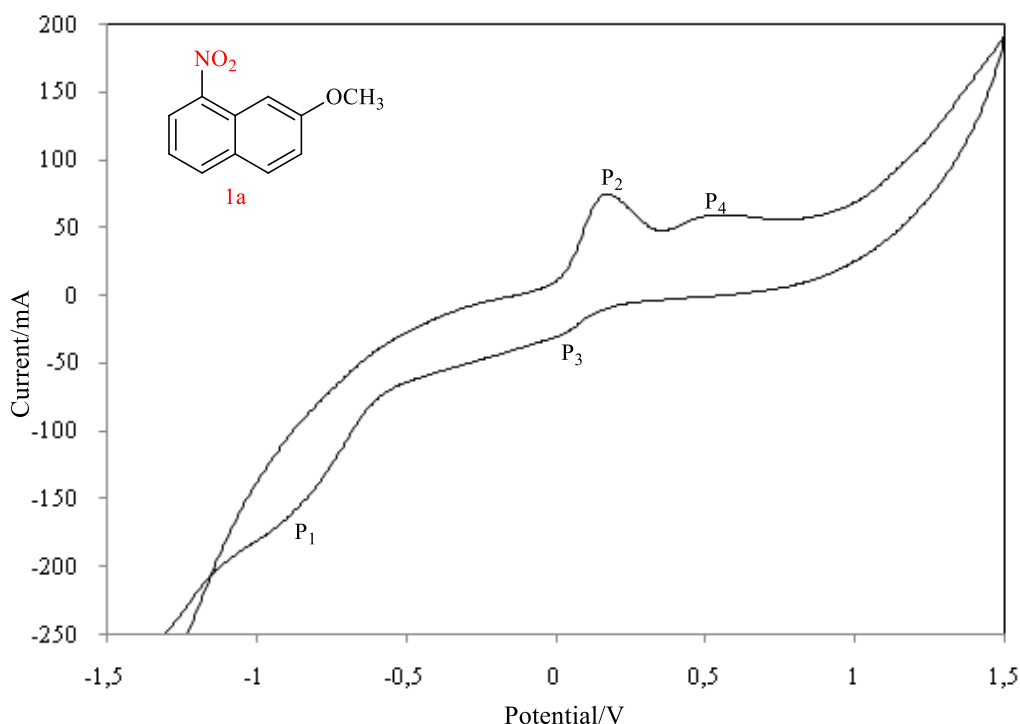


Figure III-4: Voltammogramme VC enregistré pour l'électrode CPE modifiée par la molécule 1.a. en milieu tampon acétique (1:1), pH=5,2 avec une Vb=100 mV s⁻¹.

La figure III-4 montre le voltammogramme enregistré par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule **1.a** (NO₂ en position 4), à la vitesse de balayage de 100 mV s⁻¹, en milieu tampon acétique. Nous constatons, au premier balayage, dans le sens du potentiel négatif, la présence d'un pic de réduction P₁ au potentiel -0,815V/ECS et un pic d'oxydation P₂ dans le sens du balayage positif au potentiel + 0,13V/ECS. Le deuxième cycle montre un pic de réduction P₃ au potentiel +0,09V/ECS au balayage cathodique et le pic P₂ déjà obtenu au balayage anodique précédent. Le pic P₁ est irréversible et les pics P₂ et P₃ représentent un phénomène d'oxydoréduction réversible. Le P₄ est le pic d'oxydation du groupement méthoxy (-OCH₃). La détection électrochimique de **1.a** repose sur deux systèmes d'oxydoréduction. En effet, dans un premier temps il se réduit d'une façon irréversible, selon l'équation (1). Le

produit de cette première réduction (R-NHOH) s'oxyde réversiblement selon l'équation (2).^[13]

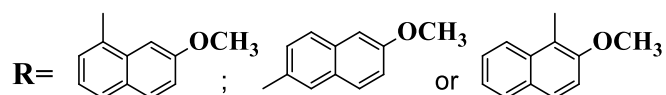
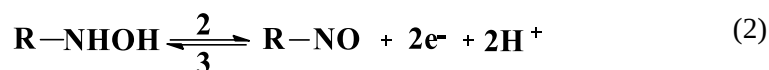
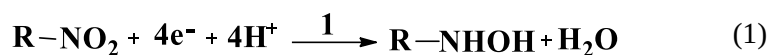


Schéma III-4 : Mécanisme réactionnel d'oxydo-réduction du groupement nitro (-NO₂)^[13]

b) Caractérisation électrochimique de 2-méthoxy-6-nitronaphtalène 1.b

Le voltammogramme enregistré par l'électrode à pâte de carbone modifiée par la molécule **1.b** (figure III-5) montre le même comportement enregistré pour la molécule **1.a** avec un déplacement des potentiels des trois pics caractéristiques de l'oxydo-réduction du groupement nitro (NO₂) qui est dû à la position du groupement nitro (NO₂) par rapport au groupement méthoxy (-OCH₃). Nous observons que le pic de réduction P₃ est moins visible pour cette molécule.

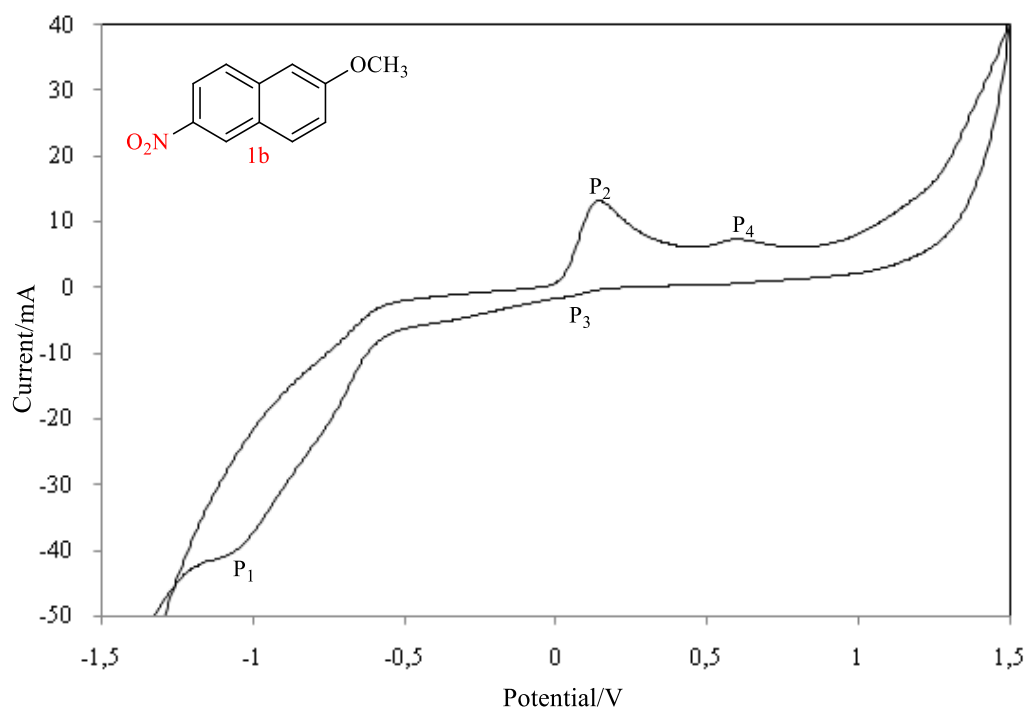


Figure III-5 : Voltammogramme VC enregistré pour l'électrode CPE modifiée par la molécule **1.b** en milieu tampon acétique (1:1), pH=5,2 et avec une $V_b=100 \text{ mV s}^{-1}$.

c) Caractérisation électrochimique de 2-méthoxy-1-nitronaphtalène **1.c**

Le voltammogramme ci-dessous (figure III-6) présente la réponse électrochimique du composé **1.c** obtenu par l'électrode EPC. Nous observons un déplacement des potentiels des trois pics caractéristiques du groupement nitro de la molécule **1.c** par rapport aux deux autres molécules vu auparavant (**1.a** et **1.b**). Par contre les pics du couple rédox (NHOH/NO) sont plus visibles pour celle-ci.

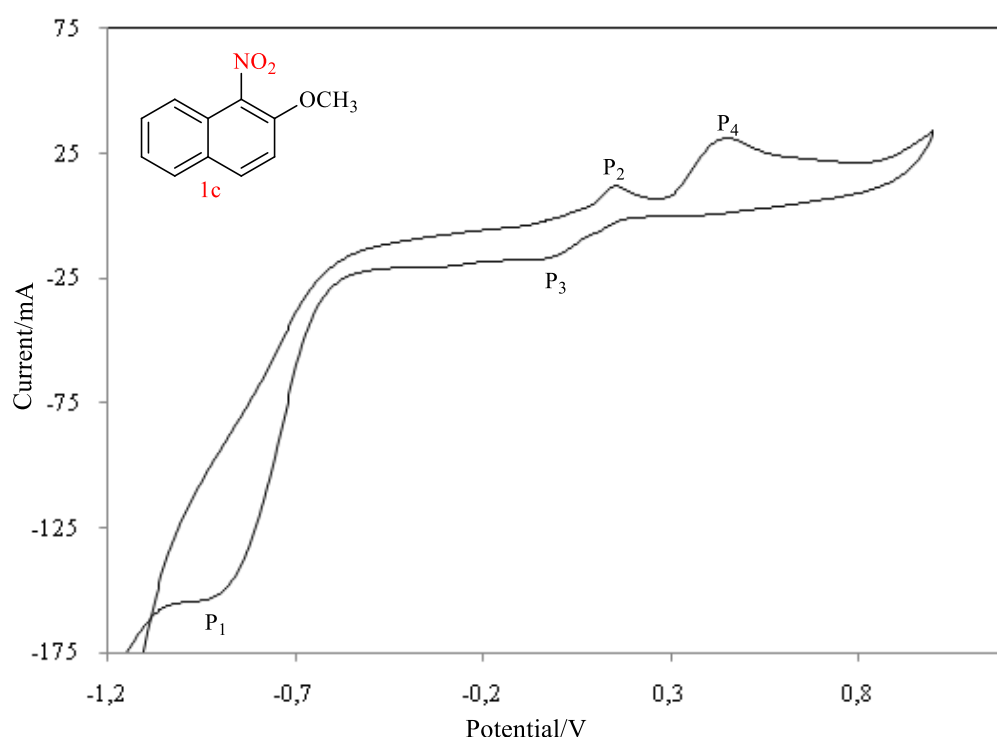


Figure III-6: Voltammogramme VC enregistré pour l'électrode CPE modifiée par la molécule **1.c** en milieu tampon acétique (1:1), pH=5,2 et avec une $V_b=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Bilan des résultats

Tableau III-2 : Les potentiels des trois pics pour chaque molécule nitrée

Molécule	1.a	1.b	1.c
Ep₁ (V)	-0,815	-1	-0,87
Ep₂ (V)	+0,13	+0,105	+0,03
Ep₃ (V)	+0,09	+0,11	+0,11

III.2.3. Caractérisation électrochimique de la molécule nitrée produite 2' et de la molécule mère 2

a) Caractérisation électrochimique de naphthalène-2-ol 2

Dans cette étude, nous avons procédé à la nitration de deux molécules dérivées du naphthalène, la différence entre ces deux molécules réside au niveau du groupement lié à chaque molécule. La première molécule possède un groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3$) et la deuxième molécule contient un groupement (OH).

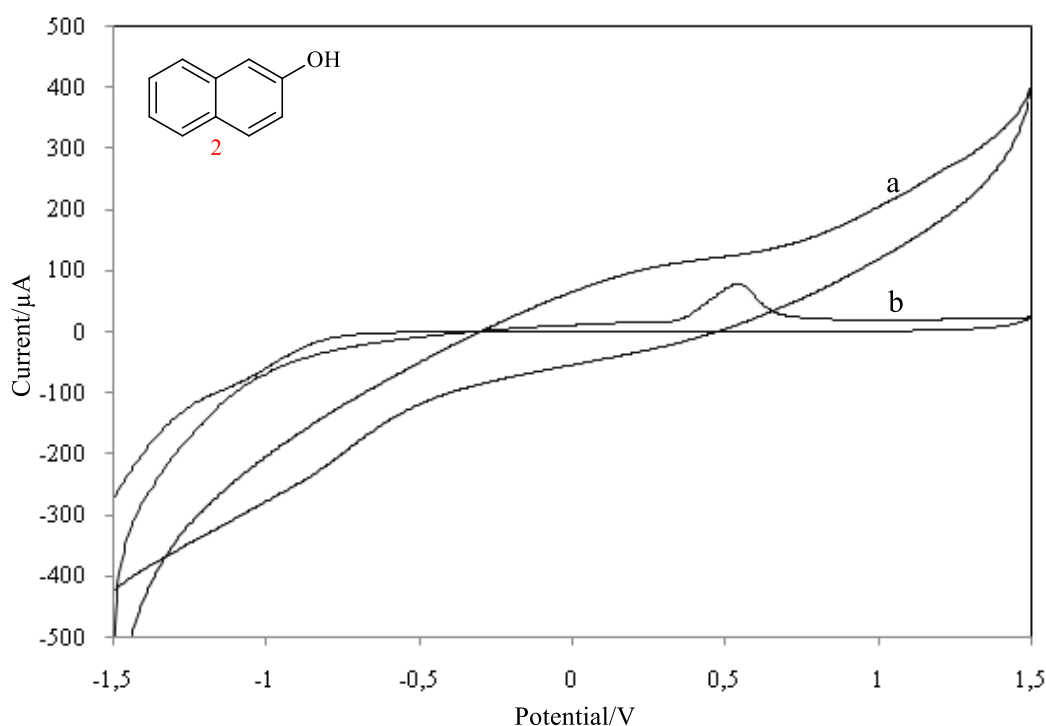


Figure III-7 : Voltammogramme VC enregistré pour l'électrode CPE modifiée par la molécule 2 en milieu tampon acétique (1:1), pH=5,2 et avec une $V_b=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Contrairement au 2-méthoxynaphtalène qui ne montre aucun pic d'oxydoréduction (figure III-3), la caractérisation de 2-naphtol présente un pic d'oxydation au niveau du potentiel 0,5 V (figure III-7).

b) Caractérisation électrochimique de 1,6-dinitronaphtalène-2-ol 2'

La figure III-8 illustre la réponse électrochimique de la molécule 2' obtenu pour l'électrode EPC.

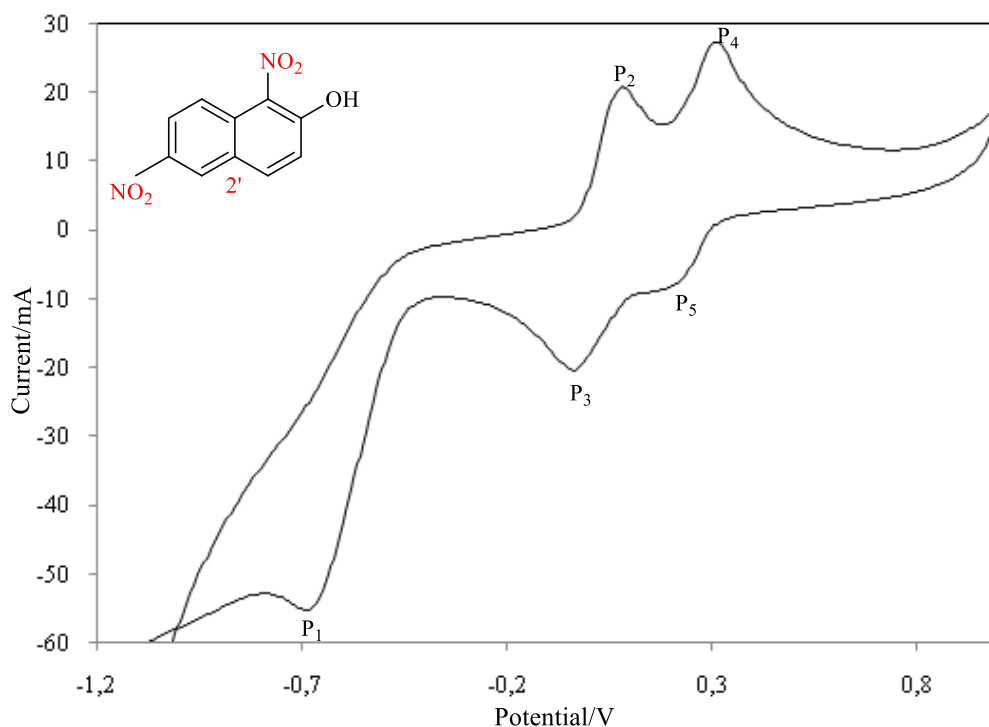


Figure III-8 : Voltammogramme VC enregistré pour l'électrode CPE modifiée par la molécule **2'** en milieu tampon acétique (1:1), pH=5,2 et avec une $V_b=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Nous observons que les pics P₁, P₂ et P₃ sont encore plus fins par rapport à ceux des molécules **1.a**, **1.b** et **1.c**. Nous remarquons aussi la présence d'un seul pic de réduction P₁ au potentiel -0,66V/ECS qui caractérise la réduction des deux groupements nitro (NO₂), par contre nous avons deux couples rédox (P₂, P₃) et (P₄, P₅) qui caractérisent l'oxydo-réduction des groupements (NHOH/NO).

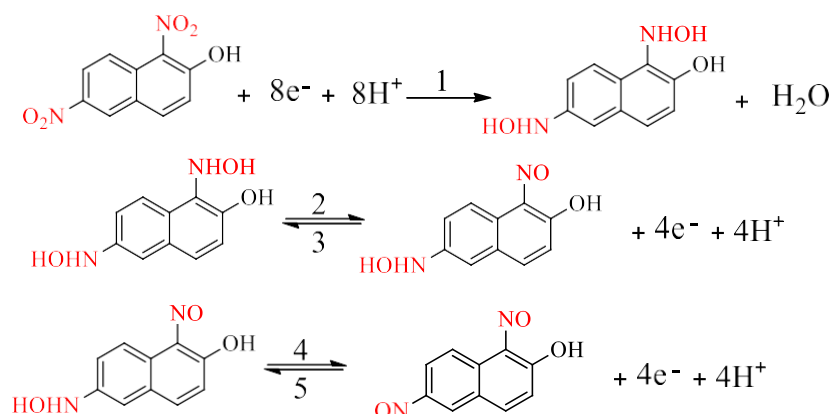


Schéma III-5 : Mécanisme réactionnel d'oxydo-réduction du groupement nitro (-NO₂) de la molécule 2', [13]

Bilan des résultats

Tableau III-3 : Les potentiels des trois pics de la molécule nitrée 2'.

Molécule	2'
Ep ₁ (V)	-0,66
Ep ₂ (V)	+0,05
Ep ₃ (V)	-0,01
Ep ₄ (V)	+0,28
Ep ₅ (V)	+0,05

D'après les tableaux III-2 et III-3 nous remarquons que les potentiels des trois pics caractéristiques de l'oxydo-réduction du groupement nitro sont compatibles aux résultats vus dans la bibliographie. [13]

III.2.4. Caractérisation électrochimique de l'acide ascorbique

Pour étudier le pouvoir antioxydant des molécules nitrées synthétisées ainsi que les molécules de départ, et afin d'avoir une large vision sur le lien entre l'oxydoréduction de ces molécules et leurs pouvoirs antioxydant, nous avons tracé le voltammogramme cyclique de l'acide ascorbique (figure III-9) qui présente une activité antioxydante importante.

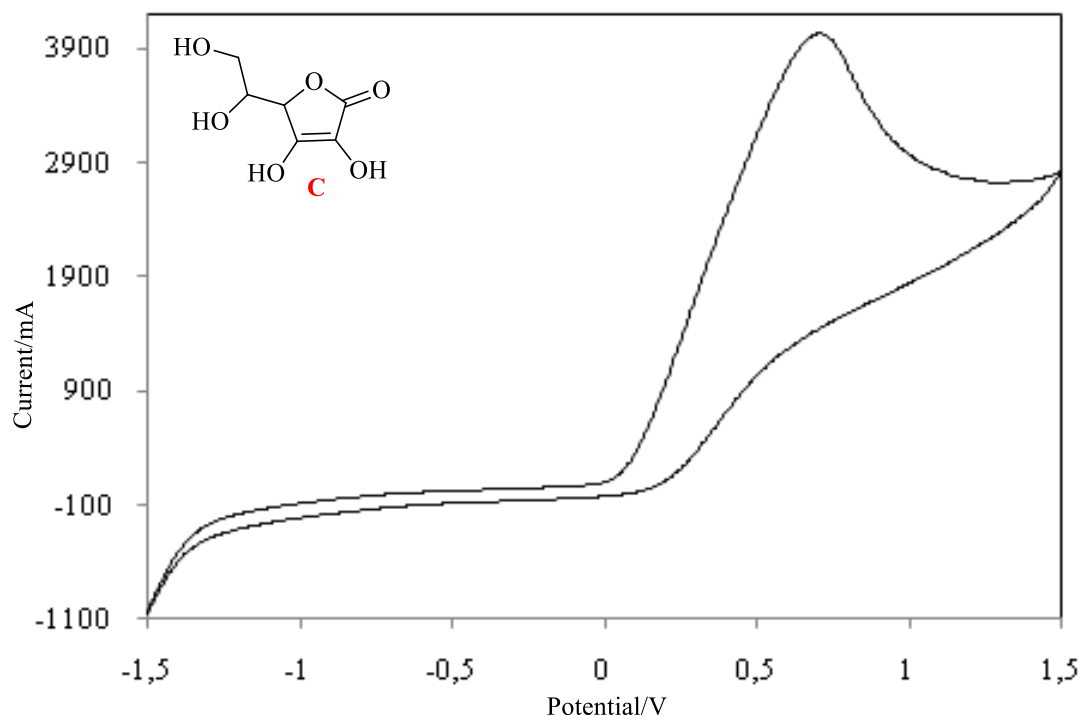


Figure III-9: Voltammogramme VC enregistré pour l'électrode CPE en milieu tampon acétique (1:1) avec l'acide ascorbique ($8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) (b), pH=5,2 et $V_b=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Sur le voltammogramme cyclique de l'acide ascorbique apparait un pic d'oxydation au potentiel 0,7 V/ECS.

III.3. Etude biologique des composés aromatiques nitrés

Cette partie a été réalisée en collaboration avec l'équipe d'Oncologie Expérimentale et de Substances Naturelles, Immuno-pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, à l'Université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal.

III.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Les potentiels de balayage des radicaux libres des composés synthétisés et de l'acide ascorbique à différentes concentrations ont été évalués à l'aide de la méthode DPPH.

La solution standard de la vitamine C (contrôle positif) est de 1 mg/100 μl de méthanol. Une solution de DPPH (1 mg/25 ml de méthanol) est préparée comme témoin.

Dans des plaques de 96 puits, les produits sont solubilisés dans un volume approprié

du DMSO pour avoir une concentration de 20 mg/ml. Dans des plaques de 96 puits, 16 µl de la solution de chaque produit et 16 µl de la vitamine C (10 mg/ml) sont ajoutés au méthanol pour avoir un volume final de 200 µl. En suite 100 µl sont transférés dans le puits suivant contenant 100 µl du méthanol (dilution 1/2). La même procédure est répétée pour réaliser les dilutions en cascades 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128. Après quoi, 150 µl de DPPH (1mg/25 ml méthanol) sont ajoutés dans chaque puits contenant 100 µl du mélange puis incubé 30 minutes dans l'obscurité à 37°C. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 517 nm. Le blanc est un mélange du méthanol et le réactif DPPH dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés comme étant le pourcentage de l'activité anti radicalaire.

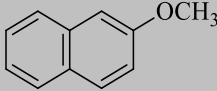
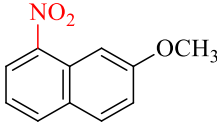
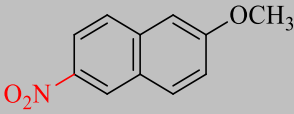
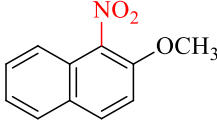
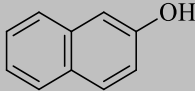
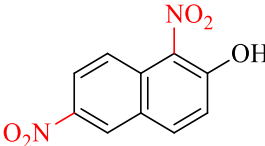
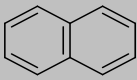
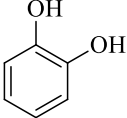
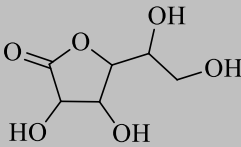
A noter, que pour certains produits, une dilution préalable de 1/30 dans du DMSO était nécessaire à cause de leur fort effet antioxydant. L'activité de piégeage des radicaux a été exprimée en pourcentage de neutralisation du radical DPPH selon la relation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'échantillon})}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

La valeur de l'IC₅₀ déterminée à partir du graphique tracé de l'activité de piégeage en fonction des différentes concentrations de chaque produit, est définie comme la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration de radicaux DPPH initiale.

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité antioxydante des produits nitrés sont rassemblés dans le Tableau III-4 ci après.

Tableau III-4: L'IC₅₀ (exprimé en µg/ml) des composés testés pour leur activité antioxydante

Molécules	Structure	Nomenclature	IC ₅₀ Value (µg/ml)
1		Méthoxy-naphthalène	>1600
1.a		7-méthoxy-1-nitronaphthalene	>1600
1.b		2-méthoxy-6-nitronaphthalène	>1600
1.c		2-méthoxy-1-nitronaphthalène	>1600
2		2-naphthol	50 ± 4
2'		1,6-dinitronaphthalèn-2-ol	>1600
A		Naphthalène	>1600
B		benzendi-1,2-ol	20 ± 2
C		acide ascorbique: vitamine C	5 ± 0.5

Les antioxydants réagissent avec le DPPH en se convertissant en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine. Le degré de décoloration indique les potentiels de récupération des composés antioxydants. Les résultats ont montré que le 2-naphtol **2** réduisait le radical DPPH de manière dépendante de la dose, et que la IC₅₀ était respectivement de 50 µg/ml et 20 µg/ml. Il est à

noter que ce composé phénolique est aussi actif que l'acide ascorbique standard ($IC_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$) utilisé.

Après la nitration du 2-naphtol en positions 1 et 6 par le réactif $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, le 1,6-dinitronaphtalène-2-ol, était totalement inactif sur le radical DPPH (Tableau 16), même aux concentrations les plus élevées (1,6 mg/ml). Comme prévu, les composés nitrés dérivés de 2-méthoxynaphtalène n'ont pas pu réagir positivement avec le radical DPPH dans nos conditions d'expérience.

L'analyse des résultats électrochimiques et biologiques obtenus montre que, les propriétés antioxydantes sont basées sur le principe suivant : la molécule a un pouvoir antioxydant, si elle possède des propriétés oxydantes plus fortes que la molécule ayant le radical libre.

Nous déduisons donc que les molécules ayant à la fois des propriétés oxydantes et des propriétés réductrices réversibles (composés **1.a**, **1.b**, **1.c** et **2'**) ne possèdent pas de pouvoir antioxydant.

Le 2-naphtol et l'acide ascorbique présentent des propriétés antioxydantes potentielles, ces molécules possèdent des propriétés oxydantes plus fortes que celle de la molécule cible, ce qui obéit au principe cité ci-dessus.

Conclusion

La première partie de ce travail a été consacré à la synthèse organique de nouvelles molécules organiques nitrées (**1.a**, **1.b**, **1.c** et **2'**) à partir des molécules mères (1: méthoxy-naphtalène et 2: naphtalène-2-ol). Le choix de ces deux molécules de départ est dû à leur structure chimique voisine.

Elle se diffère uniquement au niveau du groupement fonctionnel:

- La molécule **1** présente un groupement méthoxy (-OCH₃).
- La molécule **2** ayant un groupement hydroxide (-OH).

L'objectif de ce travail est l'étude du pouvoir antioxydant des molécules 1 et 2, avant et après la nitration. Dans le but de déterminer l'effet du changement du groupement fonctionnel ainsi que la nitration des molécules de départ sur leur pouvoir anti-oxydant.

Afin d'avoir une large vision sur ce travail, on a rajouté l'étude électrochimique de la vitamine C.

Les propriétés anti-oxydantes ont été étudiées par deux voies:

- Voie électrochimique.
- Voie biologique.

La voie électro-chimique consiste à déterminer les propriétés antioxydantes de ces molécules en se basant sur les deux principes suivants:

- Principe 1: La molécule à un pouvoir anti-oxydant, si elle possède des propriétés oxydantes plus fortes que la molécule cible ayant le radical libre (DPPH).
- Principe 2: La molécule à un pouvoir anti-oxidant, si elle possède des propriétés réductrice plus forte que la molécule cible ayant le radical libre (DPPH).

La voie biologique consiste à déterminer le pouvoir anti-oxydant des produits chimiques à l'aide de la méthode DPPH. Les antioxydants réagissent avec le DPPH, qui est un radical azoté, et se convertissant en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine.

A la fin de ce travail nous avons déduit les conclusions suivantes :

- Les molécules ayant à la fois les propriétés oxydantes et propriétés réductrices réversibles (**1.a**, **1.b**, **1.c** et **2'**) ne possèdent pas de pouvoir antioxydant, car ils ne font pas partie d'aucun des deux principes.

- La molécule **2** possède des propriétés anti-oxydantes remarquables

- La molécule **2** possède des propriétés oxydantes plus fortes que celles de la molécule cible (DPPH), ce qui obéi à la supposition 2.

Références

- [1] Mitscherlich, E. *Ann. Phys. Chem.* **1834**, 31, 625-631.
- [2] Ward, E.R. *Chem. in Britian*, **1979**, 15, 297.
- [3] Esakkidurai, T.; Pitchumani, K. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2002**, 185, 305.
- [4] Ward, E. R. *Chem. Ber.* **1979**, 15, 297.
- [5] Nowrouzi, N.; Zareh, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 5081.
- [6] (a) Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Zolfigol, M. A. *Synth. Commun.* **1997**, 27, 3301; (b) Suzuki, H.; Takeuchi, T.; Mori, T. *J. Org. Chem.* **1996**, 81, 5944; (c) Riego, J. M.; Sedin, Z.; Zaldivar, J. M.; Marziano, N. C.; Tortato, C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 513.
- [7] Leonard, N. M.; Wieland, L. C.; Mohan, R. S. *Tetrahedron*. **2002**, 58, 8373.
- [8] (a) Mukhopadhyay, C.; Datta, A. *Catal. Commun.* **2008**, 9, 2588. (b) Baltork, M. I.; Khodaei, M. M.; Nikoofar, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 591.
- [9] (a) Alexander, V. M.; Bhat, R. P.; Samant, S. D. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6957. (b) Bandyopadhyay, D.; Maldonado, S.; Banik, B. K. *Molecules*. **2012**, 17, 2643.
- [10] (a) Amani, K.; Maleki, F. *J. Iran. Chem. Soc.* **2007**, 4, 238.; (b) Baghernejad, B.; Oskooie, H. A.; Heravi, M. M.; Beheshtiha, Y. S. *Chin. J. Chem.* **2010**, 28, 39.; (c) Bose, A.; Sanjoto, W. P.; Villarreal, S.; Aguilar, H.; Banik, B. K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3945; (d) Canales, L.; Bandyopadhyay, D.; Banik, B. K. *Org. Med. Chem. Lett.* **2011**, 1, 9.
- [11] Hajipour, A. R.; Zarei, A.; Ruoho, A. E. *Russ. J. Org. Chem.* **2005**, 41, 1493.
- [12] Badgujar, D. M.; Talwar, M. B.; Asthana, S. N.; Mahulikar, P. P. *J. Sci. Ind. Res.* **2007**, 66, 250.
- [13] Pontié, M.; Thouand, G.; De Nardi, F.; Tapsoba, I.; Lherbette, S. *Electroanalysis* **2011**, 23, No. 7, 1579-1584.
- [14] Tapsoba, I.; Bourhis, S.; Feng, T.; Pontié, M. *Electroanalysis* **2009**, 21, No. 10, 1167-1176.
- [15] Ndlovu, T.; Arotiba, O. A.; Krause, R. W.; Mamba, B. B. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2010**, 5, 1179-1186.
- [16] 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.
- [17] Halliwell B., Gutteridge J.M.C.. *Free Radicals in Biology and Medicine*. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds, (1999) : 1-543.
- [18] Gilbert L., Gerschman R.; *Perspective on the history of oxygen and life* Springer, New-York, (1981).
- [19] Harman D.; *Aging, a theory based on free radical and radical chemistry*; J. Gerontol., 11 (1956) 298-300.
- [20] Harman D.; *The aging process*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 7124-7128.
- [21] Gardès-Albert, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Abedinzadeh, Z.; Jore, D. *L'actualité chimique* **2003**, 91-96.
- [22] Tessier, F.; Marconnet, P. *Science & Sport* **1995**, 10, 1-13.

- [23] Goudable, J.; Favier, A. *Nutr.Clin. Métabol.* **1997**, *11*, 115-120.
- [24] Lecerf, J. M.; Luc, G.; Fruchart, J. C. *Rev. Med. Inter.* **1994**, *15*, 641-649.
- [25] Pincemail, J.; Meurisse, M.; Limet, R.; Defraigne, J. O. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* **1999**, *4*.
- [26] Yang, X.; Xi, C.; Jiang, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8781-87836
- [27] Favier, A. *L'actualité chimique*, **2003**, 108-115.
- [28] Blies, M. S. *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
- [29] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Lebens–Wissens. Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
- [30] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. *Anal. biochem*, **1996**, *239*, 70-76.

CHAPITRE IV : Interaction Entre l'Electrode De Pâte De Carbone, l'Amoxicilline Et Les Bactéries

Introduction

Le staphylococcus aureus est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* ^[1,2]. Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, immobile, asporulé, facultativement anaérobique, habituellement disposé en grappes et fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau ^[3]. On le trouve aussi à plusieurs endroits chez les humains : aine, aisselles, région périnéale (hommes), muqueuses, bouche, glandes mammaires, cheveux, tractus intestinal, appareil génito-urinaire et voies respiratoires supérieures ^[2,4,5]. De nombreux animaux servent de réservoirs, en particulier les vaches dont les pis sont infectées ^[6]. Il est la cause de multiples infections, qui vont de la lésion cutanée (furoncle, panaris, impétigo, etc.), à l'endocardite, la pneumonie aiguë, l'ostéomyélite ou la septicémie. Cette bactérie est une des principales causes de toxoinfections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines ^[4]. Une transmission verticale est peu fréquente durant l'accouchement par voie vaginale ^[7]. La transmission interhumaine se fait par contact avec une lésion purulente ou avec un porteur ^[3]. Le manque d'hygiène et le surpeuplement accroissent le risque d'exposition à *Staphylococcus Aureus* ^[8]. L'infection peut être transmise d'une personne à l'autre par des travailleurs de la santé ou des patients ^[3]. La colonisation nasale peut entraîner une auto-infection ^[9]. Une action préventive est donc indispensable pour réduire leurs effets néfastes sur la santé. Cette prévention passe par une analyse des substances à risque et cela nécessite un détecteur capable d'y identifier la présence de la bactérie.

Pour ces bactéries, l'amoxicilline constitue le traitement de première ligne tant la sensibilité des germes est grande. L'amoxicilline est un antibiotique β -lactamine bactéricide de la famille des aminopénicillines indiqué dans le traitement des infections bactériennes à germes sensibles. C'est à Alexander Flemming que l'on attribue la découverte des antibiotiques de la famille des β -lactamines en 1928. Ce dernier fut le premier à rapporter l'activité antibactérienne de la moisissure *Penicillium* sur des colonies de *staphylococcus*. Il nomma la substance responsable de cette activité, pénicilline ^[10]. Il possède comme les autres pénicillines, une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine, précurseur du peptidoglycane (composante essentielle de la paroi cellulaire bactérienne participant au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse) ^[11]. Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP (Protéines Liant les Pénicillines).

La similarité de la conformation de l'amoxicilline et la D-alanyl–D-alanine est un élément important qui nous a aidés dans cette étude.

La manipulation chimique de la surface d'une électrode est une étape importante vers le contrôle de la structure de l'interface électrode/électrolyte ; toutefois la modification d'électrode permet de doter la surface conductrice ou semi-conductrice de propriétés électrochimiques ou chimiques particulières.

L'étude des transferts d'ions à l'interface d'électrode modifiée représente une base intéressante pour le développement de capteurs électrochimiques. A cet effet, l'objectif de la manipulation de surface est le développement de capteurs, le plus souvent miniaturisables, grâce à l'apport de propriétés remarquables de reconnaissance et de complexations ou simplement d'accélération du transfert d'électron, d'espèces organiques, inorganiques ou biologiques. Les multiples fonctionnalisations pouvant être pour de telles électrodes modifiées, donnent lieu à de nombreuses applications.

La finalité de ce travail est la fonctionnalisation des électrodes de pâte de carbone par l'antibiotique (amoxicilline) destinées à la détection du *staphylococcus aureus* et leur caractérisation par les méthodes électrochimiques.

Dans cette partie, nous donnerons les résultats de nos différentes manipulations en ce qui concerne l'électrode de pâte de carbone et apporterons des interprétations afin de les élucider. Notre étude s'articulera autour de deux points :

- Interaction entre l'électrode de pâte de carbone obtenue par adsorption, l'amoxicilline et les bactéries
- Interaction entre l'électrode de pâte de carbone obtenue par mélange, l'amoxicilline et les bactéries.

I. Etude bibliographique

I-1. *Staphylococcus Aureus* (bactérie)

I.1.1. Agent infectieux

a. Synonyme ou renvoi

SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), SASM (*Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline), SAIV (*Staphylococcus aureus* à sensibilité intermédiaire à la vancomycine), HSAIV (*Staphylococcus aureus* à sensibilité intermédiaire hétéro-résistant à la vancomycine), SARV (*Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine), infection *staphylococcique*, infection à *Staphylococcus*, impétigo, syndrome de choc toxique.

b. Caractéristiques

Le *staphylococcus aureus* est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* ^[12,13]. Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (saufs. aureus anaerobius); il est habituellement disposé en grappes. De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique (TSST-1) et des toxines exfoliatives. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau ^[14]

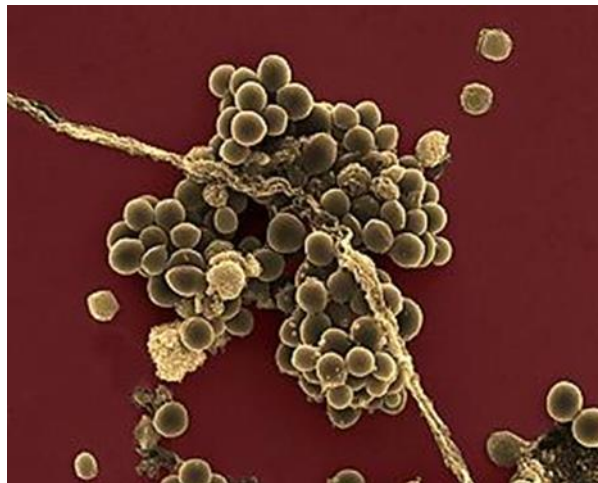


Figure IV-1 : *Staphylococcus aureus* en grappe

I.1.2. Détermination du risque

a- Pathogénicité et toxicité

Le *staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste qui peut causer diverses maladies chez les humains, allant des affections qui évoluent spontanément vers la guérison à des pathologies mortelles ^[13]. *Staphylococcus aureus* est la cause de multiples infections, qui vont de la lésion cutanée (furuncles, panaris, impétigo, etc.), à l'endocardite, la pneumonie aiguë, l'ostéomyélite ou la septicémie. Cette bactérie est une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines ^[15]. L'intoxication alimentaire par les *staphylococcus* se caractérise par une apparition brutale de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales, de crampes et de diarrhée ^[13,15]. Les symptômes disparaissent habituellement après 24 heures ^[15]. Les morsures d'animaux peuvent entraîner des infections locales, une cellulite, un érythème, une sensibilité, une fièvre légère, une adénopathie et une lymphangite (rare) ^[16]. L'érythrodermie bulleuse avec épidermolyse est causée par des toxines exfoliatives sécrétées sur l'épiderme et elle touche surtout les nouveau-nés et les jeunes enfants ^[13]. D'autres affections cutanées peuvent être causées par ces toxines exfoliatives : phlyctènes, perte cutanée, papules, furuncles, impétigo, folliculite, abcès, piètre contrôle thermique, perte de liquide et infection secondaire ^[13,15,17,18]. *Staphylococcus aureus* peut également causer une fasciite nécrosante chez les sujets immunodéprimés, mais c'est très rare ^[19]. La fasciite nécrosante est une maladie potentiellement mortelle qui s'accompagne d'une importante morbidité.

Certaines souches de *S. aureus* produisent la toxine superantigénique TSST-1, qui est responsable de 75 % des cas de syndrome de choc toxique (SCT) ^[13]. Le tableau clinique du SCT comprend des symptômes aigus et sévères, notamment une forte fièvre, un collapsus vasculaire, des vomissements, une diarrhée, des myalgies, une hypotension, une éruption érythémateuse, une desquamation et l'atteinte d'au moins 3 organes ^[13,20,21]. La mortalité est très élevée et le décès peut survenir en l'espace de 2 heures ^[20]. Le syndrome de choc toxique est associé à la colonisation vaginale par *S. aureus* producteur de toxines durant les règles, à des complications d'une infection staphylococcique ailleurs dans le corps ou à des complications chirurgicales ^[21]. Les infections peuvent être profondes : endocardite, péritonite, pneumonie nécrosante, bactériémie, méningite, ostéomyélite, arthrite septique et infections des os, des articulations et des organes ^[13,17,18].

b- Epidémiologie

Le *Staphylococcus aureus* est l'une des causes les plus fréquentes d'infection de la peau, des tissus mous et d'infections nosocomiales ^[18]. Les taux d'infection en milieux communautaires ne cessent de croître ^[18,22]. Les résidents de maisons de soins courent également un plus grand risque de contracter SARM ^[23]. Environ 20 % des personnes sont des porteurs persistants de *Staphylococcus aureus*, environ 60 % sont des porteurs intermittents et environ 20 % sont rarement des porteurs ^[14]. Les enfants sont plus nombreux à être des porteurs persistants de la bactérie ^[14]. Les jeunes femmes sont plus à risque de souffrir d'un syndrome de choc toxique ^[21].

c- Gamme d'hôtes

Ce sont les humains, les animaux sauvages et domestiques, notamment les vaches ^[24].

d- Dose infectieuse

Au moins 100 000 micro-organismes chez les humains ^[25].

e- Mode de transmission

La transmission se fait par l'ingestion d'aliments contenant des entérotoxines ^[15]. Une transmission verticale est peu fréquente durant l'accouchement par voie vaginale ^[26]. La transmission interhumaine se fait par contact avec une lésion purulente ou avec un porteur ^[14]. Le manque d'hygiène et le surpeuplement accroissent le risque d'exposition à *S. Aureus* ^[27]. L'infection peut être transmise d'une personne à l'autre par des travailleurs de la santé ou des patients ^[14]. La colonisation nasale peut entraîner une auto-infection ^[28].

f- Période d'incubation

Les symptômes apparaissent habituellement 30 minutes à 8 heures après la consommation des aliments contaminés ^[15]. Des colonies de *S. aureus* peuvent être portées pendant une période indéterminée; certaines personnes peuvent être des porteurs chroniques et d'autres des porteurs intermittents ^[14].

g- Transmissibilité

L'infection est transmissible tant qu'une lésion purulente est présente ou que le portage de la bactérie persiste.

I.1.3. Dissémination

a. Réservoir

Le *Staphylococcus aureus* est présent à plusieurs endroits chez les humains : nez, aine, aisselles, région périnéale (hommes), muqueuses, bouche, glandes mammaires, cheveux, tractus intestinal, appareil génito-urinaire et voies respiratoires supérieures [13,15,29]. De nombreux animaux servent de réservoirs, en particulier les vaches dont les pis sont infectées [24].

b. Zoonose

Possible, par contact direct ou indirect avec un animal infecté [16]

c. Vecteurs : Aucun

I.1.4. Viabilité et stabilité

a. Sensibilité aux médicaments

Des antibiotiques comme la cloxacilline et la céphalexine sont couramment utilisés pour traiter les infections à *staphylococcus* [30]. Pour traiter l'infection à SARM, on administre de la vancomycine par voie intraveineuse [31].

b. Résistance aux médicaments

De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* deviennent de plus en plus résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques [17]. Les souches résistantes à la méthicilline sont de fréquentes causes d'infection nosocomiale [32]. Une augmentation de la résistance à la vancomycine est signalée dans de nombreux hôpitaux [17]

c. Sensibilité aux désinfectants

Sensibilité à l'éthanol à 70 %, à la chlorhexidine, à l'hypochlorite de sodium à 1 %, au glutaraldéhyde à 2 %, au chlorure de benzalkonium à 0,25 % et au formaldéhyde [23,33,34].

d. Inactivation physique

Le *Staphylococcus aureus* peut croître à un pH entre 4,2 et 9,3 et dans des concentrations de sel pouvant atteindre 15 % [15]. Les entérotoxines sont résistantes à des températures qui détruiraient le bacille [15]. *S. aureus* est sensible au traitement par la chaleur sèche (160-170 °C pendant au moins une heure), mais non au traitement par la chaleur humide [35].

e. Survie à l'extérieur de l'hôte

La bactérie survit sur des carcasses et des organes (jusqu'à 42 jours), les planchers (moins de 7 jours), le verre (46 heures), dans les milieux exposés au soleil (17 heures), aux rayons UV (7 heures), dans les produits de viande (60 jours), sur les pièces de monnaie (jusqu'à 7 jours), la peau (30 minutes à 38 jours) ^[36]. Selon la taille de la colonie, *S. aureus* peut survivre de quelques jours à des mois sur des textiles ^[37].

I.1.5. Premiers soins et aspects médicaux

a. Surveillance

L'apparition de symptômes doit être surveillée. Lors d'une éclosion, une toxi-infection alimentaire peut être diagnostiquée à partir des symptômes cliniques et d'une culture de *S. aureus* dans des aliments ^[13]. Le syndrome de choc toxique peut être identifié par un diagnostic clinique et l'isolement d'une souche de *S. aureus*, de la TSST-1 ou des entérotoxines B ou C. On utilise pour ce faire les méthodes ELISA, l'agglutination passive inversée du latex ou la PCR. L'érythrodermie bulleuse avec épidermolyse peut être diagnostiquée en clinique, après détection du signe de Nikolsky et l'identification de *S. aureus* prélevé au siège de l'infection. L'examen direct au microscope de l'échantillon clinique permet de confirmer la bactériémie et les infections profondes.

Remarque : Les méthodes de diagnostic ne sont pas nécessairement disponibles dans tous les pays.

b. Premiers soins et traitement

Une antibiothérapie n'est pas habituellement nécessaire pour traiter les abcès; un drainage adéquat suffit normalement ^[17]. Une antibiothérapie appropriée est requise dans le cas des infections plus graves.

c. Immunisation

Aucune ^[13].

d. Prophylaxie

L'élimination du portage nasal par l'administration de mupirocine topique permet également d'éliminer le manuportage ^[14].

I-2.Amoxicilline

I.2.1. Découverte des β -lactamines et développement de l'amoxicilline

C'est à Alexander Flemming que l'on attribue la découverte des antibiotiques de la famille des β -lactamines en 1928. Ce dernier fut le premier à rapporter l'activité antibactérienne de la moisissure *Penicillium* sur des colonies de *staphylococcus*. Il nomma la substance responsable de cette activité, pénicilline ^[38]. Devant l'impossibilité de purifier cette molécule, l'intérêt la pénicilline comme agent antibactérien fut mitigé jusqu'en 1940, année où un groupe de recherche anglais dirigé par Florey et Chain observèrent l'efficacité de la pénicilline contre les infections à streptocoque chez les souris suite à une injection sous-cutanée de l'antibiotique ^[39]. À cette époque, il était difficile de produire, à partir de la souche de *Penicillium notatum* initialement utilisée, des quantités suffisantes de pénicilline pour effectuer des essais cliniques. Les conditions de recherche étant difficiles à cause de la seconde guerre, Florey et Chain se rendirent aux États-Unis où le développement accéléré de l'antibiotique fut considéré comme une priorité stratégique. Grâce à une meilleure sélection de la souche de moisissure et à des améliorations du milieu de culture, le rendement fut augmenté de 100 fois en seulement 2 ans ^[40]. Durant cette période, il devint évident que différentes molécules pouvaient être obtenues selon la composition du milieu de culture, la souche et les conditions de fermentation ^[40,41]. Vers la fin des années cinquante, Bachelor et son équipe démontrèrent que la structure fournissant à la pénicilline son activité antibactérienne était l'acide 6-aminopénicillamique (6-APA) et que ce dernier pouvait être obtenu par fermentation en l'absence de précurseurs de la chaîne latérale spécifique à la pénicilline G ^[42]. Cette découverte a ainsi ouvert la voie à la création de nouvelles β -lactamines de semi-synthèse, dont la chaîne latérale rattachée au 6-APA est modifiée ^[43]. Cette découverte a permis d'élargir le spectre d'activité des pénicillines : d'une part, on développa des molécules résistantes aux β -lactamases comme la méthicilline et d'autre part on développa des β -lactamines à spectre élargi comme l'ampicilline, qui est active à la fois sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces premières molécules étaient toutefois peu propices à l'administration orale et c'est en 1970 fut que découverte l'amoxicilline ce qui remédia à ce problème. Outre un spectre d'activité très similaire à celui de l'ampicilline, l'amoxicilline a une biodisponibilité orale élevée ce qui permet d'obtenir des concentrations sanguines deux fois plus élevées suite à une administration per os ^[41].

I.2.2. Structure et propriétés physico-chimiques

a. Structure

L'amoxicilline appartient au groupe des médicaments appelés antibiotiques, et plus particulièrement à la famille des pénicillines. C'est une molécule dont la masse moléculaire est de 365,4 daltons. Tel qu'illustré à la figure IV-2 ci-dessous, elle possède trois groupements ionisables : le groupement acide carboxylique COOH sur le cycle thiazolidine, le groupement hydroxyle OH du cycle para-hydroxyphényle et le groupement amine primaire sur la chaîne latérale du cycle β -lactame.

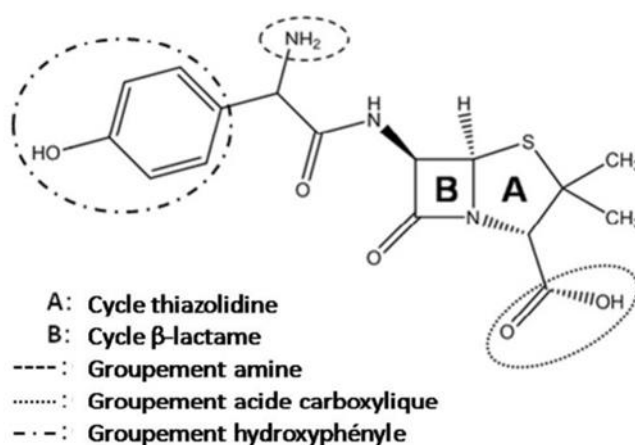


Figure IV-2 : Structure semi-développée de l'amoxicilline identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau β -lactamine

La structure commune à toutes les pénicillines est le cycle β -lactame fusionné à un cycle thiazolidine (Figure IV-3). Le cycle β -lactame des pénicillines porte une chaîne latérale qui est spécifique à chaque antibiotique et influence son action ainsi que son absorption systémique. Pour l'amoxicilline, cette chaîne comporte une amine primaire et un groupement parahydroxyphényle.

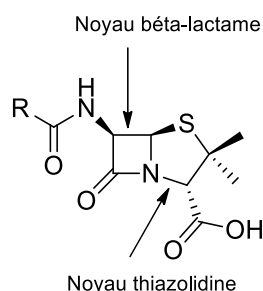


Figure IV-3 : Structure des pénicillines

b. Ionisation

Un des préalables à l'activité biologique d'une molécule est qu'elle doit pouvoir traverser les membranes cytoplasmiques de différentes cellules qui s'interposent entre son site d'administration et son site d'action. Cette membrane est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont dispersés des hydrates de carbone et des protéines. La propriété physico-chimique qui favorise ce passage transmembranaire est une charge ionique nulle. L'amoxicilline est une molécule amphotère : les valeurs de pKa de ces groupes donneurs de protons respectivement (-COOH et -OH) et celui de son groupe receveur de protons (-NH₂) sont respectivement de 2,4 et 7,4 et 9,6 ^[44]. Le point isoélectrique (pI) est la valeur de pH à laquelle la charge nette de la molécule est nulle : tel que calculé à l'aide de l'équation IV-1 ci-dessous ^[45], sa valeur pour l'amoxicilline est égale à 6,0 car la valeur de pKa du groupement hydroxyle n'est pas prise en compte étant donné sa proximité avec la valeur du pH sanguin.

Formule de calcul du point isoélectrique et valeur obtenue pour l'amoxicilline

$$pI = 1/2 (pK_1 + pK_2) = 1/2 (2,4 + 9,6) = 6,0 \quad (IV-1)$$

c. Hydrosolubilité et liposolubilité

Une deuxième propriété physico-chimique favorisant l'absorption est la capacité de la molécule à se solubiliser dans l'eau et les lipides. Il est établi que les molécules liposolubles traversent plus facilement la membrane cytoplasmique que les molécules polaires ^[46]. Le coefficient de partage octanol/eau (P), qui est habituellement présenté après avoir été transformé logarithmiquement (logP), est un indicateur du caractère lipophile d'une substance. Il est calculé à partir du rapport des concentrations d'antibiotique soluble dans l'octanol et dans l'eau (Équation IV-2). Il est à noter que la concentration d'antibiotique dans l'octanol n'est pas mesurée mais déduite à partir de la diminution de sa concentration dans l'eau, après l'ajout de la phase d'octanol.

Équation IV-2 : Calcul de la valeur du log-P

$$\log - P = \log \frac{[\text{octanol}]}{[\text{eau}]} \quad (IV - 2)$$

Plus sa valeur est négative, plus la molécule est hydrophile, alors qu'à l'inverse plus sa valeur est élevée et positive, plus la molécule est lipophile. Celle de l'amoxicilline est de 0,87

^[47]. Cette valeur supérieure à 0 indique que ce composé est légèrement plus soluble dans les lipides que dans l'eau, ce qui favorisera son passage transmembranaire.

d. Stabilité en milieu acide

Une des propriétés physico-chimiques qui favorisent l'usage thérapeutique de l'amoxicilline est que sa structure permet de conférer une stabilité au noyau β -lactame en milieu acide, ce qui était un obstacle majeur à l'utilisation orale des pénicillines. Cette stabilité est obtenue grâce à la présence d'une chaîne latérale suffisamment longue pour que son noyau hydroxy-phényl protège le lien amide du cycle β -lactame. Cette caractéristique favorise d'ailleurs son utilisation par rapport à celle de l'ampicilline, dont la biodisponibilité orale est moins élevée ^[48].

I.2.3. Propriétés biologiques de l'amoxicilline

a. Structure et polymérisation du peptidoglycane

La paroi cellulaire bactérienne, composante essentielle au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse, est composée en partie de peptidoglycane. La structure de ce polymère consiste en une série de chaînes où s'alternent l'acide N-acétylmuramique (NAM) et l'acide N-acétylglycosamique (NAG), sur lesquels est greffée une chaîne de polypeptides. Ces structures sont reliées entre elles par un pont inter-peptidique (Figure IV-4).

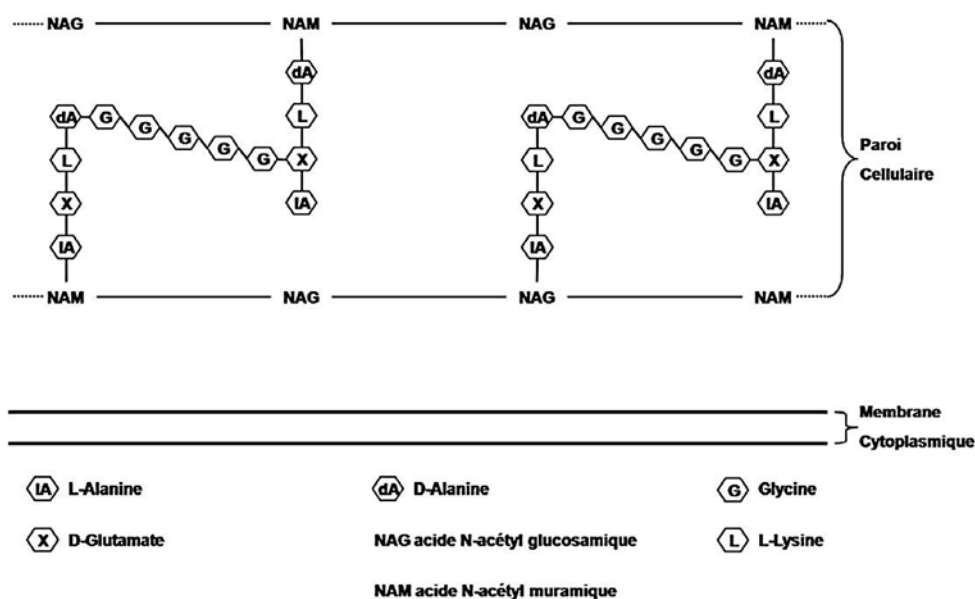


Figure IV-4: Structure du peptidoglycane ^[49]

Ces ponts inter-peptidiques sont établis grâce à l'action d'enzymes situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les transpeptidases ou PLP (Protéines Liant les Pénicillines), qui catalysent la réaction permettant la réticulation du peptidoglycane ^[49]. Au cours de cette réaction, une pentaglycine est ajoutée et la D-alanine du groupement D-alanyl-D-alanine de la chaîne peptidique subséquente est libérée.

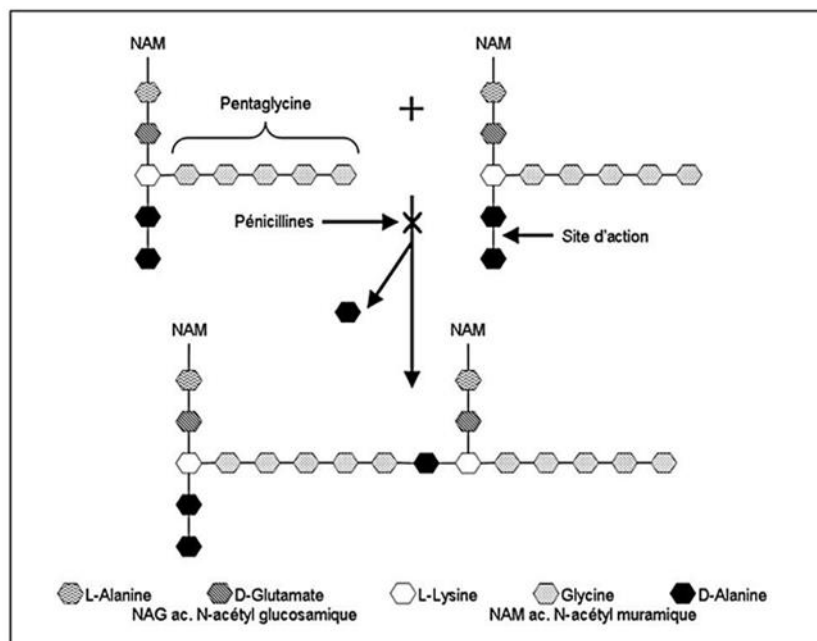


Figure IV-5 : Réaction de polymérisation du peptidoglycane ^[49]

b. Mécanisme d'action des antibiotiques de type bêta-lactamine

L'amoxicilline, comme les autres pénicillines, possède une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine du précurseur du peptidoglycane (Figure IV-6) ^[50]. Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP.

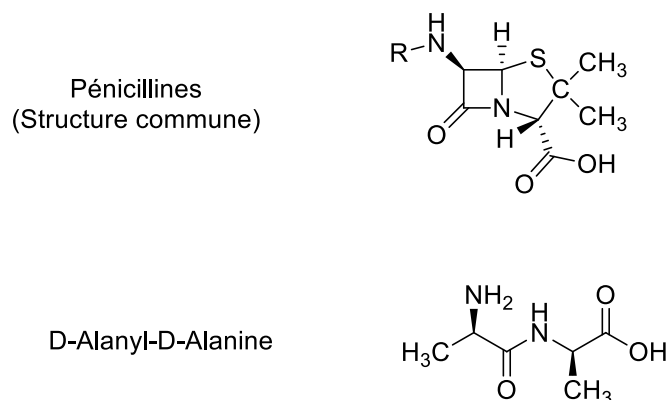


Figure IV-6: Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine

Les β -lactamines sont des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne, que ce soit des Gram positif ou négatif. Ces composés n'exercent de ce fait leur action bactéricide que si les bactéries sont en phase de croissance active et en cours de synthèse de leur paroi. Ces antibiotiques possèdent une activité temps-dépendant ce qui signifie que leur action bactéricide dépend de la durée pendant laquelle les concentrations en médicament demeurent supérieures à la concentration minimale bactéricide ou Concentration Minimale Inhibitrice.

I.2.4. Principe

Le mécanisme d'action des β -lactamines est fondé sur la liaison de l'antibiotique aux enzymes participant à la synthèse de la paroi bactérienne, les PLP (Protéines Liant la Pénicilline) encore appelées PBP (Penicillin Binding Proteins). La conséquence de cette interaction moléculaire est l'inhibition de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Ainsi, les transpeptidases bactériennes, PLP intervenant dans la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, vont reconnaître le cycle bêta-lactame du fait de son analogie structurale avec leur substrat naturel. En effet, les β -lactamines sont des analogues structuraux du substrat naturel dipeptidique D-alanyl D-alanine qui termine les chaînes polypeptidiques des précurseurs du peptidoglycane et vont donc se lier avec les enzymes responsables de la réticulation du peptidoglycane : les transpeptidases intervenant au moment de l'élongation (assemblage des chaînes peptidiques par formation de ponts interpeptidiques). Notons dès à présent que la liaison à une PLP se fait de façon covalente et irréversible. Les bêta-lactamines sont donc des « substrats suicide ». Ainsi, après que l'antibiotique s'est fixé à la PLP, la réaction de transpeptidation est inhibée, la synthèse du peptidoglycane bloquée et la cellule meurt rapidement. Toutefois, l'activité bactéricide des pénicillines n'est pas liée à la rupture de la paroi fragilisée sous l'effet de la pression osmotique car pour qu'il y ait mort cellulaire, il faut la coopération active de la bactérie qui utilise sa propre machinerie enzymatique suicide : les peptidoglycanes-hydrolases (autolysines).

I.2.5. Déroulement

a. Pénétration dans la bactérie

Les β -lactames ne doivent pas pénétrer à proprement parler dans la bactérie, mais rejoindre leur cible au niveau de la face interne de la paroi (espace périplasmique). Cet accès est direct et facile pour les bactéries à Gram positif dont le peptidoglycane est relativement perméable aux bêta-lactamines (sauf celui de *E. faecalis*). Par contre, concernant les Gram(-), les β -lactames doivent emprunter les passages ménagés par les porines au niveau de la membrane externe pour rejoindre l'espace périplasmique. Ainsi, chez les bactéries à Gram négatif, ces propriétés de perméabilité vont contribuer à définir le phénotype naturel de résistance propre à chaque espèce bactérienne.

b. Activité antibactérienne

Comme nous l'avons vu, elle résulte de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane par fixation covalente aux protéines liant la pénicilline. Ces dernières sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane et sont des transpeptidases et des carboxypeptidases. Elles sont ancrées dans la membrane cytoplasmique par leur extrémité carboxylique, et émergent sur la face externe de cette membrane dans l'espace périplasmique par leur extrémité NH_2 porteuse du site actif enzymatique.

❖ Arrêt de la croissance bactérienne :

En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Alanyl-D-Alanine, les bêta-lactames se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase. En présence d'antibiotique, cette enzyme, qui agit comme une acyl-transférase à sérine active, exerce son action hydrolytique sur la molécule antibiotique, conduisant à la formation d'un complexe enzyme-produit qui ne se dissocie pas car l'enzyme est liée de façon covalente au produit. Ce mécanisme est appelé inhibition-suicide (l'enzyme elle-même catalyse la transformation de l'antibiotique en un composé hautement réactif qui se lie à l'enzyme de façon irréversible).

Les résultats qui seront ici présentés mettront en évidence le fait que la fixation de la bêtalactamine sur la PLP peut se faire sur d'autres types d'acides aminés que la sérine, et notamment la lysine.

Les schémas suivants exposent l'action de la transpeptidase et le principe antibactérien des β -lactamines (Université catholique de Louvain, Cours en ligne, Pharmacologie et pharmacothérapie des anti-infectieux).

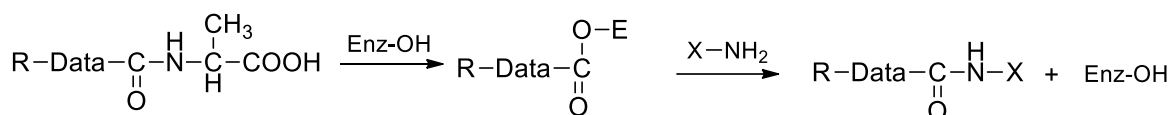


Figure IV-7 : Réaction de transpeptidation

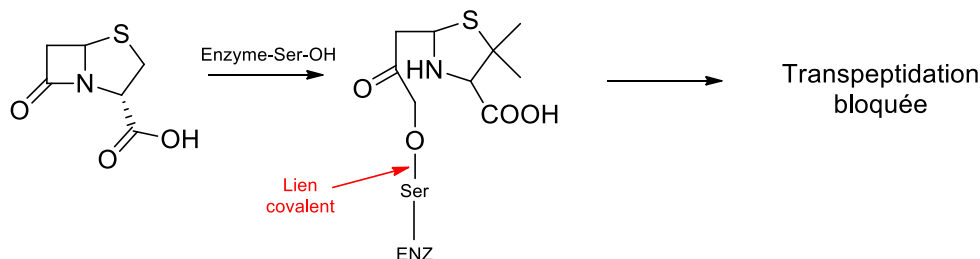


Figure IV-8 : Inhibition de la transpeptidation par la bêta-lactame

Notons en pointillé l'analogie structurelle entre la séquence D-Ala-D-Ala et la β -lactamine. L'inhibition des PLP essentielles entraîne un arrêt de croissance (effet bactériostatique). Trois effets morphologiques différents peuvent être observés selon les fixations préférentielles d'une bêta-lactamine sur la PLP : la filamentation, la formation de sphéroplastes suivie d'une lyse bactérienne, et la formation d'éléments ovoïdes.

Concernant les inhibiteurs de bêta-lactamases, elles n'ont pas de rôle contre les bactéries mais servent de substrats pour les bêta-lactamases qui ne pourront plus exercer leur effet sur les antibiotiques.

❖ Effet bactéricide :

Il fait suite à l'arrêt de la croissance de la paroi bactérienne et met en jeu le système des autolysines, qui dégradent le peptidoglycane des bactéries en phase de croissance. Ainsi la rupture de l'équilibre dynamique entre la construction du peptidoglycane et son réarrangement par les autolysines va se faire en faveur des autolysines entraînant la mort de la bactérie

Une autre hypothèse a été avancée pour expliquer l'action antibactérienne des pénicillines : une fois lié à la PLP, ce type d'antibiotiques activerait des protéines bactériennes, les holines, ayant pour effet de causer des lésions dans la membrane plasmique [32]. Ces altérations causeraient des fuites du contenu cellulaire, entraînant des hydrolases qui briseraient le peptidoglycane et lysaient la cellule [51].

II. Matériels et méthodes

❖ Poudre commerciale de graphite

La poudre commerciale de graphite a été fournie à partir de la France (Carbone, Lorraine, référence 9900). Cette poudre a été utilisée sans subir un traitement préalable.



Figure IV-9 : Poudre commerciale de graphite

II.1. Préparation des électrodes

II.1.1. Elaboration de l'électrode de pâte de carbone (EPC)

La poudre de graphite (1,6 g) a été mélangée avec le liant, l'huile de paraffine (0,4 ml) et avec l'éthanol absolu.

La pâte obtenue a été utilisée pour remplir la cavité de l'électrode (support creux qui porte la tige de carbone ; surface = $0,1256 \text{ cm}^2$) (figure IV-10). Cette tige assure le contact électrique avec la pâte. Une fois l'électrode fabriquée, elle est séchée à température ambiante avec soin pendant 24 heures. Après séchage, un polissage mécanique de la surface de cette électrode est réalisé sur papier lisse avant son utilisation afin d'obtenir une surface régulière et plus reproductible.

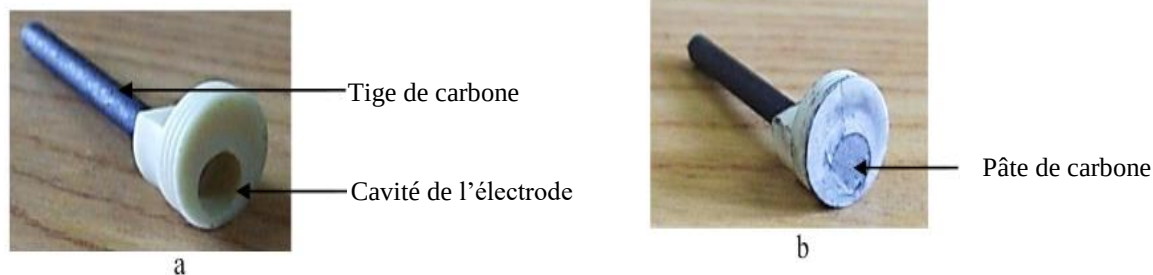


Figure IV-10 : (a) Electrode sans la pâte de carbone ; (b) Electrode avec la pâte de carbone

II.1.2. Caractérisation électrochimique

a. Description du dispositif expérimental

L'appareillage utilisé pour nos mesures est constitué d'une cellule comprenant trois électrodes connectées au voltalab 4 muni d'un potentiostat PCG 100 représenté par la figure IV-11. L'appareil utilisé est piloté par ordinateur. La programmation, l'acquisition et le traitement des résultats ont été réalisés par le logiciel voltamaster 4.

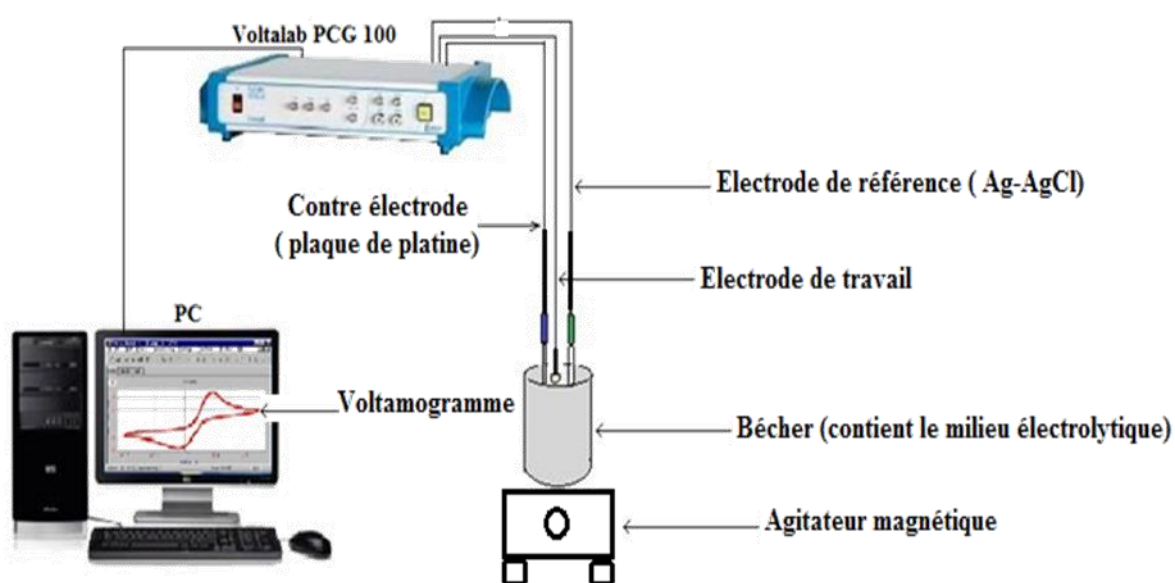


Figure IV-11 : Montage expérimental électrochimique

Le montage illustré ci-dessus est composé d'une cellule électrochimique constituée de trois électrodes: Electrode de référence, électrode auxiliaire et électrode de travail EPC

Notre électrode de travail est une électrode à pâte de carbone (figure IV-10) modifiée selon les différents cas étudiés.

- **Electrolyte support**

Les mesures électrochimiques sont toujours effectuées en présence d'un électrolyte suffisamment concentré, non électro-actif donc « indifférent » vis-à-vis des réactions aux électrodes. Son emploi permet de rendre la solution plus conductrice et de minimiser le courant de migration. Afin d'assurer une densité de courant homogène à l'électrode de

travail et de minimiser le phénomène de la chute ohmique, il est important de maintenir aussi proche que possible l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire [52].

Nous avons travaillé avec la solution de NaCl comme électrolyte support à 0,1 M.

b. Etude électrochimique de l'électrode mère

Des dispositions ont été prises pour la désoxygénation en barbotant la solution avec le gaz d'azote pendant environ 5 minutes pendant la mise en œuvre de l'expérience. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, une solution fraîche a été préparée pour chaque expérience. Toutes les expériences électrochimiques ont été effectuées à la température ambiante.

Pour la caractérisation électrochimique de l'électrode, nous avons utilisé la voltammétrie cyclique et à ondes carrées.

II.2. Modification des électrodes mères par l'amoxicilline

II.2.1. Amoxil

Cet antibiotique a été acheté de la pharmacie. C'est une marque déposée des sociétés du Groupe GlaxoSmithKline Maroc; Aïn El Aouda, Région de Rabat. Sa composition est exprimée en amoxicilline (sous forme trihydratée) 1 g, comprimés dispersibles.

II.2.2. Modification des électrodes par adsorption

a. Préparation de la solution d'amoxicilline

Une solution d'antibiotique a été préparée en dissolvant 1 g d'amoxicilline dans 100 ml d'eau distillée, soit une concentration de $2,737 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$.

b. Trempage des électrodes de travail dans la solution d'antibiotique en fonction du temps

Afin de déterminer le temps d'accumulation optimal de l'antibiotique sur les électrodes de travail, nous les avons trempées dans la solution d'amoxicilline, pendant 10, 20, 30 et 60 min. Au cours de ce trempage, nous avons procédé à l'agitation de la solution d'amoxicilline grâce à un barreau magnétique tournant à vitesse constante tout en permettant

la réhomogénéisation du liquide appauvri en substances. La durée de l'agitation est en fonction de la durée de l'accumulation ou de la préconcentration, les étapes étant simultanées.

II.2.3 Modification de l'électrode par mélange avec l'amoxicilline

Les électrodes ont été modifiées en mélangeant la poudre du carbone à celle de l'amoxicilline, à une teneur massique de 50% chacune. Leurs surfaces ont été observées au microscope en réflexion.

II.3. Etude électrochimique de l'électrode modifiée par l'amoxicilline aux différents temps de pré-concentration et par mélange

Les électrodes modifiées ont été caractérisées électro-chimiquement aux différents temps de pré-concentration afin de déterminer le temps optimal de dépôt de l'amoxicilline à la surface des celles-ci. La surface de l'électrode retenue a été observée au microscope optique en réflexion. Celle obtenue par mélange a été caractérisée selon les mêmes méthodes électrochimiques.

II.4. Caractérisation des électrodes modifiées en présence des bactéries

II.4.1 Culture des bactéries

La culture des bactéries, *staphylococcus aureus* a été faite au laboratoire de bio-interfaces et bioprocédés de la Faculté des Sciences et Technique de Beni Mellal (Maroc).

Nous présenterons le protocole de la culture dans un organigramme élucidé par des photographies.

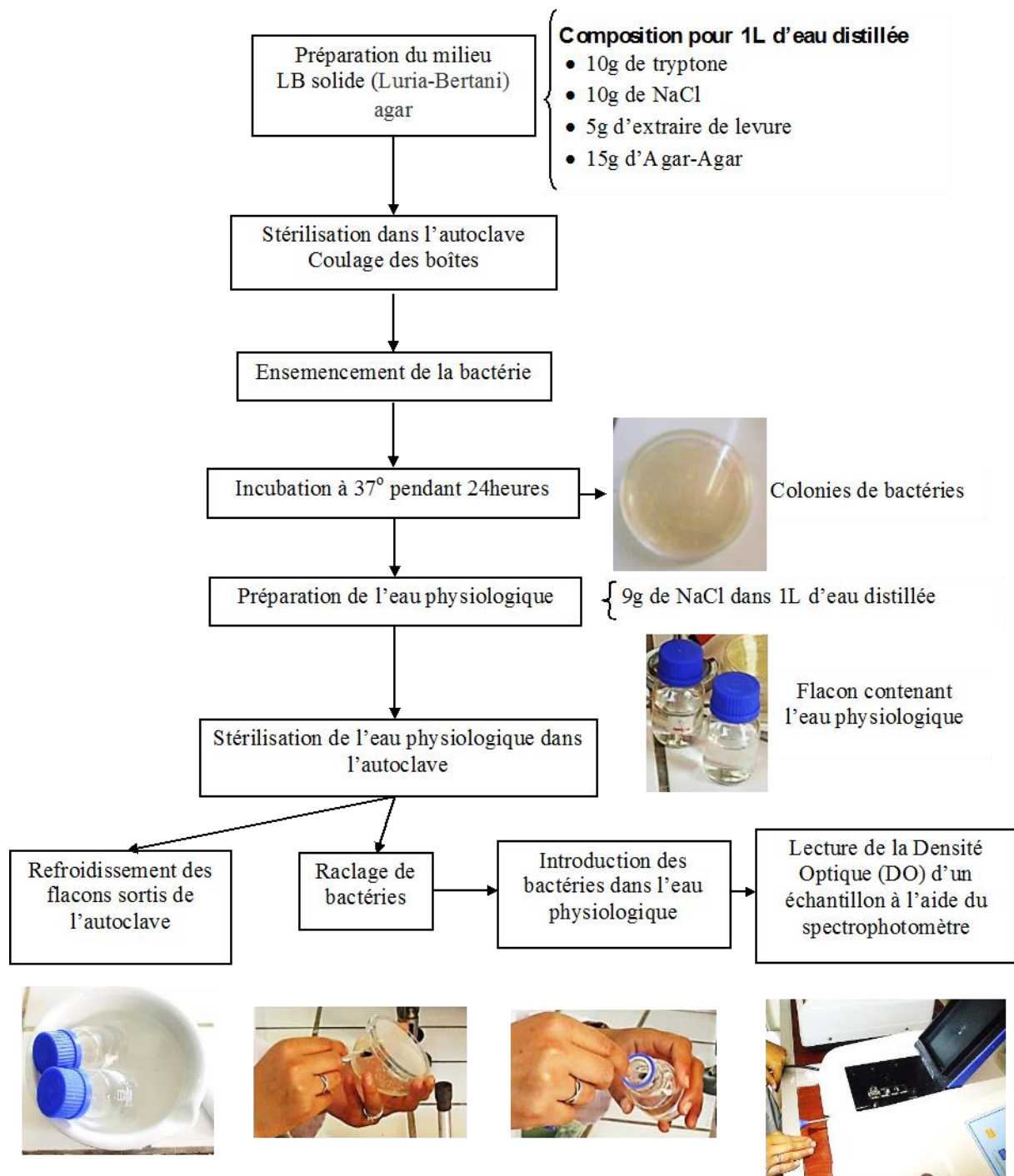


Figure IV-12 : Etapes de la culture du staphylococcus aureus

II.4.2 Etudes électrochimiques des électrodes modifiées (adsorption et mélange) en présence des bactéries

Les électrodes modifiées ont été immergées dans une cellule contenant l'échantillon de bactéries et ensuite caractérisée par la voltammétrie cyclique et à ondes carrées.

II.4.2.1 Etude de l'effet du temps de contact avec les bactéries

En vue d'étudier le comportement électrochimique des électrodes en fonction du temps de contact avec les *staphylococcus aureus*, nous avons fait des caractérisations par la voltammétrie cyclique et à ondes carrées à des intervalles de 20 min. A ces mêmes intervalles, des prélèvements de l'électrolyte contenant les bactéries ont été faits dans le but de mesurer leur densité optique.

A la fin de cette étude, les surfaces des électrodes ont été observées à l'aide du microscope optique (MO) en réflexion.

II.4.2.2 Etude de l'effet de la concentration de l'amoxicilline

Pour l'étude du comportement électrochimique des électrodes en fonction de la concentration de l'amoxicilline, nous avons utilisé les mêmes méthodes (VC et VOC). Les électrodes ont été trempées dans les solutions d'amoxicilline à différentes concentrations (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 g/L) pendant 20 min (temps de dépôt optimal). Après 30 min de contact avec la bactérie, des prélèvements de l'électrolyte (contenant les bactéries) ont été faits dans le but de mesurer la densité optique de l'échantillon.

II.4.2.3 Etude de l'effet de la densité optique des bactéries

Afin d'étudier l'effet de la densité optique de la bactérie sur les électrodes, nous avons fait la caractérisation électrochimique de celles-ci en utilisant les méthodes électrochimiques citées auparavant. Plusieurs solutions tampons contenant les bactéries à différentes densités optiques ont été préparées au laboratoire de bioprocédés et biointerfaces.

II.4.2.4 Etude de la durée de détection des bactéries

Pour cette étude, l'électrode a été caractérisée par la voltammétrie cyclique à 50 cycles, d'une durée de 66 minutes en présence de la bactérie.

II.4.2.5 Etude de l'effet du pH

Pour étudier l'effet du pH sur l'électrode, nous l'avons caractérisée à différents pH (4,22 ; 7,42 et 8,68). Le choix des pH ne s'est pas fait par hasard. En effet, le *Staphylococcus aureus* peut croître à un pH entre 4,2 et 9,3 ^[53]. Nous avons donc choisi les pH dans cette plage. Le pH mètre (Microcomputer pH/mV/TEMP Meter 6171) a été utilisé pour ajuster les valeurs du pH.

II.4.2.6 Etude de la reproductibilité du résultat des électrodes

L'expérience a été réalisée avec différentes électrodes modifiées destinées à la détection des *staphylococcus aureus*.

III. Résultats et discussions

III.1. Electrode de pâte da carbone modifiée par adsorption

III.1.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline

a. Caractérisation électrochimique

☑ Effet de la vitesse de balayage

Afin d'apprécier l'effet de la vitesse de balayage sur l'allure du voltammogramme de EPC mère, nous avons fait sa caractérisation à différentes vitesses de balayage : 10, 20, 30, 50 et 100 mV/s.

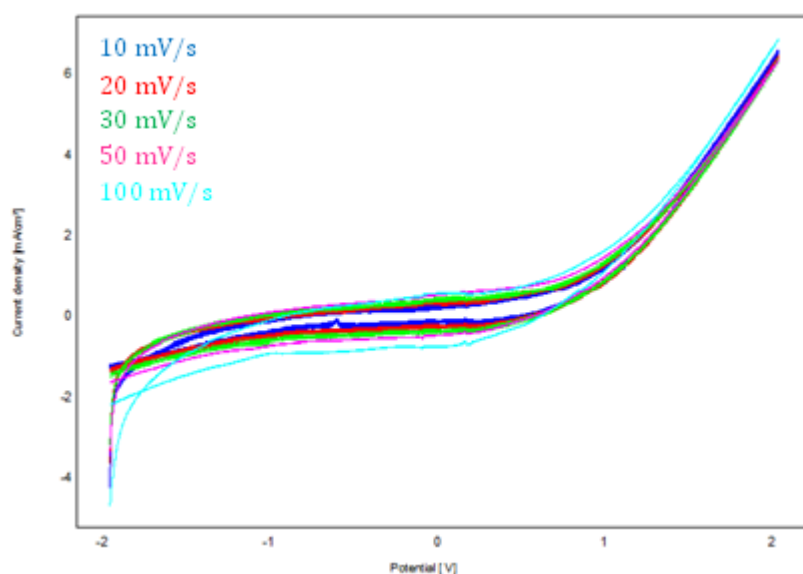


Figure IV-13 : Superposition des voltammogrammes cycliques de l'EPC mère à différentes vitesses de balayage 10, 20, 30, 50 et 100 mV/s dans NaCl à 0,1 M ; de -2V à 2V

Nous constatons que l'allure des voltammogrammes correspond à un système électrochimique rapide; la forme des courbes voltammétriques est insensible aux facteurs physiques susceptibles de modifier la vitesse de la réaction électrochimique. Cela démontre donc la stabilité. De ce fait nous avons choisi de travailler avec des vitesses relativement élevées, cette rapidité permet d'améliorer la reproductibilité des résultats en diminuant les fluctuations dues à des contaminations. La vitesse de balayage choisie est donc 100mV/s.

☑ **Choix du temps de dépôt**

Afin d'obtenir le temps de dépôt optimal de l'amoxicilline à la surface de l'électrode, celle-ci a été trempée à différents temps dans une solution d'antibiotique à une concentration de 10g/l : 10, 20, 30 et 60 min.

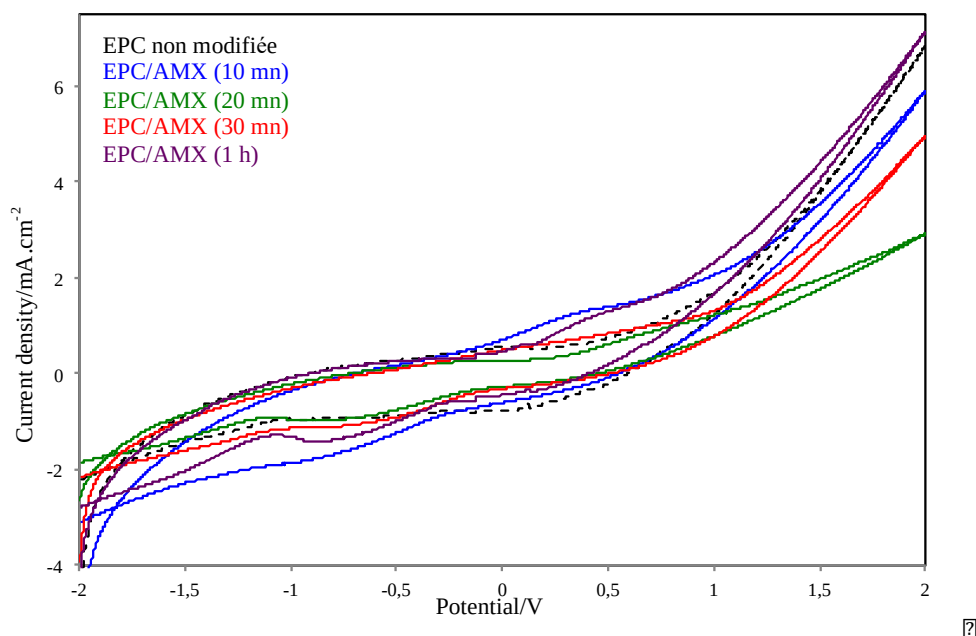


Figure IV-14 : Superposition des voltammogrammes cycliques de l'EPC non modifiée et EPC modifiée par l'amoxicilline aux différents temps de dépôt, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V, pH = 7,42

- A 10 min de trempage de l'électrode de pâte de carbone dans la solution d'amoxicilline, le voltammogramme présente une baisse de la densité de courant : Il y a un début de formation d'un film par l'amoxicilline à la surface de l'électrode.
- A 20 min de trempage, la densité de courant a considérablement baissé, ce qui dénote de la présence d'un film formé, celui de l'amoxicilline. La couche est donc à son dépôt optimal.
- A 30 min de trempage, on note une augmentation de la densité de courant : le film formé par l'amoxicilline commence sûrement à se détacher de la surface.
- A 1 heure de trempage, le voltammogramme de l'électrode modifiée (EPC/AMX) est quasi assimilable à celui de l'EPC mère : cela pourrait s'expliquer par le décollement du film formé par l'amoxicilline à la surface de l'électrode.

Après la caractérisation électrochimique des différentes électrodes obtenues, le temps de dépôt optimal retenu est 20 min.

b. Caractérisation physique

La surface de l'électrode de pâte de carbone, avant et après modification par l'amoxicilline à 20 min de temps de dépôt, a été observée au microscope optique.

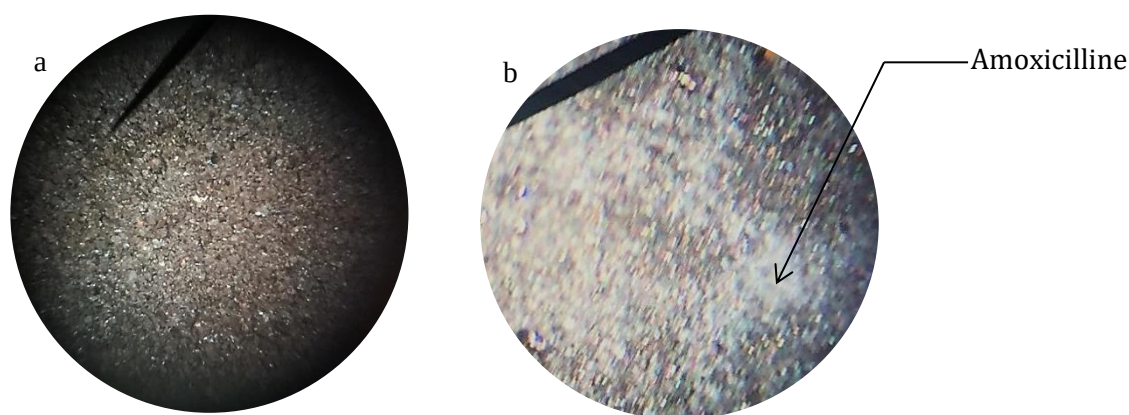


Figure IV-15 : Electrode de pâte de carbone avant modification (a) et après modification par l'amoxicilline, 20 min de temps de dépôt (b)

On observe la présence des particules blanches sur l'électrode (b) ce qui confirme la formation d'une couche de l'AMX sur sa surface.

III.1.2. Caractérisations électrochimiques de EPC/AMX ads. en présence des *Staphylococcus aureus*

III.1.2.1. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

L'électrode de pâte de carbone modifiée avec l'amoxicilline par adsorption (EPC/AMX ads.) a été caractérisée en présence des *staphylococcus*. Le voltampérogramme obtenu indique la présence de plusieurs fonctions électro-actives. En effet, comme l'indique la figure IV-16, le balayage des potentiels en oxydation fourni un pic, nommé P_1 , centré à + 0,09426V. Quant au balayage en réduction, il a indiqué deux pics, nommés P_2 et P_3 , centrés respectivement sur - 0,4477V et - 1,141V. Devant la multiplicité des signaux enregistrés, l'attribution de ces derniers nécessite l'étude électrochimique de l'amoxicilline pur. Par ce biais, on espère pouvoir isoler plus facilement le pic correspondant à la présence de la bactérie.

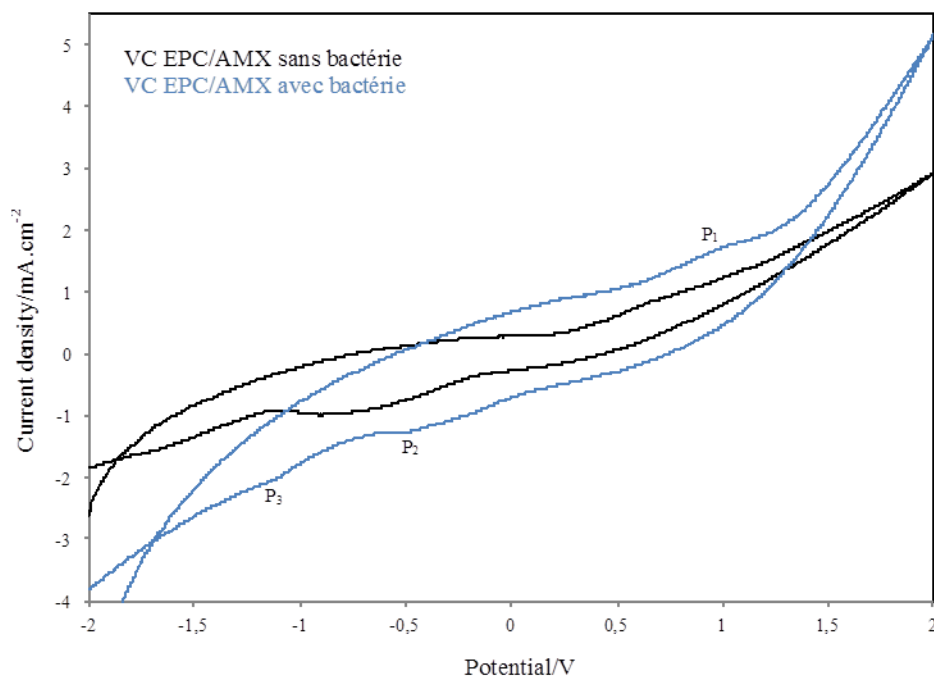


Figure IV-16 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC/AMX ads. sans bactéries et EPC/AMX ads. avec bactéries, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

➤ Etude électrochimique de l'électrode de pâte d'amoxicilline pur

Le voltampérogramme obtenu indique la présence de plusieurs fonctions électro-actives (figure IV-17). Le balayage des potentiels en oxydation fourni un pic, nommé P_1 , centré à - 0,1252 V. Quant au balayage en réduction, il a indiqué deux pics, nommés P_2 et P_3 , centrés respectivement sur - 0,3825 V et - 1,127 V.

2

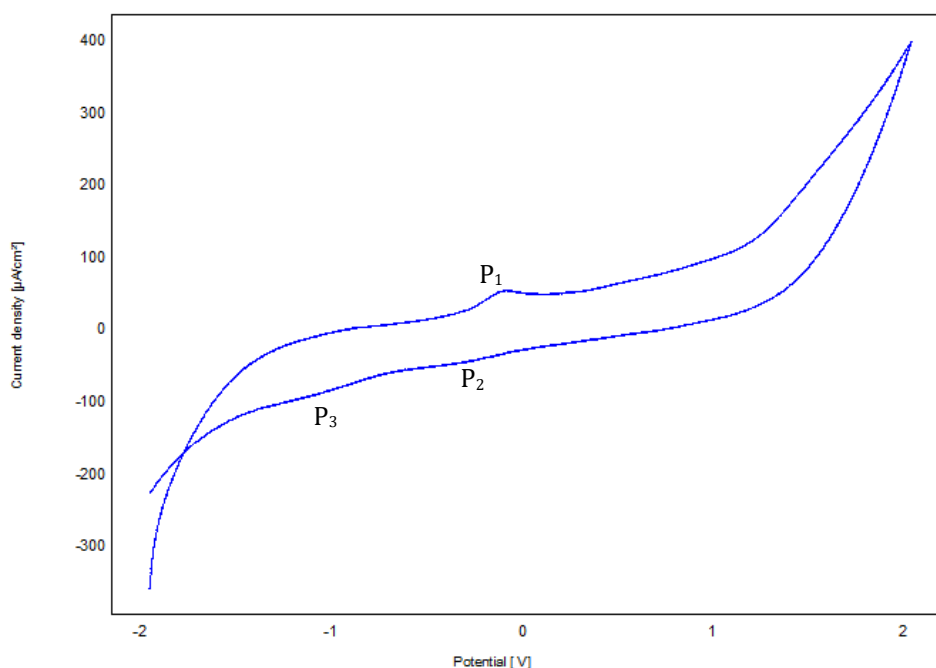


Figure IV-17 : Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'amoxicilline pur dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

La fenêtre de potentiel a considérée pourrait être de -1 V à 0 V. Une étude par la voltammétrie à ondes carrées pourrait mieux préciser la zone à exploiter.

III.1.2.2. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

L'exploration par la voltammétrie à ondes carrées a donné les résultats reportés en la figure ci-dessous. La bactérie est détectée à un potentiel de $-0,7616\text{ V}$ (dans la zone de potentiel allant de -1 à 0 V).

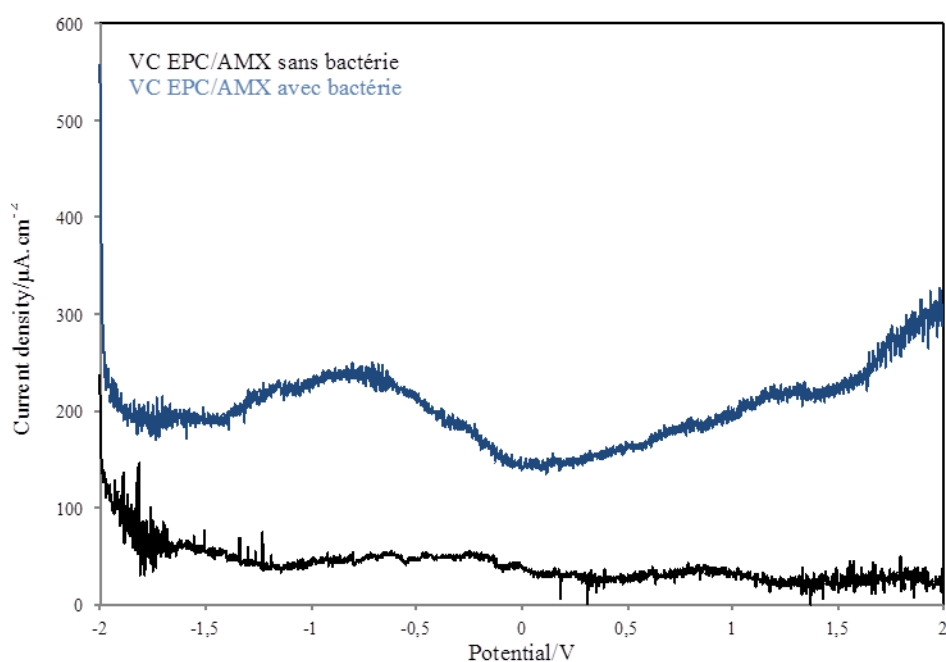


Figure IV-18 : Voltammogrammes à ondes carrées de EPC/AMX ads. sans bactéries et EPC/AMX ads. avec bactéries, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 20\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

III.1.2.3. Etude électrochimique de EPC/AMX ads. en fonction du temps de contact avec la bactérie

En vue d'étudier le comportement électrochimique de l'électrode (EPC/AMX ads.) en fonction du temps de contact avec les bactéries, nous avons fait des caractérisations par la voltammétrie cyclique et à ondes carrées à des intervalles de 20 min. A ces mêmes intervalles, des prélèvements de l'électrolyte contenant les bactéries ont été faits dans le but de mesurer la densité optique de l'échantillon. Les figures ci-dessous montrent les résultats obtenus.

a. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

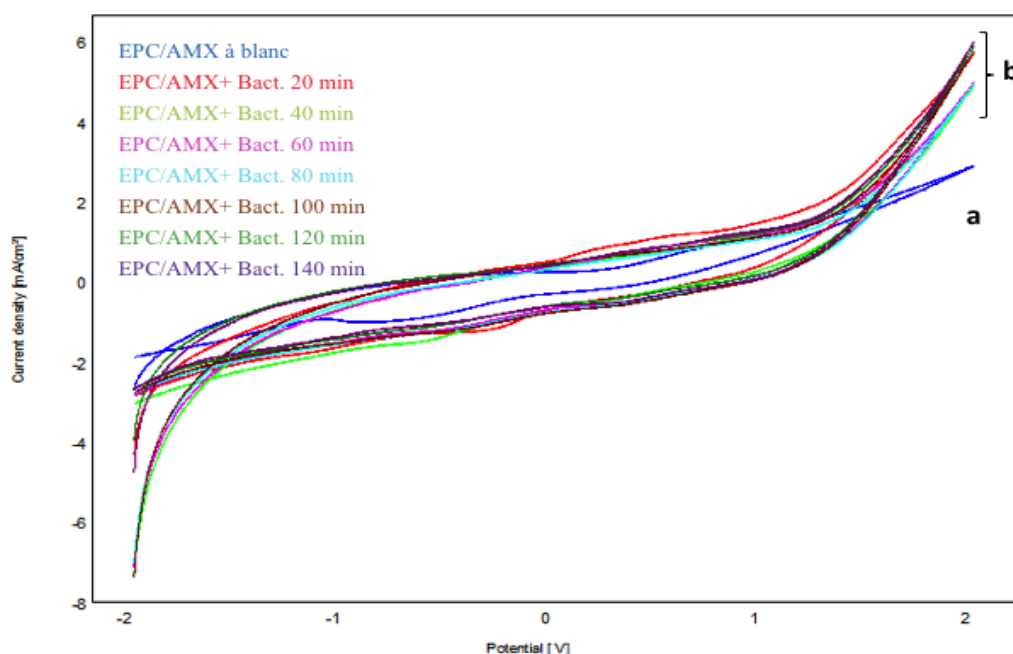


Figure IV-19 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC/AMX ads. sans bactéries (a) et EPC/AMX ads. en fonction du temps de contact avec la bactérie (b), dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

b. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

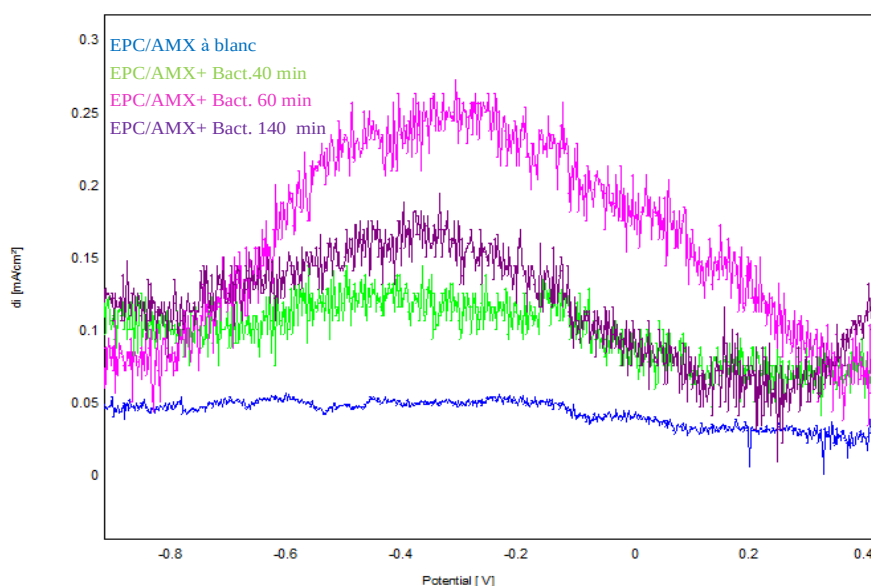


Figure IV-20 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de l'électrode de EPC/AMX ads. sans bactéries et EPC/AMX ads. en fonction du temps de contact avec la bactérie, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 20\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

Nous avons une augmentation de la densité de courant à 40 et à 60 min et une baisse à 140 min (Figure IV-20).

c. Densité du courant en fonction du temps de contact

Tableau IV-4 : Densité du courant en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie

Temps (min)	0	20	40	60	80	100	120	140
di ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	52,07	251,4	124,5	249,1	236,8	244,7	247,2	171,4

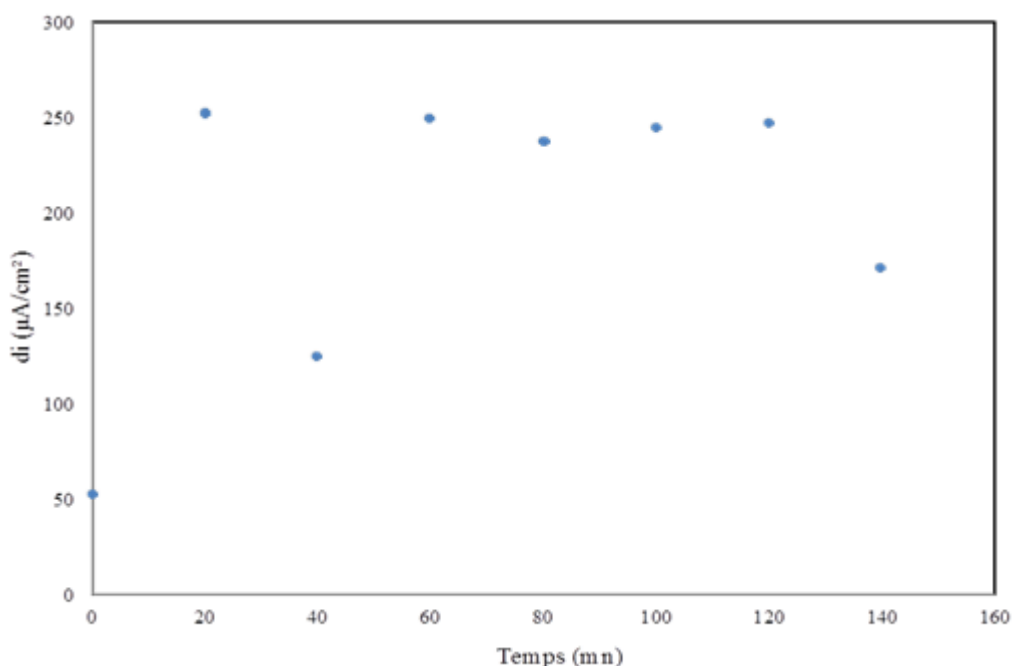


Figure IV-21 : Densité du courant en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie

On observe une alternance au niveau de la densité de courant des pics enregistrés en fonction du temps de contact avec la bactérie.

Pendant les 20 premières minutes de contact avec la bactérie, la densité de courant augmente, ce qui traduit une bonne électroactivité à la surface de l'électrode due à la réaction entre la bactérie et l'amoxicilline, plus précisément à l'ouverture du noyau β -lactame suivi de la formation de la liaison covalente avec la bactérie.

En effet la paroi cellulaire bactérienne, composante essentielle au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse, est composée en partie de peptidoglycane. Et

l'amoxicilline, comme les autres pénicillines, possède une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine, précurseur du peptidoglycane (Figure IV-10). Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP. En réagissant avec la pénicilline, la PLP ouvre le noyau β -lactame qui ensuite forme une liaison covalente avec le site actif (Figure IV-22).

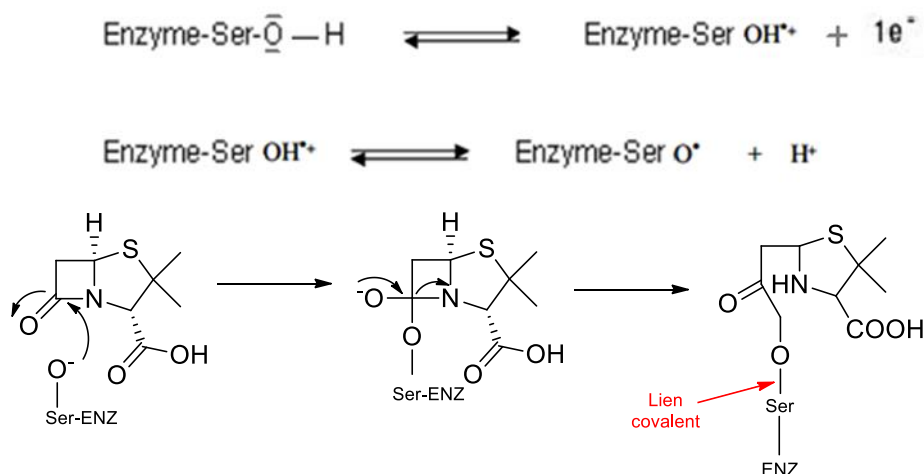


Figure IV-22 : Mécanisme de l'ouverture du noyau β -lactame

De la 20^e à la 40^e minute de contact avec la bactérie, la densité de courant diminue, ce qui pourrait s'expliquer par la formation d'un film de bactéries à la surface de l'électrode.

De la 40^e à la 60^e min de contact avec la bactérie, on assiste à nouveau à une augmentation de l'électroactivité de l'électrode ce qui confirme qu'il y a autolyse de la bactérie (tableau IV-2) et donc libération de la surface de l'électrode. Cette libération va entraîner une fois de plus l'insertion des bactéries par la formation de liaison covalente avec l'amoxicilline d'où l'augmentation de l'électroactivité.

Tout ce mécanisme pourrait expliquer les alternances observées au niveau de la densité de courant.

d. Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie

Tableau IV-5 : Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie

Temps (min)	0	20	40	60	80	100	120	140
DO	0,925	0,873	0,803	0,720	0,643	0,589	0,384	0,250

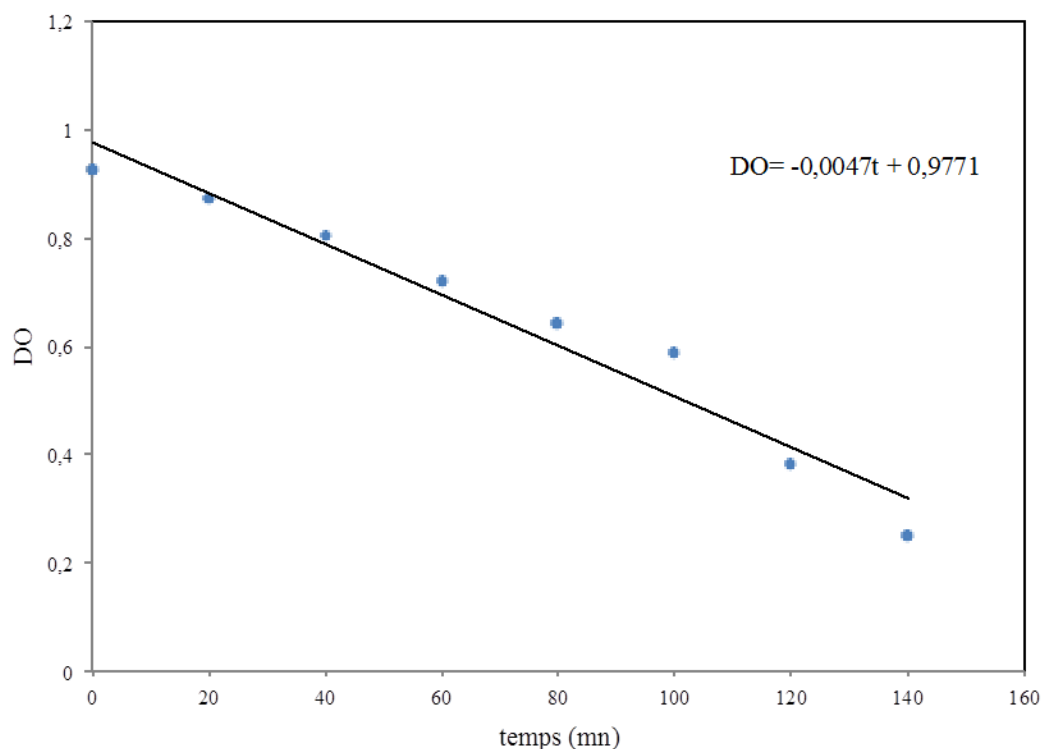


Figure IV-23 : Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie

On remarque que la DO diminue en fonction du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie.

Les bêtalactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant sur les protéines liant les pénicillines (PLP). Ces protéines sont des carboxypeptidases et des transpeptidases nécessaires à la liaison entre les chaînes latérales des peptidoglycanes. L'inhibition d'une ou plusieurs de ces enzymes fait accumuler des précurseurs de peptidoglycanes qui activent le système autolytique de la bactérie et entraînent sa lyse. ^[54] Ce qui explique la diminution de la densité optique.

e. Courbes de polarisation

Les courbes intensité-potentiel appelées aussi courbes de polarisation globale, ou courbes potentio-dynamiques sont obtenues en faisant varier de façon continue le potentiel appliqué à l'électrode de travail depuis le domaine cathodique (valeurs négatives du potentiel) jusqu'au domaine cathodique et en enregistrant pour chaque valeur de potentiel, la valeur de

la densité de courant correspondante. L'allure des courbes renseigne sur les différentes réactions électrochimiques mises en jeu pour des potentiels donnés.

Les paramètres rassemblés déduits des courbes de polarisation, tels que le potentiel de polarisation (E_p), le courant de polarisation (I_p), les bornes cathodiques et anodiques de Tafel (β_c et β_a), sont présentés dans le tableau IV-6.

Tableau IV-6 : Paramètres électrochimiques relatifs à l'effet du temps de contact de EPC/AMX ads. avec la bactérie

	EPC/AMX blanc	EPC/AMX en présence des bactéries						
		20min	40min	60min	80min	100min	120min	140min
E (i = 0) mV	-468,9	-571,4	-538,4	-628,4	-715,3	-693,4	-803,4	-781,3
R_p (kohm.cm²)	1,45	1,25	1,32	1,34	1,16	1,30	1,26	1,80
i_p (μA/cm²)	38,2266	37,1039	45,0633	39,9375	55,7303	42,2113	43,4392	18,3291
Ba (mV)	341,0	284,1	383,3	361,8	411,8	414,7	375,0	190,0
Ba (mV)	-350,9	-307,8	-354,1	-305,7	-383,8	-300,8	-323,5	-217,3

La résistance de polarisation est inversement proportionnelle au courant de polarisation. Plus la valeur de la résistance de polarisation est élevée (due à la présence d'un film de bactéries à la surface de l'électrode), plus l'intensité du courant de polarisation est faible et vice versa.

III.1.2.4. Comparaison du comportement électrochimique et physique de EPC/AMX ads.avant et après le temps de contact avec la bactérie

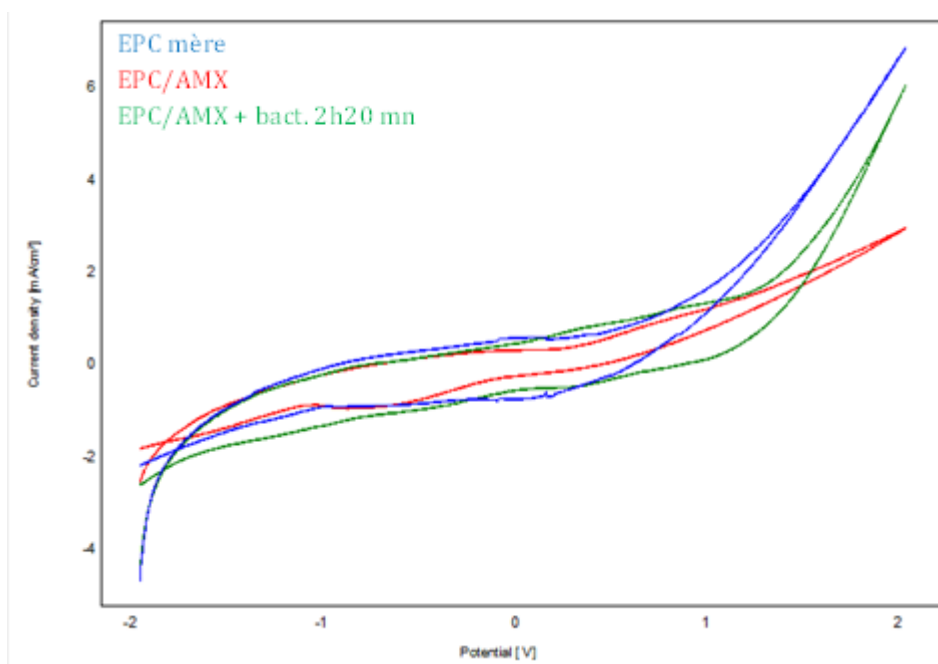


Figure IV-24 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC mère, EPC/AMX ads. sans bactéries et EPC/AMX ads. après 2h20min de contact avec la bactérie, dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

Après 2 heures 20 minutes de contact avec les bactéries, l'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline tend vers l'état initial c'est-à-dire vers l'électrode mère. La bactérie après sa lyse semble entraîner les molécules d'amoxicilline avec elle. Ce résultat est confirmé par des photographies issues de l'observation au microscope optique.

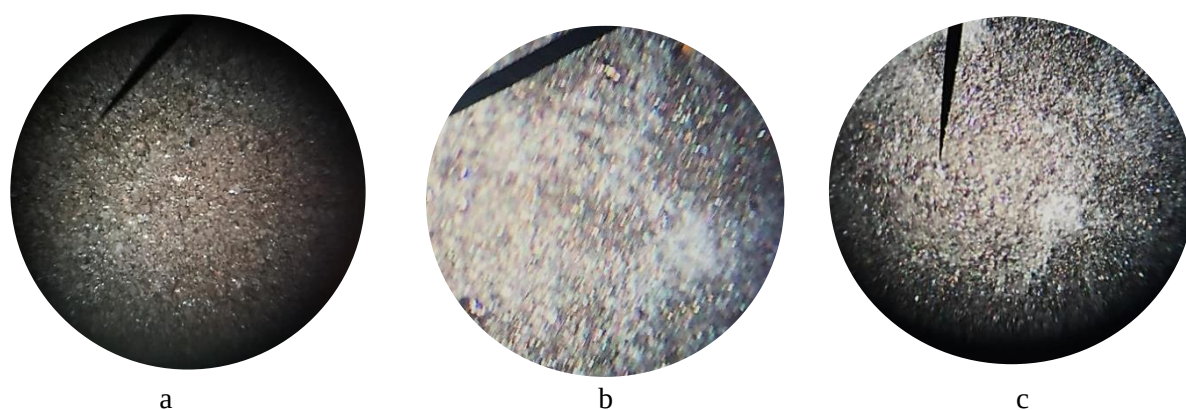


Figure IV-25 : Electrode de pâte de carbone mère (a), après modification par l'amoxicilline (b) et après 2h20min de temps de contact avec la bactérie (c)

III.1.2.5. Etude électrochimique de l'effet de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads. sur les bactéries

Les électrodes de pâte de carbone ont été trempées dans des solutions d'amoxicilline à différentes concentrations pendant 20 min (temps de dépôt optimal). Après 30 min de contact avec la bactérie, des prélèvements de l'électrolyte (contenant les bactéries) ont été faits dans le but de mesurer la densité optique de l'échantillon. Les figures ci-dessous montrent les résultats obtenus.

a. Caractérisation par la voltamétrie à ondes carrées

La figure IV-27 montre une meilleure électroactivité de EPC/AMX modifiée à une concentration de 10 g/l d'amoxicilline. Pour une meilleure appréciation de ces résultats, nous avons procédé à une comparaison de ces électrodes modifiées à différentes concentrations à blanc et avec bactéries (résultats non présentés). Ces comparaisons ont attesté que la concentration optimale est bien 10 g/l.

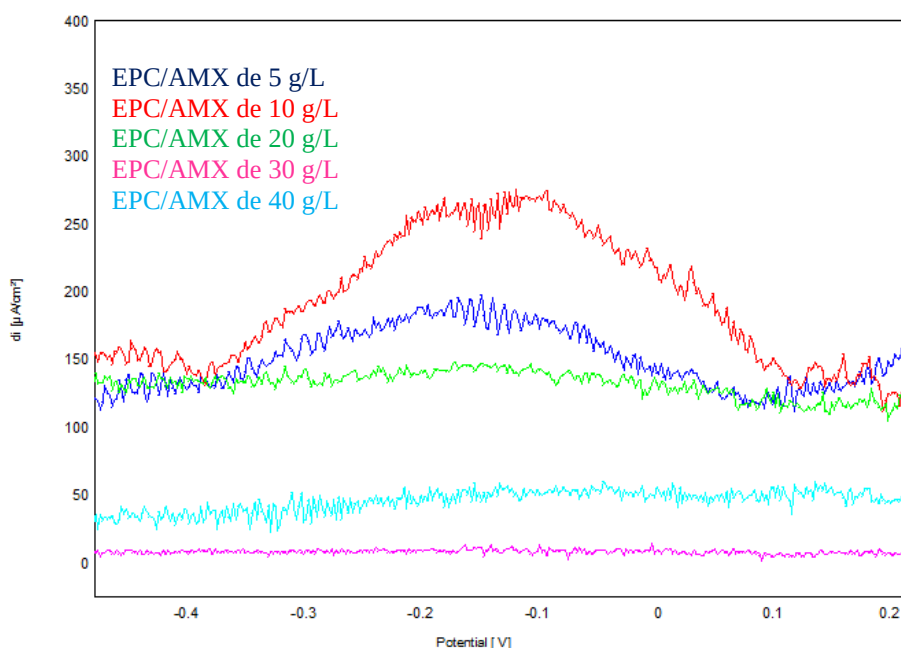


Figure IV-26 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de EPC/AMX ads. modifiées à différentes concentrations de l'antibiotique en présence des bactéries dans NaCl à 0,1 M ; $v = 20\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

b. Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline

Tableau IV-7 : Densité de courant en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads.

Concentration [AMX] (g/L)	0	1	5	10	15	20	25	30	35	40
di (μA/cm ²)	153,8	204,1	187,8	251,4	241,1	143,9	226	6,36	197,3	52,2

La densité de courant est plus importante à une concentration de 10 g/l de la solution d'amoxicilline. Au regard de ces résultats, nous pouvons dire que la concentration de l'amoxicilline est un paramètre à prendre en considération pour la détection des bactéries.

c. Densité optique en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads.

Tableau IV-8 : Densité optique en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads.

[AMX] g/l	0	1	5	10	15	20	25	30	35	40
DO	0,925	0,850	0,782	0,538	0,428	0,335	0,296	0,197	0,161	0,049

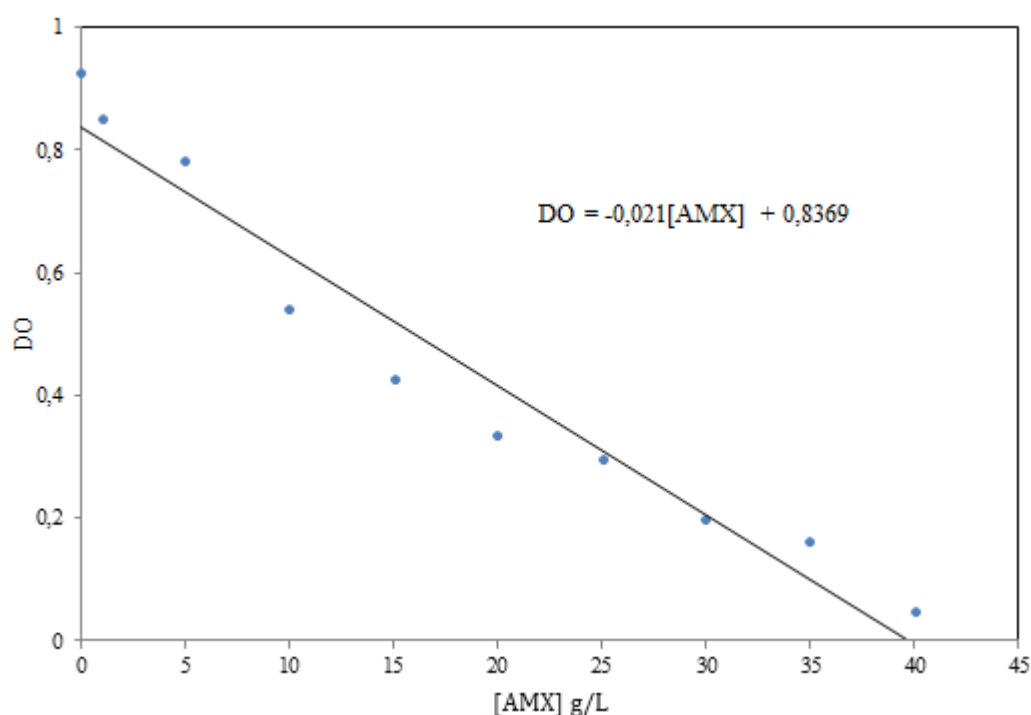


Figure IV-27 : Densité optique en fonction de la concentration de l'amoxicilline à la surface de EPC/AMX ads.

On remarque que plus la concentration de l'amoxicilline augmente plus la DO diminue.

III.1.2.6. Etude de l'effet de la densité optique (DO) de la bactérie sur EPC/AMX ads.

L'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline à une concentration de 10g/L a été caractérisée en présence de bactéries à différente densité optique.

a. Caractérisation par la voltammétrie cyclique

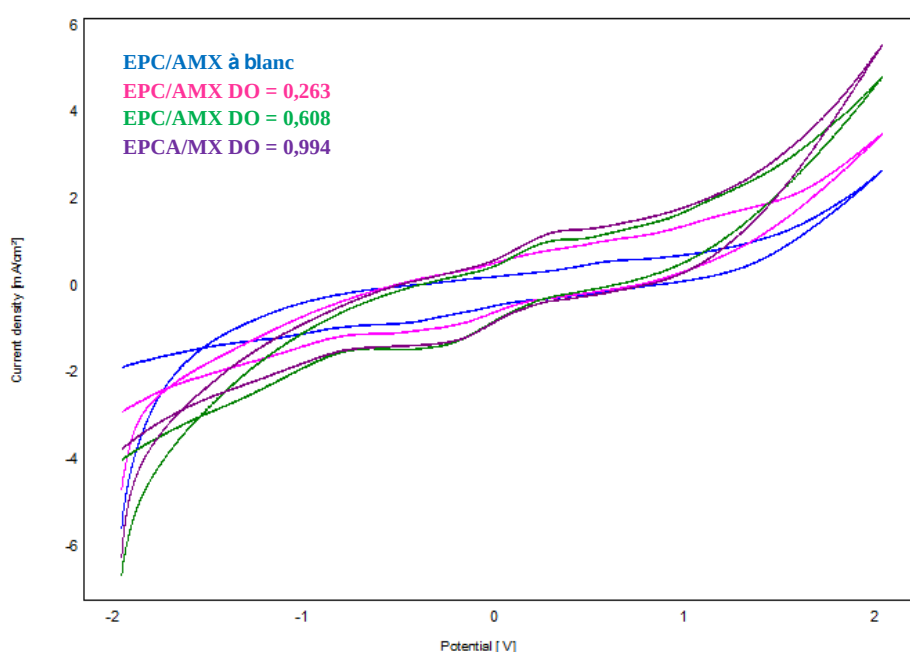


Figure IV-28 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC/AMX ads. à blanc et EPC/AMX ads. (10g/L) en présence des bactéries à différentes densités optiques dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

On enregistre une augmentation de la densité de courant ponctuée par des alternances. Cette augmentation est illustrée par la voltammétrie à ondes carrées.

b. Caractérisation par la voltammétrie à ondes carrées

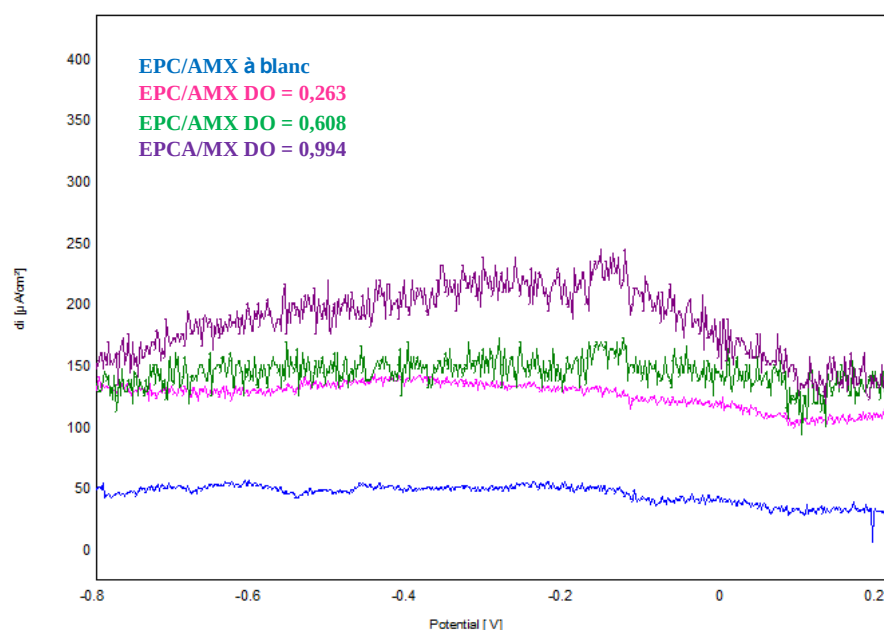


Figure IV-29 : Superposition des voltammogrammes à ondes carrées de EPC/AMX ads. à blanc et EPC/AMX ads. (10g/L) en présence des bactéries à différentes densités optiques dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

c. Densité de courant en fonction de la densité optique

Tableau IV-9 : Densité de courant (EPC/AMX ads.) en fonction de la densité optique

DO	0	0,093	0,149	0,263	0,478	0,560	0,608	0,994
$d_i (\mu\text{A}/\text{cm}^2)$	52,07	146,6	174,7	138,5	207,7	199,8	165,7	236,2

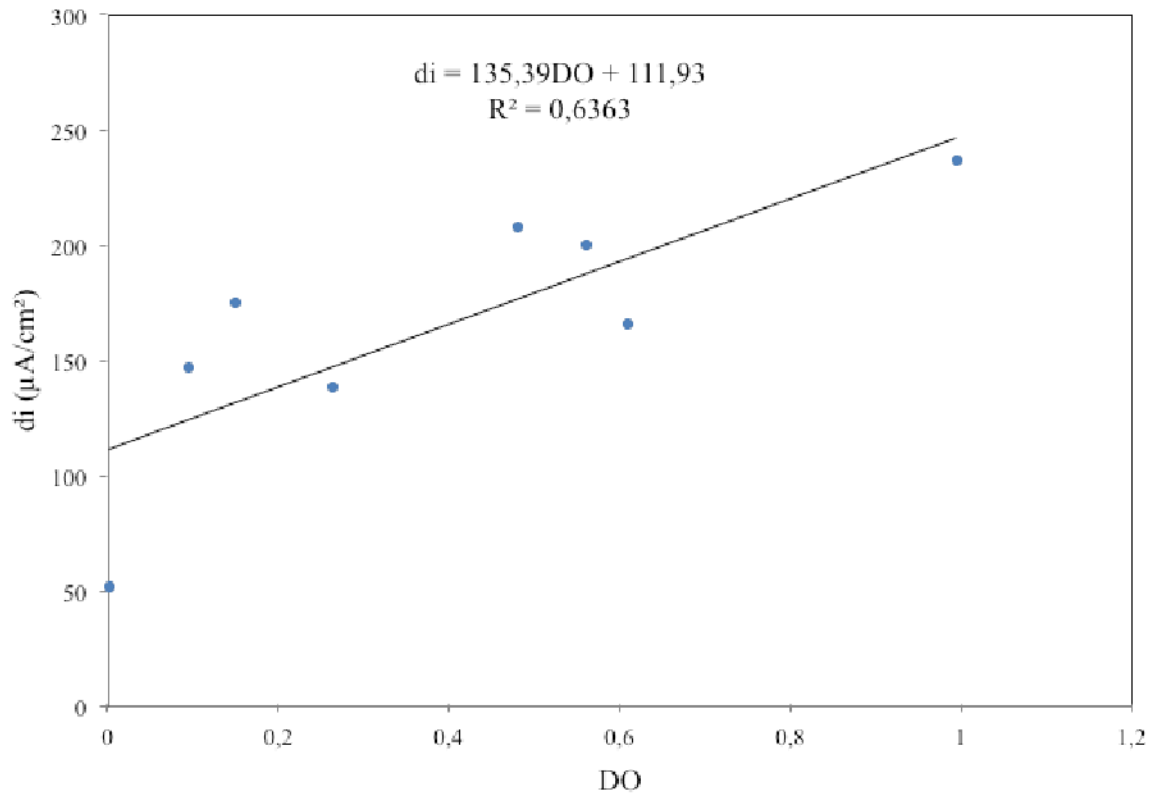


Figure IV-30 : Densité de courant (EPC/AMX ads.) en fonction de la densité optique

d. Détermination de la limite de détection et de quantification de EPC/AMX ads.

D'après Miller et Miller ^[55], la déviation standard du courant moyen (SD) mesuré peut être modélisée par l'équation:

$$SD = \frac{1}{(n-2)} \sum_{j=1}^n (i_j - I_j)^2 \quad (\text{IV. 9})$$

Où i_j est la valeur expérimentale du courant identifié à la manipulation j et I_j est la valeur correspondante calculée à la même densité optique en utilisant l'équation de calibration. n est le nombre de mesure effectué. La valeur de SD (déviatiion standard) calculée est utilisée pour la détermination de la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ).

$$LD = 3 \times \frac{SD}{\text{pente}} \quad (\text{IV. 10})$$

$$LQ = 10 \times \frac{SD}{\text{pente}} \quad (\text{IV. 11})$$

Pour l'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline, la limite de détection est de $2,954.10^{-5}$ et la limite de quantification est de $9,846.10^{-5}$.

III.1.2.7. Détermination de la durée de la détection des bactéries par EPC/AMX ads.

L'électrode a été caractérisée par la voltammétrie cyclique à 50 cycles, d'une durée de 1 h 06 min en présence de la bactérie.

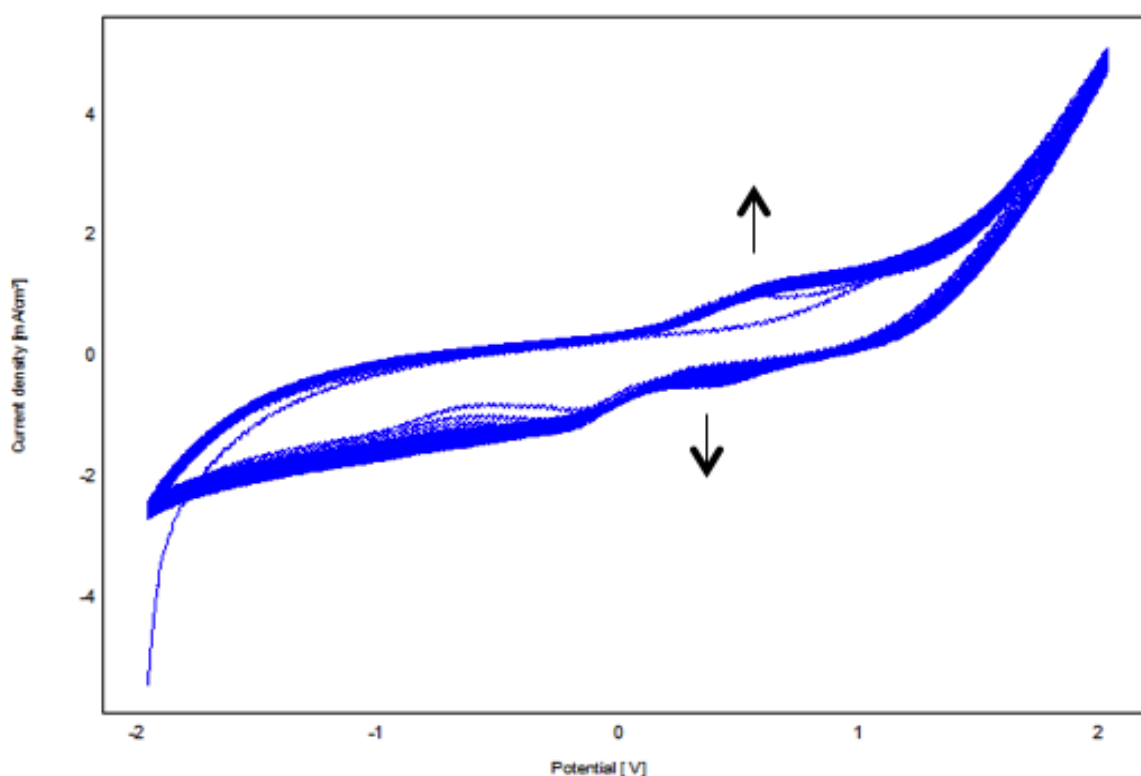


Figure IV-31 : voltammogrammes cycliques de EPC/AMX ads. en présence des bactéries pendant 50 cycles dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

Après 50 cycles, l'électrode enregistre une augmentation de la densité de courant avec la même allure du voltammogramme. Elle continue de détecter la bactérie. Une comparaison des voltammogrammes de EPC/AMX ads. à blanc et EPC/AMX ads. en présence des bactéries après les 50 cycles illustre bien cette croissance de cette électroactivité.

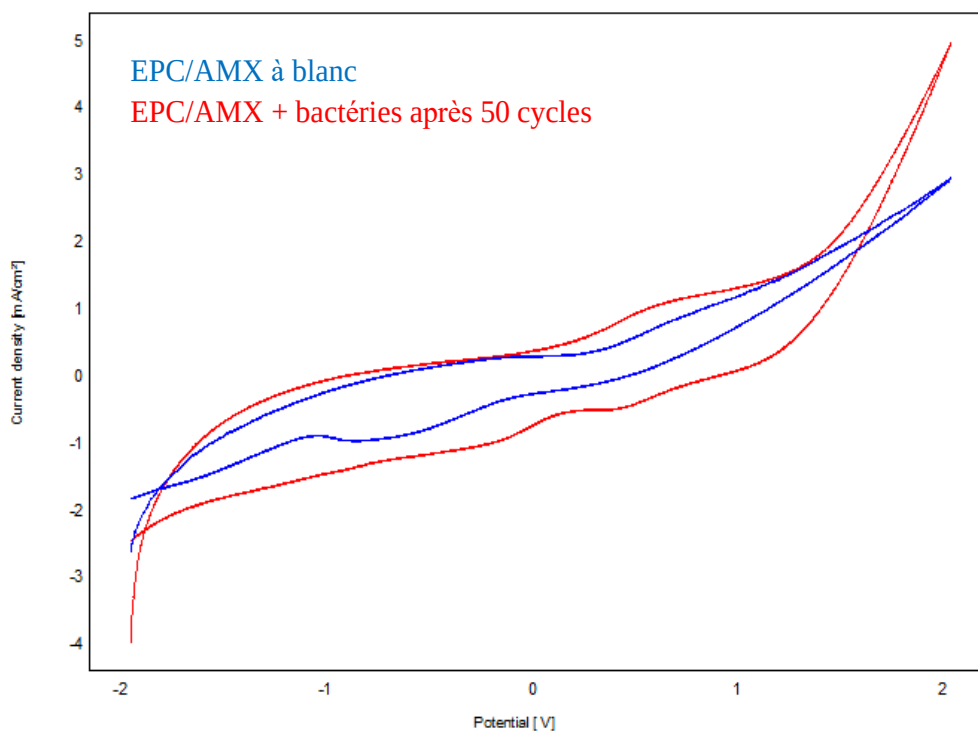


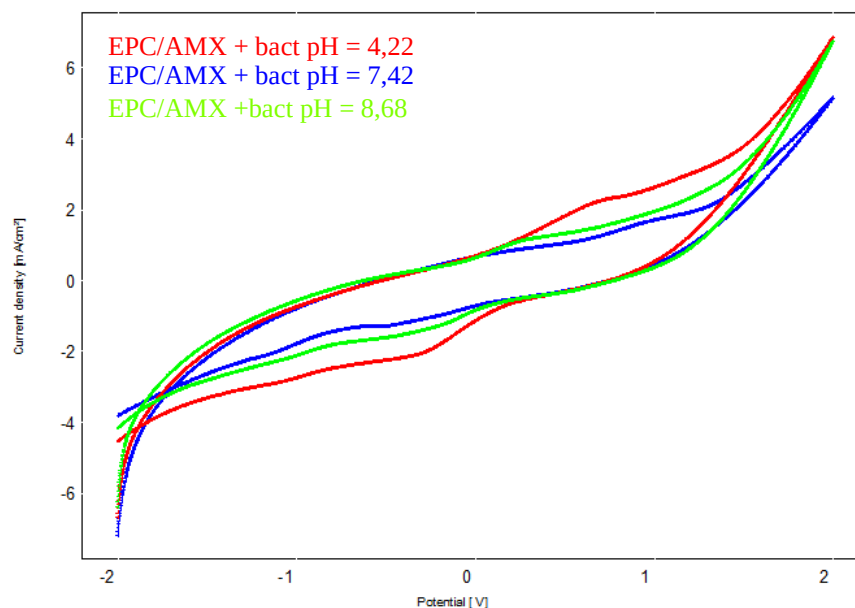
Figure IV-32 : Comparaison des voltammogrammes cycliques de EPC/AMX ads. à blanc et en présence des bactéries après 50 cycles dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

III.1.2.8. Etude de l'effet du pH

EPC/AMX ads. a été caractérisée à différents pH (4,22 ; 7,42 et 8,68). Nous avons travaillé avec une électrode de pâte de carbone ayant les paramètres suivants :

- Temps de dépôt de l'amoxicilline sur l'électrode : 20 min.
- Concentration de l'amoxicilline : 10 g/l.

L'électrode ayant donné des résultats satisfaisant quant à la détection des bactéries en milieu acide, neutre et basique, nous avons donc fait une comparaison desdits voltammogrammes dans le but de déterminer le milieu le plus favorable à l'électroactivité de celle-ci. Les résultats sont illustrés par la figure IV-34.



?

Figure IV-33 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC/AMX ads à différents pH en présence des bactéries dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V

Au regard de ces résultats, nous pouvons dire que notre électrode présente une meilleure électroactivité en milieu acide ; $\text{pH} = 4,68$.

III.1.2.8. Reproductibilité des résultats de EPC/AMX ads.

L'expérience a été réalisée avec différentes électrodes modifiées destinées à la détection des staphylococcus aureus. La réponse du signal a été toujours la même caractérisée par une augmentation de la densité de courant.

III.2. Electrode de pâte de carbone modifiée par mélange

III.2.1. Caractérisation physique et électrochimique de l'électrode de pâte de carbone avant et après modification par l'amoxicilline

L'électrode a été obtenue en mélangeant la poudre d'amoxicilline et celle de carbone à une teneur massique de 50% chacune.

a. Caractérisation physique de l'électrode obtenue

L'électrode modifiée après observation au microscope optique donne les résultats présentés à la Figure IV-34.

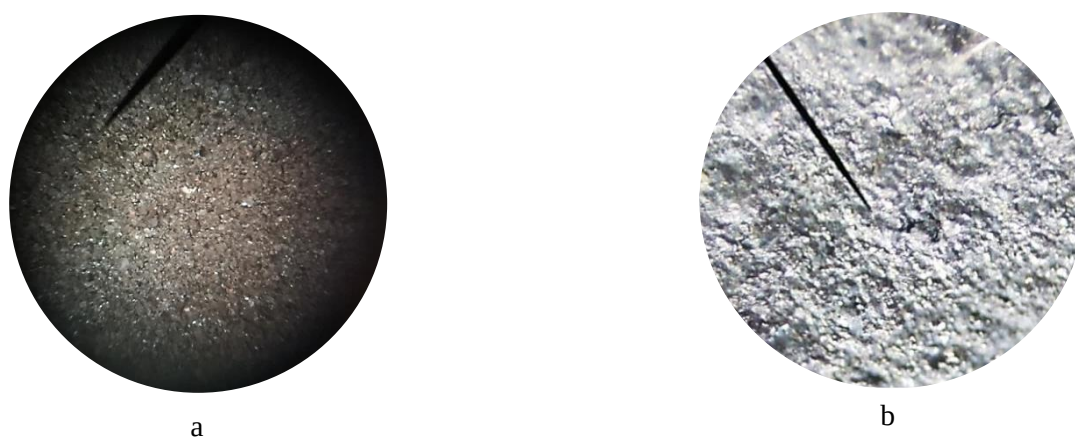


Figure IV-34 : Electrode de pâte de carbone avant modification (a) et après modification par l'amoxicilline : 50 % poudre de carbone + 50% poudre d'amoxicilline (b)

b. Caractérisation électrochimique

L'électrode de pâte de carbone modifiée avec l'amoxicilline par mélange (EPC/AMX mél.) a été caractérisée à blanc et ensuite une comparaison a été faite avec le voltammogramme cyclique de l'électrode de pâte de carbone mère.

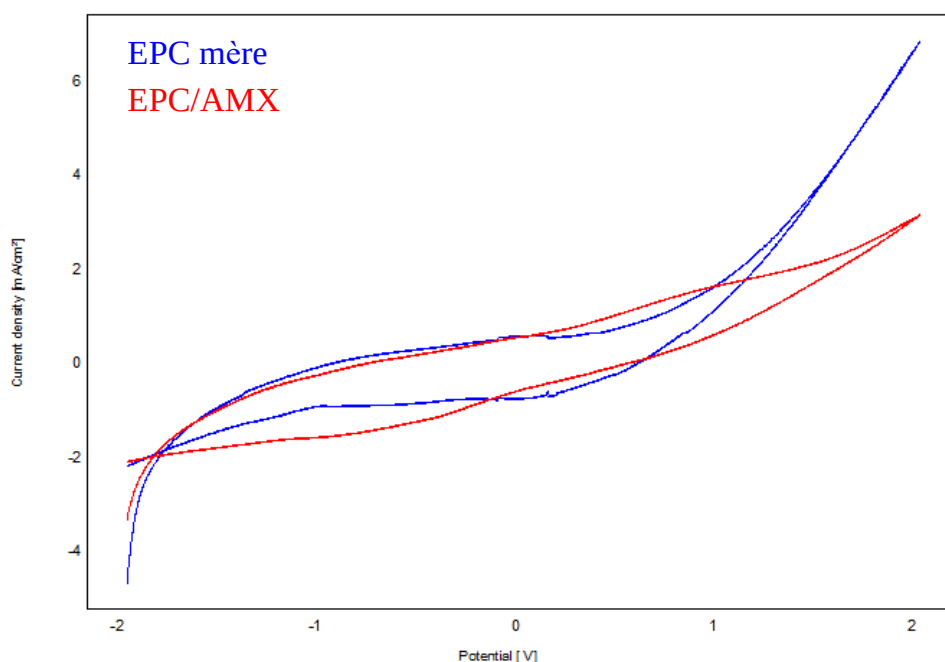


Figure IV-35 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC mère et EPC/AMX mél. à blanc dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

La comparaison des voltammogrammes montre que l'électrode de pâte de carbone mère a été bien modifiée. Cette modification se caractérise par une baisse de l'électroactivité de l'électrode due à la présence d'un film formé par l'amoxicilline à sa surface.

III.2.2. Etude de EPC/AMX mél. en fonction du temps de contact avec la bactérie

a. Caractérisation électrochimique de EPC/AMX mél. en fonction du temps de contact avec les bactéries

L'électrode a été caractérisée par la voltammétrie cyclique et à ondes carrées à des intervalles de 20 min. Des prélèvements de l'électrolyte contenant les bactéries ont été faits aux intervalles cités ci-dessus pour mesurer la densité optique de l'échantillon. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures ci-dessous.

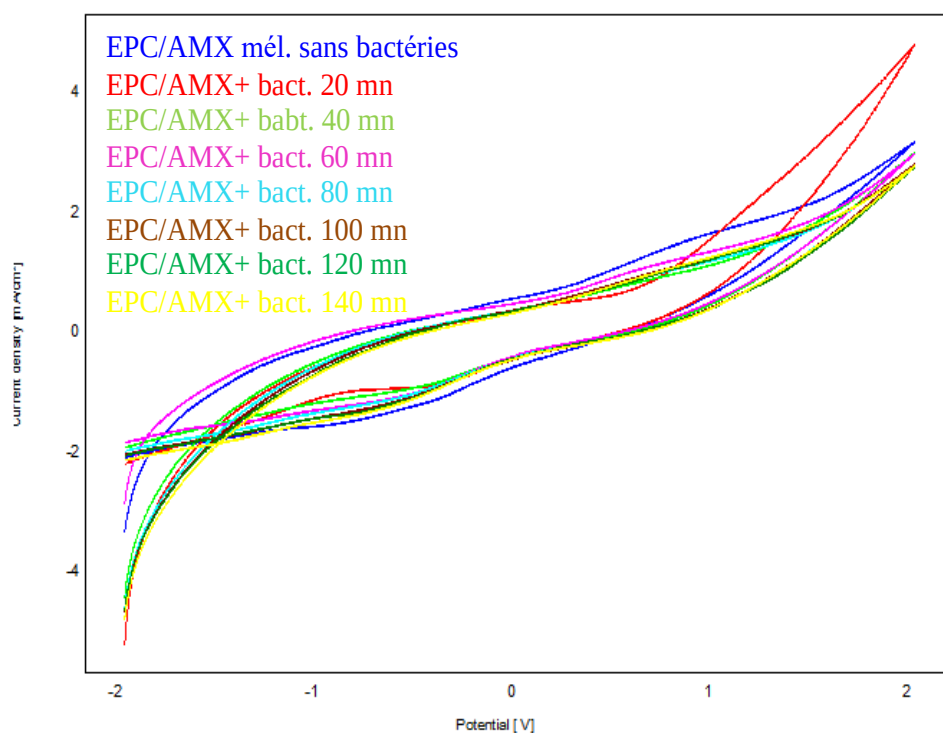


Figure IV-36 : Superposition des voltammogrammes cycliques de EPC/AMX mél. à blanc et EPC/AMX mél. à différents temps de contact avec les staphylococcus dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; $\text{pH} = 7,42$

b. Densité de courant de l'EPC/AMX mélange en fonction du temps de contact avec les *staphylococcus aureus*

Tableau IV-10 : Densité de courant de l'EPC/AMX mél. en fonction du temps de contact avec la bactérie

Temps (min)	0	20	40	60	80	100	120	140
di ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	156	133,9	125,5	141,4	149,4	138,9	122,8	141,4

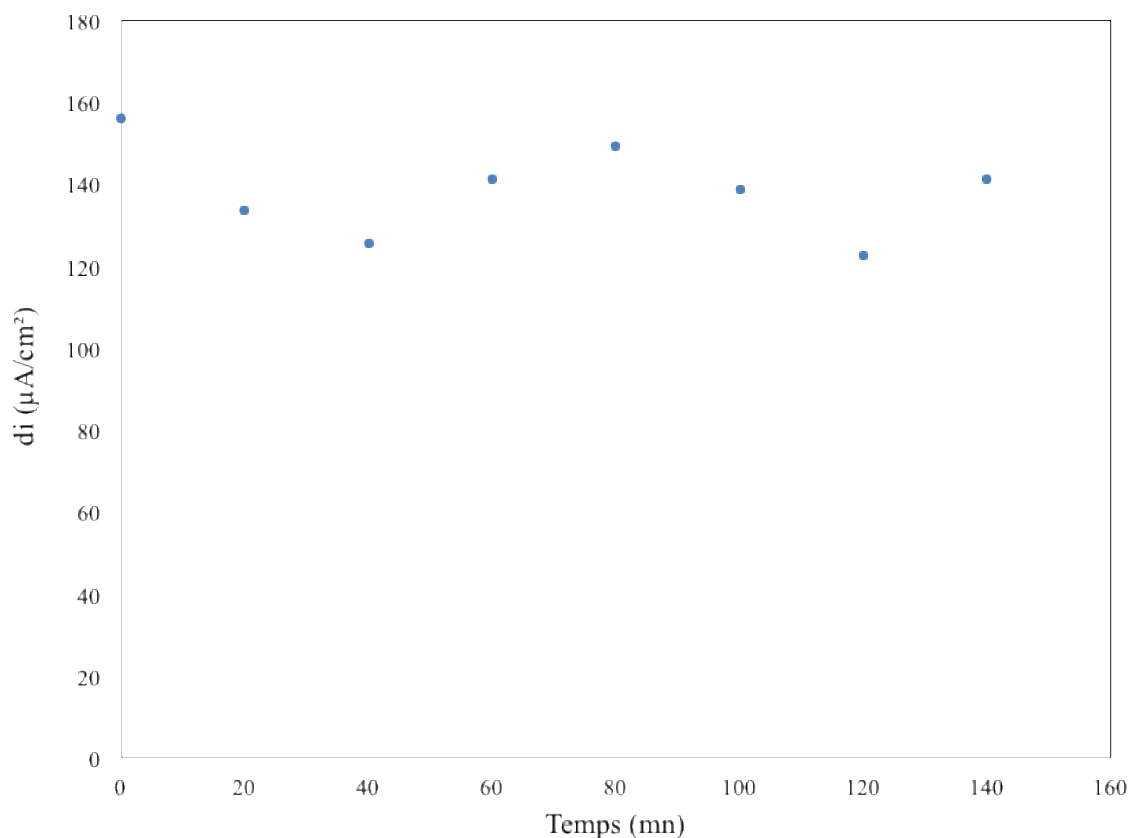


Figure IV-37 : Densité de courant en fonction du temps de contact de EPC/AMX mél. avec la bactérie

L'électrode constituée du mélange de l'amoxicilline avec la pâte de carbone à différents temps de contact avec la bactérie montre une faible électro-activité par rapport à celle sans bactéries. La détection de la bactérie est donc difficile à mener avec une telle électrode.

c. Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX mél. avec la bactérie

Tableau IV-11 : Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX mél. avec la bactérie

Temps (min)	0	20	40	60	80	100	120	140
DO	0,925	0,799	0,723	0,618	0,603	0,475	0,210	0,131

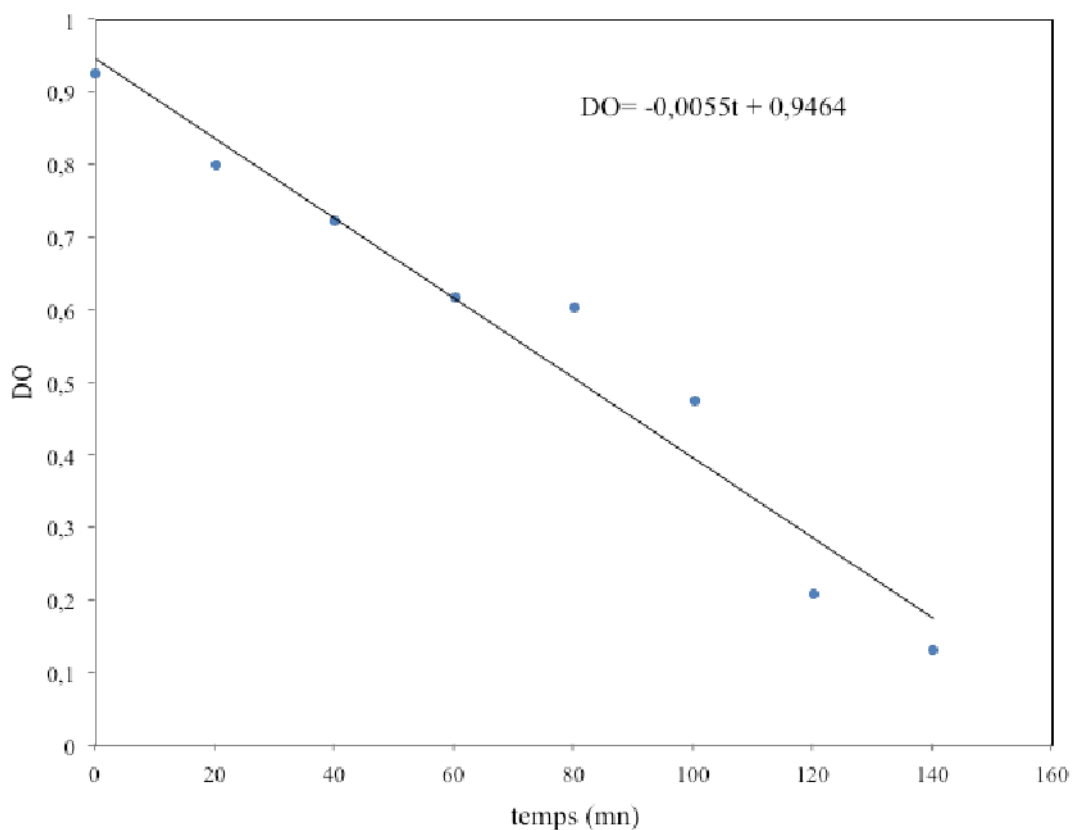


Figure IV-38 : Densité optique en fonction du temps de contact de EPC/AMX mél. avec la bactérie

On remarque que la densité optique diminue en fonction du temps de contact de l'EPC/AMX mélange avec la bactérie.

d. Comparaison du comportement physique et électrochimique de EPC/AMX mél. avant et après le contact avec la bactérie

- **Caractérisation physique de EPC/AMX mél.**

L'observation au microscope optique avant et après le contact de l'EPC/AMX mél. avec les staphylococcus a donné les résultats suivants :

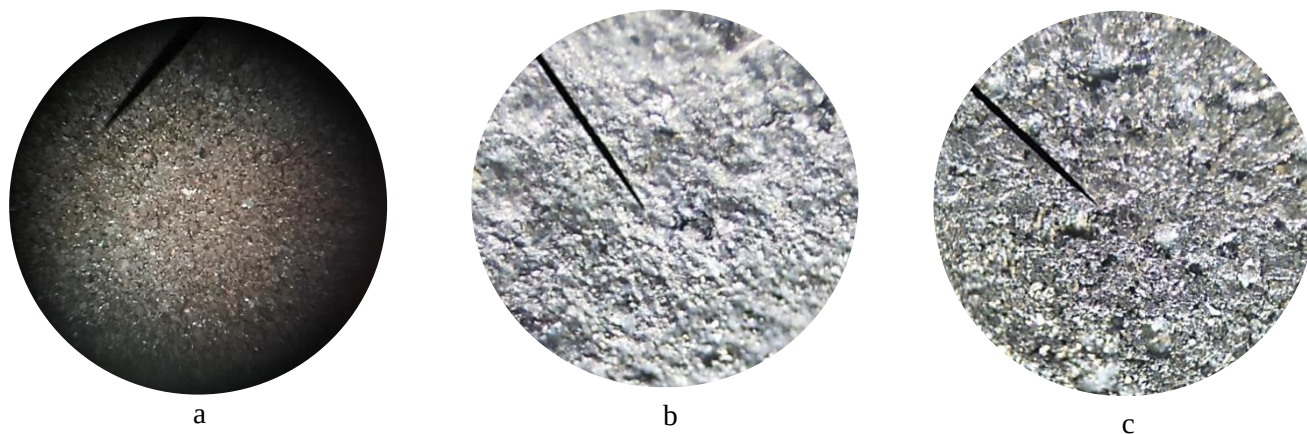


Figure IV-39 : EPC mère (a), EPC/AMX mél. avant le contact avec les bactéries (b) et après 2h20 min de contact avec les bactéries (c)

- **Caractérisation électrochimique de EPC/AMX mél.**

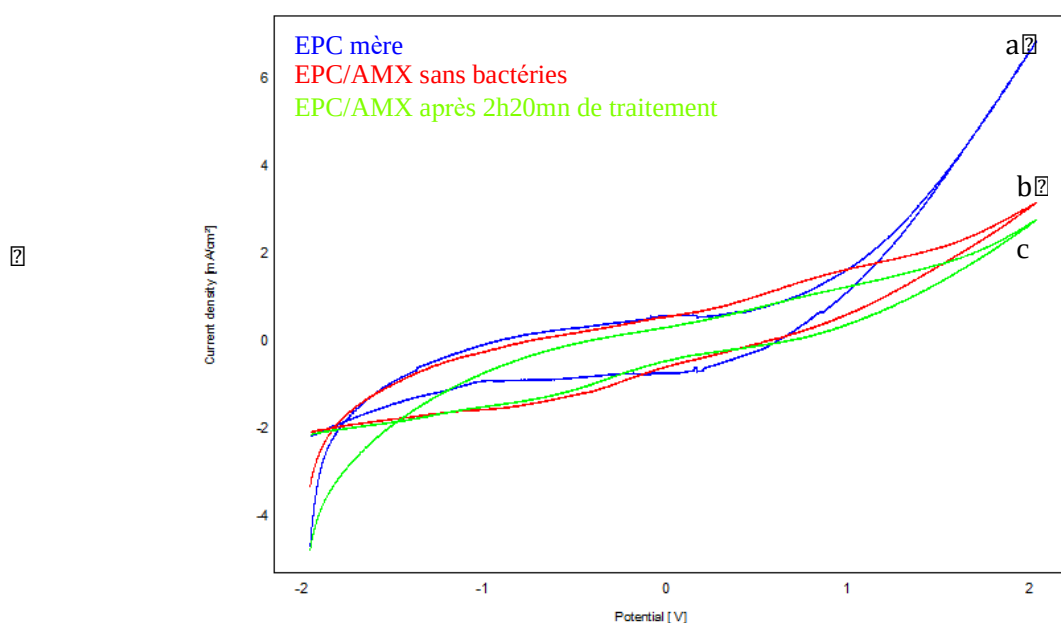


Figure IV-40 : Superposition des voltammogrammes cycliques de l'EPC mère (a), EPC/AMX mél. avant le contact avec les bactéries (b) et après 2h20 min de contact avec les bactéries (c) dans NaCl à 0,1 M ; $v = 100\text{mV/s}$, de -2V à 2V ; pH = 7,42

Après 2h20 min de traitement, le voltammogramme semble ne pas être trop différent de celui obtenu avant traitement (confirmé par la Figure IV-39).

e. Comparaison des données de la densité optique de EPC/AMX ads. et EPC/AMX mél.

Tableau IV-12 : Comparaison des données de la densité optique EPC/AMX ads.et EPC/AMX mél.

Temps (min)	0	20	40	60	80	100	120	140
DO (par dépôt)	0,925	0,873	0,803	0,720	0,643	0,589	0,384	0,250
DO (par mélange)	0,925	0,799	0,723	0,618	0,603	0,475	0,210	0,131

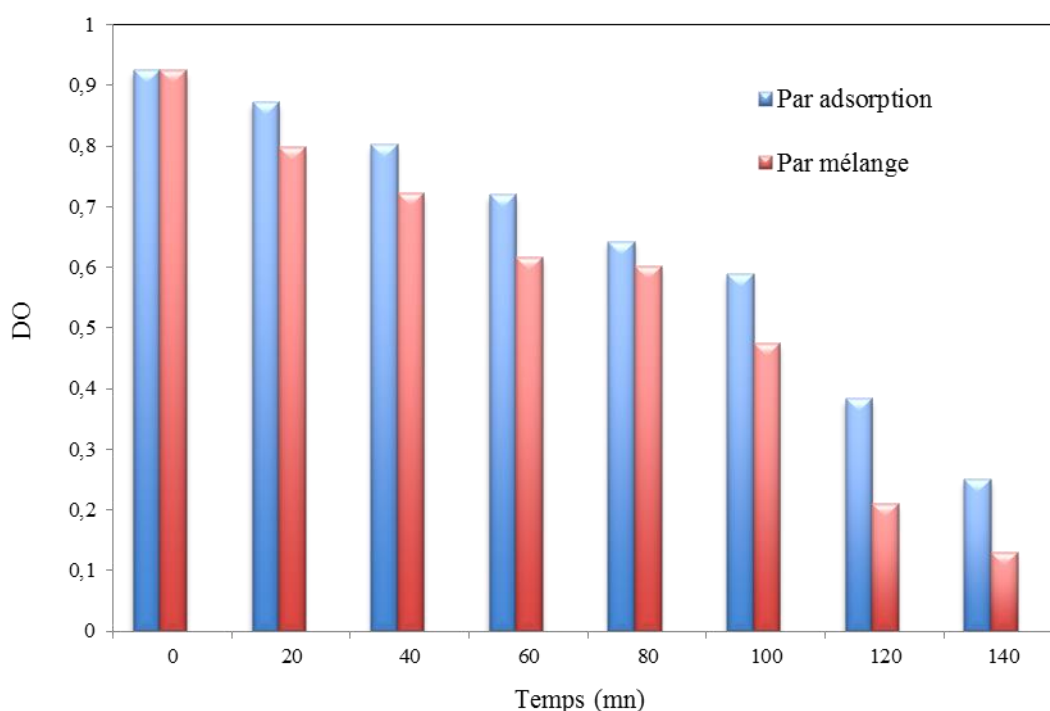


Figure IV-41 : Comparaison des données de la densité optique de EPC/AMX ads. et EPC/AMX mél.

La baisse de la densité optique de l'électrode obtenue par mélange est plus significative que celle obtenue par adsorption. Cela est sûrement dû à la forte teneur d'amoxicilline à la surface de l'électrode.

f. Effet du pH sur EPC/AMX mél. en présence des bactéries

L'électrode de pâte de carbone modifiée par l'amoxicilline par mélange n'ayant pas donné de bons résultats en milieu neutre, nous avons donc étudié son comportement électrochimique en milieu acide et basique afin de déterminer le milieu dans lequel elle pourrait être la plus électro-active.

En milieux acide et basique, elle montre une nette amélioration de son électroactivité mais pas assez suffisante pour mettre en évidence la détection de la bactérie.

Conclusion

L'étude de l'interaction entre l'électrode de pâte de carbone, l'amoxicilline et les *staphylococcus aureus* dans le but d'élaborer un capteur électrochimique a donné des résultats satisfaisants avec la modification effectuée par adsorption. L'électrode modifiée par l'amoxicilline à une concentration de 10 g/l est un bon capteur pour la détection des *staphylococcus aureus*. En plus elle conserve cette propriété dans les milieux neutre, acide et basique.

Références

- [1] Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., & von Eiff, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**, 42, 4988-4995. doi : 10.1128/JCM.42.11.4988-4995.2004
- [2] Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A., & Tenover, R. C. (Eds.). (2003). *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Herdon, VA, United States of America : American Society for Microbiology.
- [3] Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**(3), 505-520.
- [4] Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research : GMR*, **2**(1), 63-76.
- [5] Spendlove, J. C., & Fannin, K. F. (1983). Source, significance, and control of indoor microbial aerosols : human health aspects. *Public Health Reports*, **98**(3), 229.
- [6] Fitzgerald, J. R., Sturdevant, D. E., Mackie, S. M., Gill, S. R., & Musser, J. M. (2001). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* : insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(15), 8821-8826. doi : 10.1073/pnas.161098098
- [7] Reusch, M., Ghosh, P., Ham, C., Klotchko, A., Singapuri, S., & Everett, G. (2008). Prevalence of MRSA colonization in peripartum mothers and their newborn infants. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **40**(8), 667-671.
- [8] Stevens, A. M., Hennessy, T., Baggett, H. C., Bruden, D., Parks, D., & Klejka, J. (2010). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage and Risk Factors for Skin Infections, Southwestern Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*, **16**(5), 797.
- [9] van Belkum, A., Emonts, M., Wertheim, H., de Jongh, C., Nouwen, J., Bartels, H., Cole, A., Cole, A., Hermans, P., Boelens, H., Toom, N. L., Snijders, S., Verbrugh, H., & van Leeuwen, W. (2007). The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, **9**(12-13), 1471-1477. doi : 10.1016/j.micinf.2007.08.003
- [10] Bud, R. (2007) *Penicillin: Triumph and tragedy*. Norfolk, Angleterre, Oxford University Press. 340 p.
- [11] Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008). *Enzymes Lehninger Principles of biochemistry* 5th edition. Ch.4:pp. 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.
- [12] Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., & von Eiff, C. (2004). Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S

- ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 4988-4995. doi : 10.1128/JCM.42.11.4988-4995.2004.
- [13] Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A., & Tenover, R. C. (Eds.). (2003). *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Herdon, VA, United States of America : American Society for Microbiology.
- [14] Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 505-520.
- [15] Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 2(1), 63-76.
- [16] Goldstein, E. J., Citron, D. M., Wield, B., Blachman, U., Sutter, V. L., Miller, T. A., & Finegold, S. M. (1978). Bacteriology of human and animal bite wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(6), 667.
- [17] Eisenstein, B. I. (2008). Treatment challenges in the management of complicated skin and soft-tissue infections. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 2, 17-25. doi : 10.1111/j.1469-0691.2008.01922.x
- [18] Fridkin, S. K., Hageman, J. C., Morrison, M., Sanza, L. T., Como-Sabetti, K., Jernigan, J. A., Harriman, K., Harrison, L. H., Lynfield, R., & Farley, M. M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *The New England Journal of Medicine*, 352(14), 1436.
- [19] Miller, L. G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., Mehdi, S., Perlroth, J., Bayer, A. S., Tang, A. W., Phung, T. O., & Spellberg, B. (2005). Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *The New England Journal of Medicine*, 352(14), 1445.
- [20] Chen, C., Tang, J., Dong, W., Wang, C., Feng, Y., Wang, J., Zheng, F., Pan, X., Liu, D., Li, M., Song, Y., Zhu, X., Sun, H., Feng, T., Guo, Z., Ju, A., Ge, J., Dong, Y., Sun, W., Jiang, Y., Wang, J., Yan, J., Yang, H., Wang, X., Gao, G. F., Yang, R., Wang, J., & Yu, J. (2007). A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PloS One*, 2(3), e315. doi : 10.1371/journal.pone.0000315
- [21] Parsonnet, J., Hansmann, M. A., Delaney, M. L., Modern, P. A., DuBois, A. M., Wieland-Alter, W., Wissemann, K. W., Wild, J. E., Jones, M. B., & Seymour, J. L. (2005). Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4628.
- [22] David, M. D., Kearns, A. M., Gossain, S., Ganner, M., & Holmes, A. (2006). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *The Journal of Hospital Infection*, 64(3), 244-250. doi : 10.1016/j.jhin.2006.06.022

- [23] Hughes, C. M., Smith, M. B., & Tunney, M. M. (2008). Infection control strategies for preventing the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes for older people. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (1)(1), CD006354. doi : 10.1002/14651858.CD006354.pub2
- [24] Fitzgerald, J. R., Sturdevant, D. E., Mackie, S. M., Gill, S. R., & Musser, J. M. (2001). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* : insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8821-8826. doi : 10.1073/pnas.161098098
- [25] Schmid-Hempel, P., & Frank, S. A. (2007). Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathogens*, 3(10)
- [26] Reusch, M., Ghosh, P., Ham, C., Klotchko, A., Singapuri, S., & Everett, G. (2008). Prevalence of MRSA colonization in peripartum mothers and their newborn infants. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40(8), 667-671.
- [27] Stevens, A. M., Hennessy, T., Baggett, H. C., Bruden, D., Parks, D., & Klejka, J. (2010). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage and Risk Factors for Skin Infections, Southwestern Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 16(5), 797.
- [28] van Belkum, A., Emonts, M., Wertheim, H., de Jongh, C., Nouwen, J., Bartels, H., Cole, A., Cole, A., Hermans, P., Boelens, H., Toom, N. L., Snijders, S., Verbrugh, H., & van Leeuwen, W. (2007). The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9(12-13), 1471-1477. doi : 10.1016/j.micinf.2007.08.003
- [29] Spendlove, J. C., & Fannin, K. F. (1983). Source, significance, and control of indoor microbial aerosols : human health aspects. *Public Health Reports*, 98(3), 229.
- [30] Sharma, S., & Verma, K. K. (2001). Skin and soft tissue infection. *Indian Journal of Pediatrics*, 68 Suppl 3, S46-50.
- [31] Hansra, N. K., & Shinkai, K. (2011). Cutaneous community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Dermatologic Therapy*, 24(2), 263-272. doi : 10.1111/j.1529-8019.2011.01402.x; 10.1111/j.1529-8019.2011.01402.x
- [32] Collins, C. H., & Kennedy, D. A. (1999). Laboratory-acquired infections. *Laboratory-acquired Infections : History, incidence, causes and prevention*. (4th ed., pp. 234). Oxford, UK : Butterworth Heinemann.
- [33] Sinha, B., François, P. P., Nüße, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., Foster, T. J., Lew, D. P., Herrmann, M., & Krause, K. H. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cellular Microbiology*, 1(2), 101-117.
- [34] Egusa, H., Watamoto, T., Matsumoto, T., Abe, K., Kobayashi, M., Akashi, Y., & Yatani, H. (2008). Clinical evaluation of the efficacy of removing microorganisms to disinfect patient-derived dental impressions. *The International Journal of Prosthodontics*, 21(6), 531-538.

- [35] Moesby, L., Hansen, E. W., Christensen, J. D., Hoyer, C. H., Juhl, G. L., & Olsen, H. B. (2005). Dry and moist heat sterilisation cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 26(3-4), 318-323. doi :10.1016/j.ejps.2005.07.003
- [36] Leunda, A., Pauwels, K., Van Vaerenbergh, B. & Herman, P. (2010). *Sampling feasibility study of pathogenic organisms genetically modified or not in contained use activities*. Retrieved September, 2011, from [http :
//www.biosafety.be/cu/PDF/Sampling_feasibility_SBB_D2010_2505_19.pdf](http://www.biosafety.be/cu/PDF/Sampling_feasibility_SBB_D2010_2505_19.pdf)
- [37] Neely, A. N., & Maley, M. P. (2000). Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 724-726.
- [38] Bud, R. (2007) Penicillin: Triumph and tragedy. Norfolk, Angleterre, Oxford University Press. 340 p.
- [39] Chain, E, Florey, H.W., Gardner, A.D. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, 236: 226-228.
- [40] Demain, A.L., Elander, R.P., (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75: 5-19.
- [41] Geddes, A.M., Klugman K.P., Rolinson, G.N. (2007) Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30: Supp 2. 109-112.
- [42] Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H., Rolinson, G.N. (1959). Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* 183: 257
- [43] Rolinson, G.N. (1998) Forty years of beta-lactam research. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 41: 589-603.
- [44] Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K.-I., MacNeil, J.D. (1995). Chemical Analysis of Antibiotics Used in Agriculture. AOAC International, 452p.
- [45] Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). Amino acids, peptides, and proteins *Lehninger Principles of biochemistry* 4th edition. Ch.3: pp. 75-115. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Company.
- [46] Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2004) *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* 5th edition. États-Unis, McGraw-Hill Medical.
- [47] Galichet, L.Y., Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, D. (2004) *Clarke's analysis of drugs and poisons* 3rd edition, Pharmaceutical Press, Londres, Angleterre, 2101 p.
- [48] Miller, E. L. (2002). The penicillins: a review and update. *Midwifery and Women's Health*. 47: 426-434.
- [49] Petri Jr., W. (2004) Antimicrobial agents: Penicillins, Cephalosporins and other β -lactam Antibiotics. Ch.47: pp. 1189-1218. Goodman & Gilman's *The pharmacological basis of*

- therapeutics. Hardmand, J.G., Limbird, L.E., H., Goodman Gilman, A. (Eds). McGraw-Hill Professionnal.
- [50] Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008).Enzymes Lehninger Principles of biochemistry 5th edition. Ch.4:pp. 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.
- [51] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, Klein, D. (2003).Microbiologie. Paris, France, Édition de Boek.
- [52] T. Odake, M. Tabuchi, T. Sato, H. Susaki, T. Korenaga (2001), Analytical Sciences, 17: 535.
- [53] Stevens, A. M., Hennessy, T., Baggett, H. C., Bruden, D., Parks, D., & Klejka, J. (2010). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriage and Risk Factors for Skin Infections, Southwestern Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 16(5), 797.
- [54] E .Bergogne-bérézin, P.Dellamonica ; antibiothérapie en pratique clinique ; Masson ; 2^{eme} édition 1999
- [55] J.C. Miller, J.N. Miller, Analyst, 113 (1988) 1351–1356.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire s'est intéressé aux axes suivants :

- ☑ La mise au point d'un bioréacteur à *scedosporium* pour la dépollution des eaux contaminées par les résidus médicamenteux et d'élaborer des capteurs électrochimiques permettant d'évaluer les performances épuratoires de ce bioréacteur. Pour le suivi de la cinétique de la biodégradation du PAP, on a procédé à deux techniques électrochimiques, la VC et la VOC et avec deux méthodes d'étalonnages : l'étalonnage externe et l'étalonnage interne.
- ☑ La synthèse des molécules hétérocyclique nitrée à partir des molécules mères commerciaux, puis l'étude du pouvoir antioxydant de ces molécules avant et après la nitration par deux voies : Electrochimique et biologique.
- ☑ L'étude de la détection des *staphylococcus aureus* dans des solutions. Cette étude a été réalisée par l'EPC. Celle-ci a été modifiée par la molécule de l'amoxicilline jouant le rôle de biorecepteur à la surface de l'électrode synthétisée. Une application analytique a été réalisée, elle consiste à ajouter des bactéries dans des solutions et à y étudier le comportement électrochimique des biocapteurs.

En conclusion :

- ☑ L'ECV a prouvé une bonne adaptation dans le domaine de concentration étudié, notamment au début des tests avec 0,9 g/l de PAP. Par contre l'EPC n'a pas réussi à suivre la cinétique de la biodégradation à cause du problème de passivation au-delà de 0,6 g/l. L'efficacité du champignon *Scedosporium dehoogii* pour l'épuration des solutions contaminées par le PAP a été validée. Les résultats d'études ont montré que la méthode d'analyse la plus fiable a été la VC par étalonnage externe en utilisant l'ECV.
- ☑ L'Etude de l'oxydo-réduction électrochimique et l'évaluation de l'activité biologique des composés nitrés, ont aboutis aux mêmes résultats. Le 1,2-benzendiol a présenté une activité antioxydante importante, en revanche, le 1,6- dinitronaphtalène-2-ol, était totalement inactif vis-à-vis du radical DPPH.
- ☑ Les biocapteurs élaborés, en plus de détecter les bactéries *staphylococcus aureus*, développent une autre propriété, celle d'épuratrice, se traduisant par la baisse de la densité optique de la bactérie. Le matériau (EPC) utilisé dans ce travail a prouvé une grande efficacité comme support pour étudier le comportement électrochimique des

bactéries à la surface de l'électrode qui en émanaient. Les résultats obtenus nous montrent que l'électrode élaborée est particulièrement capable de détecter les bactéries étudiées à de faibles densités optiques. Cette électrode affiche une bonne reproductibilité des résultats, une bonne électroactivité en présence des bactéries dans les milieux acide, neutre et basique et une durée de détection très satisfaisantes.

Perspectives

En perspective, nous prévoyons de réaliser :

- Le Suivi de la biodégradation du PAP avec des EPC modifiées par des molécules nitrées pour vérifier le recul de la passivation.
- L'étude de l'efficacité de la biodégradation du PAP avec d'autres souches du champignon *Scedosporium dehoogii*.
- Un capteur électrochimique pour un micropolluant émergent, le diclofenac, pourrait être mis au point et testé avec *Scedosporium dehoogii* car il fait partie des molécules actuellement sous surveillance.
- La synthèse d'autre composés hétérocycliques en évaluant leurs l'activité pharmacologique.
- L'élaboration des capteurs électrochimiques pour la détection de certaines bactéries causant les maladies infectieuses d'origine hydriques.