



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Génie des Procédés et de l'Environnement*

Présentée et soutenue par :
SEKLI-BELAIDI Fadhila
Le mercredi 02 février 2011

Titre :
Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin

JURY

Stéphane ARBAULT - *Chargé de Recherche CNRS, Université de Bordeaux 1 (Examinateur)*
Maurice COMTAT - *Professeur Emérite, Université Toulouse III (Président de jury)*
Anne GALINIER - *Maître de Conférence- Practicien Hospitalier, Université Toulouse III (Examinateur)*
Philippe HAPIOT - *Directeur de Recherche CNRS, Université Rennes 1 (Examinateur)*

Ecole doctorale : *Mécanique, Energétique, Génie Civil et Procédés (MEGeP)*

Unité de recherche : *Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503*

Directeur(s) de Thèse : *Pierre GROS- Professeur des Universités, Université Toulouse III*
Pierre TEMPLE-BOYER - Chargé de Recherche CNRS, Université Toulouse III

Rapporteurs : *Nicole JAFFREZIC-RENAULT - Directeur de Recherche CNRS, Université Lyon 1*
Serge COSNIER - Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble 1

Je dédie ce travail

A mes parents sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui...

A Mourad, Merci pour ton don de soi, ta patience et de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire . . .

" Le vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier".

Pierre Gilles-De Gennes, Prix Nobel de physique en 1991, (1932-2007)

Remerciements

Remerciements

Ah, la thèse, quelle belle aventure qui s'achève ! Quelle exaltation à faire progresser la connaissance qui se dévoile un peu plus tous les jours au-delà des limites du visible. Quelle détermination et quelle persévérance d'avancer par petits pas dans les méandres mal connus de la science sans apercevoir le bout du chemin.

Pendant trois années, venir chaque matin avec le même désir d'apprendre, de découvrir et de créer, n'est possible que si des personnes vous soutiennent et vous encouragent. Ce fût le cas et l'alchimie fonctionne à merveille. Merci à tous ceux qui y ont contribué. Vous quitter se fera à contrecœur.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude à Pierre GROS et Pierre TEMPLE-BOYER qui ont dirigé cette thèse et sans qui tout ce travail n'aurait pas pu être mené. Leur rigueur, leur esprit d'analyse m'ont permis d'acquérir des compétences dans plusieurs domaines. Merci pour le soutien qu'ils m'ont apporté pendant ces trois années.

Je voudrais particulièrement remercier M. Maurice COMTAT pour avoir suivi ce travail et m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Toujours de bons conseils toutes catégories confondues (scientifiques, techniques, pédagogiques et culturelles). Sa constante disponibilité à mon égard et ses conseils lui valent ma gratitude.

Ces travaux de recherche ont été menés au sein du laboratoire de Génie Chimique. A ce titre, je souhaite remercier M. Pierre AIMAR, directeur de l'UMR 5503, de m'avoir accueillie pendant plus de trois ans. Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur soutien et leur bonne humeur. En particulier, Laure LATAPIE pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie Mme. Nicole JAFFREZIC-RENAULT, M. Serge COSNIER, M. Stéphane ARBAULT et M. Philippe HAPIOT d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit et de me faire bénéficier de leur expérience en jugeant mes travaux.

Je suis très reconnaissante à M. Anne GALINIER, toujours disponible pour discuter de l'interprétation des mesures ou d'un test expérimental de telle ou telle idée, n'hésitant pas à consacrer des heures entières à élucider les problèmes. Je la remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire de biochimie au CHU de Rangueil, pour sa gentillesse, sa motivation et ses conseils qui me furent précieux pour la rédaction de mon mémoire.

Que serait cette thèse sans mes collègues les thésards et les stagiaires ? William (pour son encouragement et son soutien), Raluca, Charlotte, Danchang, Cyril, Olivier et Nicolas.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe Capteurs Electrochimiques et Procédés, en particulier : Benjamin, Teddy, William et David.

Des chaleureux remerciements pour l'ensemble des membres de l'équipe microdispositifs et microsystèmes du laboratoire LAAS, en particulier : Céline, Jérôme, Laetitia, Marie-Laure et Emilie.

Je remercie également toutes les techniciennes du laboratoire de Biochimie au CHU Ranguel pour leur aide et leur gentillesse.

Arrivée au terme (déjà la fin !) du parcours universitaire, j'exprime toute ma gratitude à ceux qui m'ont donné goût aux sciences et à la recherche : mes parents et mes enseignants.

Sans eux je ne serais pas là, et surtout je ne serais pas moi-même. Je dédie cette thèse à mes parents. Pensées affectueuses pour mon compagnon de chemin Mourad pour le soutien et les moments inoubliables.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Acides ascorbique et urique, molécules électroactives et antioxydantes	4
I.1. Les acides ascorbique et urique et le stress oxydant	6
I.1.1. L'acide ascorbique	6
I.1.1.1. Historique de l'acide ascorbique	6
I.1.1.2. Les sources d'acide ascorbique	7
I.1.1.3. Le métabolisme de l'acide ascorbique	8
I.1.1.4. Les rôles physiologiques de l'acide ascorbique	9
I.1.1.5. Mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique	10
I.1.2. L'acide urique	11
I.1.2.1 Généralités sur l'acide urique	11
I.1.2.2 Rappels physiologiques du bilan de l'acide urique	12
I.1.2.3. Propriétés antioxydantes de l'acide urique	13
I.1.2.4. Mécanisme d'oxydation de l'acide urique	14
I.1.3. Le stress oxydant : origine et conséquences	14
I.1.3.1. Origines des espèces réactives	14
I.1.3.2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques	16
I.1.3.3. Le déséquilibre : origine et conséquences	17
I.1.3.4. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires	18
I.1.3.5. Les pathologies liées au stress oxydant	19

Sommaire

I.1.3.6. Les défenses antioxydantes	21
I.1.3.7. Les antioxydants, des agents préventifs dans les apports nutritionnels	27
I.1.3.8. Méthodes d'évaluation du stress oxydant et applications médicales	30
I.2. Introduction à l'électrochimie	34
II.2.1. Définition	34
I.2.1.1. Interface à l'équilibre	34
I.2.1.2. Interface hors d'équilibre	35
I.2.2. Cinétique électrochimique	36
I.2.2.1. Régime d'activation pur	37
I.2.2.2. Régime de diffusion pur	40
I.2.2.3. Régime mixte d'activation diffusion	42
I.2.3. Les méthodes électrochimiques utilisées	43
I.2.3.1. La voltammétrie cyclique	43
I.2.3.2. La voltammétrie impulsionnelle	47
I.2.4. Les ultramicroélectrodes	49
Conclusion	52
Références bibliographiques	53

Chapitre II: Elaboration et mise au point du microcapteur à acides ascorbique et urique par électropolymérisation du PEDOT	62
II.1. Modification de surface	64
II.2. Polymères conducteurs	68
II.2.1. Généralités sur les polymères conducteurs	69
II.2.2. Synthèse des polymères conducteurs	70
II.2.3. Applications des polymères conducteurs	72
II.2.4. Les poly(éthylènedioxythiophènes) (PEDOT)	73
II.2.5. Electropolymérisation du (PEDOT)	74
II.3. Application de l'interface modifiée par un film de PEDOT à l'élaboration d'un capteur pour le dosage des acides ascorbique et urique	74
II.3.1. Matériels et méthodes	75
II.3.1.1. Réactifs et solutions électrolytiques	75
II.3.1.2. Appareillage	75
II.3.2. Elaboration des microélectrodes fonctionnalisées par électropolymérisation du 3,4-éthylènedioxythiophène	77
II.3.3 Détection électrochimique des acides ascorbique et urique	79
II.3.3.1. Cinétique électrochimique des deux acides ascorbique et urique	79
II.3.3.2. Oxydation simultanée des acides ascorbique et urique	82
II.3.3.3. Effet de la vitesse de balayage des potentiels	83
II.3.3.4. Utilisation des méthodes électrochimiques impulsionnelles	85

Sommaire

II.3.4. Effet de l'épaisseur de la couche de PEDOT déposée	86
II.3.5. Etude de quelques paramètres de dépôt	88
II.3.5.1. La concentration du monomère EDOT	89
II.3.5.2. La limite anodique de la fenêtre de potentiel d'électropolymérisation	90
II.3.5.3. La vitesse de balayage d'électropolymérisation	93
II.3.6. Performances analytiques du capteur	94
II.3.6.1. Dosage individuel des acides ascorbique et urique	94
II.3.6.2. Dosage simultané des deux acides ascorbique et urique	97
II.3.7. Proposition d'un mécanisme EC' de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique	98
II.3.7.1. Dosage de l'acide urique en absence et en présence d'acide ascorbique	99
II.3.7.2. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction de la concentration d'acide ascorbique	100
II.3.7.3. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction des concentrations d'acide déhydroascorbique	101
II.3.8. Etude des interférents	102
Conclusion	104
Références bibliographiques	105
Chapitre III : Application du microcapteur à l'analyse du sérum sanguin	117
III.1. Quelques repères historiques de biochimie	118
III.2. La biochimie du sang	119

Sommaire

III.3. Techniques expérimentales de détection des acides ascorbique et urique sériques	122
III.3.1. Dosage de l'acide ascorbique	123
III.3.1.1. Principe du dosage	123
III.3.1.2. Matériels	123
III.3.1.3. Réactifs	124
III.3.1.4. Prétraitement des échantillons	125
III.3.1.5. Procédure du dosage	125
III.3.1.6 .Performances analytiques	126
III.3.2. Dosage de l'acide urique	127
III.3.2.1. Principe du dosage	127
III.3.2.2. Matériels et réactifs	127
III.3.2.3. Procédure du dosage	128
III.3.2.4. Performances analytiques	128
III.4. Dosage électrochimique des acides ascorbique et urique sérique	129
III.4.1. Matériels et réactifs	129
III.4.2. Procédure de dosage des deux acides dans le sérum sanguin	130
III.4.3. Performances analytiques	133
III.5. Justesse du capteur	134
III.5.1 Effet de la matrice sur l'état de surface de l'électrode	135
III.5.2 Consommation de l'acide ascorbique au cours de la procédure d'étalonnage	137

Sommaire

Conclusion	142
Références bibliographiques	143
Chapitre IV : Microcapteurs fabriqués en technologie silicium fonctionnalisés par un film de PEDOT	147
IV.1. Développement du microcapteur électrochimique	148
IV.1.1. Description du procédé technologique	149
IV.2. Application des microcapteurs électrochimiques à la détection des acides ascorbique et urique	154
IV.2.1. Matériels et méthodes	154
IV.2.1.1. Réactifs et solutions électrolytiques	154
IV.2.1.2. Appareillage	154
IV.2.2. Caractérisation électrochimique des différentes électrodes du microdispositif	155
IV.2.2.1. Microélectrode d'or	155
IV.2.2.2. Microélectrode de platine	156
IV.2.2.3. Microélectrode d'argent	157
IV.2.3. Fonctionnalisation de la surface par électropolymérisation du PEDOT	159
IV.2.4. Détection électrochimique des acides ascorbique et urique	160
IV.2.5. Performances analytiques du capteur	162
Conclusion	163
Références bibliographiques	164
Conclusion générale	165
Abréviations & Symboles	168

Introduction Générale

Dans un monde où l'espérance de vie de l'espèce humaine ne cesse d'augmenter (elle est aujourd'hui de 80 ans alors qu'elle était de moins de 20 ans dans la Grèce antique), l'engouement pour des protocoles, thérapies et habitudes alimentaires permettant de ralentir le processus de vieillissement et d'améliorer la qualité de vie ne se dément plus. Un des moyens privilégiés dans cette quête fait appel aux molécules antioxydantes (vitamines, thiols, polyphénols,...) depuis que les radicaux libres sont reconnus pour intervenir dans les mécanismes du vieillissement. Cette théorie, proposée par D.Harman il y a plus de 40 ans, postule que le vieillissement est la conséquence d'une altération progressive des constituants cellulaires sous l'effet des radicaux libres. Ce processus biologique, connu sous le nom générique de « stress oxydant », est aujourd'hui au centre de plusieurs pathologies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives.

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

La conception, l'élaboration, la mise au point et les applications de nouveaux capteurs électrochimiques, particulièrement ceux à détection ampérométrique, ont fait l'objet d'une intense activité de recherche au cours de ces dernières années. Bien que les réalisations industrielles de tels outils analytiques restent limitées, (seul le biocapteur à glucose a connu un succès commercial indéniable), les travaux de recherche actuels visent toujours à améliorer leurs performances analytiques, notamment en termes de spécificité et de sensibilité, en tirant profit des avantages liés au concept et procédé de modification de surfaces des électrodes. C'est dans ce cadre général que s'inscrivent les travaux de cette thèse, réalisés dans le cadre d'une collaboration de recherche entre le Laboratoire de Génie Chimique (LGC), le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LASS/CNRS) et le Laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU Ranguéil).

L'objectif est de développer des capteurs et des méthodes électrochimiques pour la détection des antioxydants dans les milieux biologiques, précisément les acides ascorbique et urique sériques, dans un contexte d'étude et d'évaluation du stress oxydant. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de précédentes études réalisées au LGC avec les Laboratoires Pierre Fabre (travaux de thèse d'A. Ruffien-Ciszak,) qui ont montré la possibilité d'évaluer la capacité antioxydante globale du stratum corneum par le biais de mesures électrochimiques directes à la surface de l'épiderme en utilisant des microélectrodes métalliques non modifiées. Si elle a démontré la pertinence de la démarche et ses possibilités d'exploitation, cette première étape a également mis en exergue les limitations du protocole de fabrication traditionnelle des microélectrodes et d'exploitation des résultats d'une mesure globale. Or, sur un matériau d'électrode classique (or, platine ou carbone), les acides ascorbique et urique s'oxydent à des potentiels proches, ce qui engendre un chevauchement de leur vague d'oxydation et rend difficile la quantification des espèces. Le travail présenté dans ce mémoire a pour ambition de pérenniser le procédé analytique et de le renforcer dans deux voies : d'une part dans le domaine de la recherche fondamentale, en proposant des capteurs spécifiques des molécules antioxydantes grâce au développement d'électrodes modifiées qui aboutissent à des mesures sélectives, spécifiques et quantitatives ; d'autre part au niveau du transfert de technologie, par la conception et l'utilisation de microélectrodes en technologie silicium.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre introduit les différents rôles physiologiques des acides ascorbique et urique, en particulier leur implication dans le système de lutte contre le stress oxydant. Les différentes méthodes d'évaluation du stress oxydant et de détection des molécules antioxydantes sont ensuite présentées succinctement. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée aux principes et méthodes électrochimiques utilisées au cours de ce travail.

Le deuxième chapitre présente le concept de modification de surface d'électrode, les différentes stratégies de fonctionnalisation proposées dans la bibliographie et les performances analytiques associées. L'accent est mis sur le processus de modification par électrodépôt d'un polymère conducteur (le poly (3,4- éthylènedioxythiophène) ou PEDOT). L'interface ainsi modifiée est d'abord appliquée à l'oxydation des acides ascorbique et urique dans des solutions modèles, afin de déterminer les performances analytiques du capteur (seuil

limite de détection, domaine de linéarité, sensibilité) ainsi que les caractéristiques métrologiques (répétabilité et reproductibilité).

Le troisième chapitre présente les performances du capteur appliqué à l'analyse dans le sérum sanguin. Les protocoles d'analyse électrochimique et les différentes méthodes analytiques classiques utilisées au laboratoire de biochimie sont détaillés. Les résultats du microcapteur électrochimique sont comparés à ceux obtenus par chromatographie et par spectrométrie.

Le quatrième et dernier chapitre est consacré aux premiers résultats obtenus avec les microcapteurs intégrés sur silicium et fonctionnalisés par un film de PEDOT. Dans un premier temps, les différents matériaux d'électrode déposés sur le substrat silicium sont caractérisés et leurs comportements électrochimiques comparés à ceux des métaux massifs. Les performances analytiques des microcapteurs ainsi réalisés pour le dosage des acides ascorbique et urique sont confrontées à celles obtenues avec les microélectrodes d'or massif précédemment utilisées.

Chapitre I : Acides ascorbique et urique, molécules
électroactives et antioxydantes

Chapitre I : Acides ascorbique et urique, molécules électroactives et antioxydantes

I.1. Les acides ascorbique et urique et le stress oxydant

I.1.1. L'acide ascorbique

I.1.1.1. Historique de l'acide ascorbique

I.1.1.2. Les sources d'acide ascorbique

I.1.1.3. Le métabolisme de l'acide ascorbique

I.1.1.4. Les rôles physiologiques de l'acide ascorbique

I.1.1.4.1. Rôle d'hydroxylation

I.1.1.4.2. Rôle antioxydant

I.1.1.5. Mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique

I.1.2. L'acide urique

I.1.2.1 Généralités sur l'acide urique

I.1.2.2 Rappels physiologiques du bilan de l'acide urique

I.1.2.3. Propriétés antioxydantes de l'acide urique

I.1.2.4. Mécanisme d'oxydation de l'acide urique

I.1.3. Le stress oxydant : origine et conséquences

I.1.3.1. Origines des espèces réactives

I.1.3.2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques

I.1.3.3. Le déséquilibre : origines et conséquences

I.1.3.4. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

I.1.3.5. Les pathologies liées au stress oxydant

I.1.3.6. Les défenses antioxydantes

I.1.3.6.1. Les mécanismes de défense enzymatiques

I.1.3.6.2. Les mécanismes de défense moléculaires

I.1.3.7. Les antioxydants, des agents préventifs dans les apports nutritionnels

I.1.3.8. Méthodes d'évaluation du stress oxydant et applications médicales

I.1.3.8.1. Evaluation directe des radicaux libres

I.1.3.8.2. Evaluation indirecte de l'action des espèces réactives de l'oxygène

I.1.3.8.3. Evaluation des systèmes de défense antioxydants

I.2. Introduction à l'électrochimie

II.2.1. Définition

I.2.1.1. Interface à l'équilibre

I.2.1.2. Interface hors d'équilibre

I.2.2. Cinétique électrochimique

I.2.2.1. Régime d'activation pur

I.2.2.2. Régime de diffusion pur

I.2.2.3. Régime mixte d'activation diffusion

I.2.3. Les méthodes électrochimiques utilisées

I.2.3.1. La voltammétrie cyclique

I.2.3.2. La voltammétrie impulsionnelle

I.2.4. Les ultramicroélectrodes

Conclusion

Références bibliographiques

Ce chapitre est consacré à une description générale des rôles physiologiques des acides ascorbique et urique, et de leurs implications dans le système antiradicalaire contre le stress oxydant. Outre les pathologies liées au stress oxydant, les effets des suppléments thérapeutiques sont évoqués. La deuxième partie aborde des rappels fondamentaux de l'électrochimie et des ultramicroélectrodes.

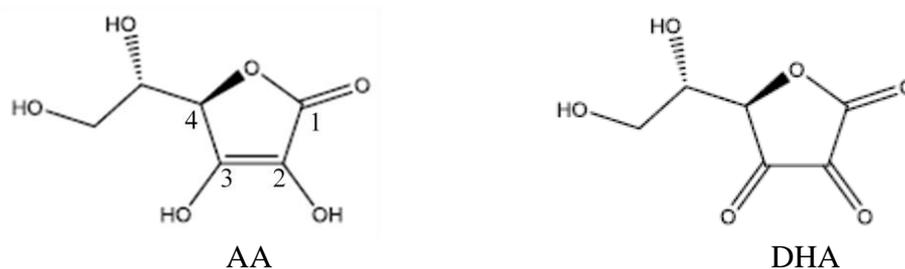
Ce chapitre a pour objectif de donner les éléments essentiels de compréhension des résultats et des interprétations, présentés aux chapitre II, III et IV. Il ne prétend pas à l'exhaustivité mais se focalise sur les techniques expérimentales utilisées au cours de cette étude.

I.1. Les acides ascorbique et urique et le stress oxydant

I.1.1. L'acide ascorbique

I.1.1.1. Historique de l'acide ascorbique

La structure chimique de l'acide ascorbique (noté AA) fut établie par Haworth en 1932. Sa formule chimique est $C_6H_8O_6$. Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui unit les carbones C_1 et C_4 . Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique (noté DHA), de formule chimique $C_6H_6O_6$.



Les autres noms de l'acide ascorbique sont la vitamine C, l'acide L-thréo-hex-2-énoïque-gamma-lactone et l'acide L-xyloascorbique ; ce dernier fait référence à ses propriétés anti-scorbutiques. Le scorbut est l'une des plus anciennes maladies connues. La première description de la maladie est retrouvée dans le papyrus égyptien d'Ebers, 1500 ans avant notre ère ^[1]. Dans l'antiquité, Hippocrate (460-370 av. J.C) déclare dans son traité "des affections internes" que « *ceux qui sont atteints ont une haleine puante, les gencives mallasses et sont sujets à l'hémorragie du nez ; ils ont parfois des ulcères aux jambes, lesquels se cicatrisent tandis que d'autres apparaissent de nouveau. La maladie guérit difficilement et conduit souvent au tombeau.* ». Durant le Moyen Age, le scorbut est endémique dans le nord de

l'Europe. Il sévit le plus souvent pendant l'hiver, lorsque les fruits et légumes frais viennent à manquer. Il est présent également pendant les guerres. Ainsi, durant la septième croisade menée par Louis IX, le sire de Joinville, en 1249, parle de la maladie comme d'une calamité : « ... *la chair de nos jambes séchait toute seule et la peau de nos jambes devenait tachetée de noir et terreuse comme une vieille chaussure. Nul n'échappait à la maladie et il fallait mourir* [2]. » Durant les XVI^{ème} et XVII^{ème} siècles, le scorbut continue à sévir chez les marins et sur la terre ferme. Il apparaît ainsi en 1870 à Londres chez les nourrissons des classes moyennes. En 1912, Funk, chimiste polonais, conclut que le rachitisme, la pellagre, le béribéri et le scorbut sont consécutifs à un déficit en composés azotés qui possèdent une structure amine. Il désigne ses composés par le terme de « vital amine » dont dérive le terme « vitamine ». A la même période, Zylva isole du citron un principe actif contre le scorbut. Si les propriétés curatives de l'orange et du citron sont connues, il faut attendre le début du XX^{ème} siècle pour identifier et préparer la substance antiscorbutique. C'est en 1927 qu'un chimiste hongrois, Szent-Györgyi, isole de manière fortuite la vitamine C. Il retrouve une substance inconnue en quantité importante dans les glandes surrénales mais aussi dans les choux et les oranges [3]. Szent-Györgyi la nomme « ignose » en référence à la terminologie des sucre « ose » et au fait que ce composé était encore inconnu. Lorsqu'il découvrit qu'il était un acide constitué de 6 atomes de carbone, il lui préféra le nom d'acide hexuronique. En 1932, Szent-Györgyi et King découvrent que l'acide hexuronique prévient le scorbut chez le cobaye. Grâce à cette découverte, la molécule est renommée en 1933 "acide ascorbique". C'est un biochimiste anglais, Norman Haworth, qui synthétise l'acide D et L ascorbique pour la première fois. En 1936 débute la production industrielle de la vitamine C. Le déficit d'apport en acide ascorbique est encore aujourd'hui un problème sanitaire pour tous les pays, car il existe des carences saisonnières ou d'origines socio-économiques liées à des régimes plus au moins volontaires. A ces déficits exogènes peuvent se rajouter un contexte clinique d'augmentation des besoins qui conduit à une carence fonctionnelle en vitamine C et aux signes du scorbut.

I.1.1.2. Les sources d'acide ascorbique

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. Il possède deux isomères : l'acide L ascorbique et l'acide D ascorbique. Seule la forme L est métabolisée de façon efficace chez l'homme, tandis que la forme D est synthétisée et utilisée chez les eucaryotes inférieurs (champignons). A l'instar des primates ou du cobaye, l'homme est incapable de la synthétiser

du fait d'une mutation du gène de la L-gluconolactone oxydase. En outre l'organisme ne dispose pas de capacité de stockage. Un apport minimal quotidien d'origine alimentaire est donc nécessaire. En France, la majeure partie des apports (70 %) provient des fruits (agrumes essentiellement) et des légumes ^[4]. Les pommes de terre, le pain et les céréales en apportent de 12 à 22 %.

I.1.1.3. Le métabolisme de l'acide ascorbique

La quantité totale d'acide ascorbique contenue dans l'organisme est estimée entre 1500 et 3000 mg. L'acide ascorbique est absorbé principalement au niveau de l'iléon grâce à un mécanisme de transport actif Na-dépendant ^[5]. Ensuite, l'acide ascorbique passe rapidement dans le sang et pénètre dans tous les tissus. Dans le sang, la majeure partie de l'acide ascorbique est sous sa forme réduite (environ 85%). Au pH physiologique, la forme majoritaire est l'anion ascorbate AH^- (85%). La forme oxydée (DHA) ne représente que 15 %. La concentration plasmatique en acide ascorbique est faible (5 à 15 $mg.L^{-1}$) alors qu'elle est 10 à 30 fois plus élevée dans les leucocytes et les plaquettes. La concentration leucocytaire reflète la concentration tissulaire. Les glandes surrénales et l'hypophyse possèdent les plus grandes concentrations tissulaires (30 à 50 μg par g). Toutefois, les reins, le cerveau et la rate contiennent à eux trois la majorité de la quantité en acide ascorbique. Les voies d'élimination de la vitamine C sont principalement les urines, les matières fécales et la sueur. L'élimination urinaire est majoritaire, la voie fécale est peu importante, sauf lors de diarrhées. Pour des apports en vitamine C de 100 mg/jour, 25 % sont excrétés. Pour les doses supérieures à 500 mg, seule une partie est ingérée et presque toute la dose absorbée est excrétée. L'élimination a lieu sous forme native ou de métabolites. Lorsque la concentration plasmatique dépasse 79 $\mu mol.L^{-1}$, l'acide ascorbique est éliminé dans les urines sous forme inchangée. Le principal métabolite de l'acide ascorbique est l'acide oxalique. A hautes doses, et en cas de déficit associé en vitamine B6, l'acide ascorbique peut être responsable de la survenue de lithiases rénales oxalocalciques ^[6].

I.1.1.4. Les rôles physiologiques de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique joue plusieurs rôles dans l'organisme, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes et hydroxylantes. Il intervient dans la synthèse du collagène, de la tyrosine, de la carnitine, du cholestérol et des acides biliaires. Il participe également au métabolisme du fer et a un rôle dans l'élimination des carcinogènes et des nitrosamines cancérigènes ^[7].

I.1.4.1. Rôle d'hydroxylation

- **Le métabolisme du collagène**

Le collagène est un peptide essentiel à la construction du tissu conjonctif, tissu de soutien des vaisseaux et des organes. On le retrouve dans la constitution de la peau et des phanères, dans la substance organique des os et des dents, au niveau des disques intervertébraux et du cristallin. L'acide ascorbique est le cofacteur d'enzymes d'hydroxylation. Sa carence est responsable d'une atteinte fonctionnelle du collagène qui peut se manifester par l'altération de la paroi vasculaire entraînant des syndromes hémorragiques, l'atteinte des muqueuses avec gingivite, l'altération de la peau et une mauvaise cicatrisation qui sont les principaux signes du scorbut ^[8].

- **Le métabolisme de la carnitine**

La carnitine est une substance retrouvée dans le muscle cardiaque, et squelettique ou encore dans le foie. Elle est impliquée dans le transport des acides gras jusqu'aux mitochondries où ils sont oxydés. Elle est synthétisée à partir de la lysine et de la méthionine grâce à deux hydroxylases à fer ferreux et dont un des cofacteurs essentiels est l'acide ascorbique ^[9].

- **Le métabolisme des catécholamines**

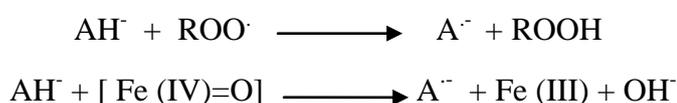
L'acide ascorbique est le cofacteur de la dopamine hydroxylase. Ainsi, il permet la transformation de la dopamine en noradrénaline. Ceci pourrait expliquer les troubles de l'humeur et mêmes les troubles psychiatriques décrits dans le scorbut.

I.1.1.4.2. Le rôle antioxydant

Le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices. C'est le plus puissant des antioxydants hydrosolubles. Il est capable de réagir directement avec les espèces réactives oxygénées et azotées. Il réduit l'anion superoxyde sous forme acide ou basique :



Il limite la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxyde et les complexes oxoferryle :



Il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques fer dépendantes en tant que transmetteur d'électrons ^[10]. Il permet aussi de régénérer la vitamine E. Son pouvoir antioxydant l'implique dans les mécanismes de défense contre plusieurs pathologies.

I.1.1.5. Mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique est un diacide dont les pKa respectifs sont égaux à 4,25 et 11,7 à 25 °C ^[11]. Son oxydation a été étudiée sur différentes électrodes ; à goutte de mercure, vitreux et platine ^[12-14]. L'oxydation de l'acide ascorbique conduit à la formation de l'acide déhydroascorbique qui s'hydrate rapidement en donnant un composé bicyclique. La figure (I.1) illustre le mécanisme de cette réaction.

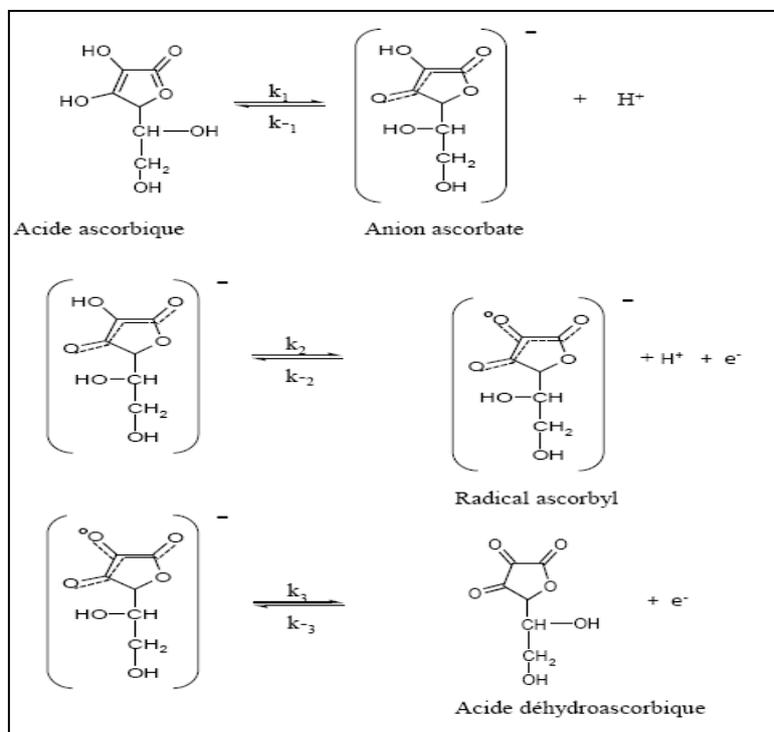
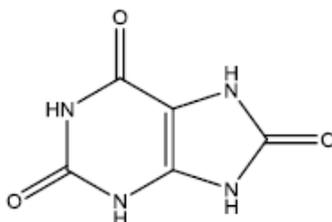


Figure I.1. Mécanisme de l'oxydation de l'acide ascorbique en milieu neutre et acide sur une électrode de platine ^[14].

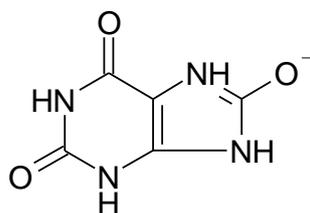
I.1.2. L'acide urique

I.1.2.1 Généralités sur l'acide urique

L'acide urique est un antioxydant hydrosoluble dont la formule chimique est $C_5N_4O_3H_4$.



Il a été longtemps associé à la goutte, une maladie autrefois appelée la "maladie des rois" ou "maladie des riches", décrite dès l'époque romaine. Elle est définie comme une surcharge urique liée à une présence endogène exagérée des purines, dont l'acide urique est le catabolite ultime à éliminer. Environ les deux tiers des purines proviennent des cellules apoptotiques, et le dernier tiers résulte des aliments ingérés. La concentration sanguine d'acide urique chez l'homme est une des plus élevées des êtres vivants. En effet, l'espèce humaine a perdu, au cours de l'évolution, l'activité de l'uricase hépatique qui transforme l'acide urique en allantoiné, converti en allantate et finalement en glyoxylate et urée. Tous ces produits sont beaucoup plus hydrosolubles que l'acide urique ^[15]. L'acide urique est ainsi devenu le produit final de dégradation des purines libres (l'adénine, la guanine, la xanthine et l'hypoxanthine) qui proviennent elles-mêmes du catabolisme des acides nucléiques endogènes et exogènes ou de la purino-génèse de *novo* (figure I.2). L'acide urique est très peu soluble dans l'eau ; dans le sang il existe à 98 % sous forme d'urate UH_2^- (urate monosodique) plus soluble que l'acide urique lui-même.



Urate UH_2^-

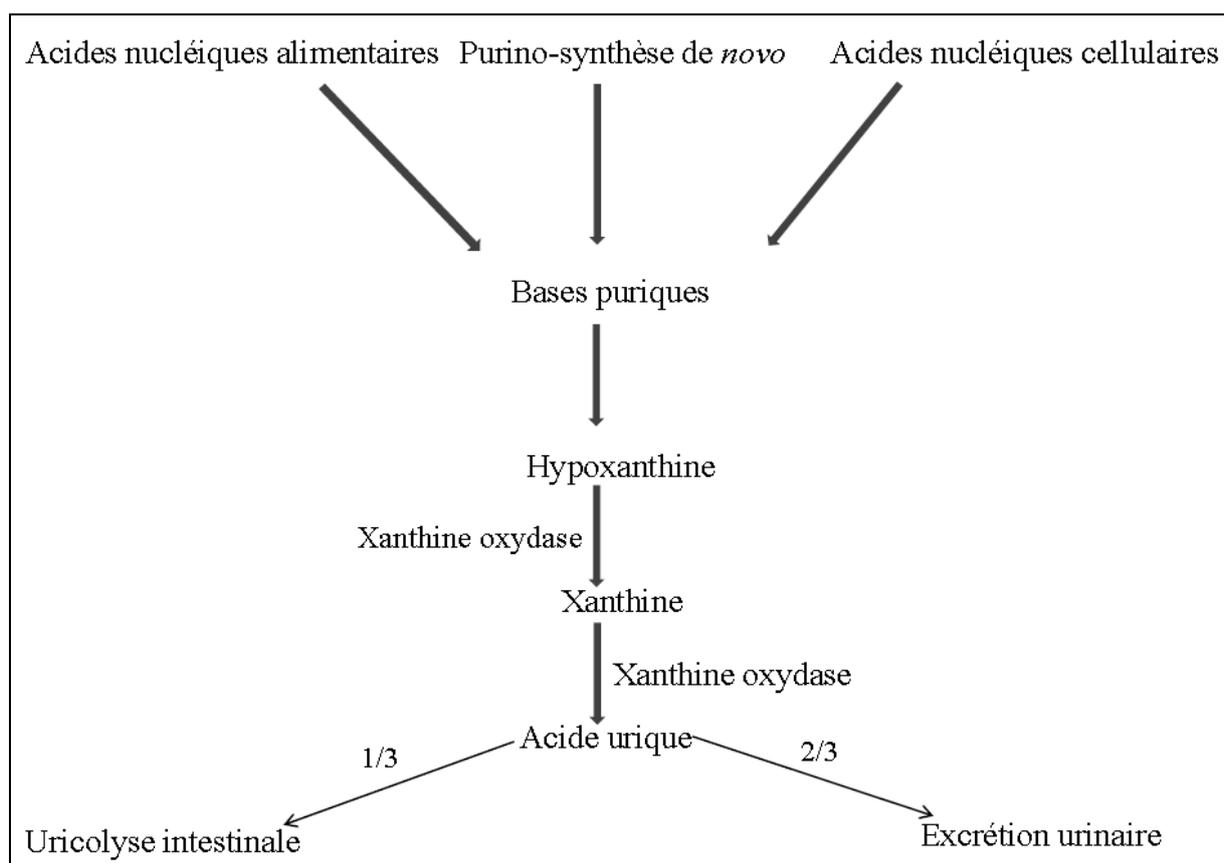


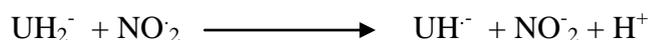
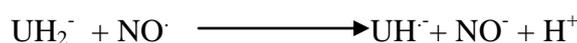
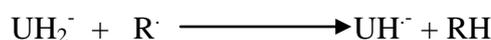
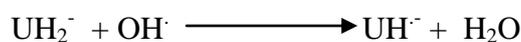
Figure I.2. Synthèse et élimination de l'acide urique au niveau de l'organisme

I.1.2.2 Rappels physiologiques du bilan de l'acide urique

Chez l'homme, la production quotidienne d'acide urique est comprise entre 600 et 800 mg, alors que la quantité d'acide urique contenue dans l'organisme varie entre 1000 et 1200 mg. Environ deux tiers de la production quotidienne d'acide urique sont excrétés dans les urines. Le tiers restant est excrété dans la bile et l'intestin pour être dégradé par l'uricase des bactéries coliques ^[16]. La concentration sérique en acide urique est comprise entre 200 et 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Comme tous les anions organiques, l'urate est transporté par les systèmes de transport luminaux et basolatéraux classiques ^[17]. 20 à 25 % de l'acide urique sont déversés dans l'intestin par les sécrétions digestives. Les bactéries intestinales, pourvues d'uricase, dégradent l'acide urique en allantoïne qui est éliminé dans les matières fécales.

I.1.2.3. Propriétés antioxydantes de l'acide urique

L'acide urique sérique est le produit final inerte du métabolisme des purines. Un excès de synthèse ou un défaut d'élimination urinaire conduit à l'hyperuricémie (augmentation de la teneur en acide urique sérique), qui est liée à l'apparition de plusieurs pathologies telles que le diabète, l'hypertension et la goutte. Il est maintenant établi que l'acide urique est un réducteur puissant des radicaux libres. En 1981, Ames et al ont montré que l'acide urique réduit les radicaux peroxyde ^[18] (constante de vitesse $3 \cdot 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), hydroxyle (constante de vitesse $7,1 \cdot 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), du monoxyde et du dioxyde d'azote (constante de vitesse $1,8 \cdot 10^7 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) ^[19]. L'acide urique est également un neutralisant puissant de l'ozone, de l'oxygène singulet, de l'acide hypochloreux et du radical superoxyde.



Il a été suggéré que les fonctions physiologiques de l'acide urique vont au-delà d'un simple marqueur du catabolisme des purines, et que ses propriétés réductrices lui permettent une forte implication dans les systèmes antiradicalaires. Autrement dit, la perte de l'enzyme uricase pendant l'évolution humaine pourrait être salutaire. Des scientifiques japonais ont rapporté la capacité de l'acide urique à empêcher l'oxydation lipidique ^[20]. L'acide urique, présent à des concentrations beaucoup plus élevées que l'acide ascorbique, apporte les deux tiers de la capacité antioxydante du plasma ^[21]. Il représente en effet seul 60% de l'activité antioxydante mais plus de 80 % en considérant la somme des concentrations de deux acides ascorbique et urique ^[22]. Au niveau du fluide lacrymal, considéré comme la première barrière protégeant la cornée contre des dommages oxydants par des réactions photodynamiques et les produits chimiques toxiques ^[23-26], l'acide urique présent à environ $179 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ apporte 38% de la capacité antioxydante.

I.1.2.4. Mécanisme d'oxydation de l'acide urique

Fichter et Kern ^[27], utilisant une électrode d'oxydes de plomb, sont parmi les premiers ayant montré que l'oxydation de l'acide urique est biélectronique et irréversible et que les produits d'oxydation dépendent du milieu d'étude (allantoïne en milieu neutre et urée en milieu acide). En 1965, Struck et Elving ont proposé un mécanisme d'oxydation de l'acide urique sur électrode en graphite pyrolytique (figure I.3) ^[28].

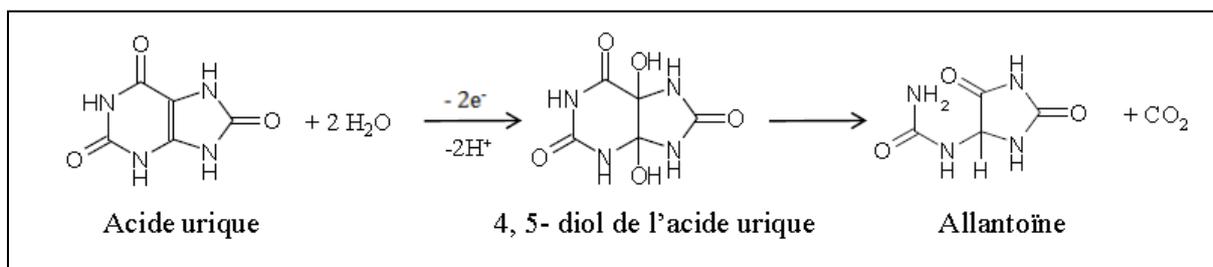


Figure I.3. Mécanisme d'oxydation de l'acide urique en milieu neutre sur une électrode en graphite pyrolytique ^[28].

I.1.3. Le stress oxydant : origines et conséquences

I.1.3.1. Origines des espèces réactives

La notion de "radicaux libres", de "stress oxydant" et d' "antioxydants" est de plus en plus souvent utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques et leurs approches thérapeutiques. On appelle radical libre toute molécule qui contient un ou plusieurs électrons libres (célibataires) la rendant très réactive. A l'état naturel, l'oxygène, qui comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche périphérique, est très instable avec une forte tendance à oxyder tout les composants qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires.

L'oxygène moléculaire, apparu voici 3 milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est le deuxième élément le plus abondant de la biosphère. Principalement formé lors de photosynthèse ^[29], c'est un carburant indispensable à la vie des cellules aérobies. L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre 2 seulement dans un processus

anaérobie). Mais tous les organismes aérobies paient le prix de ces avantages métaboliques. En effet, les cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (notées ERO) ^[30]. Les ERO sont majoritaires mais des radicaux soufrés, nitrogénés, phosphorés ou carbonés sont également formés. Ces ERO qui peuvent être radicalaires ou non radicalaires, sont aussi produites en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P)H-oxydase et les NO-synthase (figure I.4).

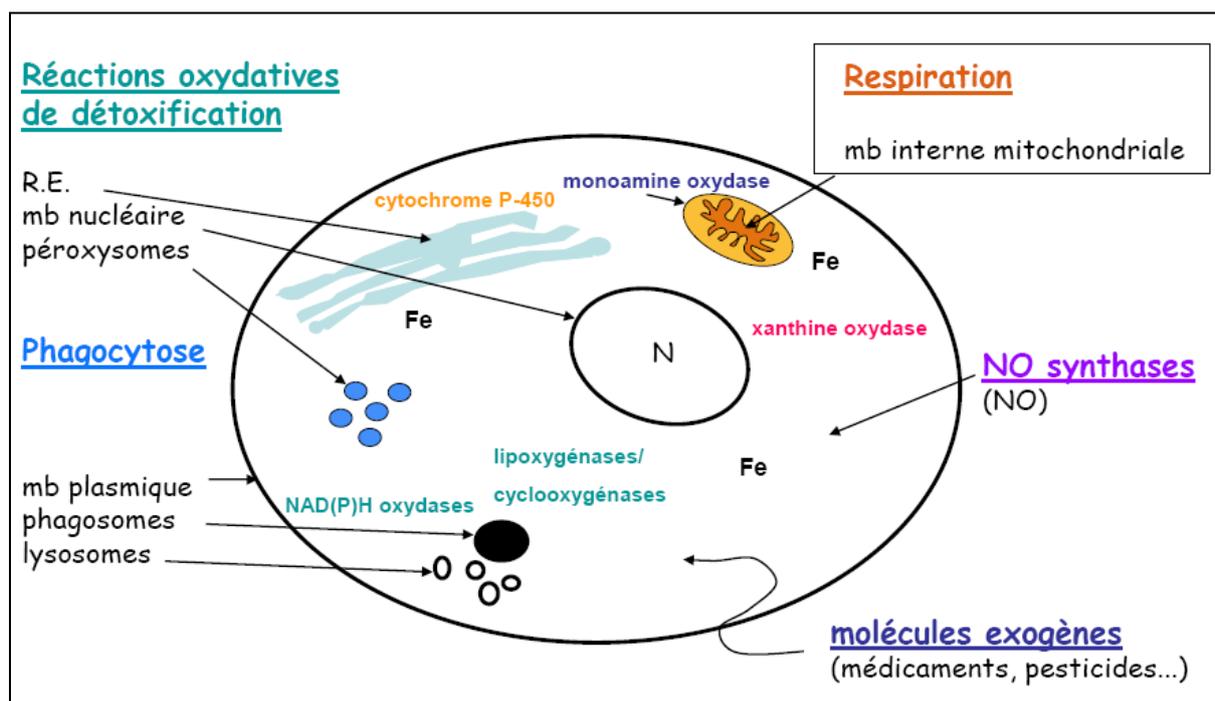


Figure I.4. Principaux sites cellulaires de productions des ERO.

Le radical OH^\bullet est formé principalement au cours de la réaction de Fenton et du cycle de Haber-Weiss mais aussi de la décomposition de l'acide peroxy-nitrique (figure I.5). Ces espèces présentent dans leur structure électronique externe un électron célibataire qui leur confère une grande réactivité chimique avec les constituants cellulaires en raison du réappariement spontané de cet électron libre. Les cellules de la paroi vasculaire présentent un état redox physiologique et l'équilibre entre la production de ces espèces réactives et leur neutralisation est lié à la présence de nombreux systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques).

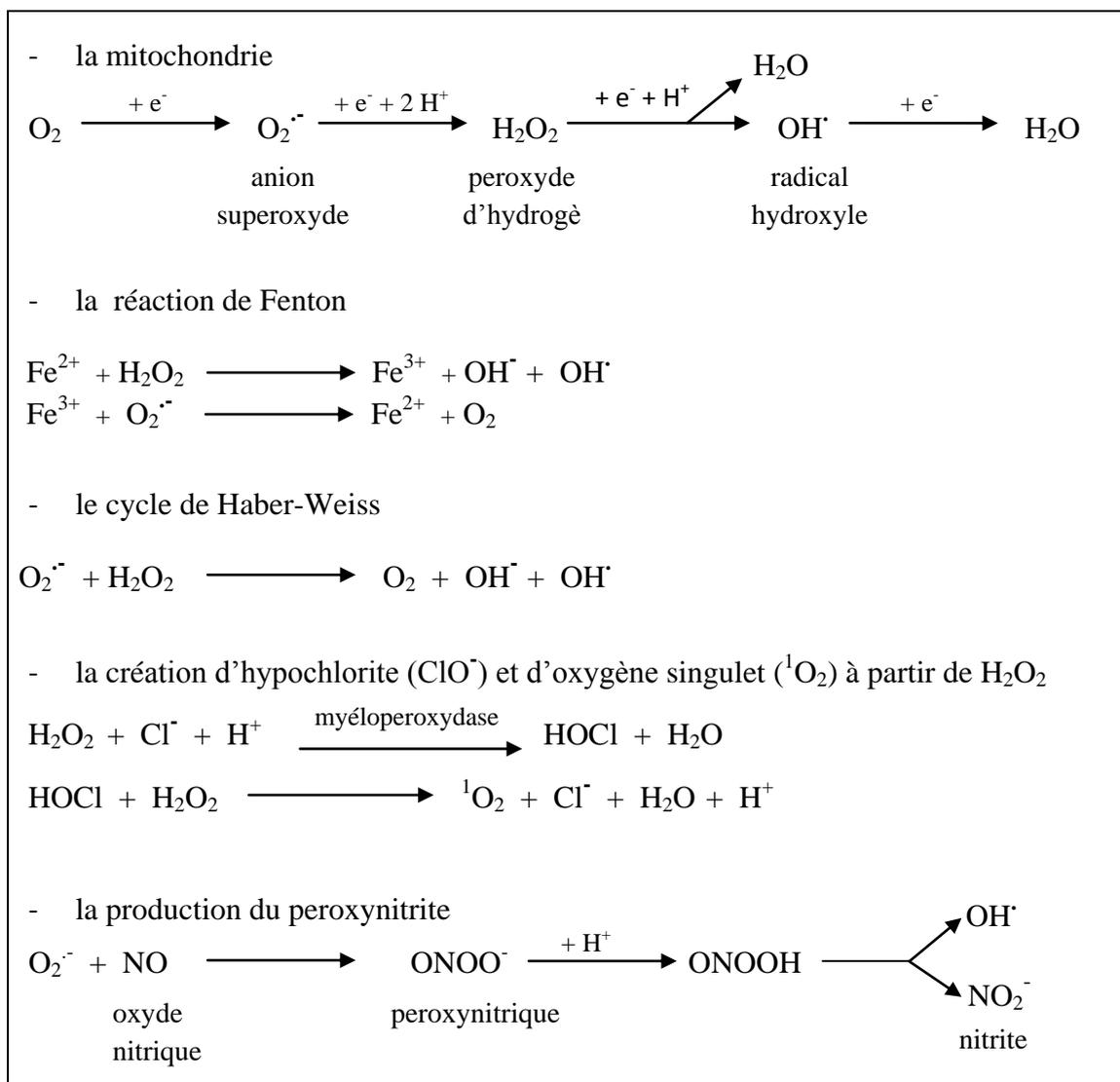


Figure I.5. Différentes voies de la genèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans l'organisme.

I.1.3.2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situation physiologique, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections ^[31]. L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, produit dans la chaîne respiratoire des mitochondries ou durant la phagocytose, est nécessaire à la performance de la réponse immunitaire ; par exemple, un

déficit de sa production peut déterminer la survenue de la granulomatose septique chronique caractérisée par l'incapacité de l'organisme à lutter contre l'agression d'agents microbiens pyogènes ^[32-34]. L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important en établissant le tonus vasculaire et en modulant la réponse inflammatoire (figure I.6).

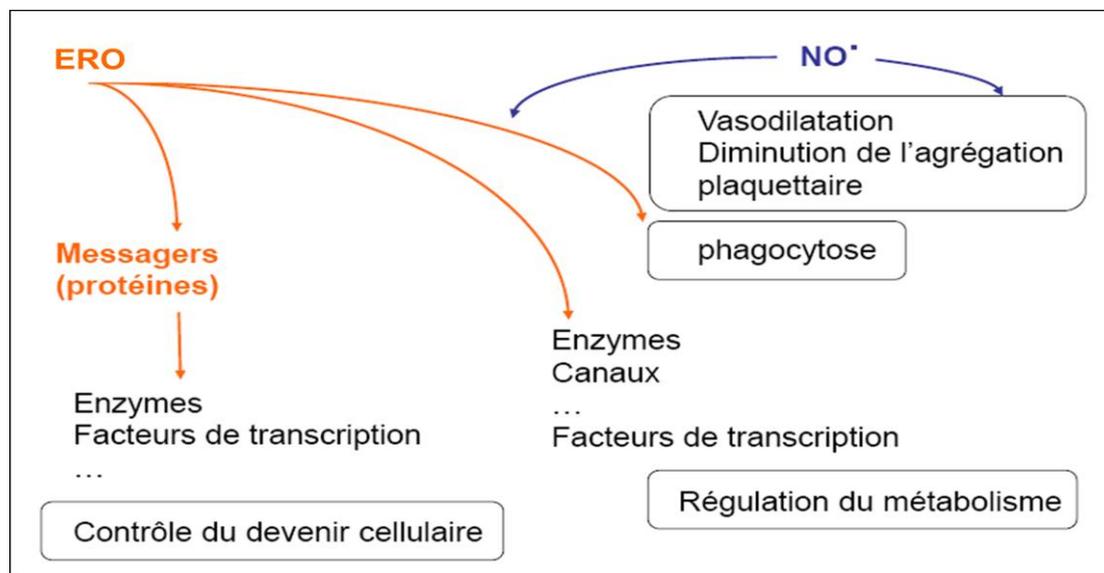


Figure I.6. Rôles physiologiques des espèces réactives.

I.1.3.3. Le déséquilibre : origines et conséquences

La notion de stress oxydant a été utilisée pour la première fois par Sies ^[35]. Il est défini comme une altération cellulaire et tissulaire par des molécules oxydantes. Il est la résultante d'un déséquilibre profond dans la balance entre les prooxydants, producteurs d'espèces radicalaires, et les antioxydants, au profit des premiers. Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale des phénomènes d'ischémie-reperfusion (xanthine oxydase), d'une activation de systèmes enzymatiques (NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine, transferrine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, cathécholamine). L'origine de ce déséquilibre peut également être de nature exogène : une alimentation pauvre en antioxydants, une exposition aux rayons ultraviolets, à l'action de substances oxydantes (solvants, pesticides, anesthésiques, tabac) ou lors d'un accroissement brutal de l'apport en oxygène ^[36]. Les ERO très électrophiles tentent de ré-apparier leur électron célibataire en agressant toutes les molécules susceptibles de céder

un électron ; leur durée de vie est donc très courte. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réactions en chaîne ^[34].

L'acide désoxyribonucléique (ADN), les lipides membranaires polyinsaturés ou encore les protéines sont les cibles privilégiées de ces oxydations. Le déséquilibre prooxydant entraîne la formation de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées et de multiples dysfonctionnements cellulaires : processus pro-inflammatoires, d'apoptose et/ou de nécrose ^[37].

I.1.3.4. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

- **L'ADN**

Les ERO, en particulier les radicaux hydroxyles, sont capables de léser et de modifier des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Parmi les bases transformées, la 8-hydroxy-guanine a été utilisée comme marqueur de stress oxydant des différentes espèces animales. Les radicaux OH[•] sont capables de réagir avec les désoxyriboses de la molécule d'ADN. Les multiples dégâts engendrés sont réparables grâce aux mécanismes d'excision et de re-synthèse effectuées par des enzymes de reconnaissance et de réparation de l'ADN. Mais lorsque ces systèmes de protection sont eux même atteints par l'oxydation, de graves altérations du matériel génétique sont induites, comme des mutations pouvant être à l'origine de cancers ^[34].

- **Les protéines**

Les ERO peuvent dénaturer les protéines de soutien comme le collagène mais aussi les protéines circulantes comme l'albumine ou la transferrine. Les protéines de reconnaissance moléculaire (enzymes, anticorps ou récepteurs membranaires) sont aussi des cibles de l'oxydation radicalaire. Les attaques s'effectuent préférentiellement sur les acides aminés portant des chaînes latérales aromatiques (phénylalanine, tyrosine, histamine, tryptophane) et sur les acides aminés soufrés ^[34].

- **Les lipides polyinsaturés et la peroxydation lipidique**

Au cours de la phase d'initiation de la peroxydation lipidique, les ERO arrachent un atome d'hydrogène aux chaînes insaturées des acides gras pour former des radicaux alkyles. Au cours de la phase de propagation, les réactions en chaîne interviennent ensuite dans la

membrane où les radicaux alkyles réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes. Cette phase est stoppée essentiellement grâce à l'action des antioxydants

physiologiques. La peroxydation lipidique a pour conséquence l'altération de la fluidité des membranes qui, associée à leur désorganisation globale, peut conduire jusqu'à leur lyse^[34].

- **Les ERO et le système immunitaire**

Le système immunitaire utilise certaines ERO produites par les macrophages comme moyen essentiel de défense contre les micro-organismes. Cependant les mêmes ERO contribuent aussi à causer des lésions associées à des réactions inflammatoires^[38]. En fait, bien que l'on ne puisse pas directement relier le stress oxydant à la déficience du système immunitaire, on sait qu'il existe des interactions moléculaires complexes entre les deux. Il a été démontré que le "tumor necrosis factor" (TNF) induisait la génération d'espèces activées de l'oxygène par les neutrophiles^[39,40] à des concentrations aussi basses que 0,5 ng.L⁻¹.

I.1.3.5. Les pathologies liées au stress oxydant

Avant d'aborder les différentes pathologies liées au stress oxydant dans l'organisme, il est important de souligner que le lien de causalité entre le stress oxydant et l'apparition des pathologies reste un sujet de controverse dans la communauté scientifique. Le déséquilibre oxydant/antioxydant est-il cause ou conséquence de ces pathologies ? La carence en micronutriments résulte-t-elle d'une carence d'apport et/ou d'une consommation excessive résultant du stress oxydant ? Où se situe la frontière entre stress oxydant physiologique et pathologique ?^[41].

- **Cancer**

Le cancer semble être une maladie dégénérative liée à l'âge. Il a été démontré que ni O₂⁻, ni H₂O₂ ne pouvaient réagir avec le désoxyribose ou les bases de l'ADN, ce qui suggère que le radical OH[•] serait le principal responsable des dégradations observées. Certaines régions de l'ADN dites "nues", contiennent des métaux de transition (Fe ou Cu), et ne sont pas couvertes par les histones. Ainsi des réactions d'oxydation peuvent survenir, catalysées par ces métaux. La mutagénicité démontrée des produits hydroxylés de la guanine et de la thymine est due à des erreurs de lecture de l'ADN lors de réplication. Par ailleurs, de nombreux facteurs

favorisant la survenue de cancers sont en fait des facteurs générant des ERO, soit directement comme le tabac ^[42], soit après phagocytose comme l'amiante ^[43,44], soit par réaction de Fenton par des métaux carcinogènes comme le chrome ou le nickel ^[45], soit par photolyse ou photo-activation comme les ultra-violets A et B ^[46].

- **Athérosclérose**

Il est actuellement admis que l'athérosclérose est liée à la peroxydation des LDL qui conduit à la genèse de la plaque athéromateuse ^[47]. En effet, ces LDL oxydées sont à l'origine de la transformation des macrophages en cellules spumeuses qui constituent les "stries lipidiques", et induisent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima qui évolueront en plaques athéromateuses surmontées par une couche fibrocellulaire dense.

- **Cataracte**

Le stress oxydant a aussi été évoqué dans la survenue de la cataracte. La cataracte est la première cause de cécité ^[48]. Un stress oxydant photo-induit par les radiations solaires et les ultraviolets entraîne l'oxydation des protéines constitutionnelles du cristallin et sa perte de transparence. Pour s'opposer au stress oxydant, le cristallin possède des concentrations élevées en vitamine C (10 fois la concentration plasmatique).

- **Allergies**

Des enquêtes épidémiologiques en Europe et au Japon indiquent une augmentation des allergies comme l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma atopique et la dermatite de contact, notamment sur les lieux de travail ^[49,50]. Le rôle des ERO dans ces affections est de plus en plus décrit. En effet, dans la dermatite de contact, une production des radicaux libres a été mesurée ^[50]. En ce qui concerne la dermatite atopique, on observe une production de radicaux O_2^- par plusieurs cellules de l'immunité dont les éosinophiles ^[47]. Certaines activités professionnelles prédisposent tout particulièrement à l'apparition, l'entretien ou l'aggravation d'un eczéma atopique des mains ^[51,52]. Dans le cas de l'asthme et de rhinites allergiques, les éosinophiles relarguent des médiateurs de l'inflammation notamment le radical O_2^- ^[53]. Ainsi, dans toutes les pathologies, les ERO interviennent sur le site de l'inflammation ^[54].

- **Maladies neurodégénératives : la piste oxydative**

Le rôle du stress oxydant dans les mécanismes de mort cellulaire au cours des maladies neurodégénératives est évoqué depuis plusieurs années ^[55]. Parmi ces affections, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson sont les plus fréquentes. Elles sont caractérisées sur le plan neuropathologique par une perte sélective de groupes neuronaux. Tout récemment, un lien vient d'être établi entre des dommages oxydatifs affectant une protéine neuronale, l' α -synucléine, et le développement de pathologies neurodégénératives. La forme familiale de la maladie de Parkinson, qui touche 1 à 2 % de la population âgée de plus de 50 ans, est associée à deux mutations de cette protéine présente dans les synapses neuronales. Des chercheurs de l'université de Pennsylvanie ont montré que, dans les lésions cérébrales neurodégénératives et dans les corps de Lewy, l' α -synucléine est abondante sous forme nitrée, issue de sa combinaison avec les ER. Le stress oxydant pourrait ainsi constituer une étape précoce dans le développement de ces affections ^[56]. Dans la maladie d'Alzheimer, la formation des dépôts amyloïdes est accélérée par la présence d'oxygène ^[57,58]. Chez les patients ayant une démence de type Alzheimer (DTA), les diènes conjugués et les peroxydes lipidiques sont significativement plus élevés ; de même, il a été observé une diminution de la capacité antioxydante au niveau du cortex temporal inférieur ^[59].

I.1.3.6. Les défenses antioxydantes

A partir de l'équilibre entre la nécessité de l'oxygène et les dangers potentiels des radicaux libres, l'organisme a développé de puissants systèmes de défense antioxydants permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible ce métabolisme. La défense contre ces ERO repose sur deux mécanismes distincts ; les enzymes et les molécules antioxydantes proprement dites (vitamines C et E, thiols, quinones, caroténoïdes, flavonoïdes) (figure I.6).

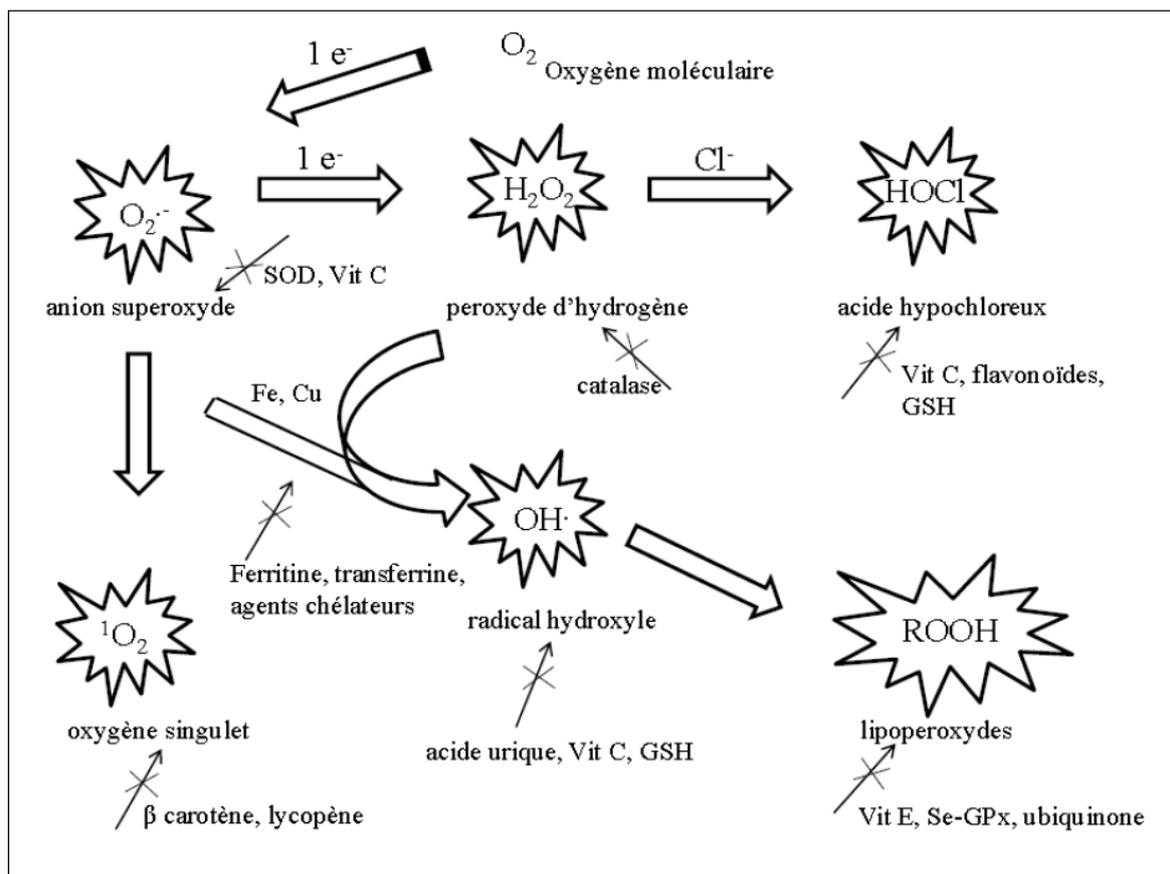


Figure I.6. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le système de défense antioxydant.

I.1.3.6.1. Les mécanismes de défense enzymatiques

Les trois systèmes principaux de défense enzymatique impliquent les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les glutathion peroxydases (figure I.6).

- **Les SOD**

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloenzymes largement distribuées au sein des organismes aérobies dont elles assurent la survie^[60]. Leur rôle est de catalyser la dismutation du radical superoxyde O_2^- en H_2O_2 et O_2 à une vitesse extrêmement importante (environ $2.10^9 L.mol^{-1}.s^{-1}$). Il existe deux types de SOD selon la nature métallique de leur cofacteur : une SOD cytoplasmique Cu et Zn dépendante et la SOD mitochondriale Mn dépendante. C'est la découverte de ces deux enzymes dans les cellules qui a permis de démontrer pour la première fois l'existence de radicaux libres dans les organismes vivants, phénomène supposé

totallement impossible par les chimistes du fait de leur danger potentiel. Ainsi, c'est en démontrant la réalité de puissants systèmes antioxydants enzymatiques endogènes que McCord et Fridovitch ont mis en évidence pour la première fois l'importance du concept du stress oxydant ^[61,62].

- **Les catalases**

Le H₂O₂ formé, intermédiaire dangereux pour la cellule, est partiellement éliminé par les catalases localisées dans les peroxysomes. Cette localisation est stratégique puisque c'est là que des enzymes à flavines, l'urate oxydase, la glucose oxydase et les D-amino-oxydases produisent le H₂O₂ ^[34].

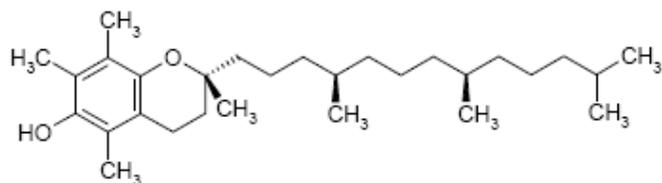
- **Les glutathion peroxydases (GSH-Px)**

Ce sont des enzymes à sélénium ayant la propriété de catalyser la réduction des hydroperoxydes et du peroxyde d'hydrogène par le glutathion réduit. Le recyclage permanent de ce dernier est assuré par la glutathion réductase. Le rôle de la GSH-Px est très important dans la plupart des tissus ^[63], par exemple dans les globules rouges et les plaquettes où elle réalise la totalité de l'élimination de H₂O₂. Il faut enfin souligner que l'activité mesurée de la GSH-Px érythrocytaire est un bon reflet de la carence en sélénium plasmatique ou érythrocytaire ^[64]. La GSH-Px plaquettaire est également un bon indicateur du statut sélénium mais les étapes nécessaires à l'isolement sont délicates.

I.1.3.6.2. Les mécanismes de défense moléculaire

Certaines molécules présentes dans l'organisme ont des propriétés antiradicalaires. Ces antioxydants sont pour la plupart apportés par l'alimentation, d'où l'attention portée aux aliments dans le renforcement du système de défense contre le stress oxydant. Ces molécules agissent par échange ou appariement d'électron célibataire. Elles sont capables d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène par des processus d'oxydoréduction. Il s'agit en quelque sorte de substance à effet tampon : lorsqu'elles sont présentes dans des zones de risque, comme les membranes cellulaires, certaines protéines et l'ADN, elles les protègent en orientant l'espèce réactive vers une voie métabolique précise. Hormis les acides ascorbique et urique présentés précédemment, ces molécules sont essentiellement la vitamine E, le bêta-carotène, les flavonoïdes, les thiols, les quinones, les chélateurs de métaux et les oligo-éléments ^[34].

• La vitamine E



La vitamine E (α -tocophérol) est l'antioxydant liposoluble majeur des lipides. Elle protège *in vivo* les structures moléculaires particulièrement sensibles à l'oxydation (double liaisons des acides gras polyinsaturés, bases nucléotidiques des brins d'ADN) et les structures condensées riches en lipides (membranes, lipoprotéines). La régénération de l' α -tocophérol se fait en permanence par les quinones et la vitamine C au niveau des sites d'action de la vitamine E, à l'interface entre les lipides et l'eau (figure I.7). Le potentiel antioxydant de l' α -tocophérol est important malgré sa faible concentration membranaire. La teneur en vitamine E membranaire et son stockage adipeux, hépatique et musculaire sont d'ailleurs peu influencés par les apports nutritionnels ^[65], sauf au cours des syndromes de malabsorption intestinale.

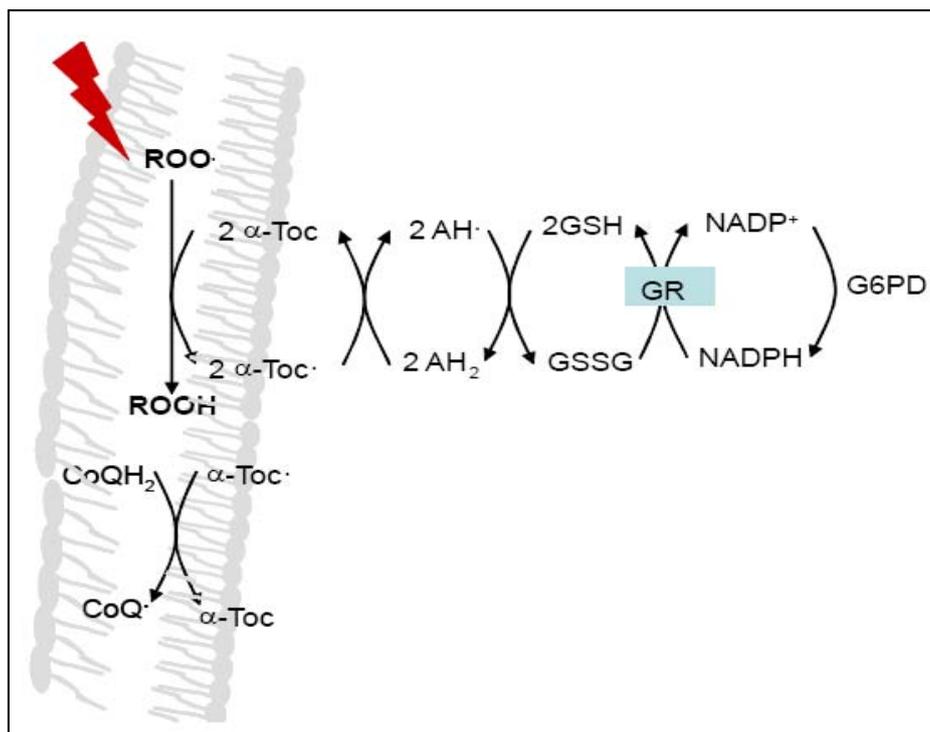


Figure I.7. Synergie d'action des antioxydants cellulaires.

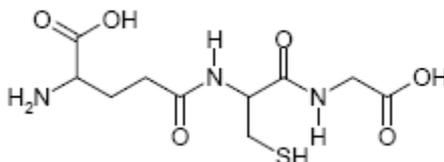
- **Le bêta-carotène et le lycopène**

Le rôle antioxydant du bêta-carotène (provitamine A) est dû aux nombreuses doubles liaisons conjuguées. Il protège ainsi l'organisme contre les agressions de $^1\text{O}_2$. Certains auteurs ont montré qu'il pourrait agir en synergie avec la vitamine E pour protéger les membranes cellulaires ^[66]. Le lycopène est l'agent le plus efficace capable de neutraliser $^1\text{O}_2$. Il présente un pouvoir antioxydant bien supérieur aux autres caroténoïdes, notamment en matière de protection cardiovasculaire ^[67] mais aussi dans le domaine antitumorigène ^[68].

- **Les bioflavonoïdes**

Les bioflavonoïdes, molécules végétales de la famille des polyphénols aux structures chimiques diverses, comme les acides benzoïques (acides salicyliques), coumarines, lignines et les tanins, sont connues pour leurs propriétés antioxydantes. Les phénols réagissent rapidement avec les radicaux libres peroxydes en donnant un radical phénoxy incapable de propager la réaction radicalaire. Leur effet protecteur est effectif dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires et cardiovasculaires, le diabète, la cataracte et le cancer. La protection cardiovasculaire serait due à une protection des lipoprotéines et à une réduction des thromboses par effet inhibiteur de l'agrégation plaquettaire ^[34].

- **Les thiols**



Le glutathion (L- γ - glutamyl- Lcystéinylglycine) existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH), celle-ci représentant environ 98 % du glutathion total. Le GSH participe de façon prépondérante aux mécanismes de défense cellulaires grâce à sa fonction sulfhydryle (-SH) à l'origine d'une grande réactivité et d'un puissant pouvoir réducteur. Les principaux dérivés à fonction thiol sont formés à partir des acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) apportés par l'alimentation protéique. La cystéine participe à la formation du glutathion au niveau du foie. Son pouvoir antiradicalaire s'exerce face aux radicaux O_2^- et OH^- ^[34].

- **Les chélateurs de métaux**

La chélation des ions métalliques par différentes molécules biologiques endogènes représente une voie majeure de la défense antioxydante extracellulaire. Elle empêche la formation de radicaux OH[•] en bloquant les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Elle limite également la décomposition d'hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy ainsi que l'autooxydation des thiols. Quelques protéines du plasma présentent cet effet : la transferrine et la lactoferrine complexent le fer, l'haptoglobine et l'hémopexine fixent des hèmes et la céruléoplasmine et l'albumine sont capables de fixer le cuivre ^[34].

- **Les oligo-éléments**

Les oligo-éléments sont des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les grandes voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires. Le rôle antioxydant paradoxal du fer s'exerce par l'intermédiaire de la catalase. Cependant sous forme d'ion Fe²⁺ libre, le fer peut être prooxydant par l'intermédiaire des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Le zinc remplit de multiples rôles dans l'organisme : un effet antioxydant par sa participation au maintien de l'activité de la SOD cytoplasmique cuivre et zinc dépendante, un effet modulateur de l'apoptose et une activité de défense anti-infectieuse. Des études récentes ont montré une baisse de la lipoperoxydation chez des diabétiques après une supplémentation par 30 mg de zinc sous forme de gluconate ^[69,70]. Il faut rappeler qu'au-delà de 30 mg/jour, le zinc peut avoir des effets négatifs sur le métabolisme lipidique en abaissant le HDL-cholestérol en modifiant le rapport zinc/cuivre et les besoins en cuivre ^[71]. Le cuivre agit en synergie avec le zinc dans la SOD cytosolique, et possède ainsi un effet antioxydant et par conséquent un effet anti-inflammatoire et anti-infectieux, notamment dans les tissus cutanéomuqueux. Le sélénium, connu pour son pouvoir anti-peroxydant, anti-inflammatoire et anti-vieillesse, agit par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase (GSH-Px) dans la lutte contre les ER toxiques. Sous forme de sélénocystéine, il entre dans la composition structurale du site actif des GSH-Px qui catalysent la réduction de H₂O₂ et des hydroxydes organiques présents dans la cellule, respectivement en eau et en alcool. Le sélénium permet de maintenir le pool intra-lymphocytaire de glutathion réduit, ce qui protège la membrane et donne aux cellules immuno-compétentes la possibilité de maintenir leur réponse. Ce rôle protecteur est complété par d'autres fonctions essentielles, telles que la détoxification des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb) qui s'accumulent dans les tissus

au cours du vieillissement, ou l'activation du métabolisme des xénobiotiques organiques. Une carence d'apport en sélénium peut affecter les capacités de défense antioxydantes de l'organisme et joue un rôle important dans la pathogénie de nombreuses maladies ^[72,73]. Le manganèse exerce une action antioxydante spécifique à travers l'activité des SOD mitochondriales pour moduler la production des radicaux libres au cours de la phosphorylation oxydative dans la respiration.

I.1.3.7. Les antioxydants, des agents préventifs dans les apports nutritionnels

Les apports nutritionnels sont un moyen préventif largement utilisé dans les pathologies liées au stress oxydant. Même si les avis restent toujours contradictoires sur leur efficacité, des essais thérapeutiques ont montré le rôle important des apports nutritifs riches en antioxydants pour freiner la progression des maladies.

- **Cancer**

Des études réalisées chez des animaux transgéniques montrent que la supplémentation en vitamine E, vitamine C et caroténoïdes peut effectivement empêcher le développement de cancers ^[74]. D'autres études aboutissent en revanche à des conclusions radicalement opposées et il a même été observé une augmentation du risque de cancer liée à la supplémentation vitaminique ^[75]. L'analyse de nombreuses études amène cependant à conclure que les régimes riches en fruits et légumes sont bénéfiques à la prévention des cancers, du poumon, du larynx, du pancréas, du sein et de la vessie ^[74]. Dans plusieurs études, une relation inverse entre les apports en acide ascorbique et le risque de cancer de l'œsophage a été montrée. L'acide ascorbique jouerait également un rôle protecteur vis-à-vis du cancer du col de l'utérus en association avec des folates et des β carotènes ^[76]. L'étude SUVIMAX, évaluant l'impact d'un apport quotidien en antioxydants à doses nutritionnelles (β carotène 6 mg, acide ascorbique 120 mg, vitamine E 30 mg, zinc 20 mg, sélénium 100 μ g) sur l'incidence de la mortalité liée à des cardiopathies ischémiques et à des cancers, a mis en évidence une diminution de 31 % du risque de cancers et de 37 % de mortalité chez les sujets supplémentés ^[77].

- **Maladies neurodégénératives**

Le rôle présumé du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer a conduit à la prescription de traitement antioxydant, principalement à base de vitamine E et de flavonoïdes. Les données restent toutefois insuffisantes. Une étude randomisée portant sur 340 patients avec DTA recevant de la sélégiline, de la vitamine E ou du placebo a montré qu'il n'existait pas une différence concernant le devenir entre les groupes au bout de 2 ans (décès, institutionnalisation, perte des activités de la vie quotidienne, progression vers une démence sévère) ^[78]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des patients atteints de la maladie de Parkinson, suggérant l'absence de rôle majeur de la vitamine E dans cette pathologie ^[79].

- **Sclérose latérale amyotrophique (SLA)**

La vitamine E a permis de réduire la progression de la paralysie de souris transgéniques exprimant une mutation de la SOD observée dans certaines formes familiales de la SLA. Une étude sur 289 patients a montré une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase du plasma ainsi qu'une diminution de la concentration des composés réactifs de l'acide thiobarbiturique (marqueurs terminaux de la peroxydation) après 3 mois de traitement par la vitamine E, prouvant l'atténuation du stress oxydant ^[80].

- **Maladies cardiovasculaires**

Plusieurs études ont montré qu'une consommation d'aliments riches en vitamine C, comme les fruits et légumes, entraîne une diminution du risque cardiovasculaire. L'acide ascorbique diminue l'athérogénèse en s'opposant au stress oxydant. Celui-ci favorise les maladies cardiovasculaires par plusieurs mécanismes : les radicaux libres oxygénés induisent l'apoptose des cellules endothéliales et favorisent aussi l'oxydation des LDL. Grâce à ses propriétés antioxydantes, l'acide ascorbique lutte contre les dysfonctions endothéliales. De son côté, l'acide urique joue un rôle très important pour limiter l'oxydation lipidique des LDL ^[20].

Toutefois, les résultats sont discordants. Une étude évaluant l'impact des antioxydants (vitamines C et E et le β carotène) auprès de 8200 femmes ayant un haut risque cardiovasculaire ou en prévention secondaire de maladies cardiovasculaires, ne trouve pas d'effet bénéfique de l'acide ascorbique dans cette population ^[81]. Une autre étude menée sur 10 ans auprès de personnes de sexe masculin et âgées de plus de 50 ans, ne révèle pas de

diminution du risque d'événements cardiovasculaires majeurs chez les sujets recevant de la vitamine C (500 mg/jour) ou de la vitamine E ^[82]. En revanche, un essai mené auprès de patients traités par cardioversion électrique pour une fibrillation auriculaire chronique, montre une diminution de récurrences précoces chez les sujets supplémentés en acide ascorbique à hauteur de 1000 mg/jour ^[83]. Des études ont montré que le phénotype de l'haptoglobine Hp influence le taux de vitamine C plasmatique et l'homéostasie du fer. Tout ceci concourt à une variabilité de la balance pro/anti-oxydante en fonction de ce phénotype. Le phénotype Hp 2-2 est associé à un état plutôt pro-inflammatoire, à une augmentation du turn-over ferrique et à un rôle antioxydant moins important. Le diabète étant caractérisé par un état inflammatoire basal et un stress oxydant majoré, les sujets diabétiques Hp 2-2 cumuleraient ces effets négatifs pour parvenir à une augmentation du risque de développement de pathologies cardiovasculaires. Les études de supplémentation vitaminique ont permis de conclure que les divergences observées sur les résultats s'expliqueraient par l'absence du déterminisme du phénotype Hp. En effet, seuls les diabétiques Hp 2-2 pourraient réellement bénéficier d'une supplémentation vitaminique dans la prévention des pathologies cardiovasculaires ^[84].

- **Cataracte**

Un travail portant sur 2900 sujets âgés de 49 à 97ans a été réalisé pour étudier les relations entre la supplémentation vitaminique et les trois principaux types de cataracte. La prévalence de la cataracte a été significativement abaissée grâce aux apports en vitamines C, vitamine E, B2, B9, en bêta-carotène et en lutéine/ zéaxanthine. Après ajustement sur les autres nutriments, seule la vitamine C est restée significativement associée à la prévalence de la cataracte ^[85]. Kluzny ^[86] a montré que la concentration en acide urique dans l'humeur aqueuse est plus faible chez les patients atteints de cataracte. Ces résultats suggérèrent que l'acide urique joue un rôle important dans le système de défense anti-radicalaire de cette pathologie à travers son pouvoir antioxydant.

- **Vieillesse cutané**

Parmi les multiples traitements locaux disponibles pour tenter de réduire le vieillissement de la peau, les antioxydants, parmi lesquels les quinones et les vitamines, occupent une place importante ^[87].

I.1.3.8. Méthodes d'évaluation du stress oxydant et applications médicales

Evaluer le stress oxydant à l'aide de marqueurs sensibles et spécifiques et savoir interpréter de façon clinique leur fluctuation sont des enjeux importants en recherche fondamentale mais également en analyse en biologie clinique. La mise en évidence d'un stress oxydant accru permet de développer des stratégies diagnostiques et thérapeutiques et de mesurer l'opportunité ou l'efficacité de l'administration d'un traitement antioxydant. Actuellement, il est possible de réaliser, à un instant donné et chez un sujet isolé, un bilan de stress oxydant qui additionne plusieurs biomarqueurs pour en tirer un score individuel de stress oxydant qui est à la base d'une stratégie de supplémentation antioxydante. Dans le grand public, l'engouement pour ces bilans est grand, malgré leur coût élevé, car ils entretiennent l'espoir d'un contrôle du stress oxydant et de ses conséquences, au premier rang desquels le vieillissement. Deux voies sont possibles pour diagnostiquer un stress oxydant ; soit l'évaluation de la teneur des espèces pro-oxydantes, soit la mesure de l'efficacité du système de défense antioxydant. Un très grand nombre de techniques sont actuellement disponibles pour répondre à cette demande ^[88-89] dont les plus couramment utilisées ont fait l'objet de revues récentes ^[90,91]. Cependant, l'interprétation des résultats est encore difficile car chaque méthode à ses spécificités et ses limites ^[92] et les valeurs de référence pour chacun des paramètres restent souvent mal définies ^[93].

I.1.3.8.1. Evaluation directe des radicaux libres

La détection des ERO est très longtemps restée difficile *in vivo*. En effet, les radicaux libres ont une demi-vie très courte (de l'ordre de 10^{-11} seconde), et il est difficile de les détecter de manière directe. La résonance paramagnétique électronique (RPE), méthode qui détecte la présence d'électrons non appariés, assure une mesure directe et sensible des radicaux libres, et la détection des radicaux libres à des concentrations de l'ordre de 10^{-10} mol.L⁻¹ tant qu'ils sont stables. Pour les radicaux très instables, un certain nombre d'approches complémentaires sont disponibles. Celle proposée par Knowles et al en 1969 pour la mesure du radical superoxyde ^[94] est appelée "rapid-freezing". Elle consiste à congeler les échantillons afin de réduire la réactivité de l'espèce. Une autre approche repose sur l'utilisation des piègeurs radicalaires qui réagissent rapidement avec les radicaux libres pour donner des produits radicalaires de durée de vie plus longue que les espèces d'origine. Cette technique est largement employée pour détecter la présence des radicaux hydroxyles et superoxyde mais également des radicaux

organiques pendant la peroxydation lipidique. A titre d'exemple, l'utilisation de 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) permet l'obtention de signaux en RPE caractérisant la production d'hydroxyle ou de superoxyde dans une situation aiguë de réoxygénation post-ischémique dans un organe isolé ^[95]. Bien que séduisante, cette méthode nécessite un équipement lourd et reste de ce fait l'apanage du domaine de la recherche. La chimiluminescence est également utilisée pour la détection des radicaux libres. Elle est basée sur l'excitation des radicaux libres par une sonde chimiluminescence qui forme un produit à l'état excité et qui émet une onde lumineuse en retombant à l'état fondamental. Cette technique a été utilisée pour la détection des anions superoxyde ^[96].

I.1.3.8.2. Evaluation indirecte de l'action des ERO

En raison de leur très courte durée de vie, la plupart des techniques d'évaluation des ERO sont donc indirectes. Ces méthodes reposent sur la mesure des sous-produits de réaction des ERO avec les substrats biologiques. Des produits d'oxydations biologiques sont à ce jour les meilleurs marqueurs du stress oxydant.

- **Dérivés de la peroxydation des lipides**

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit terminal de la peroxydation lipidique. La réactivité du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA) reste un test classique de dépistage de la peroxydation lipidique encore très utilisé ^[97]. Si cette méthode relativement simple présente une très bonne sensibilité, elle manque de spécificité en raison de la présence d'interférents (molécules ne relevant pas du stress oxydant et pouvant réagir avec le TBA) et des conditions opératoires nécessaires à la formation du complexe MDA-TBA (chauffage en milieu acide) ^[98]. Très récemment, de nouveaux marqueurs stables et spécifiques de la peroxydation lipidique ont été proposés, les F₂-isoprostanés ^[99,100], qui sont formés lors de l'attaque de l'acide arachidonique par les ERO. La détermination de ces produits dans le sang et les urines impose l'utilisation de techniques complexes, comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

- **Dérivés de l'oxydation des protéines**

L'oxydation des protéines et des chaînes latérales de certains acides aminés peut donner naissance à des composés carbonylés ou dicarbonylés qui sont dosés par spectrométrie. Cette

méthode, essentiellement utilisée sur des prélèvements cellulaires et tissulaires, est applicable au plasma. Cependant, elle est délicate à mettre en œuvre et requiert des quantités importantes de protéines. Récemment, l'utilisation d'une méthode immunoenzymatique a permis d'augmenter la sensibilité ^[101].

- **Dérivés de l'oxydation de l'ADN**

De nombreux produits d'oxydation radicalaire de l'ADN ont été identifiés mais seulement deux d'entre eux (thymidine glycol et 8-OH-2-desoxyguanosine) sont des marqueurs intéressants qui peuvent être dosés dans des cellules isolées, dans l'urine et à partir de biopsies. Cependant, les méthodes de mesure sont lourdes (spectrométrie de masse, HPLC couplée à une détection électrochimique). En outre, des précautions drastiques doivent être prises lors de l'extraction de l'ADN, ce qui limite leur utilisation aux laboratoires spécialisés ^[90].

I.1.3.8.3. Evaluation des systèmes de défense antioxydants

- **Dosage des enzymes antioxydantes**

Le dosage des SOD est préconisé dans les globules rouges, après acheminement rapide du sang total sur glace. Des kits sont commercialisés pour le dosage des activités enzymatiques. La GSH-Px peut être dosée dans différents milieux biologiques ; des kits dérivant de la méthode de Paglia basée sur la mesure spectrométrique à 340 nm de l'oxydation du NADPH en présence du glutathion et de la GSH-Px sont disponibles avec une possibilité d'automatisation du protocole ^[102]. Le dosage de la catalase dans les érythrocytes est basé sur la variation de la densité optique à 240 nm liée à la dismutation du peroxyde ^[103].

- **Dosage des molécules antioxydantes**

Le dosage des molécules antioxydantes a beaucoup progressé au cours des dix dernières années. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique est proposée pour le dosage simultané du tocophérol, du rétinol et des caroténoïdes, de l'acide ascorbique et du couple GSSG/GSH ^[104]. Les techniques spectrométriques ^[105] ainsi que les méthodes enzymatiques sont aussi largement utilisées ^[106].

- **Evaluation du statut antioxydant total**

Cette méthode repose sur la mesure du pouvoir antioxydant total lié à l'action de nombreuses substances antioxydantes dont certaines sont bien connues (protéines à groupement thiols, acide urique, vitamines antioxydantes, glutathion réduit...) pour inhiber les effets des radicaux libres ^[107]. Elle permet de déterminer la capacité antioxydante globale d'un milieu donné. Plusieurs tests sont commercialisés, citons par exemple TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ou ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Ils se différencient par les molécules génératrices des radicaux libres, les antioxydants impliqués dans la neutralisation et la méthode de détection. Si ces tests sont d'utilisation aisée, les résultats obtenus peuvent être contradictoires en raison du caractère trop peu spécifique des dosages. Un test dynamique de lyse des globules rouges (isolés ou conservés dans le sang total) sous l'action d'une source radicalaire standardisée (test KRL-Spiral) permet une approche plus intégrée de l'ensemble des mécanismes antioxydants sollicités dans une matrice biologique complexe.

I.2. Introduction à l'électrochimie

II.2.1. Définition

Peut-on définir ce que recouvre véritablement le mot *Electrochimie* ? L'un de ses premiers véritables maîtres, Michael Faraday, y voyait le chaînon manquant entre les deux piliers de la connaissance expérimentale de son époque : la physique, science de l'énergie et de ses transformations, et la chimie, science de la matière. Galvani, quant à lui y voyait la discipline qui détenait la clef du mystère de la vie, celle qui liait la physique et la chimie, les deux sciences maîtresses de l'inanimé et de ses transformations, à celle qui restait encore à inventer et qui est appelée aujourd'hui la biologie. Volta, plus prosaïque, y voyait la première source d'énergie transportable, modulable, activable ou débrayable selon la nécessité. Bien plus tard, Heyrovsky lui a donné ses premières lettres de noblesse en chimie analytique avec la polarographie. L'électrochimie s'est ainsi progressivement enrichie, diversifiée au point de devenir à elle seule une véritable science dont les concepts de bases fédèrent toute une série de disciplines sœurs allant de la biologie jusqu'aux nanosciences et aux nanosystèmes ^[108].

L'électrochimie est la discipline d'étude des processus qui régissent les transferts de charge entre deux types de conducteur : un conducteur électronique qui assure le transport de charge par le déplacement d'électrons (métaux, semi-conducteurs) et un conducteur ionique, qui permette le transport de charge par le déplacement des ions (solutions électrolytiques, électrolytes solides). La mise en contact des 2 types de conducteur provoque l'apparition d'une distribution de charges interfaciales, appelée double couche électrochimique, différente de la répartition de charges existant au sein de chacune des 2 phases et assimilable en première approximation à un condensateur. La différence de potentiel entre les plaques du condensateur, appelée potentiel électrique absolu de l'électrode, n'est pas mesurable mais uniquement repérable par rapport à une électrode de référence. On appelle E le potentiel électrique relatif de l'électrode, défini par rapport à une électrode de référence donnée.

I.2.1.1. Interface à l'équilibre

A l'équilibre, le courant qui traverse la chaîne électrochimique constituée par deux électrodes séparées par une ou plusieurs solutions électrolytiques est nul. Ces conditions permettent d'atteindre le potentiel à courant nul de chacune des deux électrodes qui, si elles sont le siège d'une réaction de transfert de charge équilibrée entre l'oxydant et le réducteur d'un même

couple redox, obéit à la loi de Nernst (équation I.1). Le potentiel électrique est alors appelé potentiel d'équilibre et noté E_{eq}

$$v_{Ox} \cdot Ox + ne^- \rightleftharpoons v_{Red} \cdot Red$$

$$E_{eq} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{(a_{Ox})^{v_{Ox}}}{(a_{Red})^{v_{Red}}} \quad \text{équation (I.1)}$$

Où E° représente le potentiel standard du couple Ox/ Red, R la constante des gaz parfait (R= 8,314 J.K⁻¹.mol⁻¹), T la température absolue (en K), n le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction, F la constante de Faraday (F= 96500 C.mol⁻¹), a_{Ox} et a_{Red} les activités des espèces oxydantes et réductrices et v_{Ox} et v_{Red} sont les coefficients stœchiométriques des espèces oxydantes et réductrices .

Les coefficients d'activité dépendent de plusieurs paramètres tels que la nature du solvant ou la concentration de l'électrolyte support. Si la force ionique de la solution reste inchangée, on peut introduire la notion de potentiel standard apparent $E^{o'}$ qui permet de déterminer le potentiel à l'équilibre en faisant intervenir la concentration des espèces et non leur activité (équation I.2).

$$E_{eq} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{(C_{Ox})^{v_{Ox}}}{(C_{Red})^{v_{Red}}} \quad \text{équation (I.2)}$$

$$\text{avec } E^{o'} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{(\gamma_{Ox})^{v_{Ox}}}{(\gamma_{Red})^{v_{Red}}} \quad \text{équation (I.3)}$$

I.2.1.2. Interface hors équilibre

Si l'intensité qui traverse la chaîne n'est pas nulle, chacune des 2 électrodes est dite polarisée. La différence entre le potentiel de l'interface hors équilibre et le potentiel à courant nul $E_{(I=0)}$ est notée surtension η .

$$\eta = E - E_{(I=0)} \quad \text{équation (I.4)}$$

L'électrode est appelée anode si elle est le siège d'une réaction d'oxydation ($\eta > 0$) ; et cathode si elle est le siège d'une réaction de réduction ($\eta < 0$). Cette expérience permet de définir plusieurs grandeurs électriques ; les potentiels de chaque électrodes repérés par rapport à une électrode de référence, les surtensions d'oxydation et de réduction, l'intensité du

courant due aux réactions électrochimiques comptée positivement pour l'oxydation et négativement pour la réduction, enfin la charge électrique transférée à travers l'interface électrode/ solution.

Lors de la réaction électrochimique, l'intensité de courant enregistrée I est la somme du courant faradique $I_{\text{faradique}}$ dû aux processus faradiques et du courant capacitif $I_{\text{capacitif}}$ dû aux processus non faradiques.

Le processus faradique correspond à des transferts électroniques hétérogènes (T.E.H) à l'interface électrode/électrolyte relatifs à des réactions d'oxydation ou de réductions des espèces présentes à l'interface. Ces réactions obéissent à la loi de Faraday : la quantité d'espèces chimiques transformées est directement proportionnelle à la quantité d'électricité qui traverse la cellule (équation I.5).

$$Q = n F N = It \quad \text{équation (I.5)}$$

Q est la quantité de charge électrique (en C) et N est le nombre de moles de réactif consommé ou de produit formé (en mol).

Le courant capacitif est dû principalement à la double couche électrochimique, assimilable à un condensateur dont la capacité varie avec le potentiel. Lorsqu'on applique un échelon de potentiel, la variation du courant capacitif décroît exponentiellement en fonction du temps t :

$$I_{\text{capacitif}} = \frac{E}{R_s} \exp\left(-\frac{t}{R_s C_d}\right) \quad \text{équation (I.6)}$$

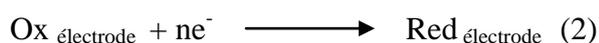
où R_s est la résistance de la solution entre l'électrode indicatrice et l'électrode de référence et C_d la capacitance du condensateur équivalent à la double couche. Le courant capacitif est souvent négligeable devant le courant faradique.

I.2.2. Cinétique électrochimique

Considérons la réaction de réduction suivante :



Cette réaction électrochimique globale admet le mécanisme à étapes consécutives suivantes :



Les étapes 1 et 3 sont des étapes de transport de matière qui peuvent intervenir sous les effets conjugués de gradients de potentiel électrique (migration), de potentiel chimique (diffusion) et de vitesse du fluide (convection). La réaction 2 est le transfert électronique hétérogène (T.E.H.) qui a lieu à la surface de l'électrode.

Dans le cas général, la description rigoureuse du processus global est très complexe. Afin de simplifier les phénomènes, il est courant d'introduire deux hypothèses simplificatrices, correspondant à des conditions expérimentales faciles à mettre en œuvre. La première consiste à introduire un électrolyte support dont les ions, en grande concentration devant celle des espèces électroactives, ne participent pas au T.E.H. Ceci permet de négliger en première approximation le phénomène de migration des espèces électroactives chargées. La seconde hypothèse consiste à négliger le phénomène de convection, par l'emploi d'électrodes fixes et de solutions immobiles, ou de coupler volontairement, de façon simple, le phénomène de convection au phénomène de diffusion. Dans le premier cas, les mesures sont réalisées sur des temps courts avant que les phénomènes de convection naturelle (dus aux gradients de température ou de masse volumique) n'aient pris naissance. Dans le second cas, l'agitation est telle que le gradient de concentration n'a lieu que sur une faible épaisseur δ à la surface de l'électrode, uniforme sur toute la surface.

Dans les conditions qui viennent d'être précisées, la réaction électrochimique peut être caractérisée par trois régimes cinétiques :

- l'activation pure, lorsque le T.E.H. est très lent devant les phénomènes de transport. Il n'existe donc pas de gradient de concentration et la concentration interfaciale est identique à la concentration en solution.
- la diffusion pure, lorsque le T.E.H. est très rapide devant les phénomènes de transport.
- la mixté activation-diffusion, qui correspond au cas où les vitesses du transfert électronique hétérogène et des phénomènes de transport ont le même ordre de grandeur.

I.2.2.1. Régime d'activation pur

En régime d'activation pur, la vitesse globale de la réaction est égale à la vitesse de T.E.H.

Considérant la réaction de réduction élémentaire suivante :



La vitesse de la réaction est définie par :

$$v = -\frac{dN_{Ox}}{dt} = \frac{dN_{Red}}{dt} = \frac{1}{nF} \frac{dQ}{dt} \quad \text{équation (I.7)}$$

Où N_{Ox} , et N_{Red} représentent les nombres de moles respectifs des espèces oxydante et réductrice et Q la quantité d'électricité échangée (Coulomb).

A la différence des réactions chimiques homogènes, les réactions électrochimiques ont lieu à une interface ; il est donc logique de normaliser la vitesse par rapport à l'aire S de cette interface. Ainsi, l'équation I.7 devient :

$$v_{TE.H} = \frac{I}{nFS} = k_a C_{Red}^{sol} - k_c C_{Ox}^{sol} \quad \text{équation (I.8)}$$

Les constantes de vitesse de transfert de charge k_a et k_c à température constante font intervenir le potentiel appliqué

pour l'oxydation $k_a = k^\circ \exp\left[\frac{\alpha nF}{RT} E_a\right] \quad \text{équation (I.9)}$

pour la réduction $k_c = k^\circ \exp\left[-\frac{\beta nF}{RT} E_c\right] \quad \text{équation (I.10)}$

k° ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) représente la constante intrinsèque de la vitesse de transfert électronique hétérogène. α et β sont les coefficients de transfert de charge respectivement anodique et cathodique dont la somme, pour un système redox rapide, est en général égale à l'unité.

Plus la constante intrinsèque de vitesse d'un système est élevée, plus la réaction est rapide et plus l'état d'équilibre interfacial est atteint rapidement.

Les valeurs de k° peuvent aller de $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les systèmes rapides à $10^{-9} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les systèmes lents.

Pour une réaction d'oxydation, la vitesse est :

$$v_a = k_a C_{Red}^{sol} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} E_a\right) \quad \text{et} \quad I_a = nFS k_a C_{Red}^{sol} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} E_a\right) \quad \text{équation (I.11)}$$

Pour une réaction de réduction, la vitesse est :

$$v_c = k_c C_{Ox}^{sol} \exp\left(\frac{-\beta nF}{RT} E_c\right) \quad \text{et} \quad I_c = -nFS k_c C_{Ox}^{sol} \exp\left(\frac{-\beta nF}{RT} E_c\right) \quad \text{équation (I.12)}$$

Le courant global est :

$$I = I_a + I_c = nFS(k_a C_{Red} - k_c C_{Ox}) \quad \text{équation (I.13)}$$

soit
$$I = nFSk^\circ \left[C_{Red}^{sol} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} E_a\right) - C_{Ox}^{sol} \exp\left(\frac{\beta nF}{RT} E_c\right) \right] \quad \text{équation (I.14)}$$

A l'équilibre, le courant global est nul, et les courants anodique et cathodique sont égaux en valeur absolue. Cette valeur, notée I_0 , est appelée intensité de courant d'échange.

$$I_0 = nFSk^\circ C_{Red}^{sol} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} E_{(I=0)}\right) = nFSk^\circ C_{Ox}^{sol} \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT} E_{(I=0)}\right) \quad \text{équation (I.15)}$$

En introduisant la notion du courant d'échange, l'équation (I.5) devient :

$$I = I_0 \left[\exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} \eta\right) - \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT} \eta\right) \right] \quad \text{équation (I.16)}$$

Cette équation est appelée équation de Butler-Volmer. Le premier terme représente la composante anodique du courant et le second la composante cathodique pour toute valeur de potentiel. Lorsque la surtension η est très positive, la composante cathodique du courant est négligeable et le courant total se confond avec le courant anodique. De même, lorsque la surtension η est très négative, la composante anodique du courant est négligeable et le courant total se confond avec le courant cathodique (Figure I.8).

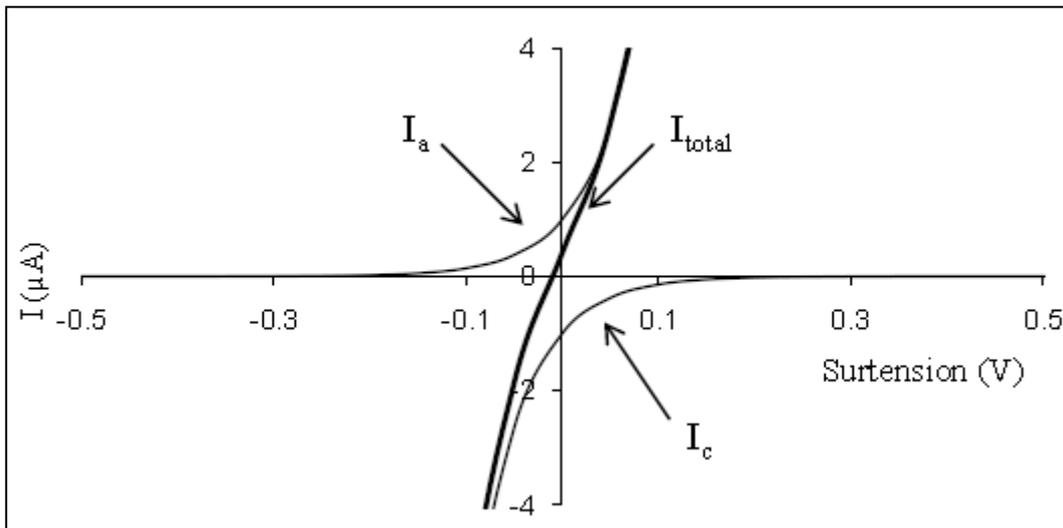


Figure I.8 : Courbes courant - surtension : composantes anodique I_a , cathodique I_c et globale I du courant avec $I_0=1\mu A$, $n=1$, $\alpha=\beta=0,5$, $T=298\text{ K}$ ^[110].

Les paramètres cinétiques α , β et I_0 de cette équation peuvent être déterminés expérimentalement à partir des courbes de Tafel qui relient le logarithme décimal de l'intensité de courant (prise en valeur absolue) en fonction de la surtension appliquée à l'électrode (figure I.9).

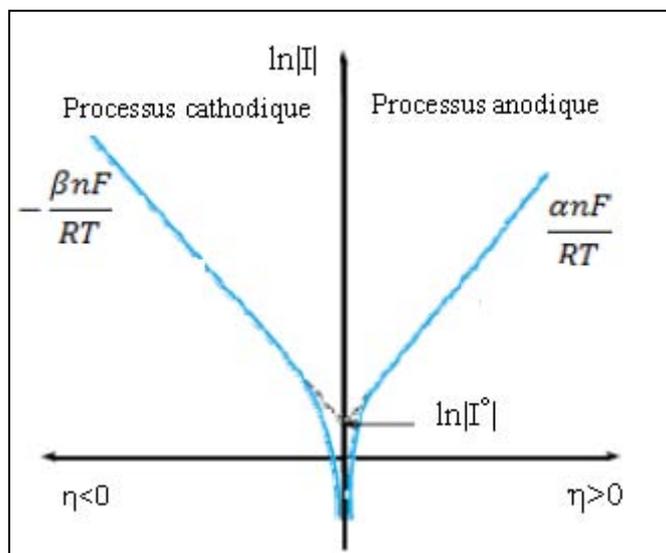


Figure I.9. Détermination des paramètres cinétiques à partir des droites de Tafel ^[109].

I.2.2.2. Régime de diffusion pur

Le régime de diffusion pur est observé lorsque la vitesse de transport de matière est très faible devant la vitesse du T.E.H. Dans les conditions décrites précédemment (solution non agitée ou agitation contrôlée, présence d'un électrolyte support), l'unique phénomène de transport de matière est la diffusion. Lorsque la solution est agitée, l'épaisseur de la couche de diffusion δ est constante. Le transport de matière est stationnaire et obéit à la première loi de Fick (équation I. 17), qui donne la densité de flux J :

$$J(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} \quad \text{équation (I.17)}$$

où D_i ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) représente le coefficient de diffusion des espèces en solution.

Avec une électrode plane, le profil de concentration est linéaire au voisinage de l'interface. L'intensité de courant est alors de la forme :

$$I = nFSD_i \left(\frac{\partial C_i}{\partial x} \right)_{(x=0)} = nFSD_i \frac{(C_i^{\text{sol}} - C_i^{\text{ele}})}{\delta} \quad \text{équation (I.18)}$$

Avec C_i^{sol} et C_i^{ele} les concentrations de l'espèce i au sein de la solution et à la surface de l'électrode.

Lorsque le transfert électronique hétérogène est maximal, la concentration à l'interface de l'électrode C_i^{ele} tend vers zéro et l'intensité tend vers une valeur limite :

$$I_{lim} = n FSD \frac{C_{solution}}{\delta} \quad \text{équation (I.19)}$$

Dans le cas où la solution est immobile, l'épaisseur de la couche de diffusion et les profils de concentrations évoluent au cours du temps (figure I.10).

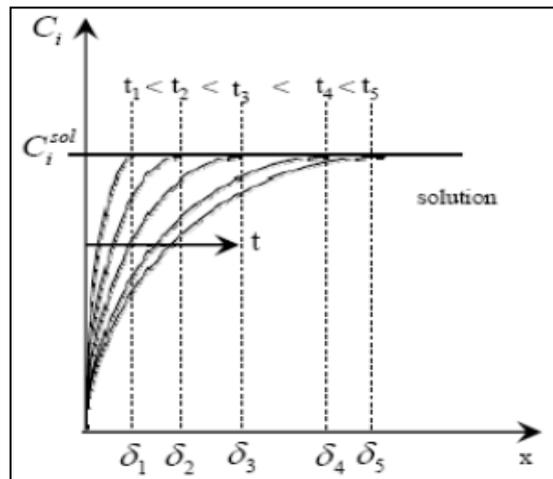


Figure I.10. Profils de concentrations au cours de temps pour une espèce i qui diffuse à l'électrode ^[110].

Ce phénomène dépendant du temps est décrit par la seconde loi de Fick. Soit pour une électrode plane :

$$\frac{\partial C_i(x,t)}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i(x,t)}{\partial x^2} \quad \text{équation (I.20)}$$

La détermination des profils de concentrations implique la résolution de la 2^{ème} loi de Fick (équation I.20) à l'aide des conditions initiales et aux limites suivantes :

$$C_i(x,0) = C_i^{sol}$$

$$C_i(\infty, t) = C_i^{sol}$$

$$C_i(0,t) = 0 \text{ (pour } t > 0)$$

La condition initiale traduit le fait que la solution est homogène à $t = 0$ et la condition semi-infinie qu'il n'y a pas de perturbation due à l'expérience, à une distance suffisante de l'électrode. La troisième condition découle de l'application d'un potentiel responsable d'une vitesse de T.E.H élevée. En utilisant la transformée de Laplace, l'expression du courant est :

$$I(t) = nFSDC_i^{sol} \frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} \quad \text{équation (I.21)}$$

L'équation I.21 est connue sous le nom de relation de Cottrell.

I.2.2.3. Régime mixte d'activation diffusion

Le régime mixte activation-diffusion correspond à des vitesses de transfert électronique hétérogène et de transport de matière du même ordre de grandeur. Ce régime est la phase de transition entre le régime d'activation et le régime de diffusion. L'équation I.22 traduit alors la relation courant-surtension.

$$I = I_0 \left\{ \frac{C_{Red}^{elec}}{C_{Red}^{sol}} \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} \eta\right) - \frac{C_{Ox}^{elec}}{C_{Ox}^{sol}} \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT} \eta\right) \right\} \quad \text{équation (I.22)}$$

Le rapport de concentrations (C^{ele}/C^{sol}) peut être exprimé en fonction des intensités :

$$\frac{C_i^{ele}}{C_i^{sol}} = 1 - \frac{I}{I_{lim}} \quad \text{équation (I.23)}$$

L'équation I.22 devient :

$$I = I_0 \left\{ \left(1 - \frac{I}{I_{lim}}\right) \exp\left(\frac{\alpha nF}{RT} \eta\right) - \left(1 - \frac{I}{I_{lim}}\right) \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT} \eta\right) \right\} \quad \text{équation (I.24)}$$

La figure (I.11) représente l'évolution de l'intensité de courant à l'état stationnaire, normalisée par rapport à l'intensité limite, en fonction de la surtension appliquée à une électrode plongée dans une solution contenant un couple Ox/Red.

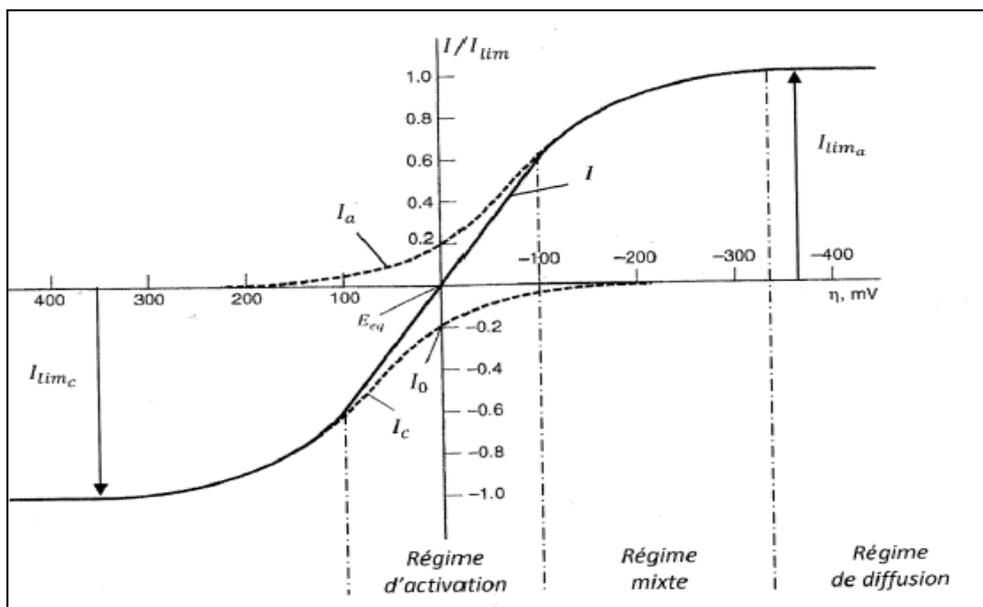


Figure I.11. Courbes courant-surtension pour un couple oxydo-réducteur ^[110].

I.2.3. Les méthodes électrochimiques utilisées

Pour l'étude de la réponse d'un système électrochimique vis-à-vis d'une perturbation électrique, plusieurs techniques électrochimiques sont disponibles. Dans la suite de cette étude, deux techniques sont utilisées ; la voltammétrie cyclique et la voltammétrie impulsionnelle.

I.2.3.1. La voltammétrie cyclique

C'est une des techniques électrochimiques les plus largement utilisées. Son avantage provient de la richesse des informations qualitatives et quantitatives collectées dans une durée de temps courte (cinétique des réactions de transfert électronique hétérogène ou encore des processus d'adsorption). Elle consiste à réaliser un balayage de potentiel linéaire aller-retour entre deux bornes de potentiel (figure I.10) et de mesurer l'intensité du courant d'électrolyse.

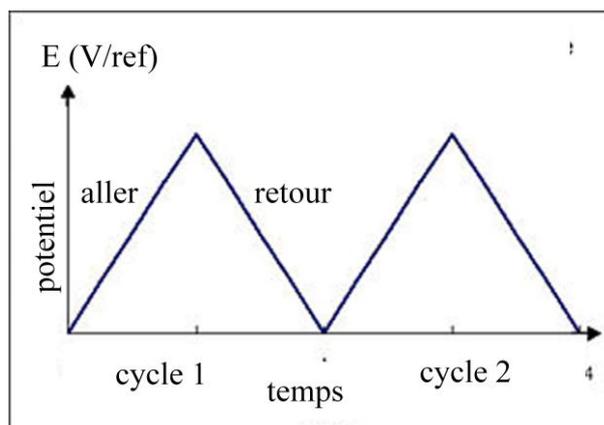


Figure I.10. Evolution du potentiel en fonction du temps en voltammétrie cyclique.

Le potentiel est une fonction de la vitesse de balayage des potentiels u et du temps :

$$E = E_i \pm ut \quad \text{équation (I.25)}$$

E_i désigne le potentiel initial qui est dans la plupart des cas le potentiel à intensité nulle. Les conditions expérimentales de mise en œuvre de cette technique sont l'utilisation d'un dispositif à trois électrodes immobiles et d'un électrolyte suffisamment concentré et non agité.

Seul le transport par diffusion semi-infinie est alors à considérer. La convection naturelle est négligeable pendant le temps de la mesure.

Pour décrire les phénomènes qui ont lieu au cours du tracé d'un voltammogramme (figure I.11.a), considérons une solution électrolytique contenant une espèce réduite. Si le potentiel initial est le potentiel à courant nul, la concentration en réducteur à l'électrode au départ est suffisamment importante pour que la vitesse du transfert électronique soit l'étape limitante du processus électrochimique. Comme indiqué par l'équation I.16 en régime d'activation pur, l'intensité croît exponentiellement avec la surtension anodique (première partie de la courbe anodique). Au fur et à mesure que le potentiel d'électrode croît, la vitesse de la réaction électrochimique augmente et induit un appauvrissement en espèce réduite à l'interface électrode/solution. Au-delà d'une certaine surtension, la concentration de réducteur à l'interface s'annule. La réaction électrochimique se poursuivant, il apparaît une couche de

diffusion dont l'épaisseur augmente au cours du temps. La vitesse de l'étape de diffusion devient l'étape déterminante de la réaction électrochimique. Dans les conditions de diffusion linéaire semi-infinie, le courant après le pic diminue alors et suit la loi de Cottrell.

L'allure des voltammogrammes cycliques informe sur les caractéristiques des systèmes étudiés. La figure I.11 présente les voltammogrammes cycliques obtenus dans le cas des systèmes rapide réversible, quasi-réversible et irréversible.

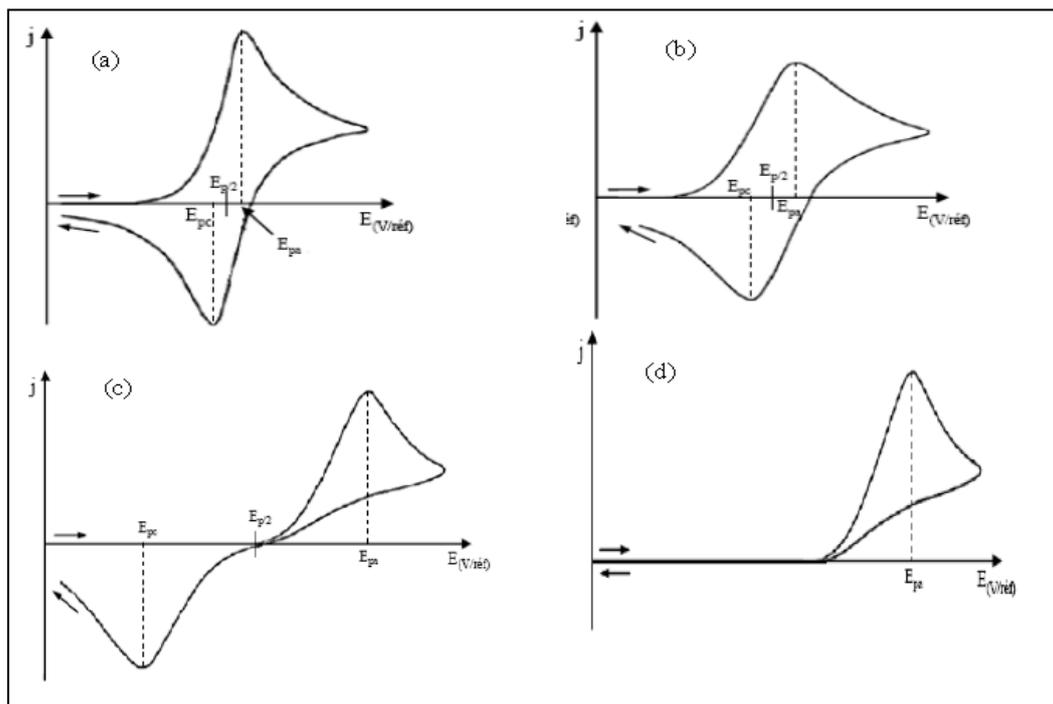


Figure I.11. Allures des voltammogrammes cycliques : (a) système rapide (réversible), (b) système quasi-réversible, (c) système très lent et (d) système irréversible ^[110].

• Système réversible

C'est le cas où le transfert de charge est très rapide. Les concentrations en oxydant et en réducteur à l'interface vérifient la loi de Nernst et le rapport de ces concentrations est fonction du temps. Le traitement mathématique du problème conduit aux équations de Randles, Sevcik, Nicholson et Shain. Il permet de définir les coordonnées des points caractéristiques de la courbe intensité-potentiel :

$$I_p = 0,4463 \frac{(nF)^{2/3}}{(RT)^{1/2}} SD^{1/2} u^{1/2} C^{sol} \quad \text{équation (I.26)}$$

$$\text{soit, à } 25^{\circ}\text{C : } I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} S D^{1/2} u^{1/2} C^{sol} \quad \text{équation (I.27)}$$

$$E_p = E_{1/2} - 1,109 \frac{RT}{nF} \quad \text{équation (I. 28)}$$

Le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ est le potentiel pour lequel l'intensité du courant est égale à la demi-somme des intensités des courants limites de diffusion anodique et cathodique. C'est une grandeur permettant d'accéder au potentiel standard apparent $E^{\circ'}$ des systèmes rapides.

$$E_{1/2} = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{Red}}{D_{Ox}} \right)^{1/2} \quad \text{équation (I.29)}$$

En outre, les potentiels de pic anodique E_{pa} et cathodique E_{pc} permettent de remonter à la valeur du potentiel standard apparent :

$$E^{\circ'} = \frac{(E_{pa} + E_{pc})}{2} \quad \text{équation (I.30)}$$

Pour un système réversible, la différence entre ces potentiels dépend seulement du nombre d'électrons échangés :

$$E_{pa} - E_{pc} = 2,3 \frac{RT}{nF} \quad \text{équation (I.31)}$$

$$\text{soit à } 25^{\circ}\text{C } E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} \quad \text{équation (I.32)}$$

- **Système irréversible**

Pour un système irréversible (figure I.11.d), le transfert électronique hétérogène est tellement lent que la réaction inverse est négligée. Comme pour les systèmes réversibles, la résolution du problème ne peut être obtenue que numériquement.

L'intensité du pic est donnée par :

$$I_p = 0,4958 \frac{(nF)^{3/2} \alpha^{1/2}}{(RT)^{1/2}} S D^{1/2} u^{1/2} C^{sol} \quad \text{équation (I.33)}$$

$$\text{soit à } 25^{\circ}\text{C } I_p = (2,99 \cdot 10^5) \alpha^{1/2} n^{3/2} S D^{1/2} u^{1/2} C^{sol} \quad \text{équation (I.34)}$$

$$E_p = E^{\circ'} - \frac{RT}{\alpha nF} \left[0,780 + \ln \left(\frac{D^{1/2}}{k^{\circ}} \right) + \ln \left(\frac{\alpha nFu}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \text{équation (I.35)}$$

- **Système quasi-réversible**

Dans le cas de systèmes quasi-réversibles, le transfert électronique est lent, mais la réaction inverse doit être prise en compte. L'écart entre les pics anodique et cathodique est en général inférieur à $0,2/n$ V. Enfin, les intensités de courant ne sont plus proportionnelles à la racine carrée de la vitesse de balayage.

I.2.3.2. La voltammétrie impulsionnelle

La voltammétrie impulsionnelle recouvre un ensemble de méthodes électrochimiques d'analyse à courant échantillonné. Le principe est d'appliquer des échelons de potentiel à intervalles réguliers au niveau de l'électrode de travail et de mesurer le courant à deux instants précis : avant le début de l'impulsion et avant la fin de chaque impulsion. Cette procédure améliore nettement la sensibilité de la mesure : quand une tension est appliquée, le courant capacitif relatif à la double couche électrochimique décroît d'une manière exponentielle avec le temps (équation I.6). La double mesure de courant effectuée permet ainsi de minimiser la composante capacitive devant la composante faradique. De ce fait, les seuils de détection sont abaissés. En outre, la mesure du courant étant de nature différentielle, la courbe obtenue est sous forme d'un pic. Ceci permet de distinguer deux signaux électrochimiques relativement proches, améliorant ainsi la sélectivité.

Ces techniques sont une adaptation à la polarographie impulsionnelle qui est la plus ancienne des techniques électro-analytiques basée sur la mesure du courant en fonction du potentiel appliqué à une goutte de mercure. Hormis les métaux, ces techniques peuvent s'appliquer à bon nombre de molécules organiques. Pour déterminer la concentration d'un analyte, il est préférable de faire appel à des méthodes de calibration interne telle que la méthode des ajouts standards.

Les techniques impulsionnelles utilisées dans la suite sont la voltammétrie à vague carrée (notée SWV pour *square wave voltammetry*) et la voltammétrie impulsionnelle différentielle (notée DPV pour *differential pulse voltammetry*). La figure I.12 schématise la forme de potentiel appliquée dans le cas de la SWV.

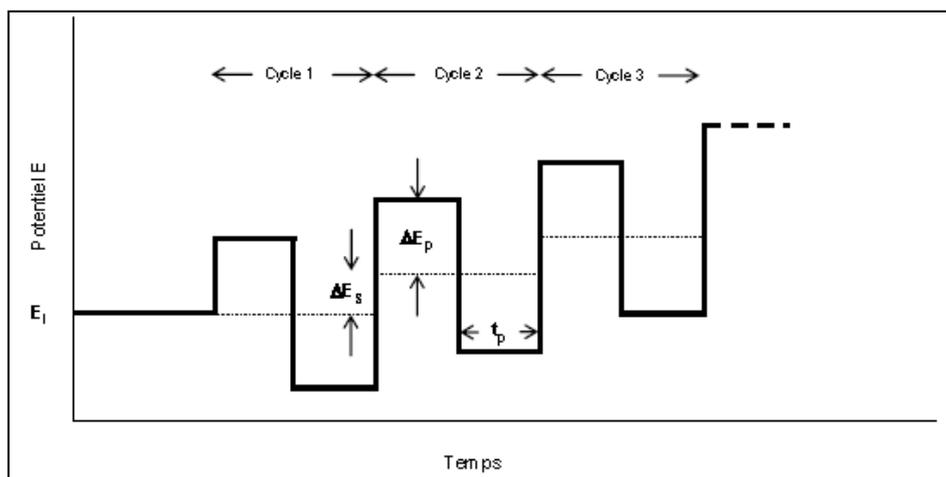


Figure I.12. Allure de la commande de potentiel imposé en fonction du temps en voltammétrie à vague carrée ^[111].

Les paramètres caractéristiques de la voltammétrie à vague carrée sont :

- ΔE_s : incrément de potentiel au début de chaque cycle.
- ΔE_p : amplitude d'une demi-période.
- la fréquence $f=1/(2t_p)$, avec t_p la période du train d'impulsion.

On superpose une tension carrée symétrique à une tension en escalier, de sorte que le début de chaque impulsion coïncide en temps et en polarité avec une marche d'escalier, tandis que la partie inverse de la tension carrée s'établit à mi-chemin de la marche. Le courant est mesuré deux fois par période, une première fois à la fin de l'impulsion dans le sens direct et une seconde fois à la fin de l'impulsion dans le sens inverse. Dans cette méthode, la vitesse de balayage peut varier dans de larges gammes : en effet cette vitesse est égale au rapport entre la hauteur de la marche de l'escalier et la période de la tension carrée :

$$u = \frac{\Delta E_s}{2t_p} \quad \text{équation (I.36)}$$

Le balayage peut donc être très rapide, ce qui permet de réduire de façon importante la durée d'analyse d'un échantillon et d'obtenir une moyenne de plusieurs cycles pour accroître le rapport signal/bruit. Cette méthode a pour avantage d'abaisser la limite de détection et d'obtenir une meilleure précision.

Pour la DPV, le potentiel est appliqué sous forme d'impulsions d'amplitude constante surimposées à un balayage linéaire en fonction du temps (figure I.13).

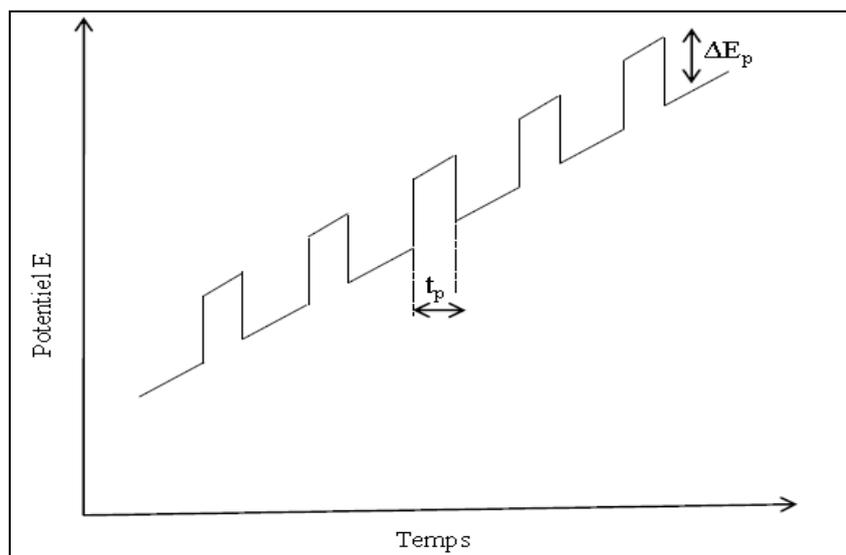


Figure I.13. Variation du potentiel en fonction du temps en voltampérométrie impulsionnelle différentielle ^[111].

Le voltammogramme obtenu a une forme gaussienne avec un pic dont l'amplitude est proportionnelle à la concentration de l'espèce électroactive (figure I.14). La largeur du pic à mi-hauteur $W_{1/2}$ permet de déterminer le nombre d'électrons échangés pour un système rapide grâce à la relation :

$$W_{1/2} = 3,5 \frac{RT}{nF} \quad \text{équation (I.37)}$$

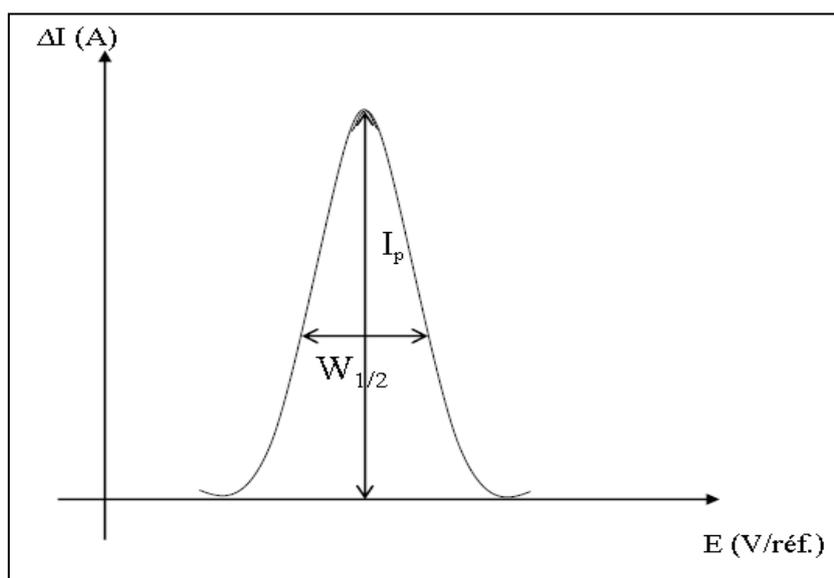


Figure I.14. voltammogramme impulsionnel représentatif des courbes obtenues avec les méthodes impulsionnelles.

II.2.4. Les ultramicroélectrodes

Les ultramicroélectrodes (UME) sont apparues à la fin des années 1970 avec les travaux de Wightman dans le liquide cébrospinal d'un rat. L'idée première était de miniaturiser la taille des électrodes en vue d'implantation *in vivo* pour la détection d'espèces d'intérêt biologique. La définition varie suivant les auteurs mais généralement une microélectrode est une électrode dont au moins une de ses dimensions caractéristiques est de l'ordre du micromètre.

La caractéristique principale des UME est d'obtenir un régime de diffusion stationnaire sans qu'il soit nécessaire d'imposer une agitation au système électrochimique. Ce phénomène est dû au profil de diffusion sphérique ou hémisphérique au voisinage de l'électrode, qui induit des effets de bord qui s'ajoutent à la diffusion linéaire. Une plus grande quantité de matière

arrivant par unité de temps à l'électrode, les profils de concentration sont établis en un temps très court (figure I.15).

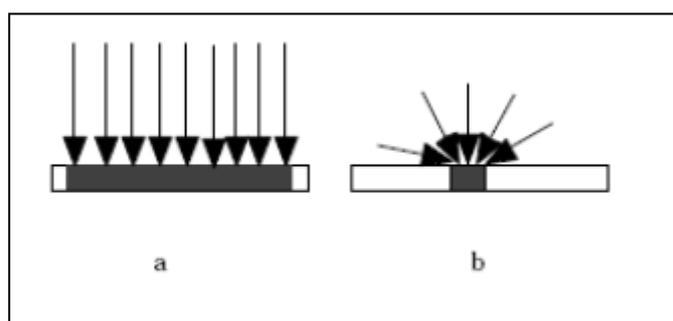


Figure I.15. Régimes de diffusion selon la taille de l'électrode ; (a) diffusion linéaire à une électrode de taille conventionnelle ; (b) diffusion hémisphérique à une microélectrode ^[110].

Dans les conditions de diffusion hémisphérique, la résolution de la seconde loi de Fick en coordonnées sphériques au voisinage d'une microélectrode de rayon r_0 portée à un potentiel constant induisant une concentration interfaciale nulle, conduit à l'équation suivante :

$$I(t) = nFSDC^{sol} \left(\frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{1}{r_0} \right) \quad \text{équation (I.38)}$$

Le courant est la somme de deux termes : le premier terme transitoire est dû à la diffusion plane semi-infinie (identique à l'expression du courant en diffusion linéaire) ; le second indépendant du temps est dû à la diffusion hémisphérique.

Cette équation présente deux formes limite :

- pour des temps courts, le premier terme est prépondérant par rapport au second. Le transport de matière est régi par la diffusion linéaire (figure I.15.a) et le courant d'électrolyse décroît avec le temps en accord avec l'équation de Cottrell.
- pour des temps longs, le second terme est prédominant et la contribution du premier terme est négligeable. Le transport de masse est dominé par la diffusion hémisphérique (figure I.5.b). Le courant est décrit par le second terme indépendant du temps.

$$I_{lim} = \frac{nFSDC^{sol}}{r_0} \quad \text{équation (I.39)}$$

Dans le cas d'une microélectrode sphérique, l'expression du courant d'électrolyse découle directement de l'équation I.39 :

$$I_{lim} = 4\pi nFDC^{sol}r_0 \quad \text{équation (I.40)}$$

Dans le cas d'une microélectrode à disque plan, il n'est pas possible de résoudre algébriquement la deuxième loi de Fick. Une solution approchée est souvent adoptée, à partir de l'équation de Saito ^[112].

$$I_{lim} = 4nFDC^{sol}r_0 \quad \text{équation (I.41)}$$

Dans le cas d'une voltammétrie à balayage linéaire de potentiel, l'état stationnaire est conservé pour des vitesses de balayage u telles que :

$$u \ll \frac{RT D}{nF r_0^2}$$

La petite taille confère aux microélectrodes des propriétés particulières :

- un état stationnaire ou quasi stationnaire est atteint après un temps d'électrolyse très court. Cette durée dépend de la taille caractéristique de l'électrode : plus celle-ci est petite, plus l'état stationnaire est atteint rapidement.

- une densité de courant assez importante : la surface étant environ 10^3 fois plus petite que celle des électrodes usuelles, la même densité de courant y correspond donc à une intensité 10^3 fois plus petite. Si les expériences sont menées avec un appareillage permettant de mesurer des courants de faible intensité, la sensibilité de la mesure en est alors accrue.
- un courant capacitif négligeable. Ce courant, lié à la capacité de la double couche électrochimique, est proportionnel à la surface de l'électrode. Il est donc plus faible avec une microélectrode qu'avec une électrode de taille normale. Comme le courant faradique est lui proportionnel à la dimension caractéristique de la microélectrode, le rapport signal sur bruit I_f/I_c est inversement proportionnel à r_0 . Ainsi, plus l'électrode est de petite taille, plus ce rapport est élevé.
- une réduction de la chute ohmique RI : diviser le courant par 1000 permet d'utiliser un milieu 1000 fois plus résistif sans distorsion du signal.

D'autre part, si l'on réduit le volume de l'échantillon, il est possible d'obtenir des concentrations importantes pour un nombre très faible de molécules : ainsi, dans $1 \mu\text{m}^3$, il suffit d'environ 600 molécules pour avoir une concentration de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, concentration qui convient tout à fait à la sensibilité des techniques de détection électrochimique. C'est ainsi qu'Amatore et al. [113] ont montré que l'on pouvait utiliser les UME pour détecter des flux d'espèces chimiques émises au voisinage d'une cellule biologique lors d'un processus de stress oxydant. L'émission d'un petit nombre de molécules peut être aisément détectée par ampérométrie, ce qui a permis une meilleure compréhension du mécanisme du stress oxydant.

Conclusion :

Les acides ascorbique et urique sont deux des molécules antioxydantes hydrophiles les plus impliquées dans le système de défense antiradicalaire. Leur dosage dans le cadre de l'évaluation et le suivi du stress oxydant est d'importance pour le diagnostic et l'aide aux protocoles thérapeutiques. Même si elles offrent des sensibilités et des sélectivités de mesures satisfaisantes, les méthodes analytiques généralement utilisées, telles que la chromatographie et la spectrométrie, nécessitent toutes l'utilisation de matériels coûteux et impliquent des protocoles opératoires compliqués avec des phases de prétraitement longues, rendant la

mesure différée dans le temps. Ce point est très important en raison de la nature des phénomènes étudiés (durées de vie très courtes des radicaux libres, réactions en chaîne entre les différentes molécules antioxydantes). Le principe de détection de la majorité de ces techniques reposant sur les propriétés oxydoréductrices des espèces, l'électrochimie est la méthode la plus adaptée à l'étude de ce type de réactions. En outre, les techniques électrochimiques sont peu coûteuses, simples à mettre en œuvre, rapides et sensibles. Elles présentent enfin des seuils de détection compatibles avec les concentrations des acides ascorbique et urique sériques. Ceci est d'autant plus vrai avec l'emploi des ultramicroélectrodes et des méthodes impulsionnelles. C'est dans ce cadre que s'effectuent les travaux décrits par la suite.

Références bibliographiques

- [1] K. J. Carpenter ; *The history of scurvy and vitamin C*. Cambridge University Press, New York (1986).
- [2] P. Aubry ; *Le scorbut une maladie des marins du XV au XVIII toujours d'actualité*. Med trop., 61 (2001) 478-480.
- [3] A. Szent Györgyi ; *Observation on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex : Description of the new carbohydrate derivative*. Biochem. J., 22 (1928) 1387-1409.
- [4] M. J. Amiot-Carlin, F. Caillavet, M. Causse, P. Combris, J. Dallongeville, M. Padilla, C. Renard ; *Les fruits et légumes dans l'alimentation. Enjeux et détermination de la consommation*. Expertise scientifique collective, INRA France, (2007).
- [5] O. Fain ; *New concept in the biology and biochemistry of ascorbic acid*. N. Engl. J. Med., 314 (1986) 892-902.
- [6] O. Traxer, B. Huet, J. Poindexter, C. Pak, M. Pearle ; *Effect of ascorbic acid consumption on urinary stones risk factors*. J. Urol, 17 (2003) 397-401.
- [7] S. S. Mirvish ; *Effect of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer*. Cancer, 58 (1986) 1848-1852.
- [8] H. Labadie ; *Vitamine C. Du scorbut à l'équilibre vitaminique idéal*. Press Med., 20 (1991) 2156-2158.
- [9] M. Okamoto, Y. Ueno ; *Is sudden with vitamin C deficiency caused by lack of carnitine?*. J. Clin. Forensic Med., 13 (2006) 26-29.

- [10] A. Renaud ; *Fer, vitamine C et acide folique : convergence sanguine*. Journal de pédiatrie et de puériculture, 16 (2003) 281-283.
- [11] G. R. Buettner, B. A. Jurkiewicz ; *Chemistry and biochemistry of ascorbic acid*. In Hand book of Antioxydants. M. Dekker. New York, (1996) 13-17.
- [12] S. Ono, M. Takagi, T. Wasa ; *Polarographic investigations of vitamin C. I. The oxidation waves of L-ascorbic acid and the reduction wave of dehydro-L-ascorbic acid* . Bull. Chem. Soc. Jpn, 31 (1958) 356-364.
- [13] I. F. Hu, T. Kuwana ; *Oxidative mechanism of ascorbic acid at glassy carbon electrodes*. Anal. Chem., 58 (1986) 3235-3239.
- [14] P. Karabinas, D. Janakoudakis ; *Kinetic parameters and mechanism of the electrochemical oxidation of L-ascorbic acid on platinum electrodes in acid solutions* . J. Electroanal. Chem., 160 (1984) 159-167.
- [15] B. Halliwell, J. Gutteridge ; *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed.: Oxford University Press, New York (1999).
- [16] J. B. Pritchard, D. S. Miller ; *Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations*. Physiol Rev., 73 (1993) 765-796.
- [17] M. A. Rafey, M. S. Lipkowitz, E. Leal-Pinto, R. G. Abramson ; *Uric acid transport*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., 12 (2003) 511-516
- [18] B. N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers, P. Hochstein ; *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer : A hypothesis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 6858-6862.
- [19] M. G. Simic, S. V. Jovanovic ; *Antioxidation mechanisms of uric acid*. J. Am. Chem. Soc., 111 (1989) 5778-5782.
- [20] R. A. Patterson, E. T. M. Horsley, D. S. Leake ; *Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward LDL: important role of uric acid*. J. Lip. Res., 44 (2003) 512-520.
- [21] P. Letonturier ; *Peut on prévenir le vieillissement ? Pour un vieillissement réussi*. Press Med., 31 (2002) 1173-1183.
- [22] T. P. Whitehead, G. H. G. Thorpe, S. R. J. Maxwell ; *Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids*. Anal. Chim. Acta, 266 (1992) 265-277.
- [23] C. K. M. Choy, I. F. F. Benzie, P. Cho ; *Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tears fluid measured using the FRASC assay*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 41 (2000) 32293-32298.

- [24] R. Gogia, S. P. Richer, R. C. Rose ; *Tear fluid content of electrochemically active components including water-soluble antioxidants*. *Curr. Eye. Res.*, 17 (1998) 257-263.
- [25] R. C. Rose, S. P. Richer, A. M. Bode ; *Ocular oxidant and antioxidant protection*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217 (1998) 397-407.
- [26] J. Horwath-Winter, S. Kirchengast, A. Meinitzer, C. Wachswender, C. Faschinger, O. Schmut ; *Determination of uric acid concentrations in human tear fluid, aqueous humour and serum*. *Acta. Ophthalmol.*, 87 (2009) 188-192.
- [27] F. Fichter, W. Kern ; *Elektrochemische Oxydationen in der Puringruppe*. *Helv. Chim. Acta*, 9 (1926) 429-441.
- [28] W. A. Struck, P. J. Elving ; *Electrolytic Oxidation of Uric Acid: Products and Mechanism*. *Biochemistry*, 4 (1965) 1343-1353.
- [29] D. L. Gilbert ; *Oxygen and living processes*. Springer-Verlag ed, New York, (1997) 73-102.
- [30] C. Ferradini ; *Espèces activées radicalaires de l'oxygène*. *Biochimie*, 68 (1986) 779-785.
- [31] D. Human ; *Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry*. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 37 (2002) 14.
- [32] L. Beaman, B. L. Beaman ; *The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38 (1984) 27-48.
- [33] S. D. Swain, T. T. Rohn, M. T. Quinn ; *Neutrophil priming in host defense : role of antioxidants as priming agents*. *Antioxid. Redox Signaling*, 4 (2002) 69-83.
- [34] M. P. Lehucher-Michel, J. F. Lesgards, O. Delubac, P. Stocker, P. Durand, M. Prost ; *Stress oxydant et pathologies humaines*. *Press Med.*, 30 (2001) 1076-1081.
- [35] H. Sies ; *Oxidative stress : introductory remarks*. H. Sies editor: Academic Press, London (1985) 1-2.
- [36] A. M. Michelson ; *Oxygen radicals*. *Agents. Actions. Suppl.*, 11 (1982) 179-201.
- [37] J.-L. Beaudeau, J. Delattre, P. Therond, D. Bonnefont-Rousselot, A. Legrand, J. Peynet ; *Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. Oxidative stress in the antherosclerotic process*. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21 (2006) 144-150.
- [38] T. F. Slater ; *Free radical mechanism in tissue injury*. *Biochem. J.*, 222 (1984) 1-15.
- [39] J. W. Larrick, D. Graham, K. Toy ; *Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes*. *Blood*, 69 (1987) 640-644.
- [40] C. F. Nathan ; *Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to product of macrophages and lymphocytes*. *J. Clin. Invest.*, 80 (1987) 1550-1560.

- [41] S. Magder ; *Reactive oxygen species : toxic molecules or spark of life?*. Crit. Care, 10 (2006) 208.
- [42] E. Hoshino, R. Shariff, A. Gossum ; *Vitamin E-suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers*. J. Parent. Enter. Nutr., 14 (1990) 300-305.
- [43] L. Goodlick, A. Kane, *Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages*. Cancer Res., 46 (1986) 5558-5566.
- [44] M. Shatos, J. Doherty, J. Marsh ; *Prevention of asbestos-induced cell death in rat lung fibroblasts and alveolar macrophages by scavengers of active oxygen species*. Environ. Res., 44 (1987) 103-116.
- [45] M. Sugiyama, K. Tsuzuki, T. Hidad ; *Reduction of chromium (VI) in Chinese hamster V-79 cells*. Biol. Trace Elem. Res., 30 (1991) 1-8.
- [46] J. C. Béani ; *Actions biologiques du rayonnement solaires sur la peau*. Rev. Int. Pédiatrie, 259bis (1995) 2-7.
- [47] J. A. Berliner, J. W. Hzincke ; *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. Free Rad. Biol. Med., 20 (1996) 707-727
- [48] D. C. Beebe, N. M. Holekamp, Y.-B. Shui ; *Oxidative Damage and the Prevention of Age-Related Cataracts*. Ophthalmic Res., 44 (2010) 155-165.
- [49] S. Belaich, Y. Marck ; *Les dermatoses allergiques professionnelles*. Rev. Fr. Allergol., 37 bis (1997) 943-946.
- [50] K. Wada, A. Saniabadi, M. Nakano ; *Direct measurement of superoxide-dependent chemiluminescence from rat skin following UV-dependent fluoroquinolone-induced dermatitis*. Free Radic. Biol. Med., 18 (1995) 923-927.
- [51] E. Nilsson, B. Mikaelsson, S. Atopy ; *Occupation and domestic work as risk factors for hand eczema in hospital workers*. Cont. Derm., 13 (1985) 16-23.
- [52] I. Rysted ; *Work-related hand eczema in atopics*. Cont. Derm., 12 (1985) 164-171.
- [53] L. Smith, M. Shamsuddin, P. H. Sporn ; *Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma*. Free Radic. Biol. Med., 22 (1997) 1301-1307.
- [54] C. W. Trenam, A. J. Dabbagh, D. R. Blake ; *The role of iron in acute model of skin inflammation induced by reactive oxygen species*. Br. J. Dermatol., 126 (1992) 250-256.
- [55] Y. Christen ; *Oxidative stress and Alzheimer disease*. Am. J. Clin. Nutr., 71 (2000) 621-629.
- [56] B. I. Giasson, J. E. Duba ; *Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions*. Science, 290 (2000) 985-989.

- [57] S. M. Yatin, S. Varadarajan, C. D. Link, D. A. Butterfield ; *In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide*. Neurobiol. Aging., 20 (1999) 325-330.
- [58] C. Schoneich ; *Redox processes of methionine relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer diseases*. Arch. Biochem. Biophys., 397 (2002) 370-376.
- [59] E. Karelson, N. Bogdanovic, A. Garlind ; *The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer disease : noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense*. Neurochem. Res., 26 (2006) 353-361.
- [60] H. M. Hassan ; *Biosynthesis and regulation of superoxide dismutase*. Free Rad. Biol. Med., 5 (1988) 377-385.
- [61] J. M. McCord, I. Fridovich ; *The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen*. J. Biol. Chem. 244 (1969) 6056-6063.
- [62] J. M. McCord, I. Fridovich ; *The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrom C reduction by a variety of electron carriers*. J. Biol. Chem., 245 (1970) 1374-1377.
- [63] M. J. Richard, F. Belleville, J. Chalas ; *Les glutathions peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique*. Ann. Biol. Clin., 55 (1997) 195-207.
- [64] J. Nève ; *Methods in determination of selenium states*. J. Trace Elem. Electrolytes. Health Dis., 5 (1991) 1-17.
- [65] J. C. Guillang, M. Lhuissier ; *Vitamine E et activité sportive*. Cah. Nutr. Diet., 31 (1996) 267-276.
- [66] P. Palloza, N. I. Krinsky ; *β -carotène and α -tocophérol are synergistic antioxidants*. Arch. Biochem. Biophys., 297 (1992) 184-187.
- [67] L. Kohlmeier, J. D. Kark, E. Gomez-Gracia ; *Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study*. Am. J. Epidemiol., 146 (1997) 618-626.
- [68] J. Levy, E. Bosin, B. Feldman ; *Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either carotene or beta-carotene*. Nutr. Cancer, 24 (1995) 257-266.
- [69] P. Faure, A. M. Roussel, M. J. Richard, S. Halimi, A. Favier ; *Zinc and insulin sentivity*. Biol. Trace Elem. Res., 32 (1992) 305-310.
- [70] R. A. Anderson, A. M. Roussel, N. Zouari, S. Mahjoub, J. M. Matheau, A. Kerkeni ; *Potential antioxidant effects or zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus*. J. Am. Coll. Nutr., 20 (2001) 212-218.

- [71] H. Sanstead ; *Requirements and toxicity of essential trace elements illustrated by zinc and copper*. Am. J. Clin. Nutr., 61 (1995) 621-624.
- [72] A. T. Diploc ; *Antioxidant nutrients and diseases prevention : an overview*. Am. J. Clin. Nutr., 53 (1991) 189-193.
- [73] M. P. Rayman ; *The importance of selenium to human health*. Lancet, 356 (2000) 233-241.
- [74] M. J. Glade ; *Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Nutrition, 15 (1999) 523-526.
- [75] M. Kaplan, T. Hayek, A. Raz ; *Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis*. J. Nutr., 131 (2001) 2082-2089.
- [76] Y. Li, H. E. Schellhorn ; *New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C*. J. Nutr., 137 (2007) 2171-2184.
- [77] J. Lin, N. R. Cook, C. Albert, E. Zaharris, J. M. Gaziano, M. Van Denburgh, J. E. Buring, J. E. Manson ; *Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk : a randomized controlled trial*. J. Natl. Cancer. Inst., 101 (2009) 14-23.
- [78] M. Sano, C. Ernesto, R. G. Thomas ; *A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's diseases*. N. Engl. J. Med., 336 (1997) 1216-1222.
- [79] G. Nicoletti, L. Crescibene, M. Scornalenti ; *Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease*. Arch. Gerontol. Geriatr., 33 (2001) 7-12.
- [80] C. Desnuelle, M. Dib, C. Garrel, A. Favier ; *A double-blind placebo controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol study group*. Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor. Neuron. Disord., 2 (2001) 9-18.
- [81] N. R. Cook, C. Albert, E. Zaharris, J. M. Gaziano, J. Mac Fadyen, E. Danielson J. E. Buring, J. E. Manson ; *A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women : results from the women's antioxidant cardiovascular study*. Arch. Intern. Med., 167 (2007) 1610-1618.
- [82] H. D. Sesso, J. E. Bring, W. G. Christen, T. Kurth, C. Belanger, J. Mac Fadyen, V. Bubes, J. E. Manson, R. J. Glynn, J. M. Gaziano ; *Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men : the physician's health study II randomized controlled trial*. J. Am. Med. Assoc., 300 (2008) 2123-2133.

- [83] P. Korantzopoulos, T. M. Kolettis, E. Kountouris, V. Dimitroula, P. Kranikis, E. Pappa, K. Siogas, J. A. Goudevenos ; *Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation*. Int. J. Cardiol., 102 (2005) 321-326.
- [84] U. Milman, S. Blum, C. Shapira, D. Aronson, R. Miller-Lotan, Y. Anbinder, J. Alshiek, L. Bennett, M. Kostenko, M. Landau; *Vitamin E Supplementation Reduces Cardiovascular Events in a Subgroup of Middle-Aged Individuals With Both Type 2 Diabetes Mellitus and the Haptoglobin 2-2 Genotype. A Prospective Double-Blinded Clinical Trial*. Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol., 2008 28 (2) 341-7
- [85] P. F. Jacques, L. T. L. Chylack, S. E. Hankinson ; *Long-term nutrient intake and early age related nuclear lens opacities*. Arch. Ophthalmol., 119 (2001) 1009-1019.
- [86] J. Kaluzny, J. J. Kaluzny, D. Raukuc ; *Uric acid level in aqueous humour of patients with cataract*. Klin. Oczna, 98 (1996) 271-273.
- [87] D. A. Glaser, C. Rogers ; *Tropical and systemic therapies for the aging face*. Facial Plast. Surg. Clin. North Am., 9 (2001) 189-196.
- [88] W. A. Pryor, S. S. Godber ; *Non invasive measurement of oxidative stress status in human*. Free Rad. Biol. Med., 10 (1991) 177-178.
- [89] A. Favier, J. Cadet, R. Kalaryanaman, M. Fontecave, J. Pierre ; *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkhäuser Verlag. New York, (1995) 56-64.
- [90] A. Favier ; *Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur*. Ann. Biol. Clin., 55 (1997) 9-16.
- [91] G. Rimbach, D. Hohler, A. Fisher ; *Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems*. Arch. Tierernahr., 52 (1999) 203-222.
- [92] D. Bonnefont-Rousselot, J.-L. Beaudeux, P. Thérond ; *Marqueurs d'oxydation des biomolécules. Biochimie médicale, marqueurs actuels et perspectives*. Ed EMI Lavoisier, Paris (2008) 173-186.
- [93] B. Palmier, V. Sblendorio ; *Oxidative stress test : overview on reliability and use. Part I*. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 11 (2007) 309-342.
- [94] P. F. Knowles, J. F. Gibson, F. M. Pick, F. R. C. Bray ; *ESR evidence for enzymatic reduction of oxygen to free radicals : the superoxide ion*. Biochem. J. 111 (1969) 53-58.
- [95] S. Pietri, T. Leibgott. C. Frévajille, P. Tordo, M. Culacasi ; *Nitrone spin traps and their pyrrolidine analogs in myocardial reperfusion injury : hemodynamic and ESR implications. Evidence for a cardioprotective phosphate effect for 5-(diethoxyphosphoryl)-(-methyl-1-pyrroline N-oxide in rat hearts*. Eur. J. Biochem., 254 (1998) 256-265.

- [96] H. Sakurai, H. Yasui, Y. Yamada, H. Nishimura, M. Shigemoto ; *Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light : a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection*. Photochem. Photobiol. Sci., 4 (2005) 715-720.
- [97] M. A. Carbonneau, E. Peuchant, D. Sess, P. Canioni, M. Clerc ; *Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma*. Clin. Chem., 37 (1991) 1423-1429.
- [98] G. Lefèvre, M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle ; *Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique*. Ann. Biol. Clin., 56 (1998) 305-319.
- [99] L. J. Roberts II, K. P. Morrow ; *Measurement of F₂-iso-prostanés as an index of oxidative stress in vivo*. Free Rad. Biol. Med., 28 (2000) 505-513.
- [100] J. L. Cracowski, F. Stanke-Labesque, C. Souvignet, G. Bessard ; *Isoprostanes : nouveaux marqueurs du stress oxydatif en pathologies humaines*. Press Med., 29 (2000) 604-610.
- [101] D. Bonnefont-Rousselot, P. Thérond, J. L. Peynet, A. Legrand, J. Delattre ; *Vieillesse et stress oxydant. Quel marqueurs potentiels ?*. Ann. Biol. Clin., 59 (2001) 453-459.
- [102] D. E. Paglia, W. N. Valentine ; *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxydase*. J. Lab. Clin. Med., 70 (1967) 158-168.
- [103] H. Aebi ; *Catalase in vitro*. Methods. Enzymol., 105 (1984) 121-126.
- [104] Z. Gazdik, O. Zitka, J. Petřlova, V. Adam, J. Zehnalek, A. Horna, V. Reznicek, M. Beklova, R. Kizek ; *Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection*. Sensors. 8 (2008) 7097-7112.
- [105] S. L. Feng, J. Wang, X. G. Chen, J. Fan ; *Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite*. Spectrochim. Acta, Part A, 61 (2005) 841-844.
- [106] Y. Zhao, X. Yang, W. Lu, H. Liao, F. Liao ; *Uricase based methods for determination of uric acid in serum*. Microchim. Acta, 164 (2009) 1-6.
- [107] R. L. Prior, G. Cao ; *In vivo total antioxidant capacity : comparison of different analytical methods*. Free Rad. Biol. Med., 27 (1999) 1173-1181.
- [108] F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, R. Méallet-Renault ; *Electrochimie, des concepts aux applications*. Dunod, Paris (2005).

- [109] A. J. Bard, L. R. Faulkner; *Electrochemical methods : fundamentals and applications*; 2nd ed.; Wiley, New York, (2001).
- [110] B. Trémillon ; *Electrochimie analytique et réactions en solution. Tome 2 Réactions et méthodes électrochimiques*. Paris : Masson, (1993).
- [111] J. Buffle, M.-L. Tercier-Waeber ; *In situ monitoring of aquatic systems. Chemical analysis and speciation*, (Eds: J. Buffle, G. Hoarvai), Vol.6, Willey, Chichester (2000) 279-405.
- [112] Y. Saito ; *Theoretical study of the diffusion current at the stationary electrodes of circular and narrow band*. Rev. Polarogr., 15 (1968) 177-187.
- [113] C. Amatore, S. Arbault, D. Bruce, Delphine; P. de Oliveira, M. Erard, M. Vuillaume ; *Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst*. Faraday Discussions. (Bioelectrochemistry), 116 (2000), 319-333.

Chapitre II: Elaboration et mise au point du
microcapteur à acides ascorbique et urique par
électropolymérisation du PEDOT

Chapitre II: Elaboration et mise au point du microcapteur à acides ascorbique et urique par électropolymérisation du PEDOT

II.1. Modification de surface

II.2. Polymères conducteurs

II.2.1. Généralités sur les polymères conducteurs

II.2.2. Synthèse des polymères conducteurs

II.2.3. Applications des polymères conducteurs

II.2.4. Les poly(éthylènedioxythiophènes) (PEDOT)

II.2.5. Electropolymérisation du (PEDOT)

II.3. Application de l'interface modifiée par un film de PEDOT à l'élaboration d'un capteur pour le dosage des acides ascorbique et urique

II.3.1. Matériels et méthodes

II.3.1.1. Réactifs et solutions électrolytiques

II.3.1.2. Appareillage

II.3.2. Elaboration des microélectrodes fonctionnalisées par électropolymérisation du 3,4-éthylènedioxythiophène

II.3.3 Détection électrochimique des acides ascorbique et urique

II.3.3.1. Cinétique électrochimique des deux acides ascorbique et urique

II.3.3.2. Oxydation simultanée des acides ascorbique et urique

II.3.3.3. Effet de la vitesse de balayage des potentiels

II.3.3.4. Utilisation des méthodes électrochimiques impulsionnelles

II.3.4. Effet de l'épaisseur de la couche de PEDOT déposée

II.3.5. Etude de quelques paramètres de dépôt

II.3.5.1. La concentration du monomère EDOT

II.3.5.2. La limite anodique de la fenêtre de potentiel d'électropolymérisation

II.3.5.3. La vitesse de balayage d'électropolymérisation

II.3.6. Performances analytiques du capteur

II.3.6.1. Dosage individuel des acides ascorbique et urique

II.3.6.2. Dosage simultané des deux acides ascorbique et urique

II.3.7. Proposition d'un mécanisme EC' de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique

II.3.7.1. Dosage de l'acide urique en absence et en présence d'acide ascorbique

II.3.7.2. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction de la concentration d'acide ascorbique

II.3.7.3. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction des concentrations d'acide déhydroascorbique

II.3.8. Etude des interférents

Conclusion

Références bibliographiques

Ce chapitre est consacré à la mise au point d'un outil analytique simple, capable de doser simultanément et sélectivement les acides ascorbique et urique. Pour atteindre cet objectif, le concept de la modification de surface est adopté. Les électrodes modifiées ont fait l'objet d'une intense activité de recherche au cours de ces dernières années et divers modes de fonctionnalisation de surface ont été développés. La modification par électropolymérisation d'un film de polymère conducteur suscite toujours l'intérêt de la plupart des recherches.

II.1. Modification de surface :

L'utilisation des méthodes ampérométriques dans l'électroanalyse représente une option de choix pour la détection de diverses molécules avec de faibles limites de détection. Cependant, suivant le milieu étudié, il peut y avoir des interférences avec d'autres espèces pouvant s'oxyder ou se réduire à des potentiels proches de celui de la molécule ciblée. L'oxydation des deux antioxydants, les acides ascorbique et urique, sur la majorité des matériaux conventionnels (carbone vitreux, platine ou or) en est une illustration. Les deux acides s'oxydent à des potentiels proches, ce qui provoque le chevauchement de leur pic anodique, rendant la mesure électrochimique sélective difficile ^[1]. La difficulté est plus importante si le milieu contient d'autres molécules, telles que la dopamine (Dop), le glutathion (GSH), et la xanthine, qui réagissent à des potentiels voisins.

La stratégie permettant de surmonter de tels problèmes repose sur l'utilisation de matériels conventionnels fonctionnalisés pour donner une électrode chimiquement modifiée.

Le concept d'électrodes modifiées est apparu il y a une vingtaine d'années en vue d'améliorer la réactivité et surtout la sélectivité des réactions électrochimiques. Ces derniers temps, différentes stratégies ont été employées pour la modification de l'électrode. Pour autant, les motivations sont communes : (i) l'amélioration de la sélectivité et de la sensibilité de la mesure électrochimique, (ii) la réduction des problèmes d'adsorption des produits d'oxydation à la surface de l'électrode (iii) la prévention de réactions indésirables rivalisant cinétiquement avec les réactions ciblées. Sans oublier les motivations d'ordres économique et temporel par le fait que ces méthodes sont moins coûteuses et moins consommatrices de temps par rapport aux autres méthodes analytiques classiques. Pour ces raisons, les électrodes chimiquement modifiées sont largement décrites comme des outils analytiques sensibles et sélectifs et sont

adoptées dans différents domaines d'application : analyse en biologie clinique, suivi des procédés agroalimentaires, contrôle de l'environnement...

En ce qui concerne les acides ascorbique et urique, les modes de modification de surface développés pour leur détection simultanée sont multiples, ce qui correspond à une grande quantité d'articles dans la bibliographie. Ici, le but n'est pas d'établir la liste complète de tout les modes ni de citer tous ces articles mais d'énumérer les plus importants. Le tableau II.1 récapitule quelques travaux consacrés aux électrodes chimiquement modifiées avec des polymères conducteurs. Le tableau II.2 liste les modifications d'électrodes par les nanotubes de carbone, tandis que dans le tableau II.3 sont rapportées des approches multiples développées telles que l'emploi d'oxydes métalliques, de nanoparticules déposées sur des électrodes conventionnelles ou l'utilisation de surfactants et de micelles.

Espèces détectées	Modification	Références
AA, AU	Polyaniline	[2]
AA, AU	Polyaniline /Acide acrylique	[3]
AA	Poly (N- méthylaniline)	[4]
AA	Polypyrrole	[5]
AA, AU	Polypyrrole suroxydé	[6]
AA, AU	Poly (N- méthylpyrrole)/nanoparticules de Pd	[7]
AU	Polypyrrole/polyaniline	[8]
AA	Polypyrrole / Polyaniline	[9]
AA, AU	Poly (3,4- éthylènedioxythiophène)	[10- 14]
AA	Poly (3,4- éthylènedioxythiophène)	[15]
AA	Poly (3,4- éthylènedioxythiophène)/ ferricyanure	[16]
AA, AU	Poly (3,4- éthylènedioxythiophène)/ catéchine	[17]
AA, AU	Poly (3,4- éthylènedioxythiophène)/ Pd	[18]
AA, AU	Poly (3,4- éthylènedioxythiophène)/nanoparticules d'Au	[19]
AU	Poly (3- acetylthiophène)	[20]
AA, AU	Poly (acétate de vinyle)	[21]
AA, Dop	Poly (3- méthylthiophène)/ nanoparticules de Pd	[22]
AA, AU, Dop	RNA	[23]
AA, AU	Poly (luminol)	[24]

Tableau II.1. Électrodes fonctionnalisées par les polymères conducteurs.

Espèces détectées	Modification	Références
AA, AU	nanotubes de carbone monofeuillet (SWCNTs)	[25]
AA, AU	nanotubes de carbone multifeuillet (MWCNTs)	[26]
AA	MWCNTs /Bi ₂ O ₃	[27]
AA, AU	MWCNTs / nanoparticules de Pt	[28]
AA, AU	MWCNTs / rouge congo	[29]
AA	MWCNTs / poly (bleu de méthylène)	[30]
AA, AU	SWCNTs/ bromure de cetylpyridinium	[31]
AA, AU	SWCNTs/ ferritine	[32]
AA, AU	SWCNTs/ polylumino	[33]
AA, AU	CNT- Nafion	[34]
AA, AU, GSH	Poudre de carbone	[35]

Tableau II.2. Fonctionnalisation de surface par les nanotubes de carbone.

Espèces détectées	Modification	Références
AA, AU	Oxydes métalliques	[36]
AA, AU	Sels de diazonium	[37]
AA, AU	Silice mésoporeuse	[38]
AA, AU	Thiols autoassemblés	[39]
AA, AU	Complexes métalliques	[40]
AA, AU	Acide caféique	[41]
AA	Acide aspartique	[42]
AA, AU	Quercétine	[43]
AA, AU	Liquides ioniques	[44]
AU	Fullerènes	[45]
AA	Nanoparticules d'or/ choline	[46]
AA	Zéolite	[47]
AA, Dop	Sol gel	[48]
AA, AU	Surfactant	[49]

Tableau II.3. Diverses modes de fonctionnalisation de surface.

Si la bibliographie offre un panel varié de modes de fonctionnalisation de surface pour une détection spécifique des acides ascorbique et urique, l'application finale envisagée (détection dans les milieux réels tels que les liquides physiologiques, l'épiderme, la muqueuse buccale) fait que la stratégie choisie pour cette étude doit répondre aux critères suivants :

1. la biocompatibilité des produits chimiques nécessaires pour la fonctionnalisation,
2. la simplicité de la procédure de fonctionnalisation (peu d'étapes, pas de synthèse organique pour disposer des réactifs),
3. la possibilité d'intégrer la procédure de fonctionnalisation au protocole de fabrication des microcapteurs électrochimiques en technologie silicium développé dans le cadre de la thèse de Céline Christophe ^[50].

Compte tenu de ces exigences, le choix s'est orienté vers les polymères conducteurs qui, depuis deux décennies, sont largement utilisés pour développer des électrodes modifiées. En effet, en formant des multicouches d'espèces actives à sa surface, la modification d'une électrode par un film de polymère permet le contrôle des propriétés physiques et chimiques de l'interface électrode/électrolyte et le contrôle de la réactivité et de la sélectivité d'une réaction électrochimique. L'électrode acquiert les propriétés chimiques et électrochimiques du système immobilisé qui joue le rôle de médiateur redox ou d'électrocatalyseur. La modification de surface par les polymères conducteurs améliore significativement la sensibilité et la sélectivité de la détection analytique et abaisse les limites de détection. Les polymères conducteurs exhibent aussi des propriétés d'anti-fouling qui sont très importantes pour une mesure électrochimique en milieu réel. Sur des temps longs, la liste des molécules détectées sélectivement sur ces matériaux ne cesse de s'allonger : cholestérol ^[51], ADN ^[52], dopamine ^[53], benzoquinone ^[54], cysteine ^[55], H₂O₂ ^[56] ...

II.2. Polymères conducteurs :

II.2.1. Généralités sur les polymères conducteurs :

Les polymères sont des matériaux qui suscitent un très grand intérêt. Leur légèreté, leur résistance, leur faible coût de production et leur facilité de transformation font que leurs domaines d'applications se sont considérablement multipliés ^[57].

Le développement des polymères conjugués commence au début des années 1970 avec la mise en évidence d'une conductivité de type métallique ($\sim 10^3$ S/cm) pour le polynitrure de soufre $[(-S=N-)_x]$ après certaines modifications ^[58]. Cette propriété remarquable suscita l'intérêt de la communauté scientifique, qui proposa rapidement d'autres composés pouvant présenter des propriétés analogues. C'est ainsi qu'en 1977, Mac Diarmid, Heeger et Shirakawa ont découvert l'oxydation partielle du film du polyacétylène par l'iode mettant ainsi en évidence les propriétés de conduction du premier polymère organique conducteur : le polyacétylène. C'est la naissance des polymères conducteurs ^[59,60]. Pour qu'un polymère organique puisse conduire l'électricité, il doit comporter un système de doubles liaisons conjuguées. Il doit aussi être « dopé », ce qui consiste à enlever des électrons « par oxydation » ou à en ajouter « par réduction ». Ces trous ou électrons supplémentaires peuvent se déplacer tout le long de la molécule qui devient ainsi conductrice d'électrons. Les travaux de ces trois pionniers ont d'ailleurs été récompensés par le prix Nobel de chimie en 2000.

Une étape importante dans le développement des polymères conducteurs s'est produite en 1979 quand Diaz et al ont montré que les films de polypyrrole synthétisés par électropolymérisation présentaient une conductivité électrique élevée et une bonne homogénéité ^[61]. La polymérisation électrochimique a été rapidement appliquée à d'autres composés aromatiques tels que les thiophènes ^[62, 63], les anilines ^[64-66]...etc.

Le terme « polymère conducteur » est aujourd'hui devenu un terme générique qui recouvre l'ensemble des polymères conjugués, que leur conductivité soit très élevée ou pas. Il existe trois principaux types de matériaux conducteurs à base de polymères conjugués :

- les polymères conducteurs composites encore appelés polymères conducteurs extrinsèques. Ils sont composés d'une matrice constituée d'un polymère isolant dans laquelle sont dispersées des particules conductrices afin d'augmenter la conductivité électrique :

particules métalliques ^[67-70], polymères intrinsèques ^[71, 72], poudre de carbone ^[73-75]. Ce type de composite trouve des applications dans les encres conductrices pour circuits imprimés, les revêtements anticorrosion, l'emballage ou encore les supports antistatiques.

- les polymères dits conducteurs ioniques. Dans ces polymères organiques, par ailleurs isolants électriques, les charges sont transportées par des ions. Un exemple concerne les oxydes de polyéthylène, dans lesquels est dissous un sel de lithium, utilisés pour la première fois par Armand dès les années 80 comme électrolyte solide pour les applications batterie Li-polymère et Li-ion. ^[76,77].

- les polymères conducteurs électroniques intrinsèques qui seront d'avantage développés dans ce travail. Ils se présentent sous la forme de chaînes de polymères avec une conjugaison totale sur chacune d'entre elles qui induit une structure électronique qui les rapproche des semi-conducteurs. Depuis le polyacétylène développé par Shirakawa, de nombreux autres polymères conjugués ont été synthétisés. Les plus courants sont la polyaniline, le polypyrrole, le polythiophène et ses dérivés et le poly(*p*-phénylène) (figure II.1). Cette liste n'est pas exhaustive, chaque monomère pouvant être modifié par greffage de fonctions. Les polymères conservent alors leur conjugaison, mais leurs propriétés peuvent être modifiées.

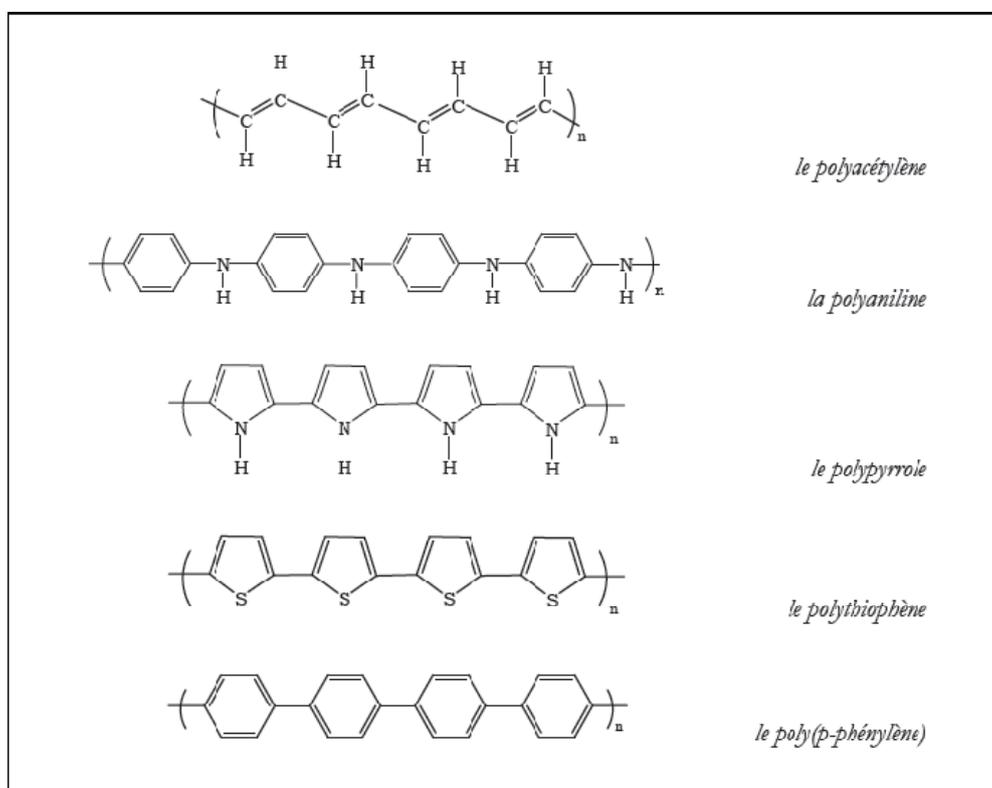


Figure II.1. Structures chimiques des polymères conducteurs les plus courants.

II.2.2. Synthèse des polymères conducteurs :

La synthèse consiste à assembler les monomères par réaction d'addition ou de condensation. Les polymères conducteurs peuvent être synthétisés par voie chimique en présence d'agents oxydants tels que FeCl_3 ou $\text{Fe}(\text{OTs})_3$ ^[78-81], ou par voie électrochimique^[82-95]. La première méthode est basée sur des réactions de condensation ; elles sont généralement conduites en présence de catalyseurs métalliques fortement réducteurs et nécessitent un contrôle rigoureux des paramètres de synthèse. La structure et les propriétés du composé obtenu dépendent fortement de la composition et de la concentration du catalyseur, du solvant, de la température et de la présence d'oxygène ou d'humidité. Un grand nombre de polymères ont été synthétisés par voie chimique ; le premier d'entre eux est le polyacétylène, préparé par Shirakawa en faisant passer un courant gazeux d'acétylène à la surface d'une solution contenant un catalyseur de type Ziegler^[81]. Malheureusement, la synthèse chimique présente souvent des rendements limités. De plus, cette méthode de synthèse nécessite une étape difficile de purification afin d'éliminer les traces de catalyseurs et les produits secondaires.

L'électropolymérisation a été largement utilisée ces dernières années comme procédé alternatif de synthèse de polymères isolants ou semi-conducteurs. L'électrosynthèse conduit à des films de polymère à la surface de l'électrode qui ont une structure et des propriétés bien définies et contrôlées. En effet, cette technique présente les avantages suivants :

- relative facilité de mise en œuvre sans présence de catalyseur
- obtention de films d'épaisseur et de structure contrôlées et reproductibles
- adressage électrochimique évitant les réactions secondaires sur les surfaces non concernées.
- adhérence et homogénéité des films à la surface de l'électrode
- possibilité d'étude de la croissance et caractérisation des films *in situ* par des techniques spectroscopiques et électrochimiques.

Les électrosynthèses des polymères sont réalisées en mode potentiostatique (potentiel constant)^[62,82], en mode galvanostatique (courant constant)^[83-84] ou bien en mode potentiodynamique (balayage de potentiel)^[85-95]. Le premier de ces modes permet de maintenir le potentiel de l'électrode à une valeur correspondant à l'oxydation du monomère. Cette méthode a pour avantage d'éviter l'oxydation simultanée du solvant. En mode galvanostatique, la vitesse de polymérisation est maintenue constante et conduit à la formation

de polymère avec une morphologie identique sur toute l'épaisseur. Le mode potentiodynamique est largement utilisé pour déterminer les différentes étapes du mécanisme et la cinétique du processus d'électropolymérisation.

Le mécanisme de l'électropolymérisation est radicalaire et présente des similitudes avec le mécanisme d'électrodépôt des métaux. Il a été proposé pour la première fois par Diaz ^[85] en 1982 dans le cadre du polypyrrole et considéré depuis comme un modèle du mécanisme de polymérisation des polymères conducteurs (figure II.2). Ce mécanisme est initié par une étape de production de radical cation par oxydation du monomère. Deux radicaux réagissent ensuite entre eux pour former un dimère. Après déprotonation, celui-ci s'oxyde à son tour. La propagation de la réaction, assurée par le couplage entre dimère cation et un radical cation, est rendue possible car le potentiel d'oxydation du monomère est plus élevé que celui des oligomères ^[95]. Ces derniers réagissent donc en priorité avec le radical cation. La croissance de la chaîne de polymère est stoppée par la réaction des radicaux avec des espèces présentes dans le milieu, tels que le solvant ou les impuretés. Le polymère insoluble ainsi obtenu est adhérent à la surface de l'électrode. La réaction de polymérisation peut s'interpréter comme une réaction EC₂EC, où E désigne une réaction électrochimique et C une réaction chimique.

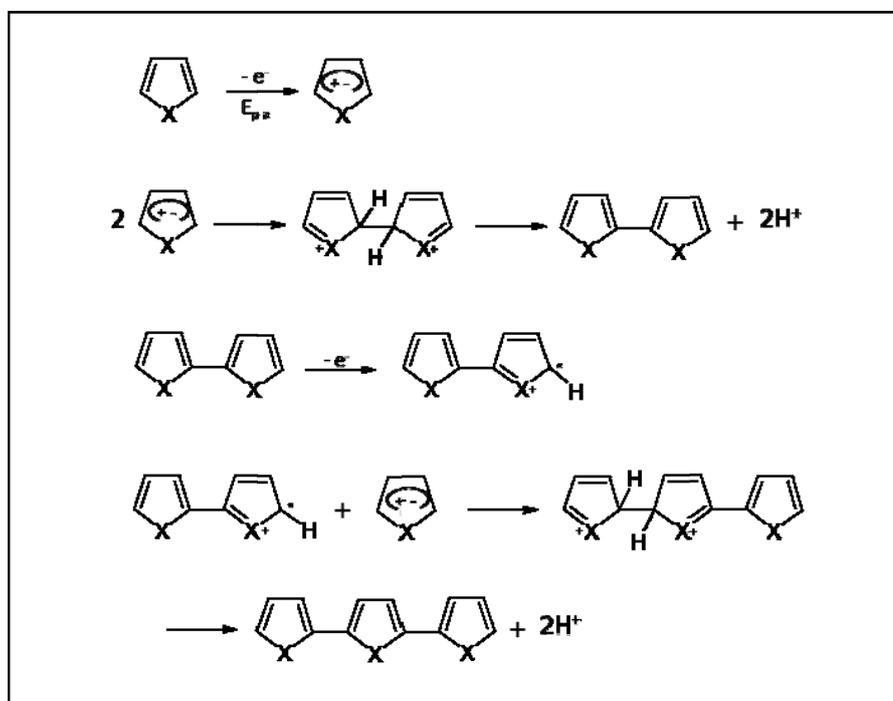


Figure II.2. Mécanisme d'électropolymérisation de cinq cycles aromatiques ^[87].

La synthèse électrochimique peut être réalisée en milieux aqueux ou organique, suivant le monomère utilisé et sa solubilité dans divers solvants. Le polypyrrole, la polyaniline et le polythiophène sont synthétisés en milieu aqueux^[96-98], organique^[99,100] ou en présence des deux^[101,102]. Il faut toutefois noter qu'en raison de la formation des radicaux cations qui présentent un fort caractère électrophile, la réaction d'électropolymérisation est sensible aux propriétés nucléophiles du solvant. Ceci explique le grand nombre de travaux réalisés en milieu organique aprotique. Les solvants les plus employés sont l'acétonitrile, le nitrobenzène et le carbonate de propylène^[87]. La synthèse en milieu aqueux suscite une grande ambiguïté, bien qu'elle présente un certain avantage du point de vue environnemental. Berk et al ont mis en évidence une diminution du rendement faradique de l'électropolymérisation du thiophène dans l'acétonitrile en présence d'eau^[103]. De même, Diaz^[104] a montré que la conductivité électrique des films de polypyrrole électrogénérés chute de 60 à 0,5 S.cm⁻¹ lorsque la teneur en eau augmente de 1 à 25 %. D'autres travaux notent au contraire un effet bénéfique de l'eau : selon Downard et al^[102], la réduction de la solubilité des oligomères en présence d'eau favorise le dépôt à la surface de l'électrode. Heinze^[105] propose quant à lui que la constante diélectrique élevée de l'eau (80 comparée à 37 pour l'acétonitrile) réduit les répulsions entre les radicaux cations pyrrole et favorise leur couplage.

Au même titre que le solvant, plusieurs électrolytes support sont employés. Ils sont choisis en fonction de leur solubilité dans le solvant retenu. En milieu organique, les sels de tétraalkylammonium sont les plus utilisés du fait qu'ils sont peu nucléophiles.

II.2.3. Applications des polymères conducteurs :

Les polymères conducteurs électrogénérés présentent à la fois les propriétés des polymères organiques (facilité de mise en forme, bonnes propriétés mécaniques et forte résistance aux acides et aux bases) et des propriétés de semi-conducteurs grâce à leur conductivité électrique qui peut être très élevée. Dans un tel contexte, il n'est pas surprenant qu'ils suscitent un intérêt considérable tant pour la recherche académique qu'industrielle. Ces recherches débouchent sur des applications pratiques très importantes. Ces polymères électriquement actifs peuvent être utilisés dans :

- la protection anticorrosion^[106,107]
- les dispositifs électroluminescents^[108]
- le stockage de l'énergie^[109,110]

- les dispositifs électrochromes car certains polymères conducteurs changent de couleur en fonction de leur état d'oxydation ^[111,112].
- le traitement antistatique ^[113].
- le biomédical : la plupart des polymères conducteurs sont biocompatibles et ont la capacité de piéger des molécules biologiques, de transférer la charge d'une réaction biochimique et de moduler leurs propriétés électriques, chimiques, physiques pour répondre au mieux à l'application, qu'elle soit dans le génie tissulaire, les sondes neurales ou les systèmes d'administration de médicaments ^[114].
- l'électroanalyse : à l'heure actuelle, le développement de capteurs est très en vogue et les débouchés potentiels sont énormes. Les polymères peuvent détecter certains ions tels que H⁺ (mesure du pH) ^[101], K⁺ ^[115] ou Ag⁺ ^[116], des vapeurs organiques ^[117] ou des gaz ^[118]. Ils peuvent servir pour l'élaboration des biocapteurs par l'immobilisation des enzymes et des particules métalliques ^[119,121], ou la fonctionnalisation de surface des électrodes pour l'étude des molécules biologiques impliquées dans les processus biochimiques des milieux vivants ^[2,24, 51-56].

II.2.4. Les poly(éthylènedioxythiophènes) (PEDOT)

D'un point de vue théorique, les polythiophènes sont considérés comme matériau modèle pour l'étude du transport de charge dans les polymères conducteurs. Leur stabilité dans le temps même à l'état oxydé, leur conductivité électrique importante et leur biocompatibilité expliquent le nombre d'études qui leurs sont dédiées pour améliorer leurs propriétés et élargir leurs domaines d'applications ^[85].

Le poly (3, 4-éthylènedioxythiophène), composé de la famille des polythiophènes connu sous le nom de PEDOT, est polymérisé pour la première fois par Jonas et Heywang ^[122] pour des applications de revêtements antistatiques. Sa configuration, avec les positions β et β' bloquées, lui confère une meilleure stabilité sous sa forme oxydée. Le PEDOT est un polymère conducteur présentant des propriétés très intéressantes : il a une bonne adhérence sur la plupart des matériaux d'électrodes, il peut être déposé électrochimiquement sur de petites surfaces avec un haut degré de conformité géométrique ; le dépôt peut être effectué sur des surfaces choisies particulièrement dans le cas des microcapteurs. Il a une bonne conductivité électrique (400- 600 S.cm⁻¹), une largeur de bande interdite modérée lui donnant une coloration à l'état réduit, ainsi qu'une bonne stabilité dans des électrolytes aqueux ^[63]. Le PEDOT conserve 98% de sa conductivité initiale après un test de vieillissement à 70°C

pendant 1300 heures, alors que le polypyrrole n'en préserve que 75% et la polyaniline 50%^[123]. D'autres travaux ont montré que le PEDOT est considérablement plus stable que le polypyrrole vis-à-vis de l'hydrolyse, la lumière et la température^[124]. Enfin, la biocompatibilité du PEDOT est un facteur clé pour la fabrication des biocapteurs et l'application à l'analyse dans les milieux biologiques^[114]. Ce sont les raisons majeures qui ont conduit à choisir ce monomère pour ce travail de thèse.

II.2.5. Electropolymérisation du (PEDOT)

L'optimisation de la synthèse électrochimique des polythiophènes et notamment du PEDOT reste un sujet d'étude majeur^[62,82-84,125-133]. Afin de mieux comprendre les mécanismes de l'électropolymérisation et d'améliorer les propriétés des films obtenus, plusieurs axes de recherches ont été développés visant à mettre en lumière l'impact de certains paramètres d'électropolymérisation : la nature du substrat (platine, or, titane, carbone vitreux)^[62,125-127], le solvant (aqueux ou organique)^[128-131], l'électrolyte support^[132-133], la concentration du monomère^[86,87], le choix de la méthode électrochimique utilisée et de ses caractéristiques^[89-94].

Si l'influence de ces paramètres sur les propriétés structurales, morphologiques et électriques des films de PEDOT est désormais bien connue, peu d'études se sont intéressées à leur impact sur les potentialités du PEDOT pour la détection électrochimique à des fins analytiques. C'est l'objectif principal des travaux qui suivent, dans le cas particulier du dosage simultané des acides ascorbique et urique.

II.3. Application de l'interface modifiée par un film de PEDOT à l'élaboration d'un capteur pour le dosage des acides ascorbique et urique

A l'issue de l'étude bibliographique, le choix s'est porté vers la modification de surface par électropolymérisation du PEDOT. Cette option ne constitue pas une nouveauté en soi : plusieurs travaux ont précédemment été publiés sur l'utilisation d'électrodes modifiées par un film de PEDOT pour la détection ou le dosage de l'acide ascorbique ou de l'acide urique^[10-19]. Toutefois, ces études ne répondent pas à la problématique soulevée ici. En effet, dans la plupart des cas, deux situations sont rencontrées : la première considère l'acide ascorbique et/ou l'acide urique comme des interférents, en particulier dans le cas du dosage de la

dopamine. Dans la seconde situation, l'acide ascorbique est présent en très grand excès dans l'échantillon : il est donc uniquement détecté dans le mélange sans être dosé, alors que sa quantification représente, au même titre que l'acide urique, un sujet d'intérêt en biologie clinique. Pour compléter ces travaux, il faut donc proposer des capteurs pour un dosage simultané et sélectif des deux acides ascorbique et urique, d'abord testés dans des solutions modèles avant d'être éprouvés dans les liquides physiologiques (chapitre III). Dans le souci d'améliorer les performances des capteurs proposés et en particulier la sensibilité et la sélectivité de la mesure électrochimique, l'influence des paramètres de d'électropolymérisation sur la réponse ampérométrique du capteur est explorée dans ce chapitre.

II.3.1. Matériels et méthodes

II.3.1.1. Réactifs et solutions électrolytiques

Le monomère 3,4-éthylènedioxythiophène EDOT et l'hexacyanoferrate de potassium $K_3Fe(CN)_6$ sont fournis par Aldrich et utilisés sans traitement préalable.

Le perchlorate de tétrabutylammoium (TBAPC) est fourni par Sigma-Aldrich.

L'acide sulfurique 95% est fourni par VWR.

Les acides ascorbique et urique de qualité analytique sont fournis par Sigma.

L'acétonitrile anhydre 99.9%, le dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et l'hydrogénophosphate de bipotassium (K_2HPO_4) sont fournis par Acros.

Les solutions électrolytiques sont préparées à partir d'une solution tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ de pH 7. Celle-ci est obtenue par dissolution de phosphate de potassium mono- et disodique dans de l'eau distillée.

Avant chaque mesure, les solutions sont désaérées par barbotage d'azote pendant 10 minutes. Durant l'expérience, un flux d'azote est maintenu à la surface de la solution.

II.3.1.2. Appareillage

L'ensemble des mesures électrochimiques utilise un potentiostat μ Autolab type III (Metrohm) piloté par le logiciel GPES. Le montage potentiostatique comprend une grille de platine comme contre-électrode et une électrode de référence au calomel saturée $Hg/Hg_2Cl_2/KCl_{sat}$ (ECS) connectée à la cellule par l'intermédiaire d'un capillaire de Luggin. Tous les potentiels sont exprimés par rapport à cette électrode de référence. Les électrodes de travail sont réalisées selon la procédure décrite par S. Menolasina^[134] à partir de fils d'or de 50 μ m de diamètre, fournis par la société Goodfellow. Les fils d'or sont rincés avec de l'eau ultrapure et

séchés dans un four pendant 30 min. Chaque fil d'or est ensuite soudé à un fil de nickel et introduit dans une pipette jusqu'à ce que le fil d'or dépasse du bout de pipette d'au moins 2 millimètres. La résine époxyde est alors introduite dans la pipette. On laisse la résine durcir à la température ambiante pendant 24 heures. Le bout de la pipette est ensuite sectionné de façon à obtenir une microélectrode disque plan. L'ultramicroélectrode est polie avec différentes catégories de papiers abrasifs. Elles sont finalement rincées et passées aux ultrasons pendant quelques secondes pour enlever d'éventuelles impuretés.

Une fois élaborées, les microélectrodes d'or subissent un traitement préalable qui consiste d'abord en un polissage à l'aide d'un papier abrasif (262x imperial lapping film sheet). Après rinçage à l'eau distillée, une activation électrochimique est ensuite réalisée par voltammétrie cyclique à la vitesse de 500 mV.s^{-1} dans une solution de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ entre $-0,3 \text{ V}$ et $+1,5 \text{ V}$ pendant le temps nécessaire à l'obtention de courbes intensité-potentiel reproductibles et présentant une allure caractéristique de l'or dans cet acide^[135] (figure II.3).

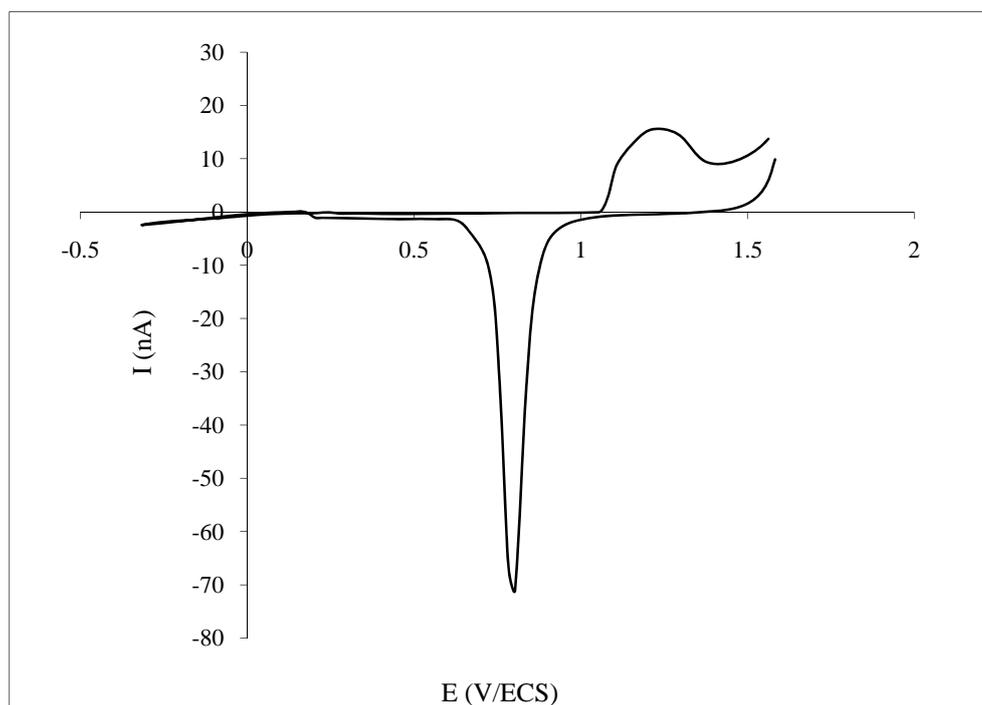


Figure II.3. Voltammogramme cyclique d'une microélectrode d'or de $50 \mu\text{m}$ de diamètre dans une solution d'acide sulfurique $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage des potentiels 500 mV.s^{-1} .

La surface électrochimiquement active de chaque électrode est ensuite déterminée par voltammétrie linéaire à l'état stationnaire à partir de la courbe de réduction tracée dans une solution désaérée tamponnée d'hexacyanoferrate (III) de potassium à 5 mmol.L^{-1} (figure II.4).

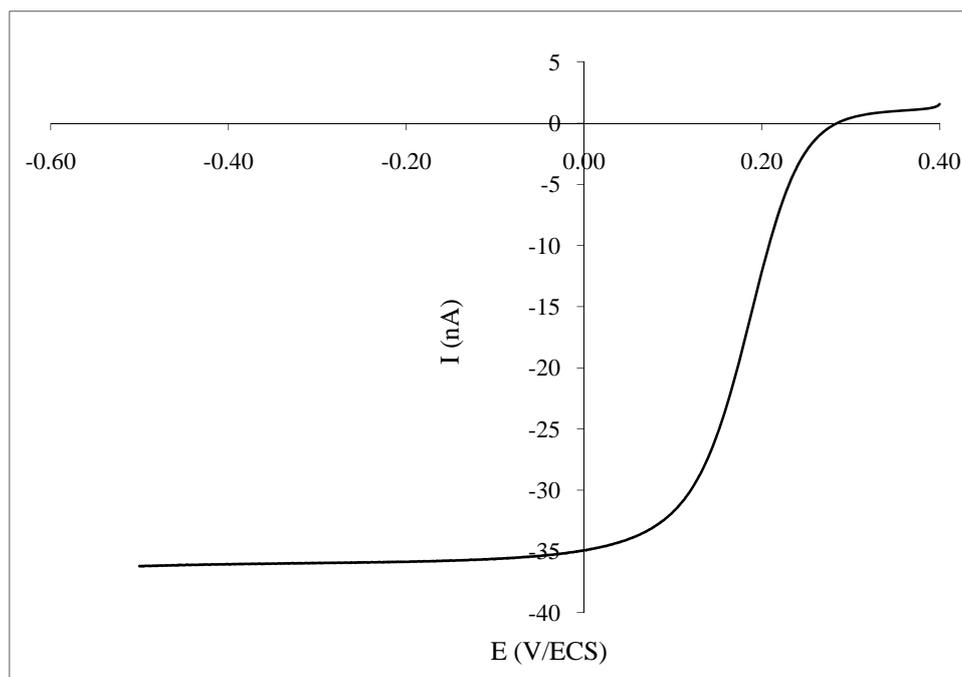


Figure II.4. Voltammogramme linéaire tracé avec une microélectrode d'or dans une solution tamponnée désaérée d'hexacyanoferrate (III) 5 mmol.L^{-1} de pH7. Vitesse de balayage des potentiels 6 mV.s^{-1} .

Avec une ultramicroélectrode, l'obtention d'un état stationnaire est rapide, même sans agitation de la solution. Le rayon de l'électrode est déterminé à l'aide de l'intensité limite correspondant au palier de diffusion (équation I.41). En prenant pour coefficient de diffusion de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ la valeur de $7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ [136], le rayon est estimé à $24 \mu\text{m} \pm 2\mu\text{m}$.

II.3.2. Elaboration des microélectrodes fonctionnalisées par électropolymérisation de 3,4-éthylènedioxythiophène

Le PEDOT est déposé selon la procédure décrite par Kumar et al [14]. Après un prétraitement de la microélectrode dans une solution désaérée d'acétonitrile contenant TBAPC $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ entre $-0,88 \text{ V}$ et $+1,5 \text{ V}$ à une vitesse de 10 mV.s^{-1} pendant 10 minutes, la polymérisation du monomère EDOT est effectuée par voltammétrie cyclique. La figure II.5 montre un exemple de courbes obtenues en faisant varier les potentiels entre $-0,6 \text{ V}$ et $1,5 \text{ V}$ à la vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} dans la solution précédente et dans laquelle le monomère est introduit à la concentration de 10 mmol.L^{-1} . Lors du premier cycle, le monomère commence à s'oxyder à 1 V . Au balayage retour, un croisement des courbes est observé à $1,2 \text{ V}$. Par analogie au dépôt métallique, Downard et Pletcher considèrent ce croisement comme un indice de nucléation [128]. Lors des cycles qui suivent, l'oxydation a lieu à un potentiel de plus en plus

cathodique. Ceci est expliqué par le fait que les oligomères déjà formés s'oxydent à un potentiel inférieur à celui du monomère ^[95]. Les voltammogrammes révèlent en outre un système quasi réversible aux alentours de -0,3 V relatif à l'activité redox du polymère. L'augmentation de l'intensité de courant au cours des cycles est une preuve de la croissance d'un film de polymère conducteur à la surface de l'électrode. L'épaisseur de film déposé peut ainsi être contrôlée par le nombre de cycles de potentiel lors de l'électropolymérisation. Après la fonctionnalisation de surface, les électrodes sont d'abord rincées à l'acétonitrile pour éliminer les oligomères encore présents dans la matrice du polymère, puis à l'eau distillée. L'électrode est désignée dans le reste de l'étude $\mu\text{Au-PEDOT}$.

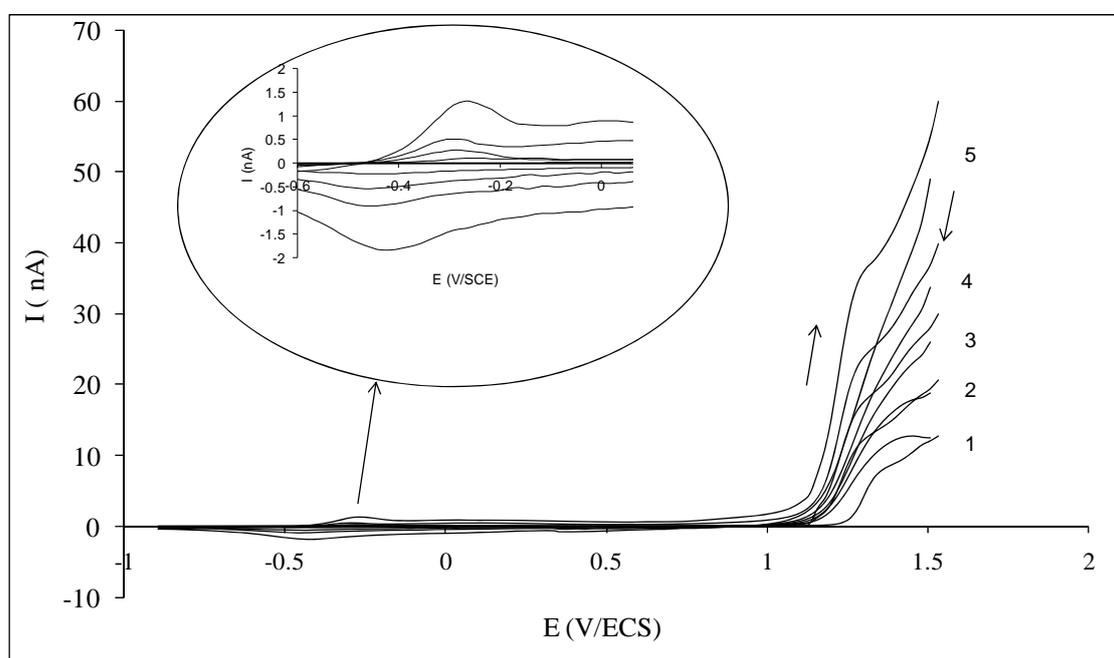


Figure II.5. Voltammogrammes cycliques successifs d'électropolymérisation obtenus avec une microélectrode d'or dans une solution désaérée d'acétonitrile contenant TBAPC à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et EDOT à 10 mmol.L^{-1} . Vitesse de balayage des potentiels : 100 mV.s^{-1} .

A l'issue de l'étape d'électropolymérisation, une série de voltammogrammes cycliques est tracée avec l'électrode modifiée dans une solution de tampon phosphate, entre -0,2 et 0,6 V à une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} (figure II.6). Cette manipulation permet de vérifier le comportement électrochimique de l'électrode modifiée dans la fenêtre de potentiel d'analyse des deux antioxydants et d'enregistrer le courant résiduel lorsque les voltammogrammes deviennent reproductibles. Pour une exploitation plus juste des résultats, ce courant est

systématiquement soustrait de l'ensemble des courbes expérimentales d'oxydation des deux acides obtenues par la suite.

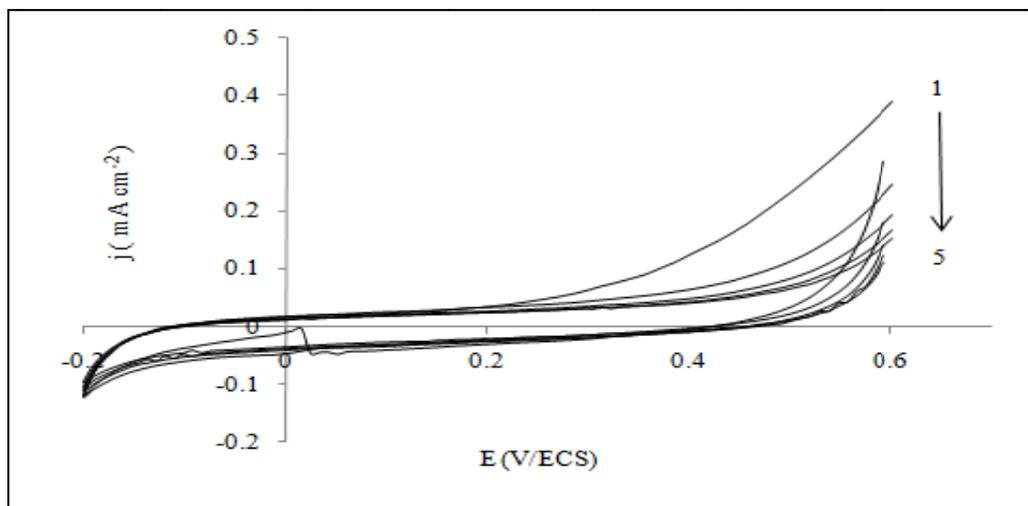


Figure II.6. Voltammogrammes cycliques successifs obtenus avec une $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution désaérée de tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de pH7. Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

II.3.3. Détection électrochimique des acides ascorbique et urique

II.3.3.1. Cinétique électrochimique des deux acides ascorbique et urique

La figure II.7 présente les voltammogrammes cycliques obtenus avec une microélectrode d'or plongée dans une solution tamponnée de phosphate $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ de pH7 contenant de l'acide ascorbique à 1 mmol.L^{-1} . Sur une microélectrode nue, une vague anodique correspondant à l'oxydation de l'acide ascorbique est observée à partir de $0,2 \text{ V}$ avec un potentiel de demi-vague de $0,35 \text{ V}$. Aucun signal n'est observé au balayage retour, confirmant que le système est irréversible. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques^[137]. La densité de courant limite mesurée au potentiel de $0,5 \text{ V}$ est égale à $0,085 \text{ mA.cm}^{-2}$. Sur $\mu\text{Au-PEDOT}$, la vague anodique est observée vers $-0,087 \text{ V}$, soit un déplacement de $0,28 \text{ V}$ vers les potentiels cathodiques par rapport à l'électrode non modifiée. La densité de courant limite mesurée sur le palier de diffusion est 2 fois plus importante ($0,2 \text{ mA.cm}^{-2}$). Ces deux observations témoignent d'un processus d'oxydation catalytique de l'acide ascorbique sur l'électrode modifiée.

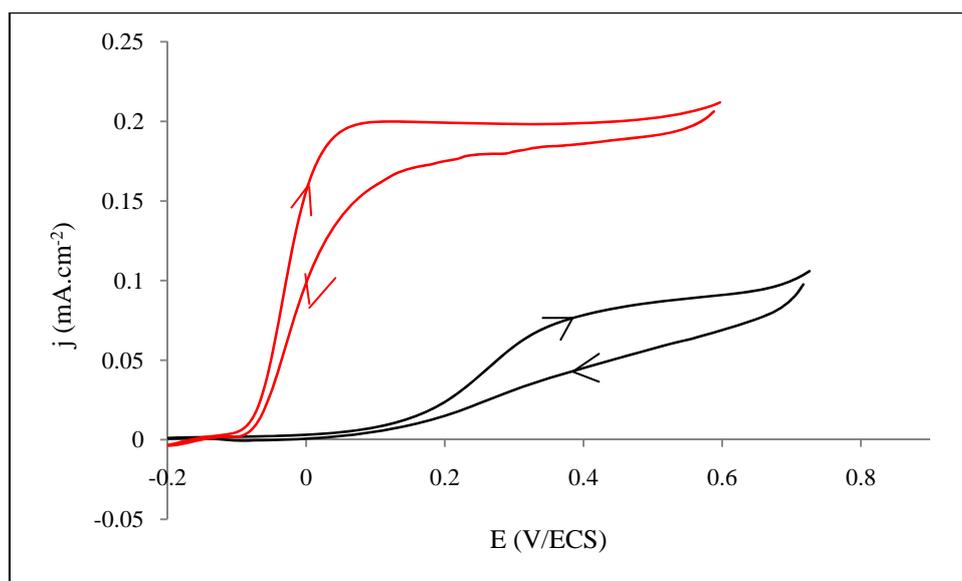


Figure II.7. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide ascorbique à 1 mmol.L^{-1} sur μAu (courbe noire) et sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ (courbe rouge). Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

Il faut remarquer que l'état stationnaire est obtenu sur les deux types d'interface (modifiée ou non), ce qui montre que la modification par PEDOT n'a pas changé les caractéristiques de la microélectrode et que la réaction d'oxydation d'acide ascorbique est toujours limitée par la diffusion de l'espèce.

Des expériences analogues ont été menées avec une solution d'acide urique 1 mmol.L^{-1} . La figure II.8 montre les voltammogrammes cycliques obtenus. En accord avec des travaux antérieurs^[137], l'oxydation de l'acide urique sur une microélectrode d'or est irréversible avec un potentiel de demi-vague estimé à $0,46 \text{ V}$ à pH7 et une densité de courant limite, mesurée à $0,6 \text{ V}$ égale à $0,088 \text{ mA.cm}^{-2}$. Sur l'électrode modifiée, des améliorations semblables à celles obtenues pour l'acide ascorbique sont observées. Le pic d'oxydation apparaît à $0,33 \text{ V}$ avec une densité de courant 3 fois plus importante. Lors du cycle retour, un pic cathodique est observé vers $0,286 \text{ V}$. Ce résultat montre que le système d'oxydation de l'acide urique sur l'électrode modifiée est quasi-réversible.

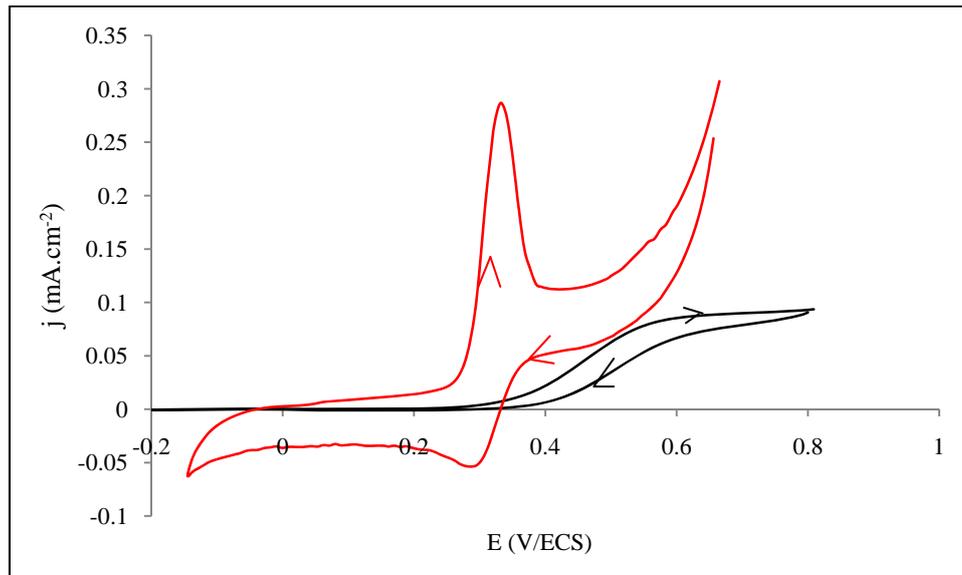


Figure II.8. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide urique à 1 mmol.L^{-1} sur μAu (courbe noire) et sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ (courbe rouge). Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

L'importante réduction des surtensions d'oxydation des acides ascorbique et urique ainsi que l'amplification des signaux électriques résultent d'un mécanisme catalytique impliquant un médiateur (polymère) redox ^[138].

Le processus redox du film de PEDOT illustré dans la figure II.5 s'écrit :

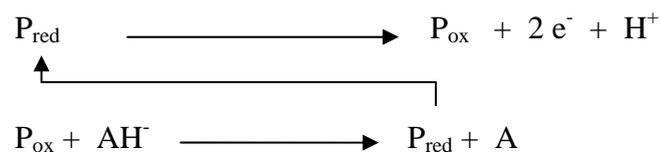


Au pH physiologique (7,4) les acides ascorbique et urique sont sous leur forme anionique $C_6H_7O_6^{-}$ et $C_5N_4O_3H_3^{-}$:

Pour l'acide ascorbique :



Le mécanisme catalytique s'écrit donc :



Cet effet catalytique est amplifié par les affinités électrostatiques et hydrophobes entre les deux anions et les groupements fonctionnels du PEDOT. Selon Martin et Lyons ^[139,140], la surface de polymère est constituée d'une distribution de charges positive et négative, les anions étant attirés électrostatiquement par les charges positives du polymère. D'autre part, Schöp et Kößmehl ^[141] reportent que les formes réduites du polymère sont hydrophobes. L'acide urique, considéré plus hydrophobe ($pK_A= 5,4$), est concentré à la surface du PEDOT grâce aux interactions hydrophobes. Ces interactions expliquent l'amplification du signal ampérométrique des acides ascorbique et urique sur l'électrode modifiée.

II.3.3.2. Oxydation simultanée des acides ascorbique et urique

L'objectif final du travail étant de proposer un capteur pour le dosage simultané des deux acides, des expériences ont été menées avec des solutions contenant le mélange des deux espèces. La figure II.9 présente les voltammogrammes cycliques obtenus avec une solution de tampon phosphate pH 7 contenant les ions ascorbate et urate à la concentration de 1 mmol.L⁻¹. Sur l'électrode non modifiée, la courbe intensité-potentielle montre une première vague peu marquée vers 0,4 V relative à l'oxydation irréversible de l'acide ascorbique, suivie de celle de l'acide urique vers 0,6 V. Les deux signaux anodiques sont trop proches l'un de l'autre, entraînant un chevauchement des deux vagues. Ce comportement confirme les résultats précédents mettant en évidence l'impossibilité de la mesure simultanée des deux antioxydants sur des matériaux conventionnels nus ^[1].

Sur l'électrode modifiée par le PEDOT, le voltammogramme enregistré est en accord avec ceux déjà obtenus lors de l'oxydation des deux acides pris séparément. Les acides ascorbique et urique commencent à s'oxyder à -0,08 et 0,25 V respectivement, avec des densités de courant 2 et 3 fois plus importantes que celles enregistrées sur l'électrode non modifiée. Les deux signaux anodiques sont séparés de presque 0,3 V, rendant la mesure simultanée des deux antioxydants plus sélective et éliminant tous risques d'interférences lors de la détection dans des milieux réels.

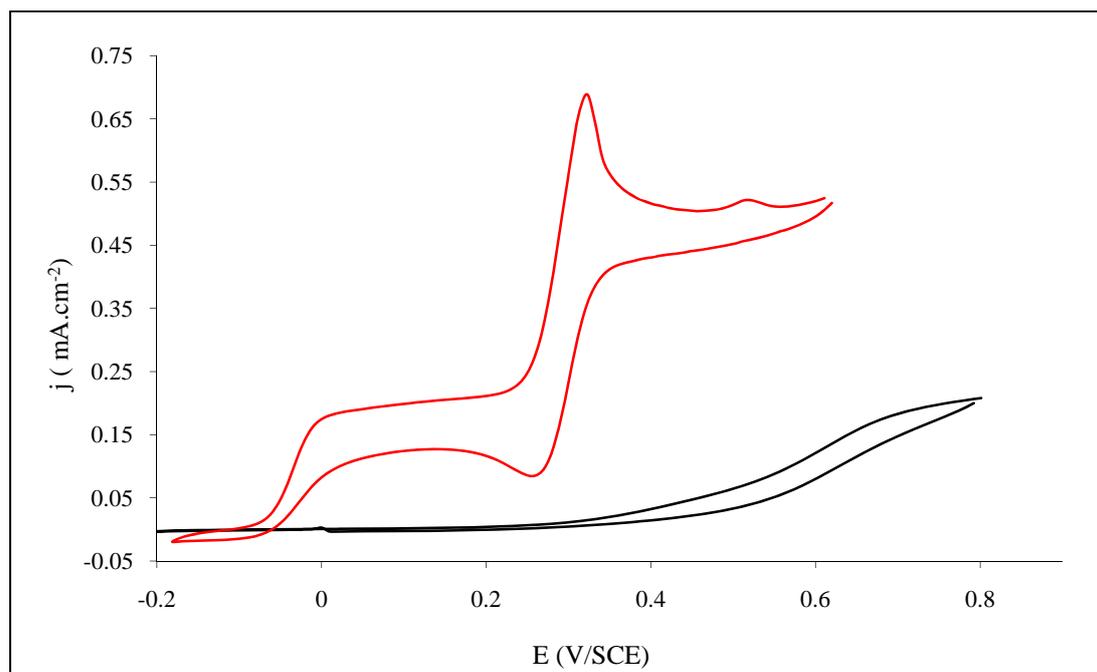


Figure II.9. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L^{-1} sur μAu (courbe noire) et sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ (courbe rouge). Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

II.3.3.3. Effet de la vitesse de balayage des potentiels

L'influence de la vitesse de balayage des potentiels adoptée au cours de la mesure électrochimique sur l'intensité d'oxydation apporte des informations sur les phénomènes impliqués lors de la réaction à l'électrode. La figure II.10 montre les voltammogrammes cycliques obtenus avec l'électrode modifiée dans une solution de tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de pH 7 contenant les acides ascorbique (figure II.10.a) et urique (figure II.10.b) à 1 mmol.L^{-1} pour des vitesses de balayage des potentiels comprises entre 1 et 200 mV.s^{-1} . L'évolution de la densité de courant est représentée sur la figure II.11.

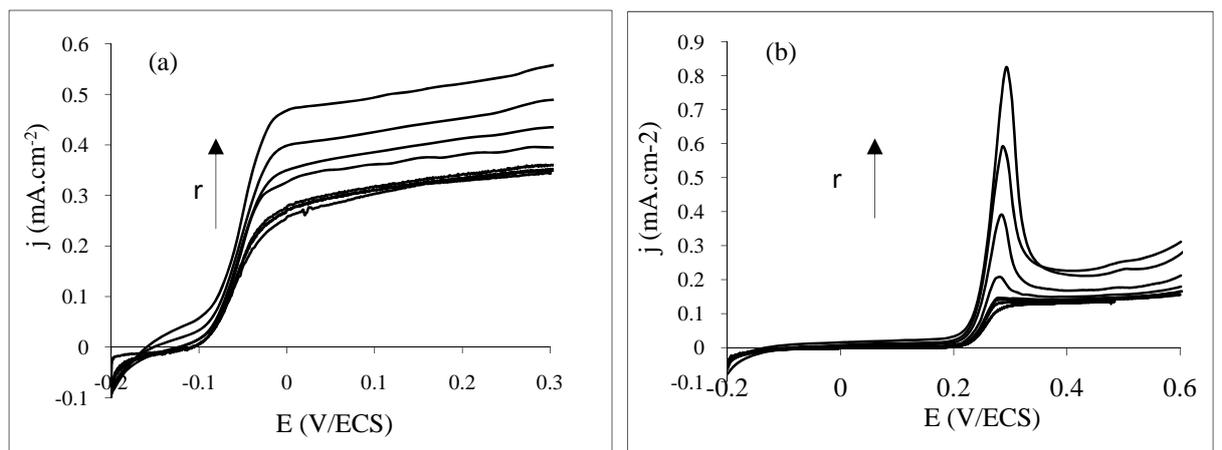


Figure II.10. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution tamponnée de phosphate 0,1 mol.L⁻¹ pH 7 contenant les acides ascorbique (a) et urique (b) à 1 mmol.L⁻¹ sur μ Au-PEDOT. Vitesse de balayage des potentiels : 1, 5, 25, 50, 100 et 200 mV.s⁻¹.

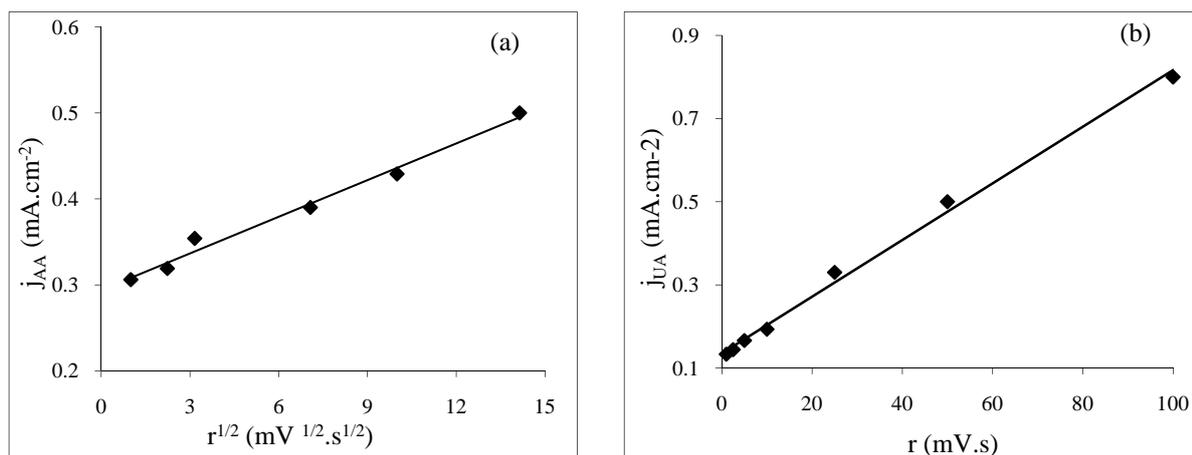


Figure II.11. Evolution de la densité de courant d'oxydation des acides ascorbique (a) et de l'acide urique (b) avec la vitesse de balayage des potentiels.

La densité de courant est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage pour l'acide ascorbique, alors qu'elle augmente linéairement avec la vitesse de balayage pour l'acide urique. Comme exposé dans le chapitre I, ces résultats indiquent que la vitesse de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique à l'électrode est contrôlée par la diffusion tandis que celle de l'acide urique est limitée par un phénomène d'adsorption. Ceci est en accord avec l'allure des voltammogrammes cycliques obtenus avec l'électrode modifiée figures (II.7 et II.8).

II.3.3.4. Utilisation de méthodes électrochimiques impulsionnelles :

Dans les milieux réels, les acides ascorbique et urique peuvent exister à des teneurs très faibles qui ne peuvent pas être atteintes par des méthodes voltammétriques à balayage linéaire des potentiels. Pour satisfaire les exigences de mesure, des méthodes électrochimiques impulsionnelles sont utilisées, connues pour abaisser les limites de détection et améliorer la sensibilité des mesures. Une première méthode concerne la voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV) avec une amplitude d'impulsion de 50 mV, un pas de potentiel de 6 mV, un temps d'impulsion de 119 ms, un temps d'intervalle 1ms et une vitesse de balayage de 6 mV.s⁻¹. Ces paramètres ont été optimisés par Bello et al ^[15], pour la détection de l'acide ascorbique sur une électrode de platine modifiée par le PEDOT.

La figure II.12 montre les voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus dans des solutions tamponnées de pH 7 contenant le mélange des deux acides ascorbique et urique à 1mmol.L⁻¹. Le même comportement catalytique est observé ; deux pics anodiques distincts à -0,051 et 0,24 V sont obtenus avec l'électrode modifiée, avec des densités de courant de pic égales à 0,23 et 0,62 mA.cm⁻² respectivement. Ces valeurs sont plus importantes que celles récupérées en voltammétrie cyclique (notamment pour l'oxydation de l'acide urique), et la DPV est choisie comme méthode électrochimique de détection pour la suite de l'étude.

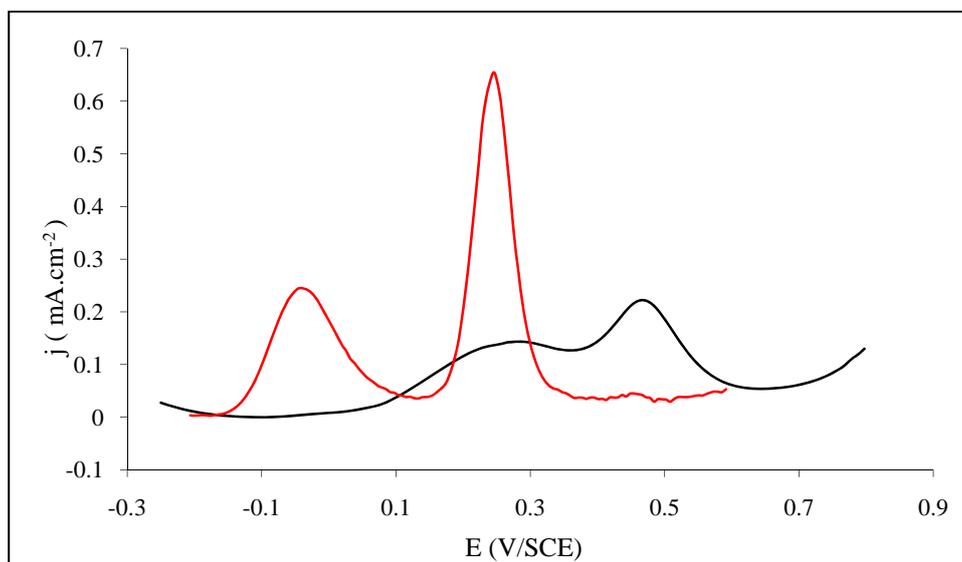


Figure II.12. Voltammogrammes impulsionnels obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L⁻¹ sur μ Au (courbe noire) et sur μ Au-PEDOT (courbe rouge).

II.3.4. Effet de l'épaisseur de la couche de PEDOT déposée

Afin d'optimiser les performances analytiques obtenues avec l'électrode modifiée, l'effet de l'épaisseur du film de PEDOT sur l'oxydation des acides ascorbique et urique a été étudié. Dans le cas d'un polymère élaboré par voltammétrie cyclique, l'épaisseur de la couche peut être contrôlée, soit par le nombre de cycles de potentiel, soit par la densité de charge de polymérisation enregistrée au cours de l'électrolyse. Avec des électrodes de travail fabriquées manuellement, il est difficile d'obtenir des surfaces actives identiques. Aussi, Il est plus facile de contrôler le dépôt de polymère à partir de la mesure de la densité de charge anodique consommée lors de l'électropolymérisation.

Une série d'électrodes modifiées a été élaborée par voltammétrie cyclique dans une solution d'acétonitrile contenant TBAPC $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et le EDOT à 10 mmol.L^{-1} et en faisant varier la quantité de charge d'électropolymérisation entre 0 et 34 mC.cm^{-2} . Pour chacune d'entre elles, un voltammogramme impulsionnel différentiel a ensuite été tracé dans une solution de tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH7 contenant l'acide ascorbique ou l'acide urique à 1 mmol.L^{-1} . Les figures II.13 et II.14 présentent l'évolution du potentiel et de la densité de courant du pic d'oxydation des deux espèces en fonction de l'épaisseur de la couche de PEDOT.

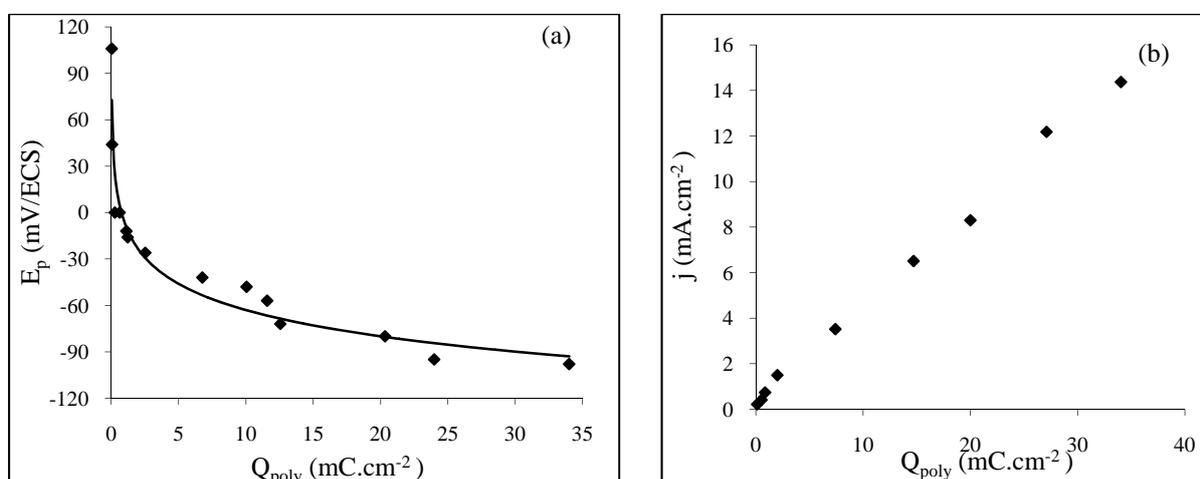


Figure II.13. Evolution du potentiel (a) et de la densité de courant (b) du pic d'oxydation de l'acide ascorbique 1 mmol.L^{-1} pH7 en fonction de la densité de charge d'électropolymérisation du PEDOT.

On note que le pouvoir catalytique du PEDOT vis-à-vis de l'oxydation de l'acide ascorbique prend effet dès les plus faibles quantités de polymère déposé. La réduction la plus importante du potentiel d'oxydation est enregistrée pour une quantité de charge inférieure à 2 mC.cm^{-2} (figure II.13.a). Elle s'accompagne d'une augmentation sensible de la réponse ampérométrique (figure II.13b). En revanche, pour des densités de charge supérieures à 12 mC.cm^{-2} , l'effet de l'épaisseur est beaucoup moins sensible. Toutefois, on observe toujours une augmentation quasi linéaire de la densité de courant d'oxydation. Une évolution similaire est observée pour l'oxydation de l'acide urique (figure II.14).

La réduction de la surtension d'oxydation et l'amplification du signal électrique témoignent d'un transfert électronique hétérogène plus rapide et d'une surface active plus importante. Il est étonnant de constater que l'effet des quantités de polymères ou d'espèces redox déposés à la surface des matériaux sur les performances analytiques des capteurs n'a été que rarement abordé. Seuls les travaux de Henstridge et al ^[142] ont montré des résultats similaires pour l'oxydation de la dopamine sur l'électrode en carbone vitreux modifiée par des nanotubes de carbone. Selon eux, la réduction de la surtension d'oxydation de la dopamine est liée au changement de la géométrie de l'électrode qui implique une modification du mode de transport de matière d'une diffusion plane semi-infinie sur l'électrode nue à une diffusion au cœur d'une structure en couche fine pour l'électrode modifiée par les nanotubes de carbone.

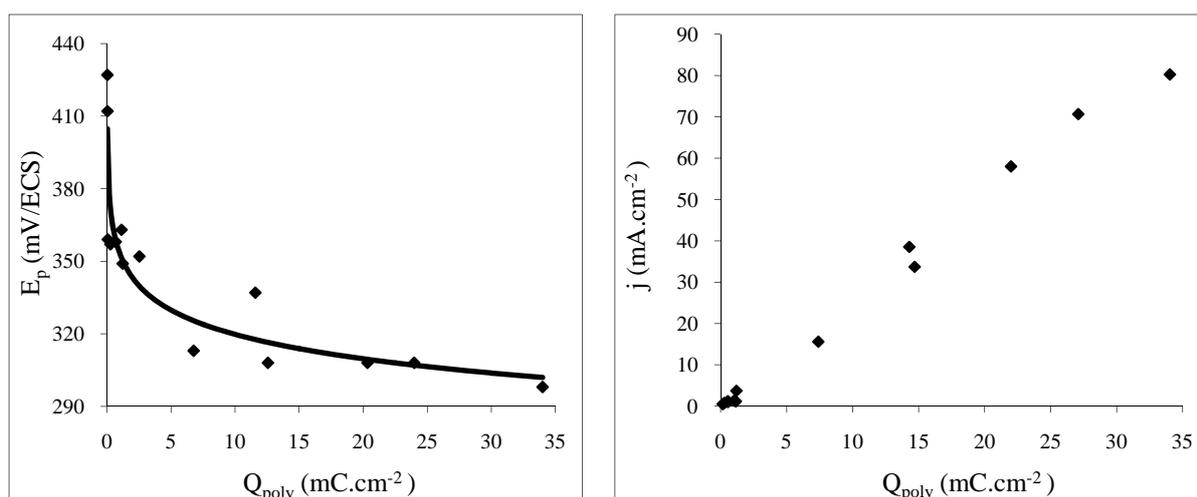


Figure II.14. Evolution du potentiel (a) et de la densité de courant (b) du pic d'oxydation de l'acide urique 1 mmol.L^{-1} pH7 en fonction de la densité de charge d'électropolymérisation du PEDOT.

Dans le tableau II.4 sont rapportés les potentiels des pics d'oxydation des acides ascorbique et urique ainsi que l'écart entre les deux potentiels en fonction de la densité de charge d'électropolymérisation. La séparation entre les deux pics est un critère très important pour la résolution des problèmes d'interférences ; plus elle est importante, meilleure est la sélectivité de la mesure. Les résultats montrent que la séparation entre les deux pics est d'autant plus grande que la quantité de PEDOT déposé est élevée. Toutefois, l'écart entre les deux potentiels est principalement marqué dès que la densité de charge d'électropolymérisation atteint $0,2 \text{ mC.cm}^{-2}$, c'est-à-dire dès les premières couches de polymère. A partir de $6,7 \text{ mC.cm}^{-2}$, l'écart se stabilise et, au-delà de 12 mC.cm^{-2} , le potentiel d'oxydation de l'acide urique ne varie plus. Dans la suite de l'étude, la valeur de 12 mC.cm^{-2} est choisie comme la quantité de charge d'électropolymérisation optimale.

$Q / \text{mC.cm}^{-2}$	$E_p \text{ AA} / \text{mV}$	$E_p \text{ AU} / \text{mV}$	$\Delta E_p / \text{mV}$
0	263	475	212
0.2	20	357	337
0.6	0	347	347
1.2	-16	349	365
2.5	-26	352	378
6.7	-42	338	380
10	-48	322	370
12	-72	308	380
20	-80	308	388
23	-93	308	401
34	-95	308	403

Tableau II.4. Influence de la densité de charge d'électropolymérisation du PEDOT sur le potentiel d'oxydation des acides ascorbique ($E_p \text{ AA}$) et urique ($E_p \text{ AU}$) et sur leur écart (ΔE_p).

II.3.5. Etude de quelques paramètres de dépôt :

Outre l'épaisseur du polymère, d'autres paramètres de dépôt peuvent avoir une influence sur les performances analytiques du microcapteur voltammétrique, notamment au niveau de la sélectivité et de la sensibilité. L'étude qui suit montre l'effet de la concentration du monomère ainsi que du domaine et de la vitesse de balayage des potentiels au cours de l'électropolymérisation.

II.3.5.1. La concentration du monomère EDOT

La bibliographie montre que la conductivité électrique des polymères conducteurs dépend des conditions opératoires de synthèse, notamment la concentration du monomère [86,87]. Afin d'évaluer l'influence de ce paramètre sur les performances du capteur, plusieurs électrodes modifiées ont été élaborées à partir de solutions d'acétonitrile contenant des concentrations en monomère comprises entre 2,5 et 20 mmol.L⁻¹. Les autres paramètres d'électropolymérisation sont inchangés (voir paragraphe II.3.2). Les électrodes modifiées sont testées pour l'oxydation du mélange (acides ascorbique et urique à 1 mmol.L⁻¹ de pH 7).

La figure II.15 rassemble les voltammogrammes impulsionnels obtenus avec un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L⁻¹ à pH 7. Quelle que soit la concentration du monomère, la sélectivité n'est pas modifiée, l'écart entre les potentiels d'oxydation des deux espèces étant globalement constant. En revanche, les réponses ampérométriques les plus fortes sont obtenues avec les films de polymères synthétisés dans les solutions les plus faiblement concentrées en monomère. En effet, les densités de courant d'oxydation des acides ascorbique et urique augmentent d'un facteur 2 et 5 respectivement lorsque la concentration en monomère chute de 20 mmol.L⁻¹ à 2,5 mmol.L⁻¹.

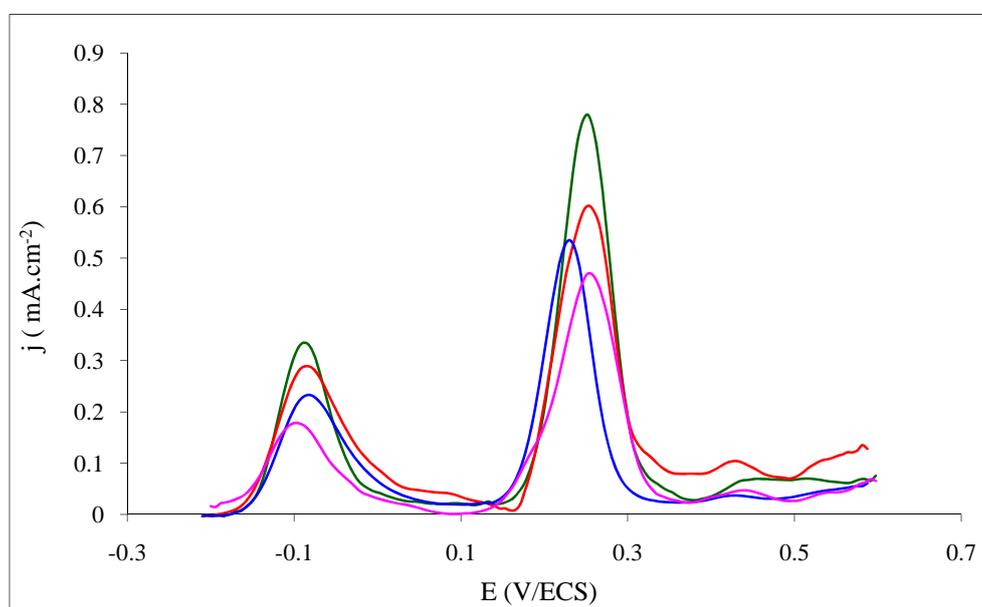


Figure II.15. Voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L⁻¹ sur différentes microélectrodes d'or modifiées par des films de PEDOT électropolymérisés à partir des solutions d'EDOT à 2,5 (vert), 5 (rouge), 10 (bleu) et 20 mmol.L⁻¹ (rose).

Ce résultat peut être expliqué par les données bibliographiques ^[86,87] qui indiquent qu'avec des solutions faiblement concentrées en monomère (3-méthylthiophène), les films de polythiophènes présentent une meilleure cohésion et des conductivités électriques plus élevées. La sensibilité la plus forte ayant été obtenue avec une concentration en monomère de 2.5 mmol.L^{-1} , c'est cette concentration qui est adoptée pour la suite des expériences.

II.3.5.2. La limite anodique de la fenêtre de potentiel d'électropolymérisation

Une autre série d'expériences a été menée en faisant varier la borne supérieure du domaine de potentiel utilisé pour l'électropolymérisation du PEDOT par voltammétrie cyclique. La limite cathodique est maintenue inchangée à $-0,88 \text{ V}$ alors que la limite anodique, initialement à $1,2 \text{ V}$, est augmentée progressivement jusqu'à 2 V . Les voltammogrammes d'oxydation des acides ascorbique et urique sur ces différentes électrodes sont reportés sur la figure II.16.

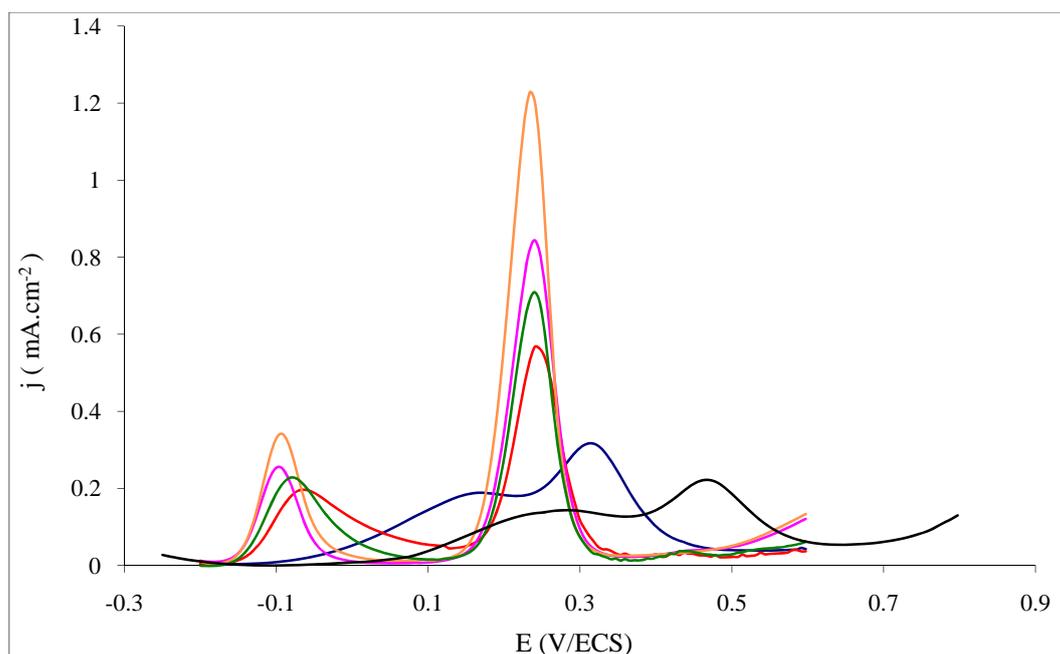


Figure II.16. Voltammogrammes impulsions différentiels obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L^{-1} sur μAu nue (courbe noire) et sur des microélectrodes modifiées par des films de PEDOT électropolymérisés dans des fenêtres de potentiels différentes : $[-0,88 - 1,2]$ (bleu) , $[-0,88 - 1,3]$ (rouge), $[-0,88 - 1,4]$ (rose), $[-0,88 - 1,5]$ (orange) et $[-0,88 - 2]$ V/ECS (vert).

Sur l'électrode modifiée entre -0,88 et 1,2 V (courbe bleue), la réponse électrochimique est similaire à celle obtenue sur l'électrode non modifiée, avec des densités de courant toutefois plus importantes. Pour autant, le déplacement des pics d'oxydation vers les potentiels cathodiques est peu important. L'augmentation de la borne supérieure de potentiel à 1,3 V (courbe rouge) permet de retrouver les performances analytiques apportées par le PEDOT : deux pics bien résolus et séparés apparaissent -0,069 et 0,240 mV.

A partir de 1,4 V, les surtensions d'oxydation des deux espèces atteignent leur valeurs minimales : deux pics sont enregistrés à -0,1 V pour l'acide ascorbique et à 0,23 V pour l'acide urique. Lorsque la limite anodique est repoussée jusqu'à 1,5 V, les densités de courant de pic d'oxydation des deux acides continuent à augmenter, notamment pour l'acide urique qui passe de 0,9 à 1,2 mA.cm⁻².

L'effet du potentiel maximal d'électropolymérisation du PEDOT a été étudié par Patra et al ^[89]. Les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage sont présentés à la figure II.17. Ils révèlent que la structure du PEDOT évolue d'une configuration sphérique compacte pour les faibles potentiels d'électrodépôt (figure II.17.a) vers une structure poreuse sous forme de fibres et fortement aérée (figures II.17.c et d) pour les potentiels plus élevés. L'hypothèse avancée pour expliquer les résultats présentés à la figure II.16 est qu'une structure poreuse favorise l'oxydation des deux acides car les sites actifs du polymère sont plus accessibles que dans le cas d'une structure compacte.

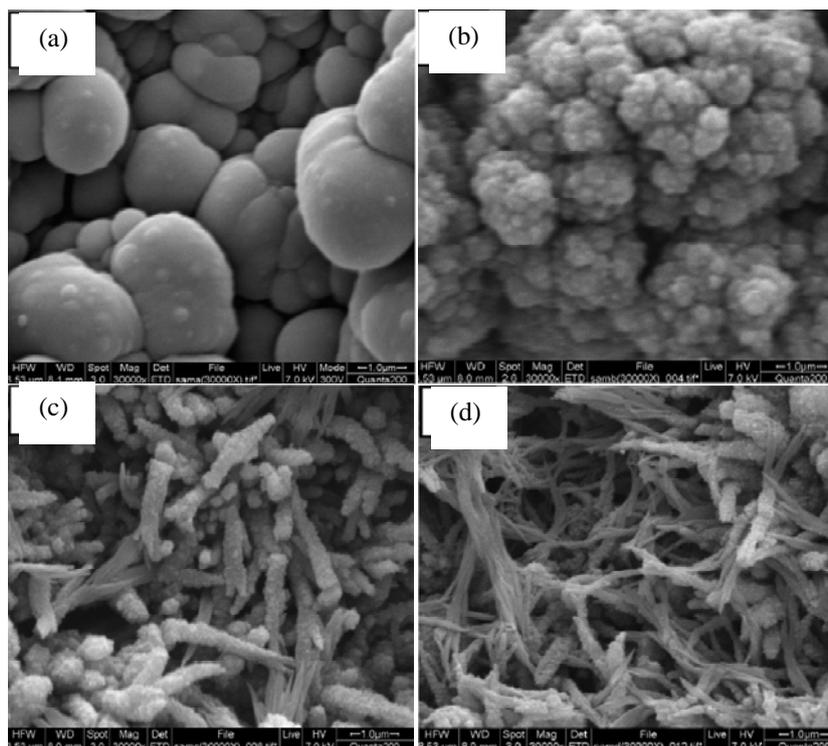


Figure II.17. Photos en microscopie électronique à balayage de films de PEDOT préparés par voltammétrie cyclique dans des domaines de potentiels différents : (a) [0-0,9], (b) [0-1], (c) [0-1,1], et (d) [0-1,2] V/ECS ^[89].

Lorsque l'électrode est portée à des potentiels plus élevés lors de l'électropolymérisation, un second pic est enregistré vers 1,6 V (figure II.18). Ce pic est relatif à la suroxydation du PEDOT ^[126]. Il est connu que la suroxydation des polymères conducteurs affecte irréversiblement leur conductivité électrique ^[143]. Par conséquent, la réponse ampérométrique enregistrée avec une telle électrode modifiée pour l'oxydation des deux acides chute sensiblement (figure II.16, courbe verte). Aussi, le potentiel de 1,5 V est retenu comme borne supérieure optimale d'électropolymérisation pour le reste de l'étude.

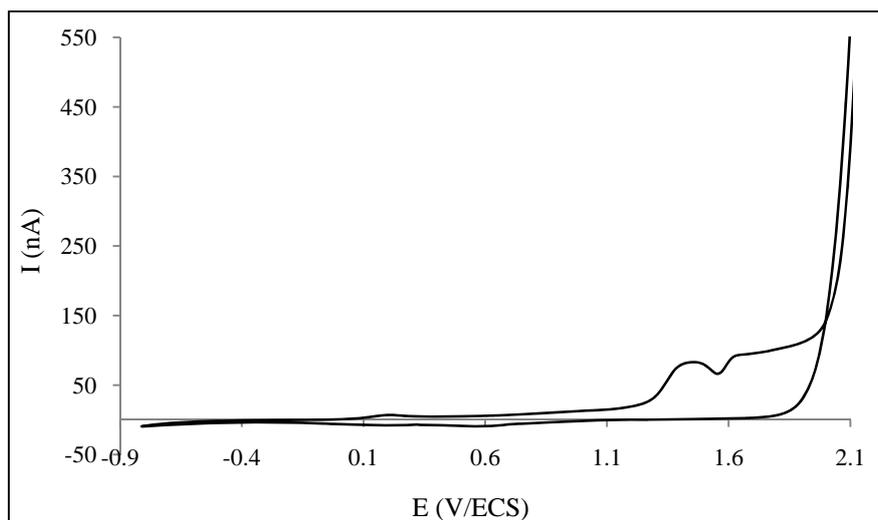


Figure II.18. Voltammogramme cyclique d'électropolymérisation obtenu avec une microélectrode d'or dans une solution désaérée d'acétonitrile contenant TBAPC à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et l'EDOT à $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Fenêtre de potentiel $-0,88$ et 2 V . Vitesse de balayage des potentiels : 250 mV.s^{-1} .

II.3.5.3. La vitesse de balayage des potentiels d'électropolymérisation

L'étude a été étendue à d'autres paramètres ayant une influence sur la structure et les propriétés catalytiques de PEDOT, notamment la vitesse de balayage utilisée lors de l'électropolymérisation. Plusieurs films de polymères ont été élaborés à la surface des microélectrodes avec les vitesses de balayage suivantes : 50 , 100 , 150 , 200 , 250 et 400 mV.s^{-1} .

La figure II.19 présente les voltammogrammes impulsionnels différentiels d'oxydation des deux acides sur les différentes électrodes. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la vitesse de balayage améliore les performances analytiques du microcapteur en termes de sélectivité et de sensibilité. Les travaux de Melato et al ^[92] montrent que les fortes vitesses de balayage de potentiel confèrent aux films de PEDOT des porosités plus importantes. Cette porosité amplifiée explique les résultats obtenus. En augmentant la vitesse de balayage de 250 à 400 mV.s^{-1} , l'amélioration de la sensibilité observée n'était pas très importante. Pour se placer dans des conditions expérimentales optimales pour la détection des acides ascorbique et urique, la vitesse de balayage de 250 mV.s^{-1} est choisie pour les études qui suivent.

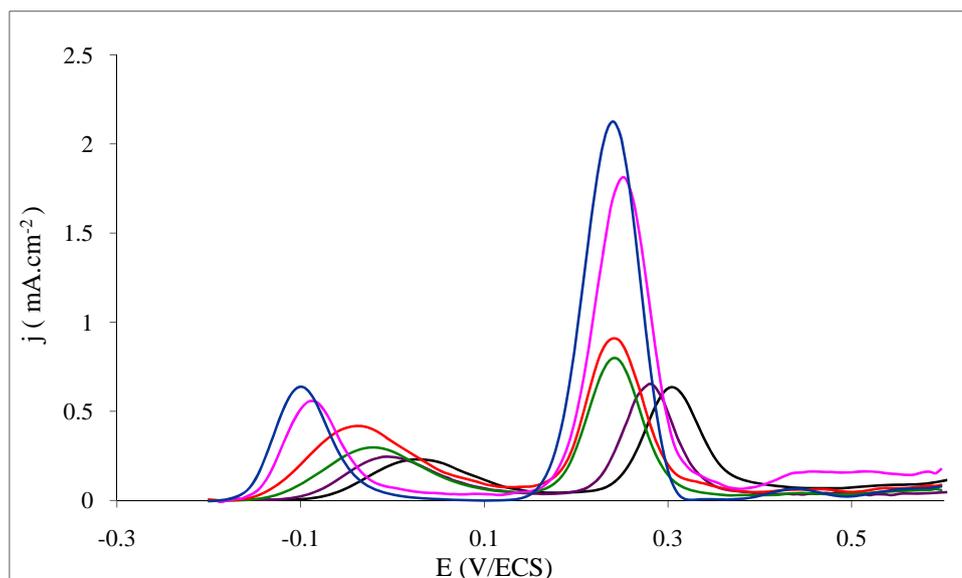


Figure II.19. Voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH7 contenant un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L^{-1} sur des microélectrodes d'or modifiées par PEDOT électropolymérisés à des vitesses de balayage différentes 50 (noir) ; 100 (violet) ; 150 (vert) ; 200 (rouge) ; 250 (rose) et 400 mV.s^{-1} (bleu).

II.3.6. Performances analytiques du capteur

II.3.6.1. Dosage individuel des acides ascorbique et urique

Une fois les paramètres d'électropolymérisation optimisés, les performances analytiques (sélectivité, sensibilité, domaine de linéarité et seuil de détection) et les caractéristiques métrologiques (répétabilité et reproductibilité) des microélectrodes d'or fonctionnalisées par des films de PEDOT électropolymérisés peuvent être déterminées. Rappelons que ces films sont obtenus par voltammétrie cyclique en balayant le potentiel entre $-0,88$ et $1,5 \text{ V}$ à une vitesse de balayage de 250 mV.s^{-1} , à partir d'une solution d'acétonitrile contenant TBAPC à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et le monomère à $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Les expériences sont réalisées dans des solutions modèles avant d'éprouver le capteur en milieu réel (chapitre III). Dans un premier temps, le dosage des deux espèces antioxydantes est effectué individuellement dans des gammes de concentrations comprises entre 10^{-5} et $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. La figure II.20 regroupe les voltammogrammes impulsionnels obtenus dans les deux cas.

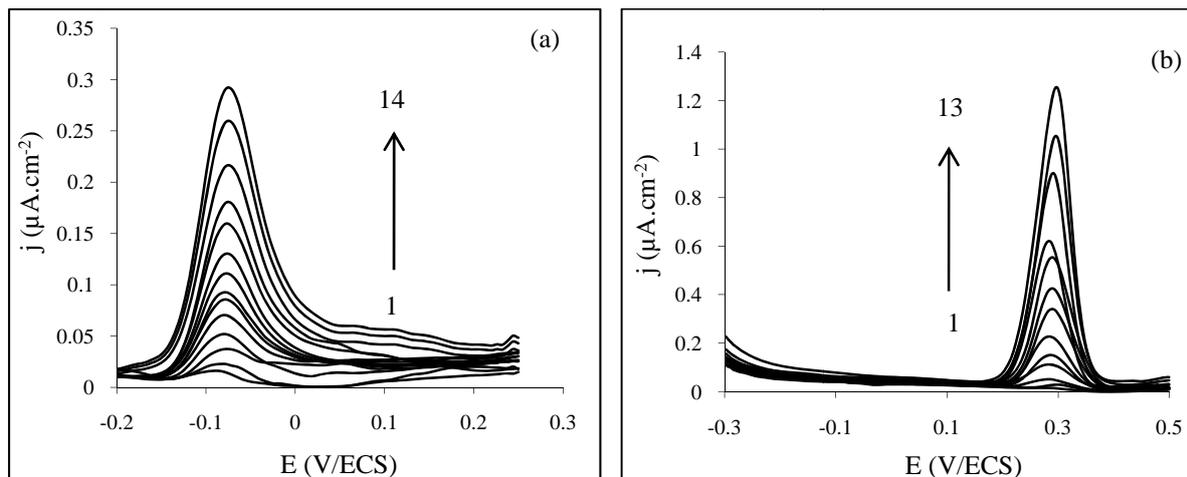


Figure II.20. Voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant des concentrations croissantes d'acide ascorbique (a) et d'acide urique (b) sur des $\mu\text{Au-PEDOT}$.

Après traitement de l'ensemble des courbes l'évolution de la densité de courant des deux pics est tracée en fonction de la concentration de chacun des deux acides. La figure II.21 présente les courbes d'étalonnage obtenues.

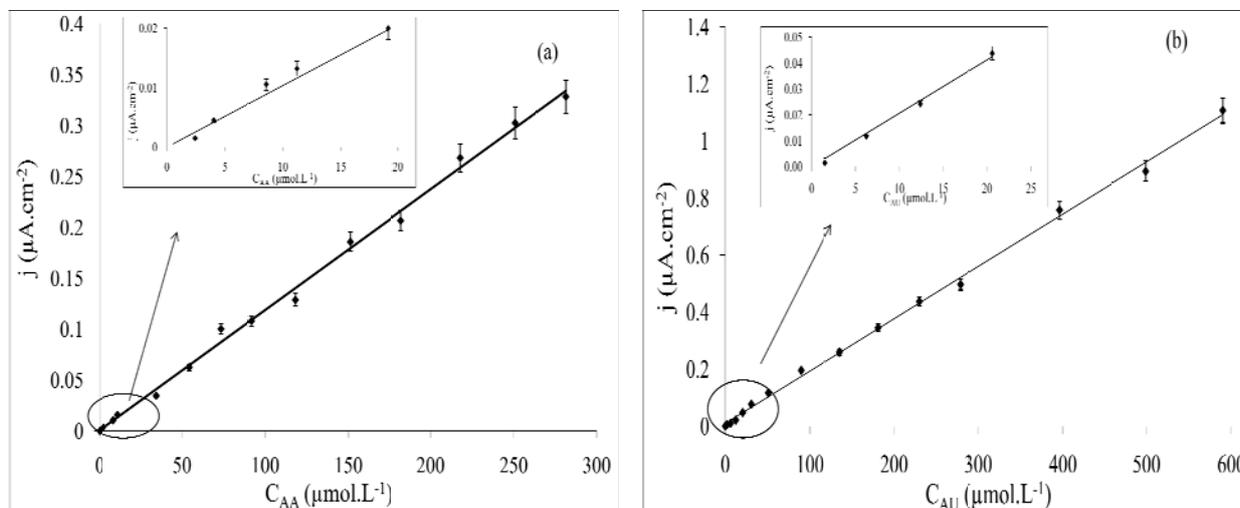


Figure II.21. Courbes d'étalonnage obtenues pour le dosage de l'acide ascorbique (a) et de l'acide urique (b) sur $\mu\text{Au-PEDOT}$. Evolution des densités de courant de pics d'oxydation des acide ascorbique (a) et urique (b) en fonction de leurs concentrations.

La sensibilité du microcapteur voltammétrique est égale à $0,875 \mu\text{A}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-2}$ pour l'acide ascorbique et à $3,06 \mu\text{A}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-2}$ pour l'acide urique. Les domaines de linéarité sont respectivement de $[5-300 \mu\text{mol}.\text{L}^{-1}]$ pour l'acide ascorbique et de $[2-600 \mu\text{mol}.\text{L}^{-1}]$ pour l'acide urique. Ces domaines incluent les domaines de concentrations physiologiques des

deux espèces dans le sérum sanguin, compris entre 34 et 79 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'acide ascorbique et entre 180-420 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'acide urique [161,162]. Les limites de détection sont respectivement égales à 2,5 et 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ces valeurs ont été obtenues pour un rapport signal/bruit égal à 3. Enfin, la répétabilité de la mesure a été évaluée à partir de trois essais. Les écarts-type sont de 1,1 et 1,4 % respectivement pour les acides ascorbique et urique.

Le tableau II.5 rassemble les performances analytiques du microcapteur issu de cette étude ainsi que celles des principaux travaux rencontrés dans la bibliographie pour le dosage de l'acide ascorbique et/ou de l'acide urique sur diverses électrodes modifiées. Les résultats obtenus ici présentent les meilleures performances en termes de réduction des surtensions d'oxydation des deux acides et de séparation des deux pics. Les sensibilités ($\mu\text{A}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-2}$), les limites de détection et les domaines de linéarité ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) sont quant à elles comparables à la plupart des travaux précédemment publiés.

Réf	E_p /mV		ΔE_p /mV	Sensibilité		Limite de détection		Domaine de linéarité	
	AA	AU		AA	AU	AA	AU	AA	AU
10	8	-	-	0.169	-	-	6	300-1500	-
20	6	330	324	7.12	24.88	7.6	0.6	10-250	2-50
23	-35	335	370	excès	6.76	-	1	-	1-20
24	13	376	363	0.283	84.35	5	0.2	30-400	0.06-10
25	-	252	-	-	0.078	-	0.17	-	3.3-96.3
35	5	300	295	excès	2.80	-	1	-	1-50
36	263	600	337	0.167	89.32	0.3	14	2-20	150-600
37	0	250	250	-	-	10	0.24	40-4000	0.5-75
38	120	380	260	0.382	0.741	-	1	-	1-300
39	-100	300	400	-	-	-	0.01	1-40	20-50
42	200	599	399	-	-	100	0.2	100-7000	0.2-60
51	100	350	250	-	-	-	-	-	-
Ce travail	-94	308	403	0.875	3.06	2.5	1.5	5-300	2-600

Tableau II.5. Performances analytiques de microcapteurs ampérométriques à surface modifiée pour le dosage de l'acide ascorbique et/ou urique.

II.3.6.2. Dosage simultané des deux acides ascorbique et urique

Pour simuler les analyses en milieux réels, le dosage simultané des deux acides a été effectué. La figure II.22 présente les voltammogrammes impulsionnels enregistrés avec des mélanges des deux acides à différentes concentrations.

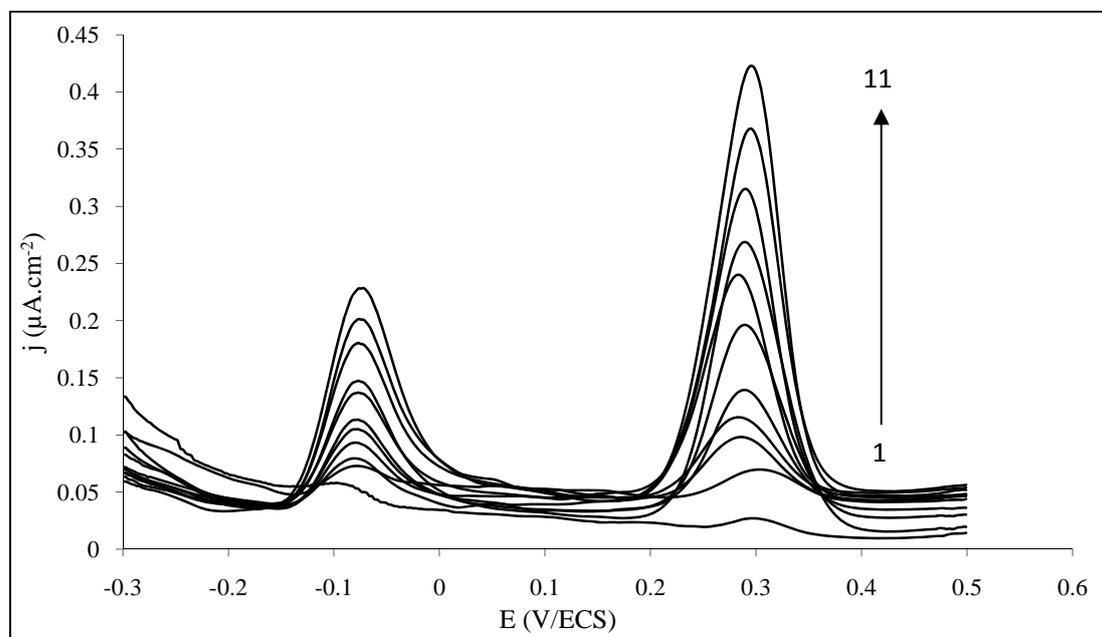


Figure II.22. Voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant des concentrations croissantes des acides ascorbique et urique sur $\mu\text{Au-PEDOT}$.

On obtient à nouveau des courbes aisément exploitables, avec des pics d'oxydation des deux espèces antioxydantes nettement séparés. Le traitement des données a toutefois montré qu'alors que la sensibilité du microcapteur vis-à-vis de l'acide ascorbique reste globalement inchangée, celle vis-à-vis de l'acide urique est sensiblement amplifiée en présence de l'acide ascorbique; elle passe en effet de $3,06$ à $4,05 \mu\text{A} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$, soit une augmentation de plus de 30%. Cette augmentation ne peut pas résulter d'un problème d'interférences étant donné la très bonne sélectivité de la mesure. Une autre explication est formulée par la suite, basée sur l'existence d'un mécanisme EC' et conduisant à la régénération de l'acide urique au voisinage de l'électrode.

II.3.7. Proposition d'un mécanisme EC' de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique :

La figure II.23 schématise le mécanisme envisagé lors du dosage simultané des acides ascorbique et urique sur l'électrode modifiée.

Ce mécanisme de régénération de l'acide urique est constitué d'une étape de transfert électronique E, au cours de laquelle la forme oxydée de l'acide urique est formée à l'électrode. Celle-ci est ensuite réduite par l'acide ascorbique lors d'une réaction chimique couplée C' qui régénère l'acide urique sous forme réduite au voisinage de l'électrode.

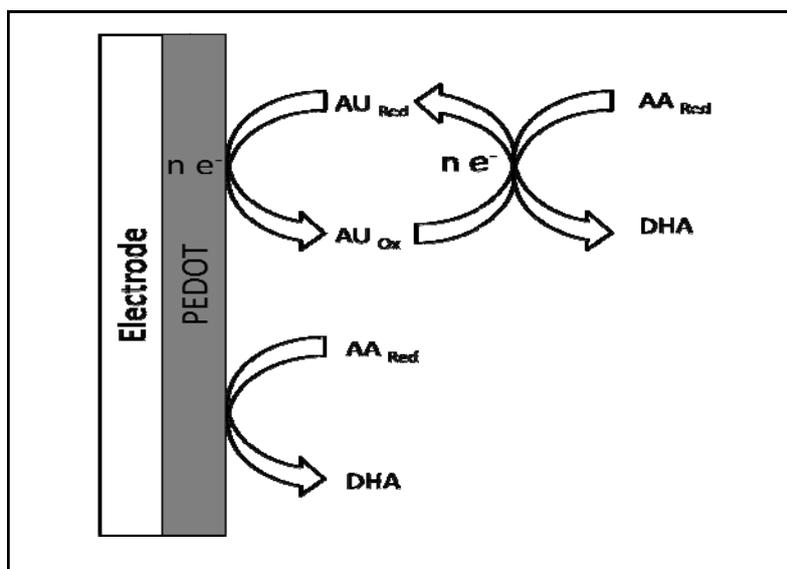


Figure II.23. Mécanisme EC' de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique sur μ Au-PEDOT.

La réaction chimique couplée est thermodynamiquement favorable puisque le potentiel standard apparent du couple redox (radical ascorbyl/ion ascorbate) à pH 7 est égal à 0,04 V et est donc inférieur à celui du couple allantoïne/urate, égal à 0,35 V.

Pour vérifier cette hypothèse, la démarche suivante est proposée :

1. évaluation de la sensibilité du capteur vis-à-vis de la détection de l'acide urique en absence et en présence d'un excès d'acide ascorbique
2. étude de l'évolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction du rapport de concentration C_{AA}/C_{AU} .
3. étude de la variation de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction du rapport de concentration C_{DHA}/C_{AU}

II.3.7.1. Dosage de l'acide urique en absence et en présence de l'acide ascorbique

Les résultats exposés au paragraphe II.3.6.2 ont montré une modification de la sensibilité du microcapteur voltammétrique en présence ou en absence d'acide ascorbique. Pour bien mettre en évidence cet écart, une seconde méthode électrochimique impulsionnelle est utilisée, la voltammétrie à signaux carrés (notée SWV pour Square Wave Voltammetry), plus sensible que la DPV. La SWV a pour autre avantage de pouvoir utiliser des vitesses de balayage des potentiels supérieures à 1 V.s^{-1} et de tracer ainsi des voltammogrammes en moins d'une seconde^[144]. Les paramètres adoptés pour cette méthode sont les suivants : fréquence de 25 Hz, amplitude de pulsion de 25 mV, pas de potentiel de 2,5 mV et une vitesse de balayage de 63 mV.s^{-1} . La figure II.24 présente les droites d'étalonnage tracées avec une solution de tampon phosphate de pH 7 contenant des concentrations croissantes d'acide urique en absence ou en présence d'acide ascorbique à 1 mmol.L^{-1} . Il est faut remarquer que l'utilisation de la voltammétrie à signaux carrés améliore très sensiblement les performances du capteur. En effet, en absence d'acide ascorbique, le seuil de détection de l'acide urique est réduit à $0,639 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ alors qu'il était de $1,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ en DPV (tableau II.5). Simultanément, la sensibilité augmente très fortement, passant de $3,06$ à $65 \text{ } \mu\text{A.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$.

Les résultats confirment par ailleurs l'influence de l'acide ascorbique sur les performances analytiques du capteur vis-à-vis de l'acide urique. En effet, en présence d'acide ascorbique à 1 mmol.L^{-1} , la limite de détection de l'acide urique est de $0,262 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ et la sensibilité est proche de $86 \text{ } \mu\text{A.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$.

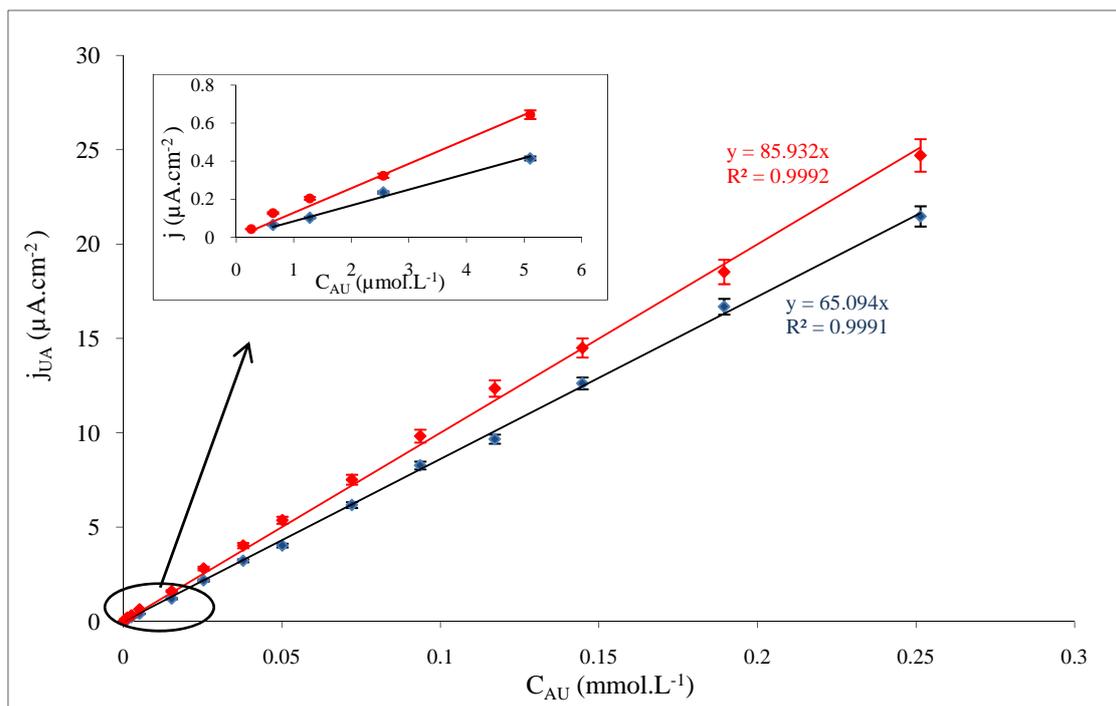


Figure II.24. Droites d'étalonnage de l'acide urique sur μAu -PEDOT en SWV en absence (courbe bleue) ou en présence (courbe rouge) d'acide ascorbique à $1 mmol \cdot L^{-1}$.

II.3.7.2. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction de la concentration d'acide ascorbique

Afin de démontrer clairement l'influence de l'acide ascorbique, les expériences précédentes ont été volontairement réalisées avec une concentration d'AA en excès. Ces conditions ne correspondent que très rarement à des situations rencontrées dans le sérum sanguin. Pour compléter l'étude, il est indispensable d'étudier l'influence de la concentration d'acide ascorbique.

Les expériences ont consisté à enregistrer la réponse ampérométrique du capteur avec des solutions tamponnées de phosphate à $0,1 mol \cdot L^{-1}$ contenant l'acide urique à $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ et des concentrations d'acide ascorbique au plus égales à $1,5 mmol \cdot L^{-1}$. La figure II.25 présente les résultats obtenus en fonction du rapport des concentrations des deux acides.

Dès les plus faibles concentrations en acide ascorbique, la densité de courant du pic d'oxydation de l'acide urique augmente sensiblement. Un plateau est visible à partir du rapport de concentration C_{AA}/C_{UA} égal à 1,5.

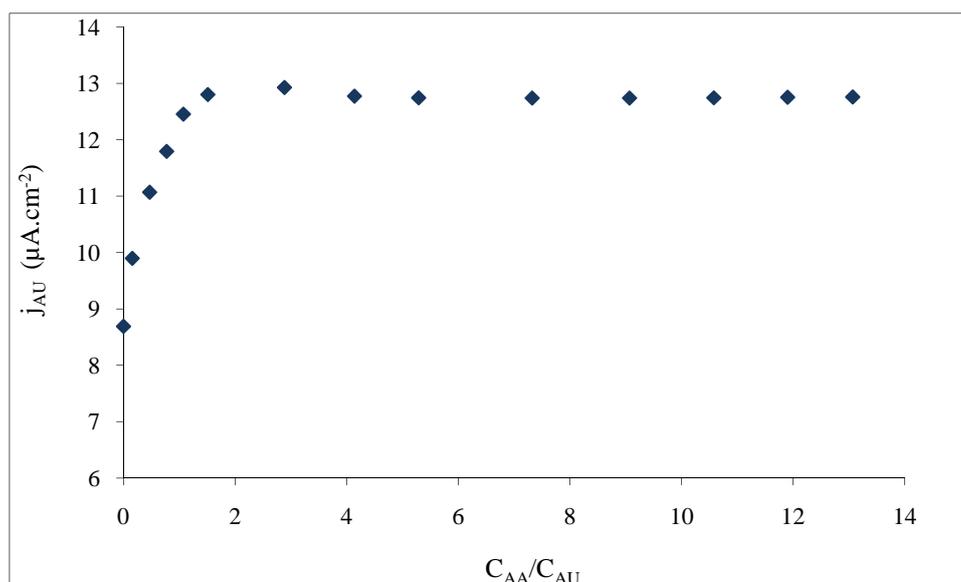


Figure II.25. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique à $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ sur μAu -PEDOT en SWV en fonction du rapport des concentrations C_{AA}/C_{AU} .

A notre connaissance, ce résultat n'a à ce jour jamais été rapporté dans la bibliographie. Il faut dire que la majorité des études se focalisent, soit sur le dosage de solutions ne contenant qu'un seul des deux acides ^[25], soit sur le dosage d'une espèce dans un mélange, l'autre espèce étant toujours présente en grand excès ^[23,36]. Si ces dernières conditions sont intéressantes dans le cas de pathologies, elles ne sont pas adaptées à l'étude des propriétés antioxydantes en conditions physiologiques normales. Dans ce cas, il est indispensable de réaliser le dosage des deux espèces simultanément de façon à ne pas induire d'erreur systématique dans l'évaluation de leur concentration. Ceci est d'autant plus indispensable que c'est pour des concentrations d'acide ascorbique correspondant aux conditions physiologiques normales que la réponse du capteur vis-à-vis de l'acide urique dépend de ces concentrations.

II.3.7.3. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique en fonction des concentrations d'acide déhydroascorbique

Afin de confirmer le mécanisme de régénération de l'acide urique, une autre série de mesures similaires a été effectuée en présence d'acide déhydroascorbique. La figure II.26 présente l'évolution de la densité de pic d'oxydation de l'acide urique en fonction du rapport des concentrations C_{DHA}/C_{AU} .

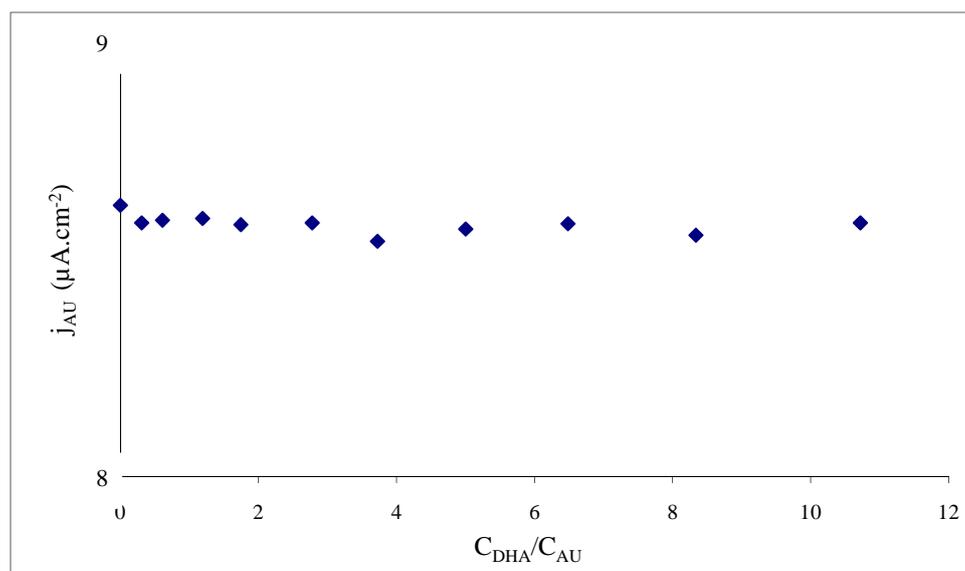


Figure II.26. Evolution de la densité de courant d'oxydation de l'acide urique à $100 \mu mol.L^{-1}$ sur μAu -PEDOT en SWV en fonction de rapport des concentrations C_{DHA}/C_{AU} .

Les résultats démontrent que l'acide déhydroascorbique n'induit aucune variation de la réponse du microcapteur vis-à-vis de la détection de l'acide urique. Comme suggéré par le mécanisme schématisé à la figure II.23, l'acide ascorbique est la seule espèce présente dans le mélange, susceptible de régénérer l'acide urique au voisinage de l'électrode et d'amplifier la réponse du capteur.

II.3.8. Etude des interférents

Avant d'éprouver le capteur dans des liquides physiologiques réels, il est indispensable d'identifier d'éventuelles espèces biochimiques pouvant interférer dans la détection des deux acides.

Un voltammogramme impulsif différentiel a été tracé dans une solution de tampon phosphate à $0,1 mol.L^{-1}$ pH7 contenant divers métabolites coexistant dans le sérum sanguin à des concentrations du même ordre de grandeur que celles des acides ascorbique et urique : la dopamine, la cystéine, la N-acétyl cystéine (NAC), la xanthine, l'hypoxanthine, le glucose, l'acide glutamique et l'albumine. Ces espèces sont ajoutées tour à tour dans le mélange des acides ascorbique et urique à des concentrations permettant d'observer leur signal anodique sur l'électrode modifiée. La figure II.27 montre la courbe obtenue.

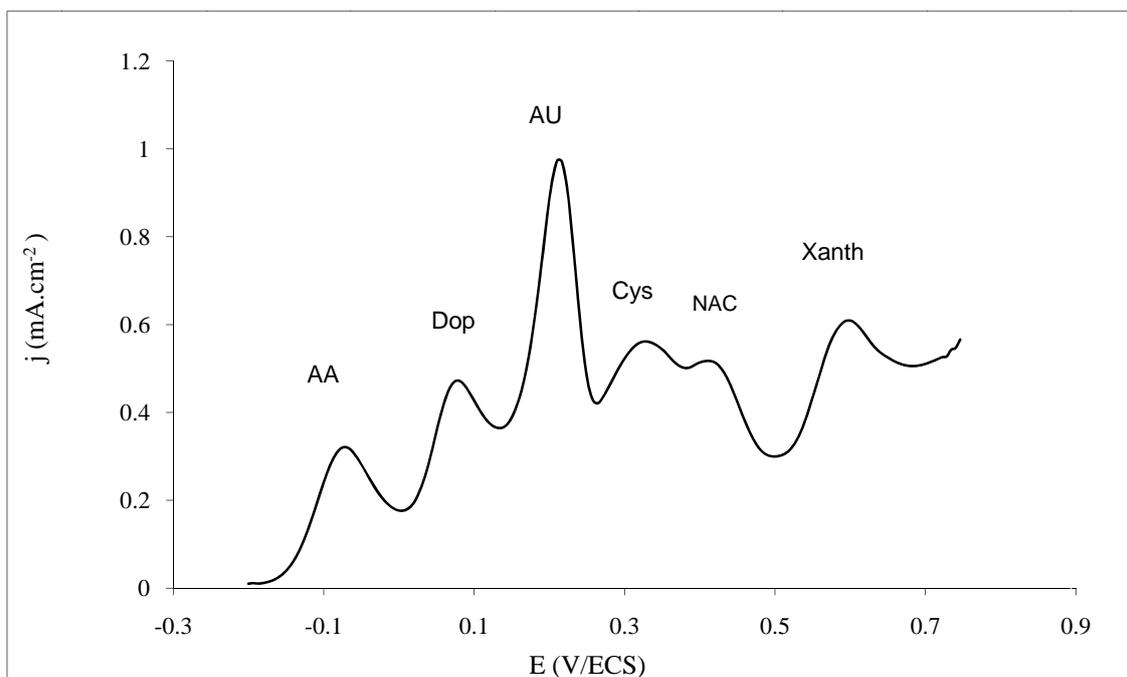


Figure II.27. Voltammogramme impulsionnel différentiel obtenu sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution désaérée de tampon phosphate pH7 contenant l'acide ascorbique (AA) $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, l'acide urique (UA) $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la dopamine (Dop) $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la cystéine (Cys) $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la (NAC) $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la xanthine (Xanth) $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$, l'hypoxanthine $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, l'acide glutamique $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$, le glucose $5,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ et l'albumine 2 g.L^{-1} .

La dopamine, la cystéine et la NAC s'oxydent sélectivement sur l'électrode modifiée par le PEDOT. Toutefois leur présence n'affecte pas le dosage des acides ascorbique et urique : les potentiels d'oxydation des deux espèces ne sont pas sensiblement modifiés et l'intensité de leur pic peut être aisément déterminée après une simple déconvolution des pics.

L'acide glutamique, l'hypoxanthine, le glucose et l'albumine ne manifestent aucune réponse électrochimique dans le domaine de potentiel étudié. Il faut tout de même préciser que la présence de l'albumine a provoqué le déplacement de $0,02 \text{ V}$ de tous les pics d'oxydation vers les potentiels anodiques, probablement suite à l'adsorption de la protéine à la surface de l'électrode.

Un traitement particulier doit être apporté à la xanthine qui est détecté à $0,6 \text{ V}$ et dont le produit d'oxydation est l'acide urique ^[145]. La figure II.28 montre les voltammogrammes successifs enregistrés dans une solution tamponnée contenant l'acide urique et la xanthine respectivement à 1 et $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. On observe une augmentation du pic d'oxydation de l'acide urique dès lors que le potentiel d'électrode atteint $0,6 \text{ V}$. L'oxydation de la xanthine à

chaque balayage de potentiel provoque une augmentation de la concentration surfacique en acide urique et un accroissement de la densité de courant au potentiel de 0,3 V.

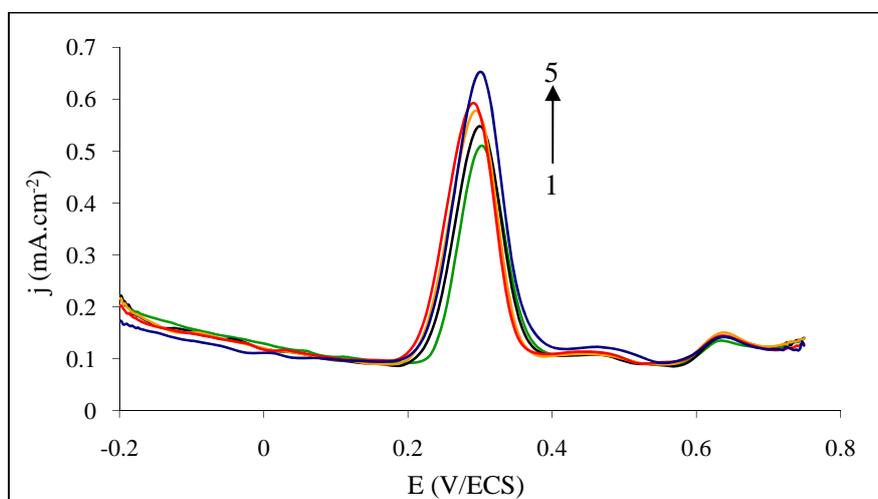


Figure II.28. Voltammogrammes impulsionnels différentiels successifs obtenus sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution désaérée de tampon phosphate pH7 contenant un mélange d'acide urique à 1 mmol.L^{-1} et de xanthine à $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Conclusion

Les résultats obtenus dans ce chapitre concernant l'élaboration et la mise au point d'un microcapteur voltammétrique pour le dosage simultané des acides ascorbique et urique, démontrent une fois encore l'apport très bénéfique des électrodes modifiées dans le domaine de l'électroanalyse. La fonctionnalisation de surface par un film de polymère conducteur électropolymérisé "PEDOT", apporte de la sélectivité et de la sensibilité à la mesure électrochimique, elle résout les problèmes d'interférence et rend les dosages simultanés possibles alors qu'ils étaient presque inconcevables avec les matériaux conventionnels.

Les performances analytiques du capteur sont à la hauteur des attentes. Les surtensions d'oxydation des deux espèces antioxydantes sont réduites de plus de 300 mV, et les courants d'électrolyse sont 2 à 3 fois plus importants que ceux enregistrés sur les électrodes nues. L'utilisation de la voltammétrie à signaux carrés comme méthode de détection électrochimique a permis d'atteindre des sensibilités et des seuils limites de détection parmi les meilleurs rencontrés dans la bibliographie. Une étude de l'influence des conditions de fabrication du polymère sur la réponse du capteur a en outre montré que les propriétés catalytiques du PEDOT dépendent directement de paramètres de dépôt : concentration du monomère, vitesse de balayage et domaine de potentiel d'électropolymérisation, épaisseur de polymère...

Le dosage simultané des deux acides dans des solutions modèles a révélé augmentation de la sensibilité du capteur vis-à-vis de l'acide urique en présence de l'acide ascorbique. Un mécanisme réactionnel de type EC' est proposé, qui repose sur une réaction chimique spontanée de régénération de l'acide urique couplée à l'étape électrochimique. L'utilisation de la microscopie électrochimique à balayage (SECM) est envisagée à court terme au laboratoire, qui devrait permettre de donner des ordres de grandeur sur les vitesses des réactions par la détermination des profils de concentration des différentes espèces au voisinage du film de polymère.

Références bibliographiques

- [1] H. Etnet, M. Knoll ; *Electrochemical characterization of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode*. Anal. Chim. Acta, 449 (2001) 129-134.
- [2] I. Jureviciute, K. Brazdžiuvienė, L. Bernotaite, B. Šalkus, A. Malinauskas ; *Polyaniline-modified electrode as an amperometric ascorbate sensor*. Sens. Actuators B., 107 (2005) 716-721
- [3] Y. Tang, K. Pan, X. Wang, C. Liu, S. Luo ; *Electrochemical synthesis of polyaniline in surface-attached poly(acrylic acid) network, and its application to the electrocatalytic oxidation of ascorbic acid*. Microchim Acta., 168 (2010) 231-237.
- [4] K. Brazdžiuvienė, I. Jureviciute, A. Malinauskas ; *Amperometric ascorbate sensor based on conducting polymer: Poly(N-methylaniline) versus polyaniline*. Electrochim. Acta., 35 (2007) 785-791.
- [5] L. Ozcan, M. Sahin, Y. Sahin; *Electrochemical preparation of a molecularly imprinted polypyrrole-modified pencil graphite electrode for determination of ascorbic acid*. Sensors, 8 (2008) 5792-5805.
- [6] M. R. Majidi, T. Khoshkdaman, M. Nazarpur ; *Simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid in blood serum using an overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode*. int. j. polym. anal. charact., 15 (2010) 351-359.
- [7] N. F. Atta, M. F. El-Kadya, A. Galal ; *Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using poly(N-methylpyrrole)/Pd-nanoclusters sensors*. Anal. Biochem., 400 (2010) 78-88.
- [8] F. Arsalan ; *An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polyaniline-polypyrrole film*. Sensors, 8 (2008) 5492-5500

- [9] A. Mohadesia, M. A. Taher ; *Electrochemical behavior of Naphthol green B doped in polypyrrole film and its application for electrocatalytic oxidation of ascorbic acid*. Sens. Actuators B., 123 (2007) 733-739.
- [10] S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified glassy carbon electrode*. J Solid State Electrochem., 10 (2006) 905-913.
- [11] V.S. Vasantha, S.-M. Chen ; *Electrocatalysis and simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using poly(3,4-ethylenedioxy)thiophene film modified electrodes*. J. Electroanal. Chem., 592 (2006) 77-87.
- [12] A. Balamurugana, S.-M. Chen ; *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co-(5-amino-2-naphthalenesulfonic acid)) (PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Anal. Chim. Acta, 596 (2007) 92-98.
- [13] S. R. Jeyalakshmi, S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using PEDOT polymer modified electrodes*. Indian J. Chem., Sect. A, 46 A (2007) 957-961.
- [14] S. S. Kumar, M. Jayaraman, K. L. Phani, Y. Kumar ; Y. Venkatraman; *Determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes*. Electroanalysis, 17 (2005) 2281-2286.
- [15] A. Bello, M. Giannetto, G. Mori, R. Seeber, F. Terzi, C. Zanardi ; *Optimization of the DPV potential waveform for determination of ascorbic acid on PEDOT-modified electrodes*. Sens. Actuators B., 121 (2007) 430-435.
- [16] T.-H. Tsai, T.-W. Chen, S.-M. Chen ; *Selective electroanalysis of ascorbic acid using a nickel hexacyanoferrate and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) hybrid film modified electrode*. Electroanalysis, 22 (2010) 1655-1662.
- [17] V. S. Vasantha, S.- M. Chen ; *Synergistic effect of a catechin-immobilized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrode on electrocatalysis of NADH in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Electrochim. Acta, 52 (2006) 665-674.
- [18] S. Harish, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *PEDOT/Palladium composite material: synthesis, characterization and application to simultaneous determination of dopamine and uric acid*. J. Appl. Electrochem., 38 (2008) 1583-1588.
- [19] J. Mathiyarasu, S. Senthilkumar, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *PEDOT-Au nanocomposite film for electrochemical sensing*. Mater. Lett., 62 (2008) 571-573.

- [20] M. Aslanoglu, A. Kutluay, S. Abbasoglu, S. Karabulut ; *A poly(3-acetylthiophene) modified glassy carbon electrode for selective voltammetric measurement of uric acid in urine sample*. Chem. Pharm. Bull., 56 (2008) 282-286.
- [21] Y. Li, X. Lin ; *Simultaneous electroanalysis of dopamine, ascorbic acid and uric acid by covalently modified glassy carbon electrode*. Sens. Actuators B., 115 (2006) 134-139.
- [22] F. N. Atta, M. F. El-Kady ; *Novel poly(3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids*. Sens. Actuators B., 145 (2010) 299-310
- [23] G. Kang, X. Lin ; *RNA modified electrodes for simultaneous determination of dopamine and uric acid in the presence of high amounts of ascorbic acid*. Electroanalysis, 18 (2006) 2458-2466.
- [24] S. A. Kumar, H.-W. Cheng, S.-M. Chen ; *Selective detection of uric acid in the presence of ascorbic acid and dopamine using polymerized luminol film modified glassy carbon electrode*. Electroanalysis., 21 (2009) 2281-2286.
- [25] S. Zhua, H. Li, W. Niu, G. Xu ; *Simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine, and ascorbic acid at single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode*. Biosens. Bioelectron., 25 (2009) 940-943.
- [26] S. Zhang, M. Xu, Y. Zhang ; *Simultaneous voltammetric detection of salsolinol and uric acid in the presence of high concentration of ascorbic acid with gold nanoparticles/functionalized multiwalled carbon nanotubes composite film modified electrode*. Electroanalysis., 21 (2009) 2607-2610.
- [27] M. Zidan, W. T. Tan, Z. Zainal, A. H. Abdullah, J. K. Goh ; *Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid mediated by lithium doped microparticles Bi_2O_3 /MWCNT modified glassy carbon electrode*. Int. J. Electrochem. Sci, 5 (2010) 501-508.
- [28] Z. Dursun, B. Gelmez ; *Simultaneous determination of ascorbic Acid, dopamine and uric acid at Pt nanoparticles decorated multiwall carbon nanotubes modified GCE*. Electroanalysis., 22 (2010) 1106-1114.
- [29] S. Shahrokhian, H. R. Zare-Mehrjardi, H. Khajehsharifi ; *Modification of carbon paste with congo red supported on multi-walled carbon nanotube for voltammetric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid*. J. Solid State Electrochem., 13 (2009) 1567-1575.
- [30] U. Yogeswaran, S.-M. Chen ; *Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid*. Sens. Actuators B., 130 (2008) 739-749

- [31] Y. Zhang, Y. Pan, S. Su, L. Zhang, S. Li, M. Shao ; *A novel functionalized single-wall carbon nanotube modified electrode and its application in determination of dopamine and uric acid in the presence of high concentrations of ascorbic acid*. *Electroanalysis*, 19 (2007) 1695-1701.
- [32] C. Dechakiatkrai, J. Chen, C. Lynam, K.M. Shin, S. J. Kim, S. Phanichphant, G. G. Wallace ; *Direct ascorbic acid detection with ferritin immobilized on single-walled carbon nanotubes*. *Electrochem. Solid-State Lett.*, 11 (2008) K4-K6.
- [33] M. Jing, W. Shuran, W. Maoqing, Z. Jialing, W. W. Liang, D. Xiaoyan ; *Polyluminal/single-walled carbon nanotube composite film-modified electrodes for simultaneous determination of propyl gallate and ascorbic acid*. *Sensors Lett*, 8 (2010) 672-676.
- [34] U. Yogeswaran, T. Soundappan, S.-Ming. Chen ; *Corrigendum to "Nanocomposite of functionalized multiwall carbon nanotubes with nafion, nano platinum, and nano gold biosensing film for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid*. *Anal. Biochem.*, 390 (2009) 224.
- [35] L. Xiao, J. Chen, C.-S. Cha ; *Elimination of the interference of ascorbic acid in the amperometric detection of biomolecules in body fluid samples and the simple detection of uric acid in human serum and urine by using the powder microelectrode technique*. *J. Electroanal. Chem.*, 495 (2000) 27-35.
- [36] J. Premkumar, S. B.Koo ; *Electrocatalytic oxidations of biological molecules (ascorbic acid and uric acids) at highly oxidized electrodes*. *J. Electroanal. Chem.*, 576 (2005) 105-112.
- [37] M. M. Nassef, A.-E. Radi, C. O'Sullivan ; *Simultaneous detection of ascorbate and uric acid using a selectively catalytic surface*. *Anal. Chim. Acta*, 583 (2007) 182-189.
- [38] D. Sun, Y. Zhang, F. Wang, K. Wu, J. Chen, Z. Yika ; *Electrochemical sensor for simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and xanthine based on the surface enhancement effect of mesoporous silica*. *Sens. Actuators B.*, 141 (2009) 641-645.
- [39] C. R. Raj, T.Ohsaka ; *Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol*. *J. Electroanal. Chem.*, 540 (2003) 69-77
- [40] T. Selvaraju, R. Ramaraj ; *Simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and homovanillic acid at copper modified electrode*. *Electrochim. Acta*, 52 (2007) 2998-3005.
- [41] N. B. Li, R. Wang, H. Q. Luo ; *Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid and dopamine on poly(caffeic acid)-modified glassy carbon electrode*. *Solid State Electrochem*, 12 (2008) 693-699.

- [42] L. Zhang, X. Lin ; *Electrochemical behavior of a covalently modified glassy carbon electrode with aspartic acid and its use for voltammetric differentiation of dopamine and ascorbic acid*. Anal. Bioanal. Chem., 382 (2005) 1669-1677.
- [43] J.-B. He, G.-P. Jina, Q.-Z. Chena, Y. Wang ; *A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid*. Anal. Chim. Acta, 585 (2007) 337-343.
- [44] A. Safavi, N. Maleki, O. Moradlou, F. Tajabadi ; *Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode*. Anal. Biochem., 359 (2006) 224-229.
- [45] N. R. Goyal, V. K. Gupta, A. Sangal, N. Bachheti ; *Voltammetric determination of uric acid at a fullerene-C60-modified glassy carbon electrode*. Electroanalysis, 17 (2005) 2217-2223.
- [46] P. Wang, Y. Li, X. Huang, L. Wang ; *Fabrication of layer-by-layer modified multilayer films containing choline and gold nanoparticles and its sensing application for electrochemical determination of dopamine and uric acid*. Talanta, 73 (2007) 431-437.
- [47] A. Nezamzadeh, M. K. Amini, H. Faghihian ; *Square-wave voltammetric determination of ascorbic acid based on its electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon-paste electrodes*. Int. J. Electrochem. Sci., 2 (2007) 583-594.
- [48] D. R. Shankaran, K. Iimura, T. Kato ; *Simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine at a sol-gel composite electrode*. Sens. Actuators B., 94 (2003) 73-80.
- [49] S. Sharath Shankar, B. E. Kumara Swamy, Umesh Chandra, J. G. Manjunatha, B. S. Sherigara ; *Simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid with CTAB modified carbon paste electrode*. Int. J. Electrochem. Sci, 4 (2009) 592-601.
- [50] C. Christophe. *Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies « Silicium et Polymères » pour l'étude du stress oxydant - Application à la biochimie cutanée*. Thèse de l'université Paul Sabatier-Toulouse III (2010).
- [51] R. Khan, P. R. Solanki, A. Kaushik, S. P. Singh, S. Ahmad, B. D. Malhotra; *Cholesterol biosensor based on electrochemically prepared polyaniline conducting polymer film in presence of a nonionic surfactant*. J. Polym. Res., 16 (2009) 363-373.
- [52] S.-C. Luo, H. Xie, N. Chen, H.-H. Yu ; *Trinity DNA detection platform by ultrasoft and functionalized PEDOT biointerface*. Appl. Mater. Interfaces, 1 (2009) 1414-1419.
- [53] S. Lupu, F.J. del Campo, F. X. Munoz ; *Development of microelectrode arrays modified with inorganic-organic composite materials for dopamine electroanalysis*. J. Electroanal. Chem, 639 (2010) 147-153.

- [54] J. C. Cooper, E. A. H. Hall ; *Catalytic reduction of benzoquinone at polyaniline and polyaniline/enzyme films*. *Electroanalysis*, 5 (1993) 385-397.
- [55] H. Xu, W. Zhang, W. Zhu, D. Wang, J. Ye, K. Yamamoto, L. Jin; *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine and methionine in hypothyroid patients' plasma by liquid chromatography using platinum/poly(methyl violet) modified electrode*. *Anal. Chim. Acta*, 545 (2005) 182-188.
- [56] H.- B. Noh, P. Kumar, T. K. Biswas, D.-S. Kim, Y.-B. Shim ; *Improved performance of an amperometric biosensor with polydiaminonaphthalene on electrochemically deposited Au nanoparticles*. *Electroanalysis*, 22 (2010) 632-638.
- [57] P. Chandrasekhar ; *Conducting polymers, fundamentals and applications. A practical approach* ; Kluwer Academic Publishers, Boston (1999).
- [58] C. K. Chiang, M. J. Cohen, A. F. Garito, A. J. Heeger, C. M. Mikulski, A. G. MacDiarmid ; *Electrical conductivity of (SN)_x*. *Solid State Commun.*, 18 (1976) 1451-1455.
- [59] H. Shirakawa, E. J. Lewis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, A. J. Heeger ; *Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 16 (1977) 578-580.
- [60] C. K. Chiang, C. R. Fincher, Y. W. Park, A. J. Heeger, H. Shirakawa, E. J. Lewis, S. C. Gau, A. G. MacDiarmid ; *Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene*. *Phys. Rev. Lett.*, 39 (1977) 1098-1101.
- [61] A. F. Diaz, K. K. Kanazawa, G. P. Gardini ; *Electrochemical polymerization of pyrrole*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 14 (1979) 635-636.
- [62] G. Tourillon, F. Garnier ; *New electrochemically generated organic conducting polymers*. *J. Electroanal Chem*, 135 (1982) 173-178.
- [63] L. B. Groenendaal, F. Jonas, D. Freitag, H. Pielartzik, J. R. Reynolds; *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future*. *Adv. Mater.*, 12 (2000) 481-494.
- [64] A. F. Diaz, J. A. Logan ; *Electroactive polyaniline films*. *J. Electroanal. Chem.*, 111 (1980) 111-114.
- [65] M. Angelopoulos, G. E. Asturias, S. P. Ermer, A. Ray, E. M. Scherr, A. G. MacDiarmid, M. Akhtar, Z. Kiss, A. J. Epstein ; *Polyaniline: solutions, films and oxidation state*. *Mol. Cryst. Liq. Cryst*, 160 (1987) 151-163.
- [66] E. M. Genies, A. A. Syed, C. Tsintavis ; *Electrochemical study of polyaniline in aqueous and organic medium, Redox and kinetic properties*. *Mol. Cryst. Liq. Cryst*, 1-4 (1985) 181-186.

- [67] G. Pinto, A.-K. Maaroufi ; *Conducting polymer composites of zinc-filled urea-formaldehyde*. J. Appl. Polym. Sci., 96 (2005) 2011-2015.
- [68] G. Pinto, M. B. Maidana; *Conducting polymer composites of zinc-filled nylon 6*. J. Appl. Polym. Sci., 82 (2001) 1449- 1454.
- [69] V. I. Roldughin, V. V. Vysotskii ; *Percolation properties of metal-filled polymer films, structure and mechanisms of conductivity*. Prog. Org. Coat., 39 (2000) 81-100.
- [70] C. Del Río, J. L. Acosta ; *Extrinsic conducting and superconducting polymer systems. IV. Superconducting properties of YBaCuO composites based on PVDF/PS/carbon black and PVDF/PS/copper polymer systems*. J. Appl. Polym. Sci., 60 (1993) 399-405.
- [71] Y.-T. Kima, W.-S. Kima, H.-W. Rhee, M.-K. Song ; *Iron corrosion protection by ultra-thin conductive films based on polypyrrole/poly(methyl methacrylate) composite*. Mol. Cryst. Liq. Cryst., 445 (2006) 193-200.
- [72] A. P. Lima Pacheco, E. S. Araujo, W. M. de Azevedo ; *Polyaniline/poly acid acrylic thin film composites: a new gamma radiation detector*. Mater. Charact., 50 (2003) 245-248.
- [73] G. Wu, C. Zhang, T. Miura, S. Asai, N. Sumita; *Electrical characteristics of fluorinated carbon black-filled poly(vinylidene fluoride) composites*. J. Appl. Polym. Sci., 80 (2001) 1063-1070.
- [74] N. V. Bhat, A.P. Gadre, V. A. Bambole ; *Structural, mechanical, and electrical properties of electropolymerized polypyrrole composite films*. J. Appl. Polym. Sci., 80 (2001) 2511-2517.
- [75] G. H. chen, D. J.Wu, W. G. Wen, W. L. Yan; *Preparation of polymer/graphite conducting nanocomposite by intercalation polymerization*. J. Appl. Polym. Sci., 82 (2001) 2506-2513.
- [76] B. Scrosati ; *Conducting polymers: advanced materials for new design, rechargeable lithium batteries*. Polym. Int., 74 (1998) 50-55.
- [77] M. Kurian, M. E. Galvin, P. E. Trapa, D. R. Sadoway, A. M. Mayes; *Single-ion conducting polymer–silicate nanocomposite electrolytes for lithium battery applications*. Electrochim. Acta, 50 (2005) 2125-2134.
- [78] V. C. Janu, R. Singh, A. K. Singh, S. G. Kulkarni; *Chemical synthesis, characterization and thermal analysis of polyaniline / ZnO nanocomposite*. AIP Conf. Proc., 1276 (2010) 249-259.
- [79] L. Joshi, B. Gupta, R. Prakash; *Chemical synthesis of poly(5-carboxyindole) and poly(5-carboxyindole)/carboxylated multiwall carbon nanotube nanocomposite*. Thin Solid Films, 519 (2010) 218-222.

- [80] S. Fujii, S. Matsuzawa, Y. Nakamura ; *One-pot synthesis of conducting polymer-coated latex particles: ammonium persulfate as free radical initiator and chemical oxidant*. Chem. Commun., 46 (2010) 7217-7219.
- [81] T. Ito, H. Shirakawa, S. Ikeda; *Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated soluble Ziegler-type catalyst solution*. J. Polym. Sci., Part A., 12 (1974) 11-20.
- [82] G. Tourillon, F. Garnier ; *Effect of dopant on the physicochemical and electrical properties of organic conducting polymers*. J. Phys. Chem., 87 (1983) 2289-2292.
- [83] J. Roncali, F. Garnier, M. Lemaire, R. Garreau ; *Poly mono-, bi- and trithiophene: Effect of oligomer chain length on the polymer properties*. Synth. Met., 15 (1986) 323-331.
- [84] J. Roncali, A. Yassar, F. Garnier ; *Electrosynthesis of highly conducting poly(3-methylthiophene) thin films*. Chem. Soc. Chem. Commun., 9 (1988) 581-582.
- [85] A. F. Diaz, J. I. Castillo, J. A. Logan, W.-Y. Lee ; *Electrochemistry of conducting polypyrrole films*. J. Electroanal. Chem., 129 (1981) 115-132.
- [86] J. Roncali, M. Lemaire, R. Garreau, F. Garnier ; *Enhancement of the mean conjugation length in conducting polythiophenes*. Synth. Met., 18 (1987) 139-144.
- [87] J. Roncali ; *Conjugated Poly(thiophenes): Synthesis, functionalization, and applications*. Chem. Rev., 92 (1992) 711-738.
- [88] G. Sabouraud, S. Sadki, N. Brodie ; *The mechanisms of pyrrole electropolymerization*. Chem. Soc. Rev., 29 (2000) 283-293.
- [89] S. Patra, K. Barai, N. Munichandraiah ; *Scanning electron microscopy studies of PEDOT prepared by various electrochemical routes*. Synth. Met., 158 (2008) 430-435.
- [90] M. C. Morvant, J. R. Reynolds ; *In situ conductivity studies of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*. Synth. Met., 92 (1998) 57-61.
- [91] L. Niu, C. Kvarnström, K. Fröberg, A. Ivaska; *Electrochemically controlled surface morphology and crystallinity in poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films*. Synth. Met., 122 (2001) 425-429.
- [92] A. I. Melato, M. H. Mendonça, L. M. Abrantes ; *Effect of the electropolymerisation conditions on the electrochemical, morphological and structural properties of PEDOT films*. J. Solid State Electrochem., 13 (2009) 417-426.
- [93] H. Randriamahazaka, V. Noël, C. Chevrot ; *Nucleation and growth of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) in acetonitrile on platinum under potentiostatic conditions*. J. Electroanal. Chem., 472 (1999) 103-111.

- [94] T. Darmanin, M. Nicolas, F. Guittard ; *Electrodeposited polymer films with both superhydrophobicity and superoleophilicity*. Phys. Chem. Chem. Phys. 10 (2008) 4322-4326.
- [95] C. P. Andrieux, P. Audebert, P. Hapiot, J.-M. Saveant ; *Identification of the first steps of the electrochemical polymerization of pyrroles by means of fast potential step techniques*. J. Phys. Chem., 95 (1991) 10158-10164.
- [96] A. Mollahosseini, E. Noroozian ; *Electrodeposition of a highly adherent and thermally stable polypyrrole coating on steel from aqueous polyphosphate solution*. Synth. Met., 159 (2009) 1247-1254.
- [97] E. Tamburri, S. Orlanducci, F. Toschi, M. L. Terranova, D. Passeri ; *Growth mechanisms, morphology, and electroactivity of PEDOT layers produced by electrochemical routes in aqueous medium*. Synth. Met., 159 (2009) 406-414.
- [98] D. Pahovnik, E. Zagar, J. Vohlidal, M. Zigon, Majda ; *Ionic liquid-induced formation of polyaniline nanostructures during the chemical polymerization of aniline in an acidic aqueous medium*. Synth. Met., 160 (2010) 1761-1766.
- [99] Y.-B. Kim, J.-K. Choi, J.-A. Yu, J.-W. Hong ; *Synthesis and characterization of a non-aqueous conductive microgel coated with poly(aniline)-DBSA in a colloidal dispersion*. Synth. Met., 131 (2002) 79-85.
- [100] J. Ouyang, Y. Li ; *Effect of electrolyte solvent on the conductivity and structure of as-prepared polypyrrole films*. Polymer, 38 (1997) 1971-1977.
- [101] S. Carquigny, O. Segut, B. Lakard., F. Lallemand, P. Fievet ; *Effect of electrolyte solvent on the morphology of polypyrrole films: Application to the use of polypyrrole in pH sensors*. Synth. Met., 158 (2008) 453-461.
- [102] A. J. Downard, D. Pletcher; *The influence of water on the electrodeposition of polypyrrole in acetonitrile*. J. Electroanal. Chem., 206 (1986) 139-145.
- [103] F. Beck, U. Barsch, Ulrich; *The role of water in the electrodeposition and doping of polythiophene and two of its derivatives*. Makromol. Chem., 194 (1983) 2725-2739.
- [104] A. F. Diaz, B. Hall; *Mechanical properties of electrochemically prepared polypyrrole films*. IBM J. Res. Dev., 27 (1983) 342-347.
- [105] J. Heinze ; *Electronically conducting polymers*. Top. Curr. Chem., 152 (1990) 1-47.
- [106] Y.- T. Kim, W.-S. Kim, H.-W. Rhee, M.-K. Song ; *Iron corrosion protection by ultra-thin conductive films based on polypyrrole/poly(methyl methacrylate) composite*. Mol. Cryst. Liquid. Cryst., 445 (2006) 193-200.
- [107] S. Biallozor, A. Kupniewska ; *Conducting polymers electrodeposited on active metals*. Synth. Met., 155 (2005) 443-449.

- [108] T.-W. Lee, O. Kwon, M.-G. Kim ; *Hole-injecting conducting-polymer compositions for highly efficient and stable organic light-emitting diodes*. Appl. Phys. Lett., 87 (2005) 231106/1-231106/3.
- [109] R. J. Waltman, A. F. Diaz, J. Bargon ; *Electroactive properties of polyaromatic molecules*. J. Electrochem. Soc., 131 (1984) 1452-1456.
- [110] S. Panero, P. Prospero, B. Kalptse, B. Scrosati ; *Characteristics of electrochemically synthesized polymer electrodes in lithium cells—II. Polythiophene*. Electrochim. Acta, 31 (1986) 1597-1600.
- [111] S. Tarkuc, E. Sahmetlioglu, C. Tanyeli, I.M. Akhmedov, L. Toppare ; *A soluble conducting polymer: 1-Phenyl-2,5-di(2-thienyl)-1H-pyrrole and its electrochromic application*. Electrochim. Acta, 51 (2006) 5412-5419.
- [112] O. Mert, E. Sahin, E. Ertas, T. Ozturk, E. A. Aydin, L. Toppare ; *Electrochromic properties of poly(diphenyldithieno[3,2-b;2',3'-d]thiophene)*. J. Electroanal. Chem., 591 (2006) 53-58.
- [113] M. Dietrich, J. Heinze, G. Heywang, F. Jonas ; *Electrochemical and spectroscopic characterization of polyalkylenedioxythiophenes*. J. Electroanal. Chem., 369 (1994) 87-92.
- [114] N. K. Guimard, N. Gomez, C. E. Schmidt ; *Conducting polymers in biomedical engineering*. Prog. Polym. Sci., 32 (2007) 876-921.
- [115] P. Pawlowski, A. Michalska, K. Maksymiuk; *Galvanostatic polarization of all-solid-state K⁺-selective electrodes with polypyrrole ion-to-electron transducer*. Electroanalysis, 18 (2006) 1339-1349.
- [116] Z. Mousavi, J. Bobacka, A. Lewenstam, A. Ivaska; *Response mechanism of potentiometric Ag⁺ sensor based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) doped with silver hexabromocarbon*. J. Electroanal. Chem., 593 (2006) 219-226.
- [117] S. Hamilton, M.J. Hepher, J. Sommerville ; *Polypyrrole materials for detection and discrimination of volatile organic compounds*. Sens. Actuators B., 107 (2005) 424-432.
- [118] K. Xu, L. Zhu , A. Zhang, G. Jiang, H. Tang ; *A peculiar cyclic voltammetric behavior of polyaniline in acetonitrile and its application in ammonia vapor sensor*. J. Electroanal. Chem., 608 (2007) 141-147.
- [119] A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, A. Malinauskas ; *Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole*. Electrochim. Acta, 51 (006) 6025-6037.
- [120] P.-C. Nien, T.-S. Tung, K.-C. Ho; *Amperometric glucose biosensor based on entrapment of glucose oxidase in a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film*. Electroanalysis, 18 (2006) 1408-1415.

- [121] P. Gros, H. Durliat, M. Comtat ; *Use of polypyrrole film containing $Fe(CN)_6^{3-}$ as pseudo-reference electrode: application for amperometric biosensors*. *Electrochim. Acta*, 45 (2000) 643-650.
- [122] F. Jonas, L. Schrader ; *Conductive modifications of polymers with polypyrroles and polythiophenes*. *Synth. Met.*, 41 (1991) 831-836.
- [123] R. Jolly, S. Pairis, C. Petrescu ; *Aging compared in three polymer conductors*. *J. Chim. Phys.*, 95 (1998) 1400-1405.
- [124] K. Lerch, F. Jonas, M. Linke ; *Properties and applications of Baytron (PEDT)*. *J. Chim. Phys.*, 95 (1998) 1506-1509.
- [125] A. R. Hillman, E. Mallen ; *Nucleation and growth of polythiophene films on gold electrodes*. *J. Electroanal. Chem.*, 220 (1987) 351-367.
- [126] R. Hernandez, A. F. Diaz, R. Waltman, J. Bargon ; *Surface characteristics of thin films prepared by plasma and electrochemical polymerizations*. *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 3333-3337.
- [127] Z. Deng, W. H. Smyrl, H. S. White ; *Stabilization of metal-metal oxide surfaces using electroactive polymer films*. *J. Electrochem. Soc.*, 136 (1989) 2152-2158.
- [128] A. J. Downard, D. Pletcher ; *A study of the conditions for the electrodeposition of polythiophene in acétonitrile*. *J. Electroanal. Chem.*, 206 (1986) 147-152.
- [129] D. Delabouglise, R. Garreau, M. Lemaire, J. Roncali ; *Study of polythiophene structure using monomers selectively labelled with deuterium*. *New J. Chem.*, 12 (1988) 155-161.
- [130] J. Xia, H. Zhang, J. Ouyang ; *Highly conductive PEDOT: PSS films prepared through a treatment with zwitterions and their application in polymer photovoltaic cells*. *J. Mater. Chem.*, 20 (2010) 9740-9747.
- [131] K. Sheng, S. Gaoquan ; *Synthesis of discus-like poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*. *Synth. Met.*, 160 (2010) 1354-1358.
- [132] G. Tourillon, F. Garnier ; *Morphology of conducting organic polymers: Polythiophene and poly(3-methyl thiophene)*. *J. Polym. Sci., Polym. Phys.*, 33 (1984) 33-39.
- [133] J. R. Reynolds, S.-G. Hsu, J. A. Howard ; *The effect of electrolyte-controlled growth morphology on the charge transport properties of poly(3-methylthiophene)*. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Chem.*, 27 (1989) 2081-2103.
- [134] S. Menolasina ; *Fabrication and characterization of gold ultra and microelectrodes*. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 27 (2004) 26-32.
- [135] J. O. M. Bockris, B. E. Conway, S. Sarangapani, E. Yeager ; *Comprehensive treatise of electrochemistry*. Plenum Press. New York. (1983) 59.

- [136] A. J. Arvia, J. C. Bazan, J. S. W. Carroza ; *The diffusion of ferro- and ferricyanide ions in aqueous potassium chloride solutions and in solution containing CMC sodium salt*. *Electrochim. Acta*, 13 (1968) 81-90.
- [137] A. Ruffien-Ciszak. *Potentialités des microélectrodes pour une évaluation directe et non invasive des propriétés antioxydantes du stratum corneum*. Thèse de l'Université Paul Sabatier-Toulouse III (2005).
- [138] C. P. Andrieux, J M. Dumas-Bouchiat, J.-M. Savéant ; *Kinetics of electrochemical reactions mediated by redox polymers films. New formulation and strategies analysis and optimisation*. *J. Electroanal. Chem.*, 169 (1984) 9-21.
- [139] C. R. Martin, L. S. Van Dyke, in: R. W. Murray (Eds) ; *Mass and Charge Transport in Electronically Conductive Polymers*, Wiley, New York, (1992) 403-424.
- [140] M. E. G. Lyons ; in M. E. G. Lyons (Eds) ; *Charge percolation in electroactive polymers, electroactive polymers electrochemistry, Part I*. Plenum Press, New York, (1994) 65-116.
- [141] G. Schöpf, G. Kößmehl ; *Electrically Conductive Polymers*, Springer-Verlag, Germany, (1997) 80.
- [142] M. C. Henstridge, E. J. F. Dickinson, M. Aslanoglu, C. Batchelor-McAuley, R. G. Compton; *Voltammetric selectivity conferred by the modification of electrodes using conductive porous layers or films: The oxidation of dopamine on glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes*. *Sens. Actuators B.*, 145 (2010) 417-427.
- [143] E. Tamburri, S. Orlanducci, F. Toschi, M.L. Terranova, D. Passeri; *Growth mechanisms, morphology, and electroactivity of PEDOT layers produced by electrochemical routes in aqueous medium*. *Synth. Met.*, 159 (2009) 406-414.
- [144] A. J. Bard, L. R. Faulkner; *Electrochemical methods: fundamentals and applications*; 2nd ed.; Wiley, New York, (2001) 293-298.
- [145] G. Dryhurst ; *Electrochemical oxidation of uric acid and xanthine at the pyrolytic graphite electrode. Mechanistic interpretation of electrochemistry*. *J. Electrochem. Soc.*, 119 (1972) 1654-1664.

Chapitre III : Application du microcapteur à l'analyse du sérum sanguin

Chapitre III : Application du microcapteur à l'analyse du sérum sanguin

III.1. Quelques repères historiques de biochimie

III.2. La biochimie du sang

III.3. Techniques expérimentales de détection des acides ascorbique et urique sériques

III.3.1. Dosage de l'acide ascorbique

III.3.1.1. Principe du dosage

III.3.1.2. Matériels

III.3.1.3. Réactifs

III.3.1.4. Prétraitement des échantillons

III.3.1.5. Procédure du dosage

III.3.1.6. Performances analytiques

III.3.2. Dosage de l'acide urique

III.3.2.1. Principe du dosage

III.3.2.2. Matériels et réactifs

III.3.2.3. Procédure du dosage

III.3.2.4. Performances analytiques

III.4. Dosage électrochimique des acides ascorbique et urique sérique

III.4.1. Matériels et réactifs

III.4.2. Procédure de dosage des deux acides dans le sérum sanguin

III.4.3. Performances analytiques

III.5. Justesse du capteur

III.5.1 Effet de la matrice sur l'état de surface de l'électrode

III.5.2 Consommation de l'acide ascorbique au cours de la procédure d'étalonnage

Conclusion

Références bibliographiques

L'objectif de ce travail est de proposer *in fine* un outil de détection et de dosage quantitatif électrochimique des antioxydants, précisément des acides ascorbique et urique, dans les milieux biologiques. Dans le chapitre II, il a été montré que la fonctionnalisation des microélectrodes d'or par électropolymérisation du PEDOT a apporté une sélectivité et une sensibilité accrues pour les deux acides. L'étude de l'influence des paramètres d'électropolymérisation a considérablement amélioré les performances analytiques du capteur. Dans ce chapitre, le capteur optimisé est appliqué au dosage des deux acides dans le sérum sanguin. L'objectif est de confirmer les résultats obtenus dans les solutions modèles et de tester les potentialités de ce capteur dans un fluide biologique.

III.1. Quelques repères historiques de biochimie

La biochimie est la discipline qui étudie les réactions chimiques du monde vivant. Elle n'est pas seulement une science descriptive capable d'identifier des structures à l'échelle de la molécule, elle permet aussi d'aborder les problèmes quantitatifs et décrire les changements et les transformations chimiques liés au fonctionnement vital. Elle aide enfin à comprendre les mécanismes de contrôle et de régulation des métabolites. Bien que ce terme n'ait été employé pour la première fois qu'en 1903 Neuberg dans le sens "chimie de la vie", des physiologistes, sous l'impulsion des médecins qui voulaient comprendre le fonctionnement du corps humain, se sont préoccupés des années plus tôt de la nature des substances qui constituent les organismes. Les études commençaient alors à être pratiquées d'abord dans les liquides, plus faciles à analyser que les tissus solides. Les espèces contenues dans les urines, le sang ou encore les extraits de végétaux, sont étudiées. Pendant longtemps, la chimie des urines puis du sang est considérée comme la seule discipline de la "biologie médicale".

Depuis le début du vingtième siècle, la biochimie pratique son grand inventaire ; aujourd'hui, même s'il est faux de croire que l'étude des métabolismes est terminée, il est tout à fait juste de penser que l'essentiel est acquis. L'exploration biochimique d'organes est bien connue et de pratique courante pour la plupart des fonctions du foie, du rein, des muscles, du tube digestif et de ses annexes, des neurones, des cellules sanguines, des tissus osseux, conjonctifs et de certaines glandes ^[1].

Les biochimistes participent également à l'étude des maladies. Les anomalies biochimiques se traduisent soit par l'apparition de molécules de structures anormales, soit par des variations de

la quantité de certaines espèces présentes dans le sang, l'urine et les tissus. Chaque pathologie induit des modifications différentes. L'étude de ces modifications peut aider à déduire la nature de la maladie causale. Dans ce cas, par des dosages ou des caractérisations moléculaires, le biochimiste aide le médecin à établir un diagnostic. Par conséquent, une seconde discipline issue de la biochimie est adossée à la médecine, c'est la biochimie clinique, qui permet également de suivre les progrès du traitement par le retour à la normale. La place qu'occupe la biochimie clinique est indiscutable et s'est révélée indispensable auprès des cliniciens spécialistes.

III.2. La biochimie du sang

Le sang d'un homme représente environ 8% de son poids. Il se compose de cellules et de fragments cellulaires qui baignent dans une solution aqueuse, le plasma. Autrefois, on pensait que le sang avait la capacité de guérir beaucoup de maladies, comme la tuberculose et l'épilepsie. On prescrivait l'ingestion de cet "élixir de vie" pour guérir n'importe quelle infection ; c'était "l'aspirine de nos aïeux". Au cours du XIX^e siècle, les anciennes croyances furent lentement remplacées par les connaissances médicales modernes ; on apprit à connaître les propriétés biologiques du sang ainsi que les rôles qu'il joue dans l'organisme. Le "breuvage de la vie" exerce diverses fonctions : transport, homéostasie, défense et autoprotection.

Le plasma sanguin représente 55% du volume du sang. C'est une solution aqueuse contenant des électrolytes, des molécules nutritives (glucose, lipoprotéines, des métabolites, des protéines, des vitamines, des éléments à l'état de traces et des hormones. La phase liquide issue de la coagulation du sang est désignée sous le nom de sérum qui se distingue par l'absence de fibrinogène total.

Le rôle du plasma est très important. Il intervient dans la régulation de l'équilibre acido-basique et dans le métabolisme de l'eau et des éléments minéraux. Il apporte aux tissus les substances alimentaires absorbées au niveau de la muqueuse intestinale. Il conduit les déchets (urée, acide urique, etc.) élaborés au cours du métabolisme cellulaire vers les frontières de sortie de l'organisme (reins, intestins, peau, poumons). Il est également la voie utilisée pour le transport du fer, des hormones, des lipides et de certaines enzymes. Il joue un rôle prépondérant au cours des phénomènes chimiques de la coagulation du sang. L'étude du plasma permet donc de connaître le statut nutritionnel, le métabolisme, d'étudier leurs variations et de suivre leurs modifications pathologiques. Puisque le plasma et le sang sont les

reflets du corps humain, l'étude de leurs constituants et de leur homéostasie est d'un intérêt capital, aussi bien en physiologie qu'en pathologie ^[2].

L'analyse sanguine est un des examens biochimiques les plus sollicités pour le diagnostic et le suivi thérapeutique. Un laboratoire d'analyses médicales d'activité moyenne réalise entre 12500 et 37500 prélèvements sanguins par an ^[3] et plus de 365 000 prélèvements annuels dans un centre hospitalier universitaire comme le CHU Rangueil à Toulouse.

Une liste des métabolites particulièrement importants du plasma est présentée dans le tableau III.1.

	Métabolite	Concentrations sanguines physiologiques
Glucides		
	Glucose	3600 – 6100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Lactate	400 – 1800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Pyruvate	70 – 110 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Constituants azotés		
	Urée	3500 – 9000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Acide urique	180 – 540 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Créatinine	60 – 130 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Acides aminés	2300 – 4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Ammoniaque	20 – 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Lipides		
	Lipides totaux	5,5 – 6,0 g.L^{-1}
	Triglycérides	1,0 – 1,3 g.L^{-1}
	Cholestérol	1,7 – 2,1 g.L^{-1}
Protéines		
	Protéines totaux	60 – 80 g.L^{-1}
	Albumine	35 – 55 g.L^{-1}
	α_1 Globuline	1 – 4 g.L^{-1}
	α_2 Globuline	5 – 9 g.L^{-1}
	β Globuline	6 – 11 g.L^{-1}
	ferritine	0,002 – 0,0025 g.L^{-1}
	transferrine	2 – 3,3 g.L^{-1}
	ceruloplasmine	0,2 – 0,4 g.L^{-1}
Vitamines		
	Vitamine A	1,04 – 2,44 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Acide ascorbique	> 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
	Vitamine B1 TPP*	150 – 170 nmol.L^{-1}
	Vitamine B2 FAD*	149 – 221 nmol.L^{-1}
	Vitamine B6 PLP	>30 nmol.L^{-1}
	Vitamine E	21 – 39 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Constituants inorganiques		
	Sodium	135 – 150 mmol.L^{-1}
	Potassium	3,5 – 5,0 mmol.L^{-1}
	Calcium	2,2 – 2,6 mmol.L^{-1}
	Magnésium	0,8 – 1,2 mmol.L^{-1}
	Chlorure	100 – 110 mmol.L^{-1}
	Bicarbonate	20 - 28 mmol.L^{-1}
	Fer	600 – 1400 mmol.L^{-1}
	Cuivre	700 – 1550 mmol.L^{-1}

Tableau III.1. Récapitulatif des différents métabolites du plasma^[4,5]. * : dans le sang total.

Si les acides ascorbique et urique sont parmi les molécules les plus dosées en biochimie clinique, il est important de noter que les cliniciens ne s'intéressent pas nécessairement à leur aspect antioxydant. L'exemple le plus concret concerne l'acide urique qui, bien que ses propriétés antioxydantes soient maintenant bien élucidées, n'est suivi cliniquement que dans le cadre du catabolisme des bases puriques et les pathologies qui lui sont liées, telles que la goutte et les calculs rénaux. Ceci renforce l'intérêt de cette étude d'évaluer sélectivement la capacité antioxydante du sérum sanguin par l'élaboration d'un capteur spécifique des acides ascorbique et urique mais, au contraire, montre que la méthode électrochimique proposée peut avoir des applications prometteuses qui serviront à mettre en lumière les métabolismes de ces deux molécules.

III.3. Techniques expérimentales d'analyses biochimiques

L'essor de la biochimie et de la biologie moléculaire est intimement lié à l'amélioration constante et continue des techniques expérimentales. En ce qui concerne le dosage des acides ascorbique et urique, les méthodes utilisées sont multiples : les méthodes enzymatiques ^[6], la spectrofluorimétrie ^[7], la fluorimétrie ^[8] et l'électrophorèse capillaire ^[9]. Elles se basent toutes sur les propriétés oxydo-réductrices de ces deux molécules. Elles sont progressivement abandonnées au profit de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui diffère par les modes de dérivation et de détection (fluorimétrique, UV, électrochimique, coulométrique).

La HPLC avec une détection fluorimétrique sensible et spécifique de l'acide déhydro-ascorbique (forme oxydée de l'acide ascorbique) est utilisée au laboratoire de biochimie du CHU Rangueil pour le dosage de l'acide ascorbique ^[10]. Pour l'acide urique, c'est la méthode enzymatique avec une détection spectrométrique qui est adoptée ^[11].

Ces méthodes nécessitent des étapes de prétraitement différentes selon le milieu biologique étudié.

III.3.1. Dosage de l'acide ascorbique

III.3.1.1. Principe du dosage

Dans le sérum, l'acide ascorbique est présent sous ses deux formes détectables ; oxydée (acide déhydro-ascorbique DHA) et réduite (anion ascorbate AH⁻). La technique utilisée au laboratoire de biochimie est basée sur le dosage de la forme oxydée ; qui est rendue fluorescente par couplage avec l'ortho-phénylène diamine OPD. La séparation se fait sur une colonne C18 en polarité de phase inversée et en mode isocratique.

La procédure de dosage de l'acide ascorbique sous forme réduite se fait donc en deux étapes :

1. dosage du DHA présent dans le sérum.
2. dosage du DHA total après oxydation de la forme réduite par le ferricyanure de potassium selon la réaction suivante :



La différence entre les deux concentrations en acide déhydro-ascorbique représente la concentration sérique en anion ascorbate.

III.3.1.2. Matériels

La figure III.1 schématise une chaîne chromatographique standard.

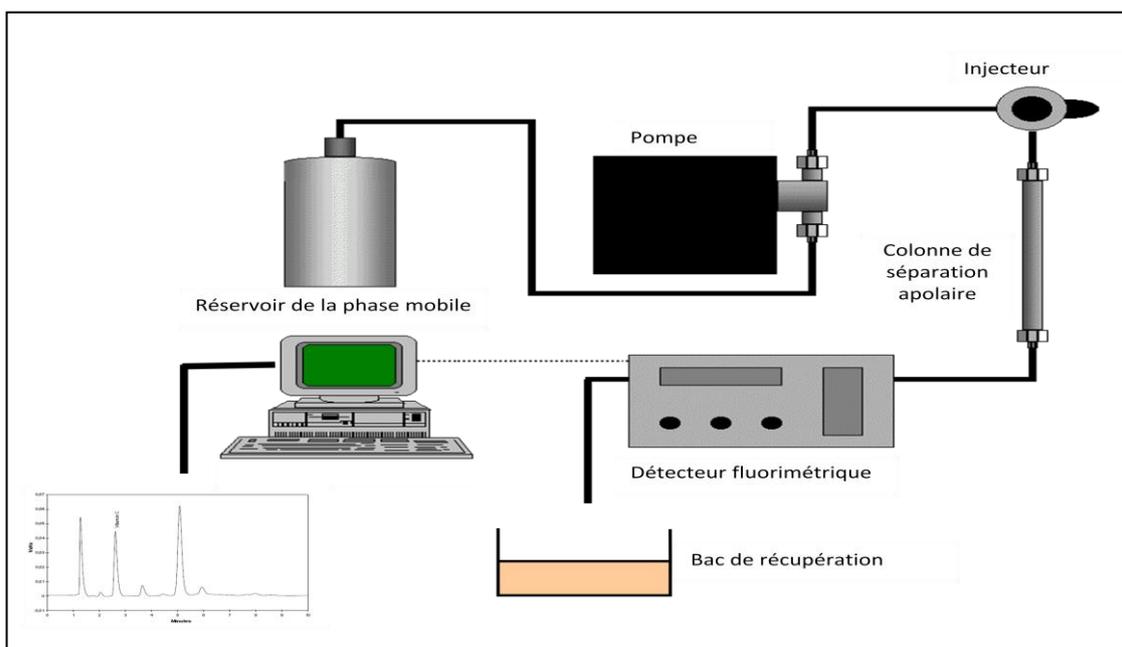


Figure III.1 Schéma simplifié d'une chaîne chromatographie en phase liquide à haute performance. avec détecteur fluorimétrique.

Le dosage de l'acide ascorbique dans des sérums sanguins se fait en plusieurs étapes et requiert l'utilisation de divers matériels :

1- Etape de prétraitement des échantillons

- un mélangeur de vortex
- des tubes de centrifugation
- des pipettes de haute précision
- une centrifugeuse

2- Etape de dosage

Le dosage est réalisé grâce à un équipement Dionex[®] qui comporte :

- une colonne Phenomenex Onyx monolithe C18 100x4,6 mm thermorégulée à une température de 25 °C
- une pompe imposant un débit de la phase mobile de 1,6 mL.min⁻¹
- un fluorimètre fixé à une longueur d'excitation de 350 nm et une longueur d'émission de 420 nm
- un passeur d'échantillons programmé à une température de 8 °C.

III.3.1.3. Réactifs

1- Etape de prétraitement des échantillons

- une solution d'acide métaphosphorique à 0,5 mol.L⁻¹ préparée dans une solution d'eau distillée contenant 25% de MeOH pour la déprotéinisation du sang.

2- Etape de dosage

- une phase mobile constituée d'une solution de tampon phosphate/méthanol à pH 7,8 ajusté avec l'acide orthophosphorique
- une solution de ferricyanure de potassium à 0,3 mmol.L⁻¹ pour l'oxydation de l'acide ascorbique sérique
- une solution tamponnée d'acétate de sodium CH₃COONa à 2,21 mmol.L⁻¹ pH 6,9 (ajusté avec une solution d'acide chlorhydrique concentrée)
- une solution d'ortho-phénylène diamine (OPD) C₆H₄(NH₂)₂ à 4 mmol.L⁻¹ pour la fluorescence
- une solution de salicylamide à 1,47 mmol.L⁻¹ utilisée comme standard interne (SI).
- deux solutions étalon d'acide ascorbique de concentrations C₁ et C₂ égales respectivement à 37 et 125 μmol.L⁻¹ fournies par ChromSystem[®].

Ces solutions sont conservées à - 20°C et à l'abri de la lumière.

III.3.1.4. Prétraitement des échantillons

Dans le cas du dosage sérique, le sang est recueilli dans un tube sec et est ensuite centrifugé à 3500 tr/min et à +4°C pendant 10 minutes. Après centrifugation, 50 µL sont déprotéinisés par une acidification par l'acide métaphosphorique. Pour avoir une déprotéinisation complète, le mélange est agité 1 minute au vortex, puis centrifugé pendant 10 minutes à la même vitesse. Le surnageant est ainsi récupéré et conservé à -20°C ou à -80°C de préférence jusqu'à l'analyse en série HPLC.

III.3.1.5. Procédure du dosage

Il est à noter que les deux dosages de l'DHA ne se font pas dans le même échantillon. Deux séries sont nécessaires pour pouvoir déterminer la concentration sérique en acide ascorbique. Chaque série nécessite la préparation de standards internes et la calibration du système avec les deux solutions étalons d'acide ascorbique.

- Dosage du DHA sérique

Dans les conditions physiologiques normales, les concentrations sériques en acide déhydro-ascorbique sont faibles comparées à celles de l'anion ascorbate. Pour cette raison, lors du dosage du DHA, les standards internes et les solutions de calibration C_1 et C_2 sont 10 fois moins concentrés que lors du dosage du DHA total. Les sérums à doser sont préparés comme suit : à 200 µL du surnageant décongelé, il est ajouté,

- 50 µL de SI
- 250 µL d'acétate de sodium
- 1 mL d'OPD

50 µL de ce mélange sont prélevés et injectés manuellement dans la chaîne. Le dosage du DHA se fait échantillon par échantillon car la forme réduite de l'acide ascorbique s'oxyde rapidement quand elle est en contact avec les réactifs.

- Dosage du DHA total

Pour le dosage de l'ADHA total, les échantillons sont passés en même temps que les deux solutions d'étalonnage. Cette fois-ci, à 100 µL du surnageant sont ajoutés,

- 50 µL de ferricyanure de potassium
- 50 µL de SI
- 250 µL d'acétate de sodium
- 1 mL d'OPDA

Le mélange est maintenu au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. Refroidis dans la glace, 50 µL sont prélevés, mis dans les flacons ambrés Dionex et injectés dans le système aidé d'un passeur d'échantillon. Le dosage se fait automatiquement.

Les concentrations en DHA sont calculées selon la formule (III-1) après intégration des pics du chromatogramme.

$$\text{Concentration}_{\text{sérum}} = \frac{\text{Surface du pic}_{\text{sérum}} \times \text{Concentration}_{\text{solution étalon}}}{\text{Surface du pic}_{\text{solution étalon}}} \quad (\text{III-1})$$

La figure III.2 présente l'allure générale d'un chromatogramme obtenu lors du dosage de l'DHA total.

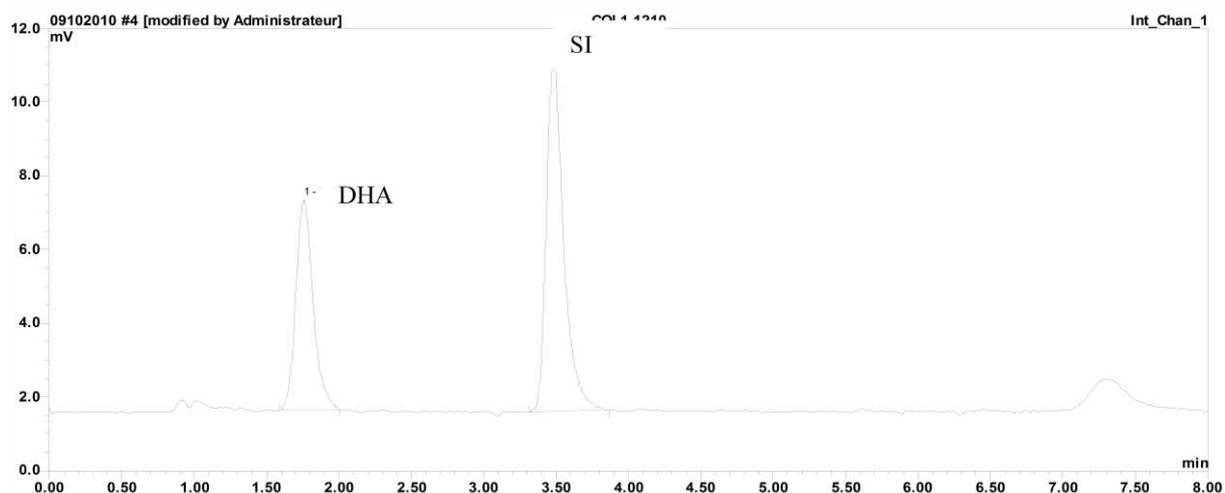


Figure III.2. Chromatogramme du dosage de l'acide déhydro-ascorbique total.

III.3.1.6. Performances analytiques de la technique

La répétabilité et la reproductibilité de la méthode sont étudiées pour les concentrations en acide ascorbique C_1 et C_2 .

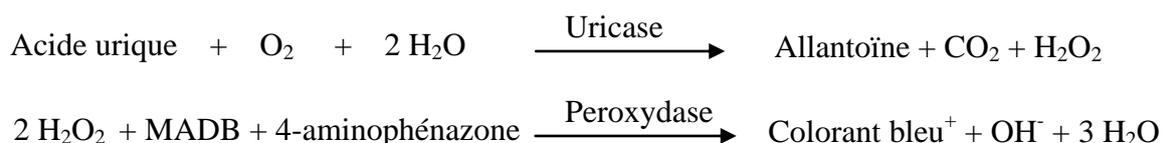
- Répétabilité : CV = 2,5 % pour C_1 et 3,6 % pour C_2 .
- Reproductibilité : CV = 9 % pour C_1 et 8 % pour C_2 .
- Limite de détection : 1,4 µmol.L⁻¹.
- Limite de quantification : 5 µmol.L⁻¹.

La méthode est validée par la Société Francophone Vitamines & Biofacteurs SFVB dans le cadre d'une campagne qualité en vue d'accréditation COFRAQ – ISO 15189 réalisée 4 fois par an.

III.3.2. Dosage de l'acide urique

III.3.2.1. Principe du dosage

L'acide urique présent dans le sérum sanguin est dosé par spectrométrie ^[11]. L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne. Le peroxyde d'hydrogène, produit lors de la réaction précédente, réagit avec le sel disodique N,N-bis(4-sulfobutyl)-3,5-diméthylaniline (MADB) et la 4-aminophénazone en présence de peroxydase pour produire un chromophore quantifiable par spectrométrie.



L'acide urique est stable dans le sérum ou le sérum EDTA pendant 7 jours si l'échantillon est conservé entre 2 et 8°C et pendant 3 jours entre 15 et 25°C. Afin d'éviter la précipitation de l'urate dans l'échantillon, il est conseillé d'ajouter un volume suffisant d'hydroxyde de sodium pour amener le pH entre 8 et 9.

III.3.2.2. Matériels et réactifs

Le dosage de l'acide urique est réalisé avec les équipements et réactifs suivants :

- un spectromètre pour la lecture en bichromatisme à 660/800 nm
- un bain thermostaté à 37 °C
- des tubes à essais
- une solution de tampon phosphate à 42 mmol.L⁻¹ pH 7,5
- une solution de MADB à 0,15 mmol.L⁻¹
- une solution de 4-aminophénazone à 0,30 mmol.L⁻¹
- une solution étalon d'acide urique à 431 µmol.L⁻¹ fournie par Beckman
- une solution de peroxydase d'activité ≥ 5,9 kU.L⁻¹ (98 µkat.L⁻¹)
- une solution d'uricase d'activité ≥ 0,25 kU.L⁻¹ (4,18 µkat.L⁻¹)
- une solution d'ascorbate-oxydase d'activité ≥ 1,56 kU.L⁻¹ (26 µkat.L⁻¹)

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau distillée et sont conservées entre 2 et 8 °C. Elles sont utilisables tant que des signes de dégradation n'apparaissent pas (présences de particules, turbidité...)

III.3.2.3. Procédure du dosage

Les réactifs sont placés pendant quelques minutes à température ambiante ou dans le bain thermostaté. Dans le tableau III.2 sont résumées les conditions opératoires adoptées pour le dosage de l'acide urique et pour l'étalonnage de l'analyseur. Le réactif A est une solution qui contient le tampon phosphate, le MADB, le 4-aminophénazone, la peroxydase, l'uricase et l'ascorbate-oxydase.

	Blanc	Etalon	Sérum
Eau distillée	25 µL	-	-
Etalon acide urique	-	25 µL	-
Echantillon	-		25 µL
Réactif A	1 mL	1 mL	1 mL

Tableau III.2. Conditions opératoires pour le dosage de l'acide urique et la calibration de l'analyseur.

Les solutions ainsi préparées sont d'abord bien agitées puis incubées pendant 10 minutes à température ambiante (16-25°C) ou pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon sont lues à 660 nm.

La concentration en acide urique est calculée selon la formule (III-2)

$$\text{Concentration}_{\text{sérum}} = \frac{A_{\text{sérum}}}{A_{\text{étalon}}} \times C_{\text{étalon}} \times \text{facteur de dilution} \quad (\text{III-2})$$

III.3.2.4. Performances analytiques

Dans le tableau III.3 sont portés les résultats obtenus avec l'appareil OLYMPUS en utilisant 3 sérums de concentrations en acide urique différentes $S_1 = 171 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $S_2 = 388 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $S_3 = 1362 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Performances	Sérums		
	S ₁	S ₂	S ₃
Répétabilité (CV %)	1,11	1,55	0,73
Reproductibilité (CV %)	1,71	2,44	2,12
Limite de détection ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	2		
Domaine de linéarité ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	89 – 1785		

Tableau III.3. Performances analytiques de la technique de détection d'acide urique par l'analyseur Olympus.

Le spectrophotomètre automatisé Olympus est muni d'un système d'étalonnage pour l'analyse du sérum. Les valeurs en acide urique du calibre sont conformes à la méthode de référence par spectrométrie de masse par dilution isotopique. Le calibre est réétalonné tous les 30 jours. Des contrôles externes sont réalisés et validés par Biorad®.

III.4. Dosage électrochimique des acides ascorbique et urique

III.4.1. Matériels et réactifs

Les sérums sanguins proviennent du laboratoire de biochimie et sont congelés dans des tubes bruns. Ils sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Précisons que ces sérums sont centrifugés mais qu'ils ne sont pas été déprotéinisés.

Les mesures électrochimiques sont réalisées avec le même montage expérimental que celui décrit dans le paragraphe II.3.2.1. Les microélectrodes d'or de rayon égal à $24 \mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$ sont modifiées par électropolymérisation de PEDOT selon la procédure décrite dans le paragraphe II.3.2 et sous les conditions opératoires suivantes : une concentration en monomère de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, un balayage de potentiel entre $-0,88$ et $1,5 \text{ V}$ à une vitesse de balayage de 250 mV.s^{-1} . Pour le dosage des acides ascorbique et urique, la voltammétrie impulsionnelle différentielle est utilisée avec les paramètres décrits dans le paragraphe II.3.3.4.

III.4.2. Procédure de dosage des deux acides dans le sérum sanguin

Les mesures électrochimiques sont réalisées directement dans 250 μL de sérum sans ajout d'électrolyte support ou de diluant. Le sérum est désaéré par barbotage d'azote pendant 10 minutes. Durant l'expérience, un flux d'azote est maintenu à la surface de la solution.

Dans une première série de mesures, la fenêtre de potentiel est fixée entre -0,2 et 0,7 V. Cette fenêtre est choisie dans le but de détecter le maximum de molécules sériques susceptibles de s'oxyder à l'électrode.

Le voltammogramme impulsionnel obtenu dans un des sérums analysés est présenté dans la figure III.3.

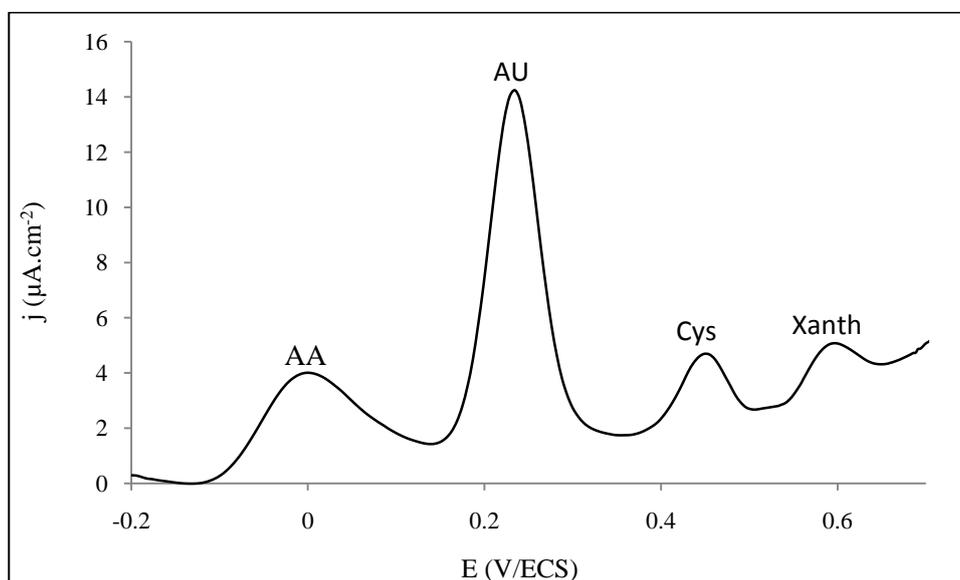


Figure III.3. Voltammogramme impulsionnel sur une μAu -PEDOT obtenu directement dans un sérum sanguin.

Ce voltammogramme montre plusieurs pics anodiques qui sont identifiés par la méthode des ajouts dosés. Les pics enregistrés à -0,004, 0,234, 0,449 et 0,592 V correspondent respectivement à l'acide ascorbique, l'acide urique, la cysteine et la xanthine. Afin d'éviter que l'oxydation électrochimique de la xanthine ne modifie la concentration d'acide urique (paragraphe II.3.8), la fenêtre d'analyse est réduite entre -0,2 et 0,4 V pour le reste de l'étude.

Quelques sérums laissent apparaître un pic supplémentaire enregistré vers 0,125 V (figure III.4). Conformément à l'étude menée au paragraphe II.3.8 sur les espèces interférentes, ce pic a été attribué à la dopamine.

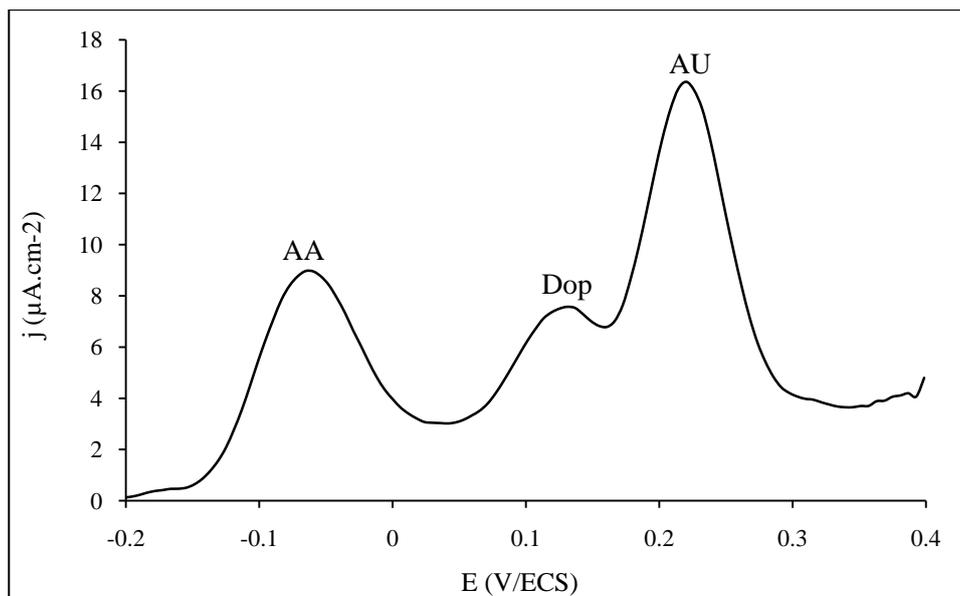


Figure III.4. Voltammogramme impulsionnel sur une $\mu\text{Au-PEDOT}$ obtenu directement dans un sérum sanguin contenant la dopamine.

La concentration des deux acides est déterminée par la méthode des ajouts dosés. La figure III.5 montre les voltammogrammes impulsionnels différentiels obtenus avec des sérums sanguins dans lesquels sont ajoutés des concentrations croissantes d'acides ascorbique (III.5.a) et urique (III.5.b). Les différents ajouts provoquent d'une part une augmentation de la densité de courant du pic suite à l'enrichissement du milieu avec une des deux molécules et d'autre part la diminution du signal du second pic par effet de dilution.

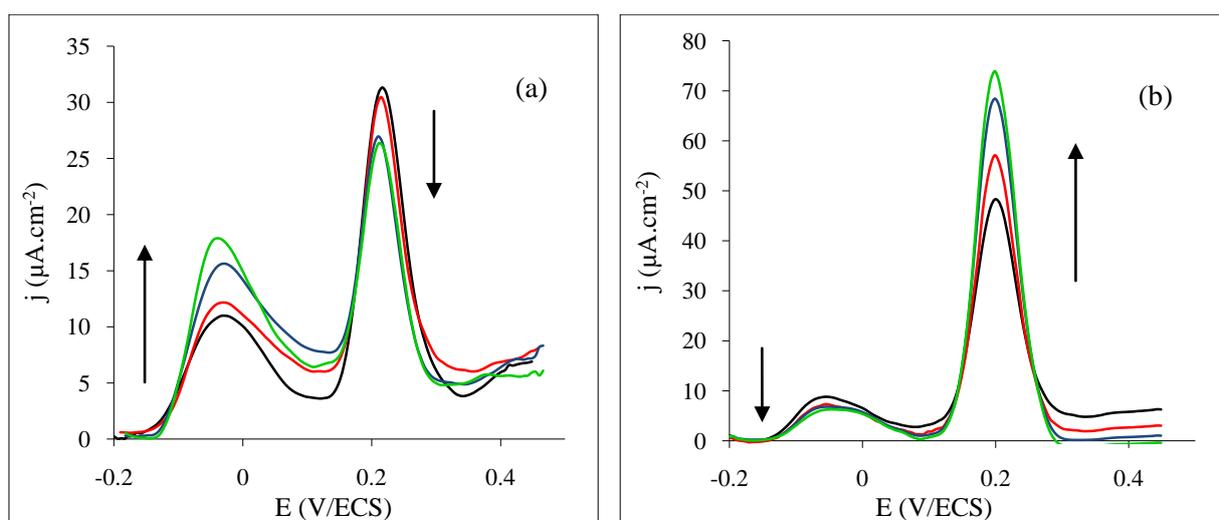


Figure III.5. Voltammogrammes impulsionnels sur une $\mu\text{Au-PEDOT}$ obtenu directement dans des sérums sanguins (noir) et en fonction des ajouts d'acide ascorbique (a) et d'acide urique (b).

La figure III.6 indique les droites d'étalonnage résultantes, respectivement pour les acides ascorbique (III.6.a) et urique (III.6.b). L'intersection de ces droites avec les axes des abscisses permet de déterminer les concentrations initiales dans le sérum. Dans la plupart des cas, une calibration avec un seul point suffit pour la détermination de la concentration de l'espèce dans le sérum sanguin.

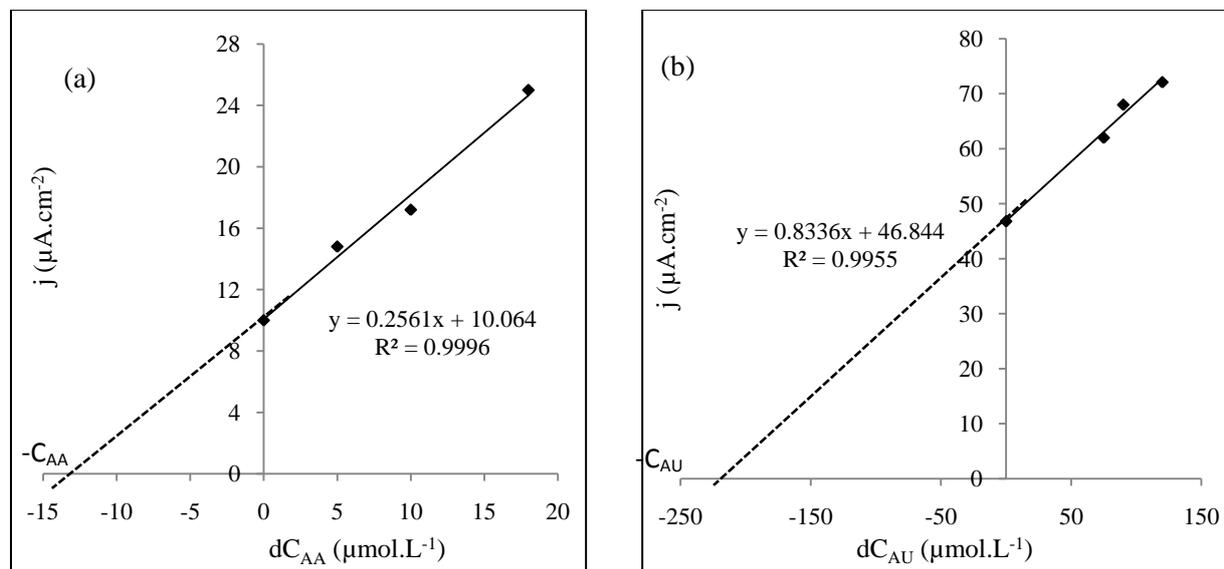


Figure III.6. Droites d'étalonnage obtenues par la méthode des ajouts dosés pour l'acide ascorbique (a) et l'acide urique (b).

35 sérums ont été analysés. La comparaison des résultats des dosages électrochimiques avec ceux obtenus par les méthodes chromatographique (paragraphe III.3.1) et enzymatique (paragraphe III.3.2) est représentée dans les figures III.7 a et b.

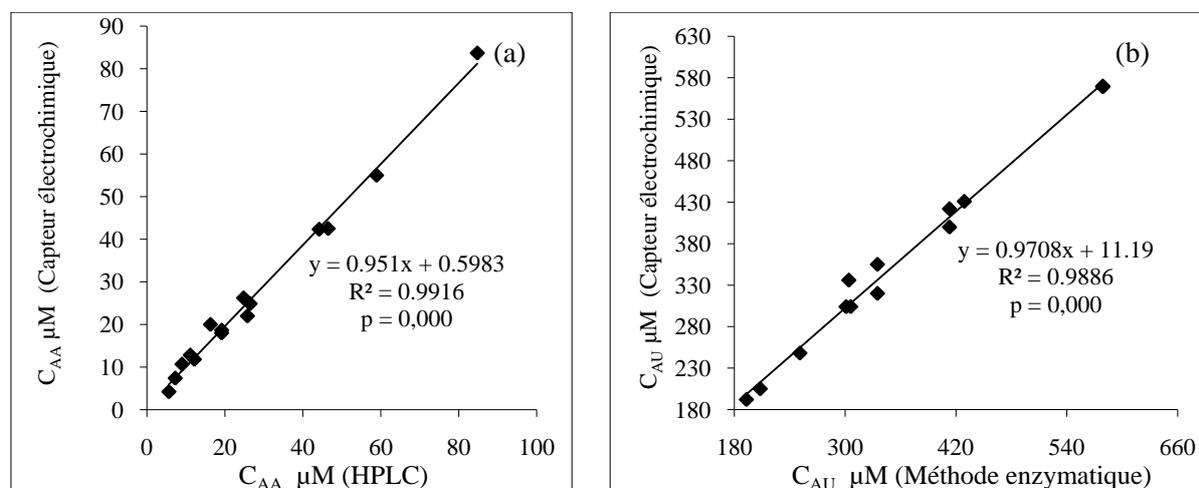


Figure III.7. Graphiques comparatifs des résultats du microcapteur électrochimique et des méthodes chromatographique pour le dosage de l'acide ascorbique (a) et enzymatique pour le dosage de l'acide urique (b).

Ces graphiques de comparaison révèlent une bonne corrélation entre la méthode électrochimique et les méthodes classiques de détection, dans la gamme des concentrations physiologiques normales (cf. tableau III.1).

III.4.3. Performances analytiques

Le tableau III.4 résume les performances analytiques du microcapteur voltammétrique.

Performances	n	Acide ascorbique	Acide urique
Répétabilité (CV %)	3	5,28	4,87
Reproductibilité (CV %)	4	7,41	5,4

Tableau III.4. Performances analytiques du microcapteur électrochimique.

Les résultats de cette étude sont prometteurs. Ils montrent que la mesure électrochimique directe dans le sérum sanguin avec une microélectrode à interface modifiée a le même degré de fiabilité que les méthodes analytiques classiques. Néanmoins, la méthode électrochimique est plus simple à mettre en place, notamment pour le dosage de l'acide ascorbique : l'étape de prétraitement des sérums sanguins est éliminée et seul l'anion ascorbate, impliqué dans le système de défense antioxydant, est dosé.

Dans la bibliographie, plusieurs études ont été consacrées à la conception de capteurs électrochimiques spécifiques pour la détection simultanée des acides ascorbique et urique dans les liquides physiologiques. Parmi ces travaux, rares sont ceux qui sont parvenus à doser les deux acides simultanément. Souvent seul l'acide urique est détecté dans les sérums et les urines ^[12-23]. Quand à l'acide ascorbique, il est dosé soit à partir de comprimés de vitamine C dissous ^[24-26], soit dans des sérums synthétiques ^[27-29] ou des mélanges de vitamines ^[30]. Quelquefois, il est dosé dans des sérums et des urines dilués, contenant initialement l'acide ascorbique à des concentrations élevées suite à l'ingestion de vitamine C ^[25, 31-33]. Wang ^[34] et Zhang ^[35] ont quant à eux déterminé des concentrations physiologiques d'acide ascorbique dans des urines.

Comparée à ces travaux, particulièrement ceux utilisant une électrode fonctionnalisée par le PEDOT ^[16, 37-44], l'originalité de cette étude réside dans l'analyse directe de sérum sans traitement préalable de l'échantillon et le dosage des deux espèces antioxydantes dans des gammes de concentrations en accord avec les concentrations physiologiques normales.

III.5. Justesse du capteur

Pour l'acide ascorbique, les résultats n'ont pas toujours été justes ; pour quelques sérums, la détection électrochimique a donné des résultats en désaccord avec ceux obtenus par chromatographie. Le tableau III.5 reporte ces cas.

Sérum	Concentration sérique en acide ascorbique ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	Capteur électrochimique	HPLC
1	156	17,25
2	120	9,75
3	54	25
4	90	7
5	39	87

Tableau III.5. Comparaison des résultats obtenus avec le microcapteur et la chromatographie HPLC pour le dosage de l'acide ascorbique.

Pour expliquer ces discordances, deux hypothèses ont été explorées, qui se basent sur l'effet de la matrice du sérum sur la mesure électrochimique. D'une part, le sérum sanguin est un milieu très complexe qui contient des molécules, telles que les protéines, susceptibles de modifier l'état de surface de l'électrode, notamment par adsorption. Cet effet est d'autant plus important que les sérums sont dosés directement sans aucune dilution. D'autre part, le sérum peut aussi comporter dans sa composition des molécules à l'état oxydé, des cations métalliques libres et/ou des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, susceptibles de réagir avec l'acide ascorbique introduit par les ajouts, modifiant alors la justesse des droites d'étalonnage.

Une analyse exhaustive de la composition des sérums du tableau III.5 aurait pu être envisagée pour vérifier ces hypothèses et expliquer l'origine de la différence entre les résultats. La difficulté réside toutefois dans la composition très complexe du sérum sanguin et du nombre considérable d'espèces suspectées de réagir avec l'acide ascorbique. Une approche alternative a été adoptée, consistant à réaliser des séries d'expériences avec deux sérums. Le premier, désigné « sérum A », fait partie de la catégorie pour laquelle les mesures électrochimique et chromatographique sont en accord ; le second est le sérum 2 du tableau III.5, désigné « sérum B ».

III.5.1. Effet de la matrice sur l'état de surface de l'électrode

La première série de manipulation a pour objectif de mettre en évidence un éventuel phénomène d'adsorption d'espèce(s) contenue(s) dans les sérums. Plusieurs courbes intensité-potentiel à l'état quasi-stationnaire sont tracées avec la $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution aqueuse d'acide ascorbique à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Entre chaque courbe, l'électrode est laissée en contact, soit avec une solution de tampon phosphate, soit avec l'un des deux sérums, pendant des durées de temps croissantes. L'électrode modifiée est ensuite rincée à l'eau distillée et séchée.

La figure II.8 montre les courbes obtenues lorsque l'électrode est mise en contact avec le tampon phosphate. Aucune évolution n'est notée : les voltammogrammes restent identiques même après 12 minutes d'immersion.

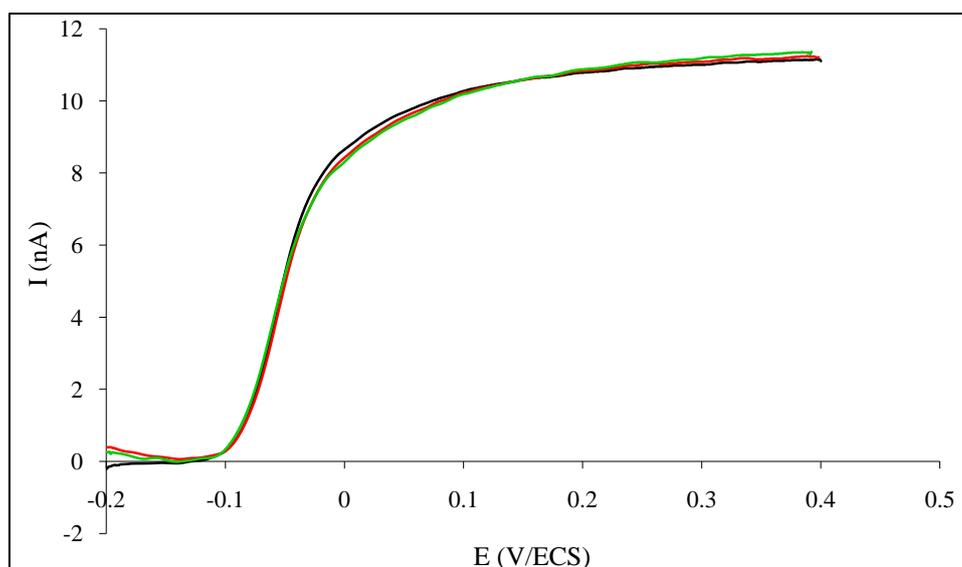


Figure III.8. Voltammogrammes obtenus sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide ascorbique à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en fonction du temps d'immersion de la microélectrode dans une solution de tampon phosphate 0.1 mol.L^{-1} pH 7 : (noir) 0 s, (rouge) 240 s, (vert) 420 s, Vitesse de balayage : 6 mV.s^{-1} .

La figure III.9 présente les résultats de mesures similaires effectuées en mettant la $\mu\text{Au-PEDOT}$ en contact respectivement avec le sérum A (figure III.9.a) et avec le sérum B (figure III.9.b). Quel que soit le sérum utilisé, les voltammogrammes montrent un déplacement de la vague d'oxydation de l'acide ascorbique d'environ $0,02 \text{ V}$ vers les potentiels anodiques ainsi qu'une diminution de la vitesse du transfert électronique hétérogène. Ceci confirme l'hypothèse précédemment évoquée : mettre l'électrode en contact avec les sérums modifie son état de surface, éventuellement suite à l'adsorption de constituants du sérum.

Cette modification de surface explique le fait que dans le sérum les pics d'oxydations des acides ascorbique et urique sont enregistrés à des potentiels plus anodiques que dans les solutions modèles.

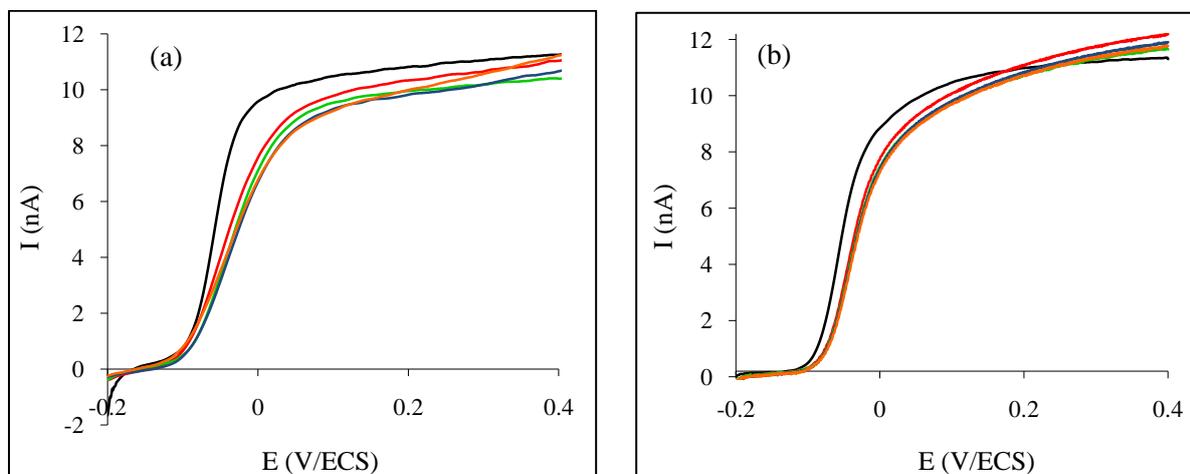


Figure III.9. Voltammogrammes obtenus sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide ascorbique à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, en fonction des temps d'immersion de la microélectrode dans les sérums A (a) et B (b) : (noir) 0 s, (rouge) 30 s, (vert) 90 s, (bleu) 240 s, (orange) 420 s. Vitesse de balayage : 6 mV.s^{-1} .

La figure III.10 montre l'évolution du courant d'oxydation de l'acide ascorbique, enregistré au potentiel de $0,05 \text{ V}$ en fonction du temps de contact avec les sérums. On observe d'une part une diminution du courant, même pour des temps de contact courts (30 secondes). Une immersion prolongée n'induit pas de diminution supplémentaire majeure du courant. Ce résultat met en évidence la rapidité du phénomène. D'autre part, la diminution du signal est du même ordre de grandeur dans les deux cas. En conséquence, le phénomène de modification de surface induit par la mise en contact de l'électrode avec le sérum ne permet pas d'expliquer les différences de résultats rassemblés dans le tableau III.5.

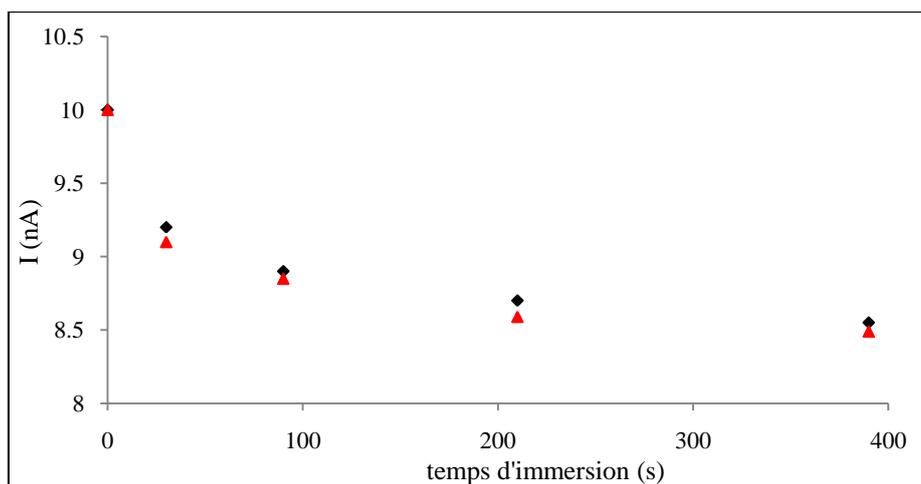


Figure III.10. Evolution de l'intensité du courant d'oxydation de l'acide ascorbique à 0,05 V en fonction des temps d'immersion dans les sérums A (◆) et B (▲).

III.5.2. Consommation de l'acide ascorbique au cours de la procédure d'étalonnage

Afin de valider la seconde hypothèse, i.e. la présence d'espèces dans le sérum réagissant avec les ajouts d'acide ascorbique introduits lors de l'établissement de la courbe d'étalonnage, une autre série d'expérience est menée. Dans un premier temps, une droite d'étalonnage est tracée dans une solution de tampon phosphate contenant l'acide ascorbique à une concentration comprise entre 5 à 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Dans une seconde étape, des ajouts successifs de sérum A ou B sont effectués dans 400 μL de tampon phosphate contenant l'acide ascorbique à 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les deux droites d'étalonnage peuvent alors être comparées.

Les figures III.11 a et b présentent le voltammogramme obtenu dans 400 μL d'acide ascorbique à 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ainsi que ceux enregistrés après les ajouts successifs des sérums A et B respectivement. L'ajout de sérum provoque un déplacement de la vague d'oxydation vers les potentiels anodique et une diminution de l'intensité d'oxydation de l'acide ascorbique suite aux dilutions. Une deuxième vague d'oxydation est enregistrée vers 0,17 V et son intensité augmente linéairement avec les ajouts. Cette vague peut être attribuée à l'oxydation de l'acide urique provenant du sérum.

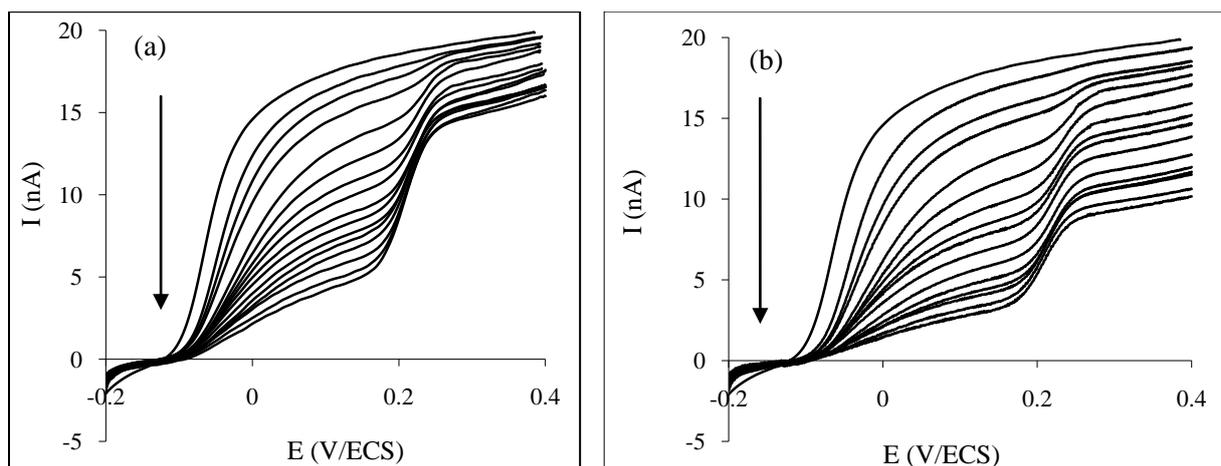


Figure III.11. Voltammogrammes obtenus sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide ascorbique initialement à $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$, en fonction d'ajouts successifs des sérums A (a) et B (b).

Le traitement des voltammogrammes des figures III.11 a et b a permis d'établir les droites d'étalonnage de l'acide ascorbique en présence des deux sérums. Les intensités de courant sont lues directement sur les voltammogrammes au potentiel de 0,1V et les concentrations sont recalculées en tenant compte des dilutions et des ajouts en acide ascorbique présents dans les deux sérums. Les figures III.12 et III.13 présentent les droites obtenues, qui sont comparées à celle établie dans le tampon phosphate.

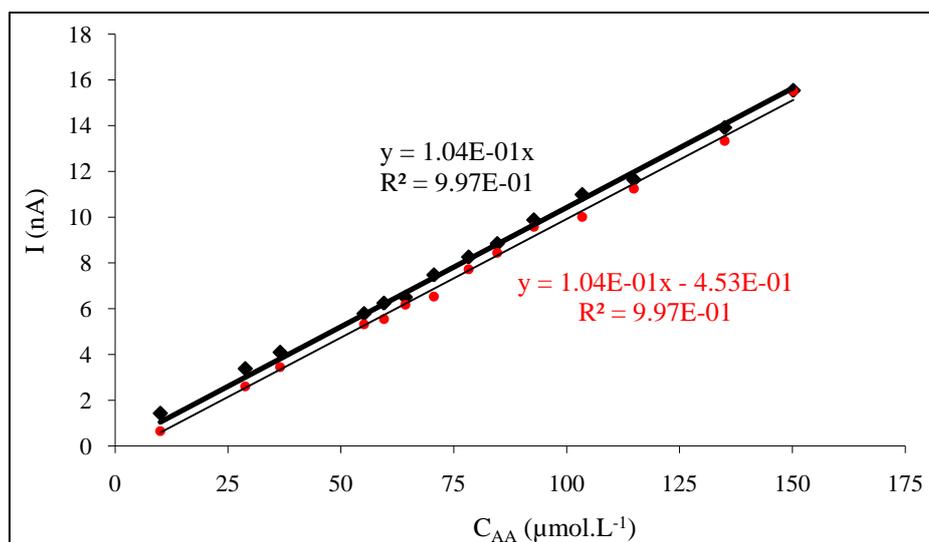


Figure III.12. Droites d'étalonnage de l'acide ascorbique sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ établies dans une solution de tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH7 (♦) et en présence du sérum A (●).

Dans le cas du sérum A (figures III.12), la pente de la droite d'étalonnage est légèrement inférieure à celle obtenue avec une solution tampon. La diminution du signal est d'environ 10%. En se basant sur les résultats de l'effet de la matrice, cette diminution peut être expliquée par la modification de l'état de surface de l'électrode suite à l'adsorption des composants du sérum.

Avec les ajouts du sérum B, les intensités de courant sont largement plus faibles que celles qui sont obtenues avec le tampon phosphate (figure III.13). En outre, l'écart entre les deux mesures est de plus en plus important en fonction des ajouts du sérum B vers les concentrations décroissantes. La figure III.14 indique la différence entre les intensités obtenues dans les deux solutions en fonction de la fraction volumique du sérum B dans le mélange. La relation linéaire laisse à penser que le sérum sanguin contient des espèces à l'état oxydé qui peuvent être réduites par l'acide ascorbique.

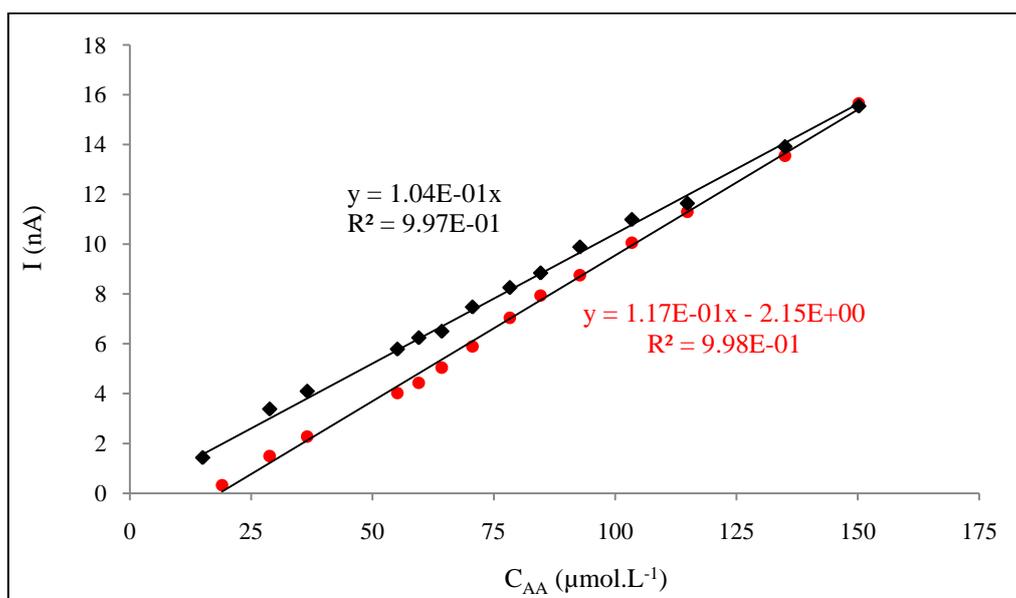


Figure III.13. Droites d'étalonnage d'acide ascorbique sur $\mu\text{Au-PEDOT}$ établies dans une solution de tampon phosphate 0.1 mol.L^{-1} pH7 (♦) et en présence du sérum B (●).

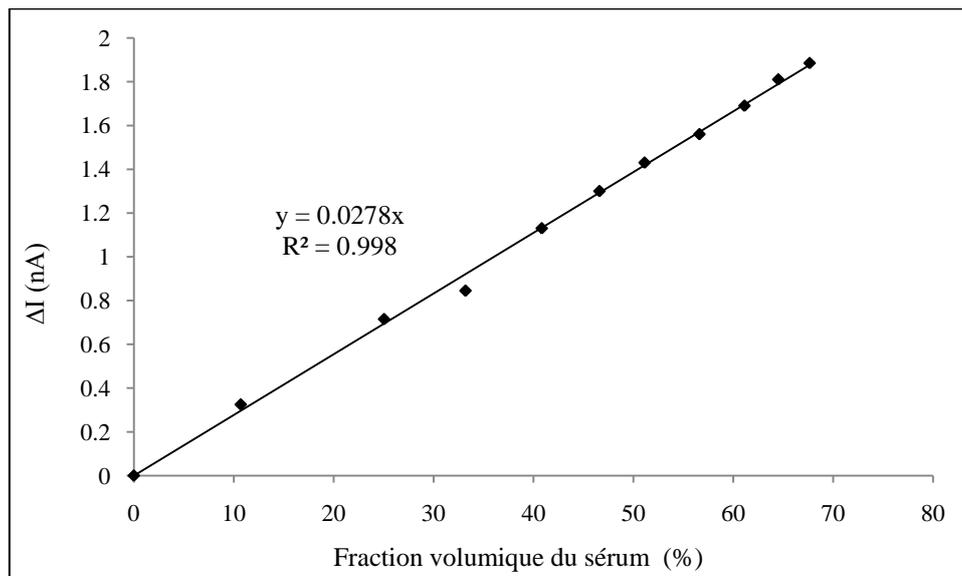


Figure III.14. Evolution de l'écart des intensités de courant d'oxydation de l'acide ascorbique en fonction de la fraction volumique du sérum B dans la solution d'étalon.

A partir de ces résultats, il est possible de supposer que les droites d'étalonnage établies avec les sérums du tableau III.5 sont incorrectes, puisqu'elles sont tracées en fonction des concentrations d'acide ascorbique ajoutées qui sont probablement surestimées par rapport aux teneurs réellement présentes dans le milieu pendant la mesure. La figure III.15 illustre la reconstitution possible des droites d'étalonnage qui permettra de retrouver des valeurs de concentrations d'acide ascorbique comparables à celles obtenues par HPLC. la chromatographie.

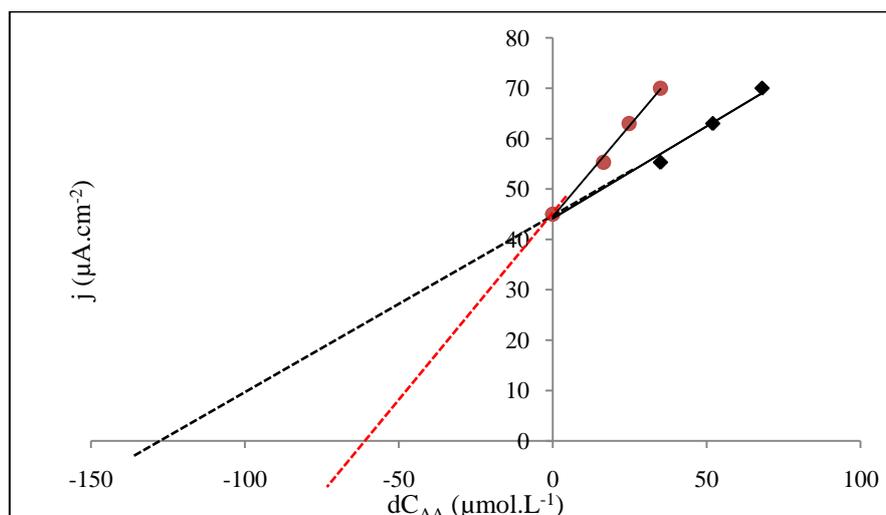


Figure III.15. Illustration de la reconstitution des droites d'étalonnage réalisées avec les sérums du tableau III.5. (◆) concentrations surestimées ; (●) concentrations réelles

Pour tenter de cerner les molécules du sérum impliquées dans la réaction de consommation de l'acide ascorbique ajouté, une 3^{ème} étude est lancée. Elle consiste à doser l'acide ascorbique de sérums provenant de patients en soins intensifs et présentant des signes particuliers tels que :

- un taux de ferritine élevé
- un taux de fer bas
- un taux de cholestérol élevé

Une droite d'étalonnage est établie par ajouts dosés d'acide ascorbique dans 400 μ L de sérum. Des mesures électrochimiques et chromatographiques sont réalisées en parallèle afin de vérifier la concentration en acide ascorbique tout le long du tracé de la droite. Pour cela, 50 μ L du sérum sont prélevés après chaque ajout d'acide ascorbique afin d'être analysés par HPLC. La solution mère d'acide ascorbique utilisée pour les ajouts est également analysée. Le tableau III.6 regroupe les résultats obtenus avec 5 sérums. Pour chaque sérum sont indiquées la concentration initiale d'acide ascorbique obtenue par analyse chromatographique, les variations de concentrations dues aux 3 ajouts et deux résultats obtenus avec le capteur électrochimique ; le premier (noté C_{cal1}) est obtenu en utilisant les droites d'étalonnage établies avec les concentrations simplement calculées, le second (noté C_{cal2}) repose sur les droites d'étalonnage tracées avec les concentrations réelles déterminées par HPLC.

Sérums	C_{AA} sérique (HPLC)	$C_{ajoutée} = 20$	$C_{ajoutée} = 36$	$C_{ajoutée} = 50$	C_{AA} sérique (capteur)	
		C_{HPLC}	C_{HPLC}	C_{HPLC}	C_{cal1}	C_{cal2}
1	11,23	16,23	32,62	43,58	22,24	12,82
2	24,82	17	33	39	35	26,23
3	7,27	14,65	37,89	37,43	16,66	7,4
4	44,20	19,94	37,35	51,85	41,74	42,34
5	5,62	21,23	35,96	48,74	4,16	4,22

Tableau III.6. Comparaison des résultats obtenus par chromatographie et par le capteur électrochimique pour le dosage de l'acide ascorbique sérique.

Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur la nature des espèces du sérum impliquées. Comme pour les résultats du tableau III.5, une différence est observée avec certains sérums selon que le microcapteur électrochimique ou la méthode chromatographique est utilisé, alors que les résultats sont très similaires avec d'autres sérums.

En revanche, dans la première situation, la réponse du capteur est systématiquement corrigée lorsque les droites d'étalonnage sont établies à l'aide des concentrations étalons déterminées par chromatographie. Ce dernier résultat vérifie la justesse de la réponse ampérométrique du capteur, et valide la seconde hypothèse évoquée selon laquelle les concentrations d'acide ascorbique dans les solutions d'étalonnage sont inférieures à celle théoriquement calculées, certainement en raison d'une réaction de consommation de l'acide ascorbique par des espèces contenues dans le sérum. Il est probable que cette réaction de consommation de l'acide ascorbique soit provoquée par des espèces oxydées engendrées au cours de la mesure électrochimique.

Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent les potentialités des microélectrodes fonctionnalisées par le PEDOT pour le dosage simultané des acides ascorbique et urique dans le sérum sanguin.

Les résultats du microcapteur électrochimique sont obtenus dans des sérums n'ayant subi aucun prétraitement ou dilution. La méthode proposée permet donc un gain de temps considérable particulièrement pour le dosage de l'acide ascorbique, puisqu'elle élimine l'étape du prétraitement et qu'elle dose directement la forme réduite de l'acide ascorbique, seule forme impliquée dans le système de défense antioxydant. Un résultat électrochimique est obtenu en 5 minutes au maximum (en fonction du nombre des ajouts faits), alors que chaque série de mesure chromatographique nécessite entre 15 et 20 minutes. Des mesures électrochimiques réalisées avec étalonnage en un point ont donné des résultats assez satisfaisants tout en réduisant encore plus le temps du dosage. Ce gain de temps peut s'avérer très bénéfique pour le diagnostic et le suivi thérapeutique. Sans compter l'éventuelle économie induite par la mesure électrochimique, alors que le coût d'un dosage d'acide ascorbique au laboratoire biochimie de l'hôpital Rangueil est évalué entre à 37,80 € et celui de l'acide urique à 2,16 €.

Références bibliographiques

- [1] A. Stahl, J. Agneray, G. Férard, J. C. Fruchert, J. C. Jardilier, A. Revol, G. Sies ; *Biochimie Clinique*. SIMEP Paris, 1988.
- [2] P. Boulanger, J. Polonovski, F. Tayeau, P. Mandel, G. Biserte ; *Biochimie Médicale*. Masson Paris, 1971.
- [3] J.-P. Darchis, E. Denarie, S. Poignant, R. Talec, M. Boutry ; *Analyse des activités des laboratoires médicaux pour les examens automatisés. Exemple à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière*. ITBM-RBM, 26 (2005) 150-158.
- [4] J. Koolman, K.-H, Rohm ; *Biochimie*. Flammarion Paris, 2006.
- [5] F. Horn, G. Lindenmeier, C. Grollhosl, I. Moc, S. Berghold, N. Schneider, B. Munster ; *Biochimie Humaine*. Flammarion Paris, 2005.
- [6] Y. Zhao, X. Yang, W. Lu, H. Liao, F. Liao ; *Uricase based methods for determination of uric acid in serum*. *Microchim Acta*, 164 (2009) 1-6.
- [7] S. L. Feng, J. Wang, X. G. Chen, J. Fan ; *Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite*. *Spectrochim. Acta*, 61 (2005) 841- 844.
- [8] H.-W. Park, S.-M. Alam, S.-H. Lee, M.-M. Karim, S.- M. Wabaidur, M. Kang, J.-H. Choi ; *ascorbic acid sensor based on the fluorescence quenching of silver nanoparticles*. *Luminescence*, 24 (2009) 367-371.
- [9] M. C. Polidori, W. Stahl, O. Eichler, I. Niestroj, H. Sies ; *Profiles of antioxidants in human plasma*. *Free Rad. Biol. Med.*, 30 (2001) 456-462.
- [10] A.-J. Speek, J. Schrijver, W.-H. Scheur ; *Fluorimetric determination of total vitamin C in whole blood by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization*. *J. Chromatogr.*, 305 (1984) 53-60.
- [11] D. Barham, P. Trinder ; *An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxudase system*. *Analyst*, 97 (1972) 142-145.
- [12] A. Özcan, Y.Sahin ; *Preparation of selective and sensitive electrochemically treated pencil graphite electrodes for the determination of uric acid in urine and blood serum*. *Biosens. Bioelectron*, 25 (2010) 2497-2502.
- [13] R. M. A.Tehrani, S. A. Ghani ; *Voltammetric analysis of uric acid by zinc-nickel nanoalloy coated composite graphite*. *Sens. Actuators B.*, 145 (2010) 20-24.

- [14] M. Noroozifar, M. K. Motlagh, A. Taheri ; *Preparation of silver hexacyanoferrate nanoparticles and its application for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid*. Talanta, 80 (2010) 1657-1664.
- [15] R. P. da Silva, A.-W. O. Lima, S. H. P. Serrano ; *Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution*. Anal. Chim. Acta, 613 (2008) 89-98.
- [16] S. R. Jeyalakshmi, S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using PEDOT polymer modified electrode* ; Indian J. Chem., Sect. A., 46 A (2007) 957-961.
- [17] A. Safavi, N. Maleki, O. Moradlou, F. Tajabadi ; *Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode*. Anal. Biochem., 359 (2006) 224-229.
- [18] L. Xiao, J. Chen, C.-S. Cha ; *Elimination of the interference of ascorbic acid in the amperometric detection of biomolecules in body fluid samples and the simple detection of uric acid in human serum and urine by using the powder microelectrode technique*. Anal. Chem., 495 (2000) 27-35.
- [19] E. Popa, Y. Kubota, D.-A. Tryk, A. Fujishima ; *Selective voltammetric and amperometric detection of uric acid with oxidized diamond film electrodes*. Anal. Chem., 72 (2000) 1724-1727.
- [20] Y. Li, X. Lin ; *Simultaneous electroanalysis of dopamine, ascorbic acid and uric acid by poly (vinyl alcohol) covalently modified glassy carbon electrode*. Sens. Actuators B., 115 (2006) 134-139.
- [21] S. Shahrokhian, H.-R. Zare-Mehrjardi, H. Khajehsharifi ; *Modification of carbon paste with congo red supported on multi-walled carbon nanotube for voltammetric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid*. J. Solid Electrochem., 13 (2009) 1567-1575.
- [22] S. Zhu, H. Li, W. Niu, G. Xu ; *Simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine, and ascorbic acid at single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode*. Sens. Actuators B., 25 (2009) 940-943.
- [23] S. A. Kumar, H.-W. Cheng, S.-M. Chen ; *Selective detection of uric acid in the presence of ascorbic acid and dopamine using polymerized luminol film modified glassy carbon electrode*. Electroanalysis, 21 (2009) 2281-2286.
- [24] B. Habibia, M.-H. Pournaghi-Azarb ; *Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by use of a MWCNT modified carbon-ceramic electrode and differential pulse voltammetry*. Electrochim. Acta, 55 (2010) 5492-5498.

- [25] M. B. Gholivand, M. Amiri ; *Preparation of polypyrrole/nuclear fast red films on gold electrode and its application on the electrocatalytic determination of methyl-dopa and ascorbic acid*. *Electroanalysis*, 21 (2009) 2461-2467.
- [26] T. Selvaraju, R. Ramaraj ; *Simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and homovanillic acid at copper modified electrode*. *Electrochim. Acta*, 52 (2007) 2998-3005.
- [27] A. Ensafi, M. Taei, T. Khayamian ; *A differential pulse voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using poly (3-(5-chloro-2-hydroxyphenylazo)-4,5-dihydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid) film modified glassy carbon electrode*. *J. Electroanal. Chem*, 633 (2009) 212-220.
- [28] A. I. Gopalan, K. P. Lee, K. M. Manesha, P. Santhosh, J. H. Kima, J. S. Kanga ; *Electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid at a novel gold nanoparticles distributed poly(4-aminothiophenol) modified electrode*. *Talanta*, 71 (2007) 1774-1781.
- [29] N. F. Atta, M. F. El-Kady, A. Galal ; *Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using poly(N-methylpyrrole)/Pd-nanoclusters sensor*. *Anal. Biochem.*, 400 (2010) 78-88.
- [30] S. Shahrokhian, M. Ghalkhani ; *Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid and uric acid at a carbon-paste modified electrode incorporating thionine–nafion ion-pair as an electron mediator*. *Electrochim. Acta*, 51 (2006) 2599-2606.
- [31] D. Sun, Y. Zhang, F. Wang, K. Wu, J. Chen, Y. Zhou ; *Electrochemical sensor for simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and xanthine based on the surface enhancement effect of mesoporous silica*. *Sens. Actuators B.*, 41 (2009) 641-645.
- [32] J. Qiu, P. Hu, R. Liang ; *Separation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on a dynamically modified poly(dimethylsiloxane) microchip*. *Analyt. Sci.*, 23 (2007) 1409-1414.
- [33] J. Fei, L. Luo, S. Hu, Z. Gao ; *Amperometric determination of ascorbic acid at an electrodeposited redox polymer film modified gold electrode*. *Electroanalysis*, 16 (2004) 319-323.
- [34] M. Y. Wang, X. Y. Xu, F. Yang, S.Y. Zhang, X. J. Yang ; *Development of an amperometric sensor for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using 2-[bis(2-aminoethyl)amino]ethanol, 4,40-bipyridine bridged dicopper(II) complex*. *J. Appl. Electrochem.*, 38 (2008) 1269-1247.
- [35] L. Zhang, X. Lin ; *Covalent modification of glassy carbon electrode with glutamic acid for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid*. *Analyst*, 126 (2001) 367-370.

- [36] N. F. Atta, M. F. El-Kady ; *Novel poly(3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids*. Sens. Actuators B., 145 (2010) 299-310.
- [37] J. Mathiyarasu, S. Senthilkumar, K.L.N. Phani, V. Yegnaraman ; *PEDOT-Au nanocomposite film for electrochemical sensing*. Mater. Lett., 62 (2008) 571-573.
- [38] S. Harish, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *PEDOT/Palladium composite material: synthesis, characterization and application to simultaneous determination of dopamine and uric acid*. J. Appl. Electrochem., 38 (2008) 1583-1588.
- [39] S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, V. Yegnaraman ; *Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified glassy carbon electrode*. J. Solid. Electrochem., 10 (2006) 905-913.
- [40] A. Balamurugan, S.-M. Chen ; *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co-(5-amino-2-naphthalenesulfonic acid))(PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Anal. Chim. Acta, 596 (2007) 92-98.
- [41] V. S. Vasantha, S.-M. Chen ; *Electrocatalysis and simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using poly(3,4-ethylenedioxy)thiophene film modified electrodes*. J. Electroanal. Chem, 592 (2006) 77-87.
- [42] V. S. Vasantha, S.-M. Chen ; *Synergistic effect of a catechin-immobilized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrode on electrocatalysis of NADH in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Electrochim. Acta, 52 (2006) 665-674.
- [43] T.-H. Tsai, T.-W. Chen, S.-M. Chena ; *Selective electroanalysis of ascorbic acid using a nickel hexacyanoferrate and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) hybrid film modified electrode*. Electroanalysis, 22 (2010) 1655-1662.
- [44] S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, Y. Kumar Jain, V. Yegnaramana ; *Determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes*. Electroanalysis, 24 (2005) 2281-2286.

Chapitre IV : Microcapteurs fabriqués en
technologie silicium fonctionnalisés par un film de
PEDOT

Chapitre IV : Microcapteurs fabriqués en technologie silicium fonctionnalisés par un film de PEDOT

IV.1. Développement du microcapteur électrochimique

IV.1.1. Description du procédé technologique

IV.2. Application des microcapteurs électrochimiques à la détection des acides ascorbique et urique

IV.2.1. Matériels et méthodes

IV.2.1.1. Réactifs et solutions électrolytiques

IV.2.1.2. Appareillage

IV.2.2. Caractérisation électrochimique des différentes électrodes du microdispositif

IV.2.2.1. Microélectrode d'or

IV.2.2.2. Microélectrode de platine

IV.2.2.3. Microélectrode d'argent

IV.2.2.4. Détermination de la surface active de la microélectrode de travail

IV.2.3. Fonctionnalisation de la surface par électropolymérisation du PEDOT

IV.2.4. Détection électrochimique des acides ascorbique et urique

IV.2.5. Performances analytiques du capteur

Conclusion

Références bibliographiques

L'intégration et la miniaturisation des microsystèmes et microcapteurs chimiques sont des points essentiels pour améliorer les performances des analyses en milieux biologiques. L'utilisation des technologies de la microélectronique pour la réalisation de ces microcapteurs permet une intégration, un gain de temps de réalisation et de faibles coûts de production grâce à la fabrication collective.

Ce chapitre est consacré à la fonctionnalisation de surface des microélectrodes intégrées sur silicium par électropolymérisation de PEDOT pour la détection des acides ascorbique et urique. Les microdispositifs intégrés sur silicium ont été fabriqués dans la centrale technologique du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS) dans le cadre des travaux de thèse de C. Christophe ^[1].

IV.1. Développement du microdispositif électrochimique

Ces dernières années, le domaine des microcapteurs a connu un développement remarquable sous l'effet de trois facteurs principaux :

- une demande accrue en capteurs fiables, autonomes, à usage unique ou à longue durée de vie dans des domaines d'application divers : analyse biomédicale, contrôle de l'environnement, suivi de procédés chimiques, analyse de la qualité des produits finis...
- la généralisation de l'automatisation et du contrôle des opérations unitaires dans le génie des procédés
- la recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse

L'utilisation des techniques de la microélectronique dans le domaine des microcapteurs électrochimiques permet d'envisager des productions massives à faible coût. La miniaturisation et l'intégration apportent une aisance dans la mesure grâce à un dispositif moins encombrant que le montage électrochimique classique, ainsi que la possibilité d'intégration de l'électronique et du capteur sur la même puce. Cette miniaturisation ouvre des perspectives d'application et des progrès en mettant à disposition un équipement d'analyse de taille réduite, permettant des tests simples et rapides sur des types de substrats variés, et nécessitant une préparation simples des échantillons.

Pour atteindre ces objectifs, les capteurs issus des méthodes de fabrication collective doivent répondre aux exigences suivantes :

- la biocompatibilité des matériaux, ces microcapteurs étant destinés à des analyses en biologie clinique et pouvant être étendus plus généralement à l'analyse du monde vivant.
- des propriétés électriques, cristallographiques et physicochimiques des matériaux d'électrodes déposés, analogues à celles des matériaux massifs.
- la facilité d'utilisation.
- la fiabilité dans le temps.
- la possibilité d'intégration de couches sensibles.

IV.1.1. Description du procédé technologique

Le procédé technologique mis au point pour fabriquer les microcapteurs est basé sur les étapes standards de la technologie silicium ^[2]. Néanmoins, il a été adapté aux particularités des capteurs électrochimiques. Il repose d'une manière générale sur deux principes :

- définition de motifs,
- dépôt de couches métalliques.

La structuration et la définition des motifs sont réalisées grâce au procédé de photolithographie qui permet de transférer les motifs d'un masque sur le substrat de silicium. Deux éléments sont essentiels pour réaliser cette technique : un masque, sur lequel les motifs à créer sont préalablement définis, et une résine photosensible. On distingue trois types de résine : positive lorsque les parties insolées présentent une meilleure solubilité dans les solvants révélateurs que la résine de départ ; négative si la lumière fait réticuler le polymère qui devient insoluble dans le révélateur ; « réversible » lorsque la résine peut être soit positive soit négative selon le traitement subi.

Dans le cadre de la réalisation des microcellules électrochimiques, une technique dite « Lift-off » appropriée au dépôt de couches minces est utilisée. Le principe de cette technique est de créer en premier lieu un "pochoir" temporaire sur le substrat à l'aide d'une résine photosensible. Le substrat nettoyé et isolé (électriquement) est donc enduit d'une couche de résine exempte de défauts, d'une épaisseur connue et uniforme. Après un pré-recuit pour l'élimination des solvants résiduels et l'amélioration de l'adhérence, le masque définissant les motifs est aligné sur la plaquette et la structure est insolée par des radiations ultraviolettes. Ainsi, l'image du motif est transférée sur la résine. Lors de l'étape de développement, les

solvants révélateurs éliminent les parties solubles, ce qui définit le motif à la surface du substrat. Une étape de post-recuit permet l'élimination des solvants résiduels, l'augmentation de l'adhérence et l'accroissement de la résistance de la résine aux attaques chimiques. Ensuite, la métallisation est réalisée sur l'ensemble de la plaquette, suivie d'une étape de libération, qui permet de récupérer le motif métallique prédéfini par le pochoir (figure IV.1). La résine utilisée dans les différentes étapes de photolithographie doit avoir une bonne adhérence sur le substrat et la partie insolée (photoresist) doit être facilement enlevée dans les solvants appropriés. Une résine nommée AZ5214 est utilisée dans cette étude.

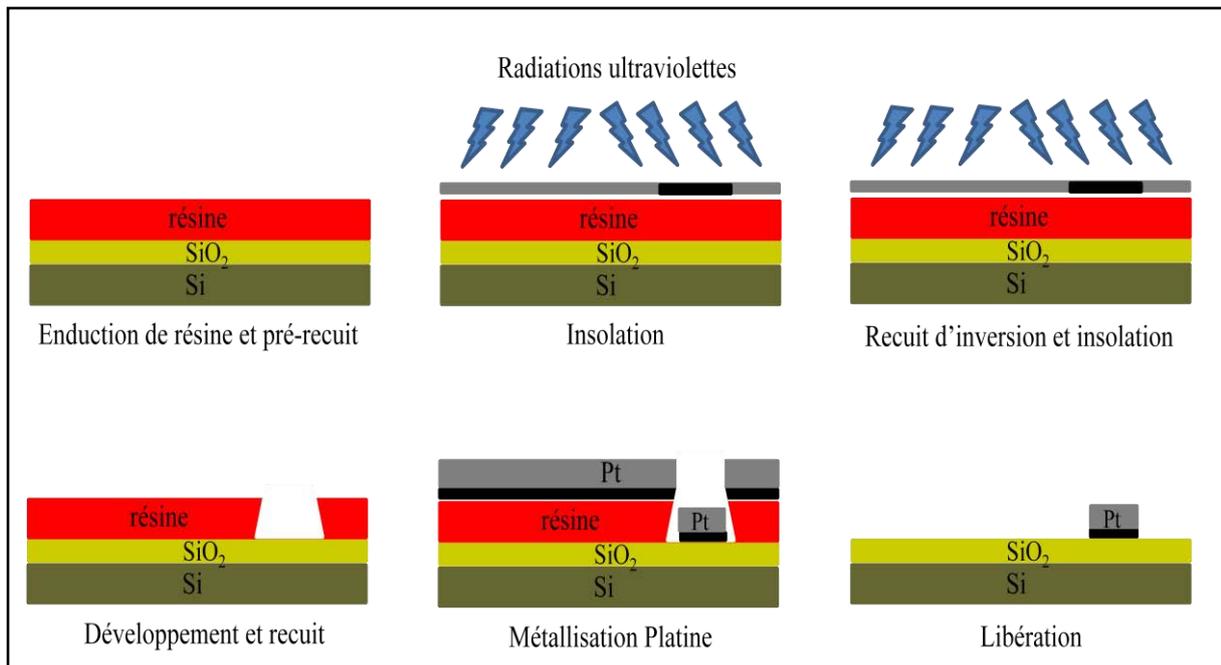


Figure IV.1. Différentes étapes du procédé lift-off " bi-couche".

Au total, ce procédé technologique implique 12 étapes, depuis le choix du substrat jusqu'au montage des puces.

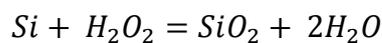
Choix du substrat

Le substrat de silicium de type P (dopage au bore) a été choisi, avec une orientation cristallographique <100>. La dimension de la plaquette est de 4 pouces ; elle est dictée par l'équipement disponible dans la centrale technologique du LAAS-CNRS.

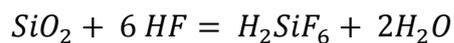
Etape 1 : nettoyage des plaquettes

Le nettoyage des plaquettes est une étape souvent répétée tout au long de la fabrication des composants. Elle a pour rôle d'enlever les impuretés et les composants organiques en surface du silicium. Elle consiste à faire croître une fine couche d'oxyde qui piège les impuretés et qui est ensuite éliminée par attaque chimique à l'acide fluorhydrique ^[3]. Cette étape s'effectue de la manière suivante :

- oxydation du silicium par immersion de la plaquette pendant deux minutes dans un bain contenant de l'acide sulfurique à 96% vol. et de l'eau oxygénée à 30% vol. dans un rapport volumique 1/1 :



- Rinçage de la plaquette dans l'eau déionisée et séchage sous azote
- Attaque chimique dans l'acide fluorhydrique à 10% vol. pendant 30 secondes pour enlever la couche d'oxyde :



- Rinçage des plaquettes dans l'eau déionisée et séchage sous azote.

Etape 2 : oxydation du masque

Cette étape a pour but de faire croître une couche d'oxyde de silicium suffisamment épaisse (supérieure à 1µm) afin d'isoler électriquement le substrat des différentes couches métalliques déposées par la suite. L'oxydation est réalisée à haute température (1150°C).

Etape 3 à 10 : réalisation des dépôts métalliques

Huit étapes de photolithographie, de métallisation et de recuit s'enchaînent pour effectuer les différents dépôts métalliques. Le tableau IV.1 regroupe l'ensemble de ces étapes.

	photolithographie	métallisation	recuit
Niveau 1 (étapes 3-5)	Création des pistes de conduction et des électrodes auxiliaires (électrode de platine)	Titane (20 nm) servant d'une couche d'accroche. Platine (200 nm) déposé par évaporation par faisceau d'électrons	À 250°C pour diminuer les contraintes des zones métalliques et améliorer l'accroche des couches métalliques
Niveau 2 (étapes 6-8)	Définition des électrodes de travail (électrodes d'or) et des plots de contact	Or (800 nm) par évaporation par faisceau d'électrons directement sur le platine	Identique à l'étape 5
Niveau 3 (étapes 9-10)	Définition des microélectrodes de référence	Argent (400 nm) par évaporation par effet Joule	/

Tableau IV.1. Récapitulatif des différentes étapes de photolithographie, de métallisation et de recuit.

Etape 11 : photolithographie de la passivation (isolation et définition des zones actives)

Cette dernière étape de photolithographie consiste à isoler électriquement les pistes de conduction et à définir les zones actives, les ouvertures des électrodes et les plots de contact. Une résine nommée SU-8 est choisie pour réaliser des couches d'isolation de 1 à 2 μm d'épaisseur afin de réduire l'encastrement des électrodes. La figure IV.2 représente une coupe longitudinale et une photographie de la structure finale du microdispositif. A ce stade, seule l'électrode de référence Ag/AgCl n'est pas réalisée. Elle est fabriquée en fin de process, composant par composant, par oxydation du dépôt métallique d'argent.

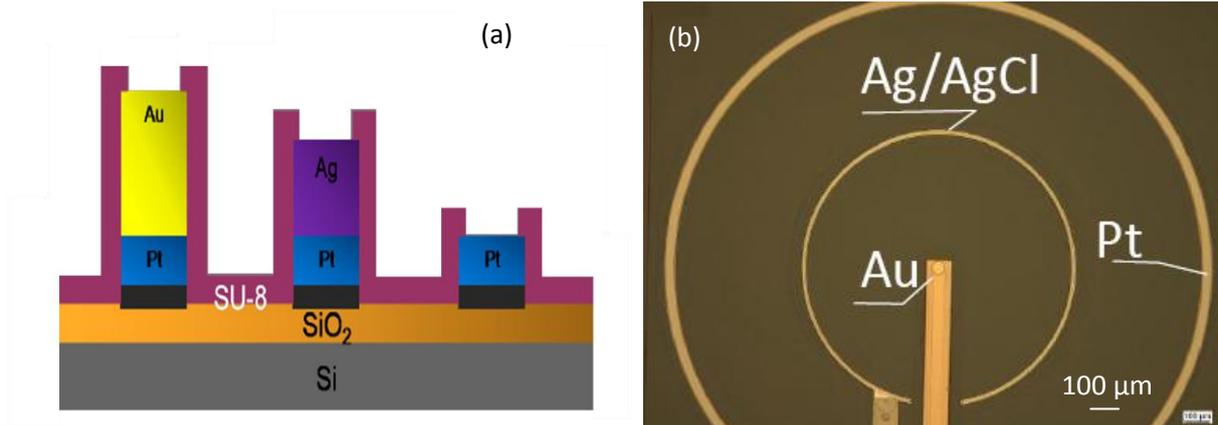


Figure IV.2. Schéma de coupe (a) et photographie (b) de la structure finale du composant.

Etape 12 : montage des composants

Une plaquette peut contenir 126 composants. Avant sa découpe, elle est d'abord enduite avec une résine de protection afin d'éviter la contamination des composants par la poussière générée lors de la coupe avec une scie diamantée. Après élimination de la résine de protection, les composants sont collés sur un circuit imprimé et câblés à l'aide d'un fil d'or qui assure les connections électriques. Pour protéger et renforcer mécaniquement les connectiques, une silicone biocompatible LOCTITE 5248 (Henkel Loctite) est déposée sur la zone de connexion (figure IV.3).

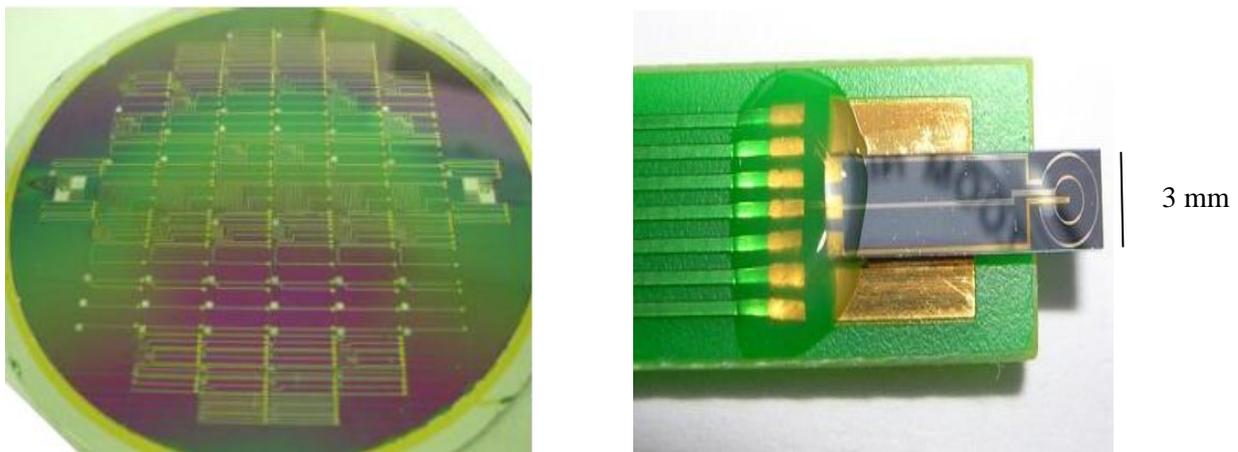


Figure IV.3. Photographies de la plaquette avant la découpe et du composant monté sur le support.

IV.2. Application des microcapteurs électrochimiques à la détection des acides ascorbique et urique

La surface de la microélectrode de travail en or du microdispositif est fonctionnalisée par un film de PEDOT. Le microcapteur est utilisé pour le dosage des acides ascorbique et urique dans des solutions modèles. Le but est de comparer les performances analytiques de ces composants à celles obtenus avec les microcapteurs utilisant des matériaux d'électrode massifs.

IV.2.1. Matériels et méthodes

IV.2.1.1. Réactifs et solutions électrolytiques

Les réactifs et les solutions utilisés sont identiques à ceux cités dans le paragraphe II.3.1.1 :

- solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ pour la caractérisation et l'activation des microélectrodes (or et platine),
- solution de nitrate de potassium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 2 pour la caractérisation des microélectrodes d'argent.
- solution d'hexacyanoferrate (III) de potassium à 5 mmol.L^{-1} pour l'estimation de la surface active des microélectrodes de travail.
- solution d'acétonitrile contenant TBAPC à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et le monomère EDOT à $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ pour la fonctionnalisation des microélectrodes de travail.
- solutions d'acides ascorbique et urique préparées dans une solution de tampon phosphate à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7.

IV.2.1.2. Appareillage

L'ensemble des mesures électrochimiques est réalisé avec un potentiostat μ Autolab. Lors des caractérisations des différents matériaux intégrés, les électrodes du microdispositif sont branchées comme des électrodes de travail et le montage électrochimique est complété par une tige de platine utilisée comme une électrode auxiliaire et une électrode de référence au calomel saturée $\text{Hg/Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{\text{sat}}$ (ECS) connectée à la cellule par l'intermédiaire d'un capillaire de Luggin. Au cours de l'électropolymérisation du PEDOT et des détections électrochimiques des deux acides, les microélectrodes de travail et auxiliaire du microdispositif sont utilisées et l'électrode de référence ECS externe est conservée.

IV.2.2. Caractérisation électrochimique des différentes électrodes du microdispositif

La première étape de caractérisation électrochimique des différents matériaux déposés est réalisée dans des solutions désaérées et non agitées d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ou de nitrate de potassium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 2. Le but de cette étape est non seulement d'activer les surfaces des électrodes mais également de comparer leurs réponses ampérométriques aux données bibliographiques concernant les matériaux massifs.

IV.2.2.1. Microélectrode d'or

La figure IV.4.a présente le voltammogramme cyclique obtenu avec une microélectrode d'or intégrée, plongée dans une solution désaérée et non agitée d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Dans le domaine de potentiel étudié, le comportement électrochimique de l'or déposé sur silicium est comparable à celui de l'or massif (figure IV.4.b) ^[4]. Les réactions électrochimiques caractéristiques de l'or dans ce milieu sont nettement visibles :

1. l'oxydation de l'or qui débute vers 1 V.
2. la réduction des oxydes d'or à 0,85 V.

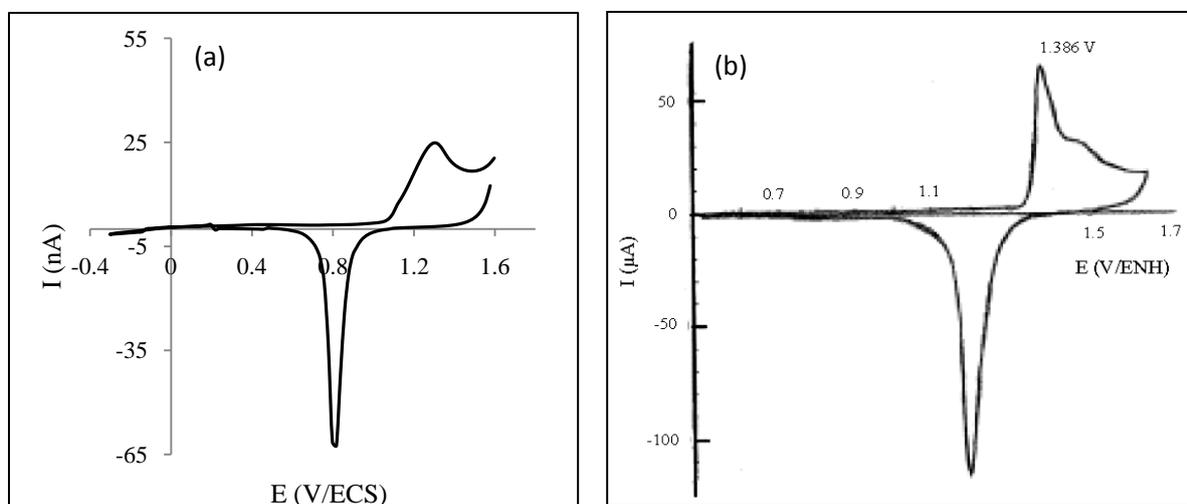


Figure IV.4. Voltammogrammes cycliques obtenus sur électrode d'or. (a) microélectrode d'or intégrée sur silicium dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, vitesse de balayage des potentiels 50 mV.s^{-1} . (b) or polycristallin massif dans une solution d'acide sulfurique à $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, vitesse de balayage 20 mV.s^{-1} ^[4].

Quelquefois, les microélectrodes d'or intégrées sur silicium montrent une détérioration du signal électrochimique lorsque plus d'une centaine de cycles de potentiel est effectué. Les voltammogrammes cycliques présentent alors plusieurs vagues d'oxydation et de réduction supplémentaires entre 0,5 et -0,3 V (figure IV.5). Selon C. Christophe ^[1], ce phénomène peut être attribué à la couche d'accroche de platine située sous le dépôt d'or qui est en contact avec la solution électrolytique suite à des défauts structurels de la couche de passivation.

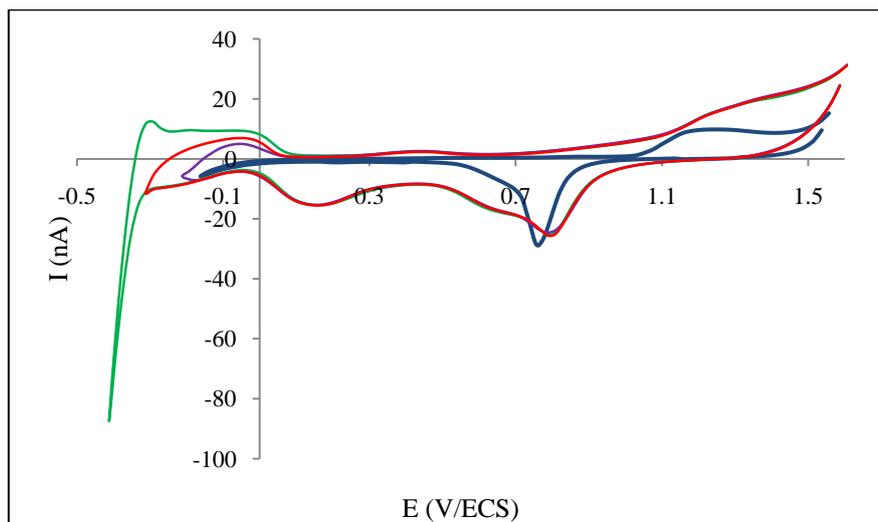


Figure IV.5. Voltammogrammes cycliques d'une microélectrode d'or intégrée sur silicium dans une solution d'acide sulfurique $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage des potentiels 50 mV.s^{-1} . 1^{er} cycle (bleu), 20^{ème} cycle (violet), 50^{ème} cycle (rouge) et 100^{ème} cycle (vert).

IV.2.2.2. Microélectrode de platine

Le comportement électrochimique du dépôt de platine sur silicium a été étudié dans les mêmes conditions opératoires. Le voltammogramme de la figure IV.6.a met en évidence la formation des oxydes de platine à partir de 0,6 V et leur réduction à 0,3 V. Dans la zone cathodique, le voltammogramme présente les réactions d'oxydation de l'hydrogène adsorbé et la réduction du proton adsorbé. Bien qu'il ne soit pas identique à celui d'un matériau massif (figure IV.6.b) ^[4], la courbe obtenue révèle les réactions électrochimiques attendues avec ce type d'interface.

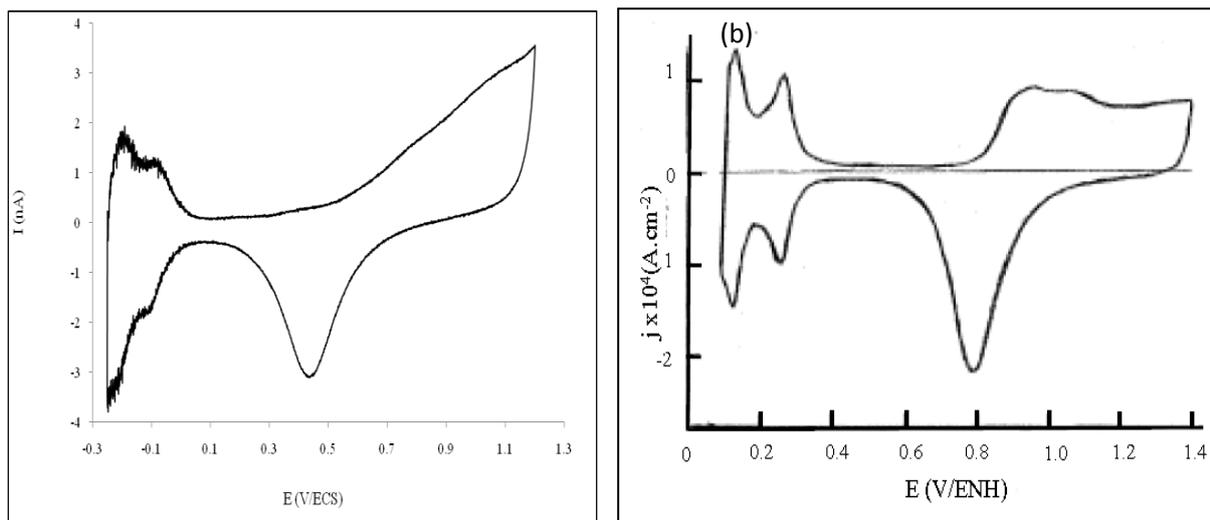


Figure IV.6. Voltammogrammes cycliques obtenus sur électrode de platine. (a) microélectrode de platine intégrée sur silicium dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, vitesse de balayage des potentiels 50 mV.s^{-1} . (b) platine massif dans une solution d'acide sulfurique à 1 mol.L^{-1} , vitesse de balayage 100 mV.s^{-1} [4].

IV.2.2.3. Microélectrode d'argent

Afin de caractériser électrochimiquement le dépôt d'argent, une solution de nitrate de potassium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 2 est utilisée. Le voltammogramme obtenu est présenté dans la figure IV.7 a.

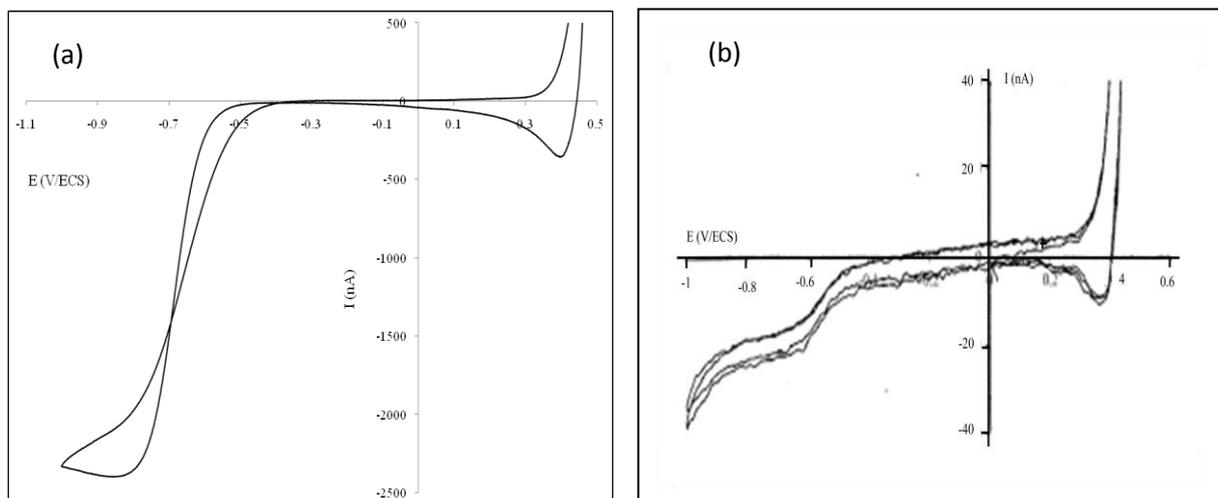


Figure IV.7. Voltammogrammes cycliques obtenus sur microélectrodes d'argent silicium dans une solution de nitrate de potassium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 2. (a) argent intégrée sur silicium et (b) argent massif [5]. Vitesse de balayage des potentiels 50 mV.s^{-1} .

Ce voltammogramme met en évidence les réactions suivantes :

1. l'oxydation de l'argent à partir de 0,3 V
2. la réduction du proton vers -0,5 V

On peut également observer un pic de réduction des ions Ag^+ vers 0,3 V, produits lors du balayage anodique. La courbe obtenue est similaire à celle obtenue avec une microélectrode d'argent massif dans le cadre des travaux de thèse d'A. Ruffien-Ciszak (figure IV.7.b) [5].

IV.2.2.4. Détermination de la surface active de la microélectrode de travail

Dans un second temps, le rayon des microélectrodes de travail en or est estimé en traçant le voltammogramme dans une solution d'hexacyanoferrate (III) de potassium à 5 mmol.L^{-1} à l'état stationnaire (figure IV.8). A l'aide de l'intensité limite de diffusion (équation I.41) et en tenant compte du coefficient de diffusion des ions $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ($D = 7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) [6], le rayon est estimé à $22 \pm 1 \mu\text{m}$.

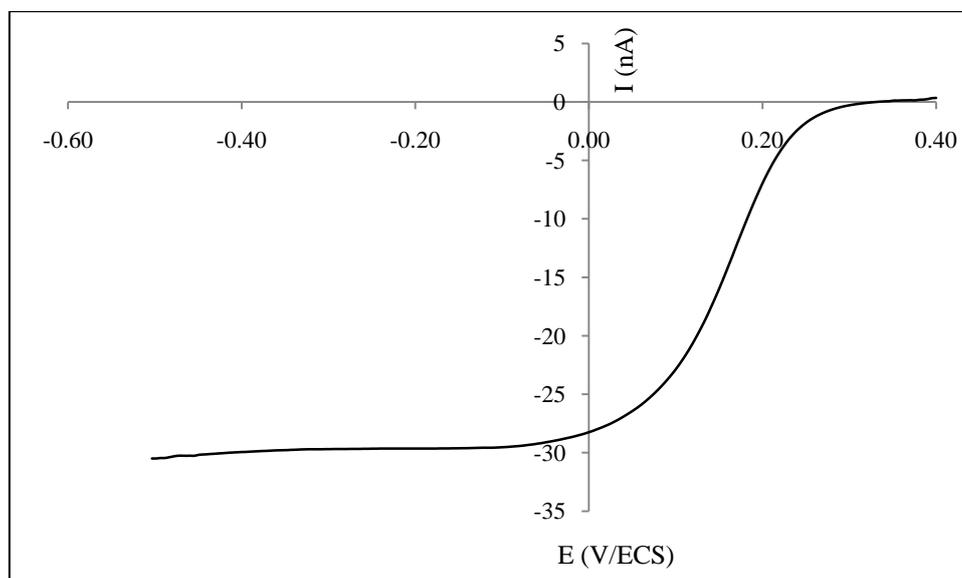


Figure IV.8. Courbe intensité-potential tracée avec une microélectrode d'or intégrée dans une solution aqueuse désaérée d'hexacyanoferrate (III) 5 mmol.L^{-1} pH 7. Vitesse de balayage des potentiels : 6 mV.s^{-1} .

IV.2.3. Fonctionnalisation de la surface par électropolymérisation du PEDOT

L'électropolymérisation du PEDOT est réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.3.2). Rappelons que les films de PEDOT sont obtenus par voltammétrie cyclique en balayant le potentiel entre -0,88 et 1,5 V à une vitesse de balayage de $250 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, à partir d'une solution d'acétonitrile contenant TBAPC à $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et le monomère à $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les voltammogrammes cycliques enregistrés au cours de l'électropolymérisation avec la microélectrode d'or intégrée sont indiqués à la figure IV.9. et comparables à ceux précédemment obtenus avec les microélectrodes d'or massif (figure II.5). Au premier cycle, l'oxydation du monomère débute à 1,2 V avec un pic vers 1,4 V. Lors des cycles suivants, l'intensité de courant est de plus en plus importante et témoigne de la conductivité électrique de la couche de polymère déposé. L'activité redox du polymère est mise en évidence par la présence d'un signal centré vers -0,4 V.

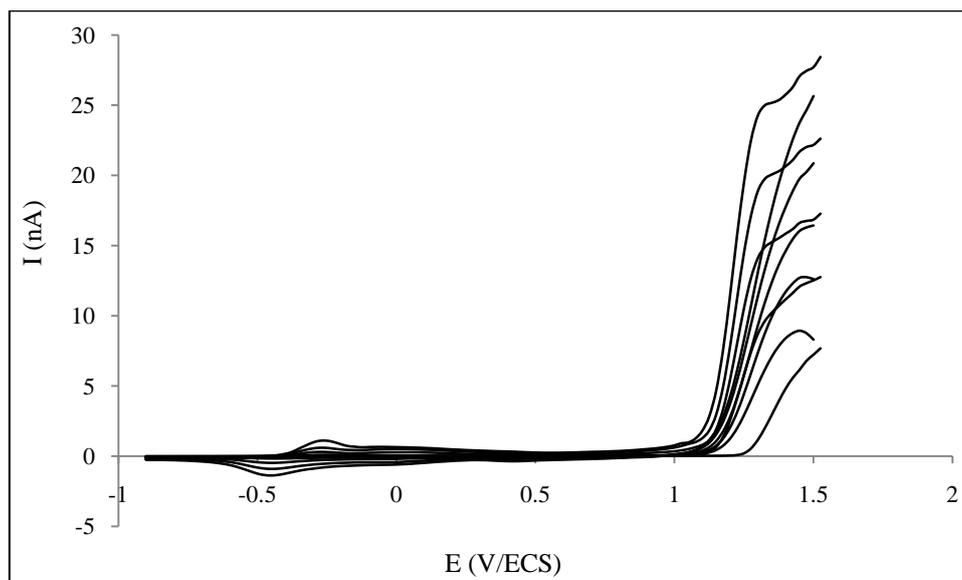


Figure IV.9. Voltammogrammes cycliques successifs d'électropolymérisation obtenus avec une microélectrode d'or intégrée sur silicium dans une solution désaérée d'acétonitrile contenant TBAPC à $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et EDOT à $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Vitesse de balayage des potentiels : $250 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

IV.2.4. Détection électrochimique des acides ascorbique et urique

Les expériences ont été réalisées dans des solutions désaérées de tampon phosphate à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7 contenant l'acide ascorbique et/ou l'acide urique à 1 mmol.L^{-1} . Les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites au chapitre II (paragraphe II.3.3 pour les mesures en voltammétrie cyclique et II.3.3.4 pour les mesures en DPV).

La figure IV.10 présente les voltammogrammes cycliques d'oxydation d'acide ascorbique sur des microélectrodes d'or massif (figure IV.10.a) ou intégrées sur substrat silicium (IV.10.b) et fonctionnalisées par le film de PEDOT. Les deux courbes sont similaires : on observe une réduction de la surtension d'oxydation d'environ $0,23 \text{ V}$ sur l'électrode intégrée et de $0,28 \text{ V}$ sur l'or massif. Comme avec les microélectrodes de fabrication manuelle utilisées au chapitre II, il a été également noté que la fonctionnalisation induisait une amplification de la réponse ampérométrique d'un facteur proche de 2 par rapport à la même électrode non modifiée.

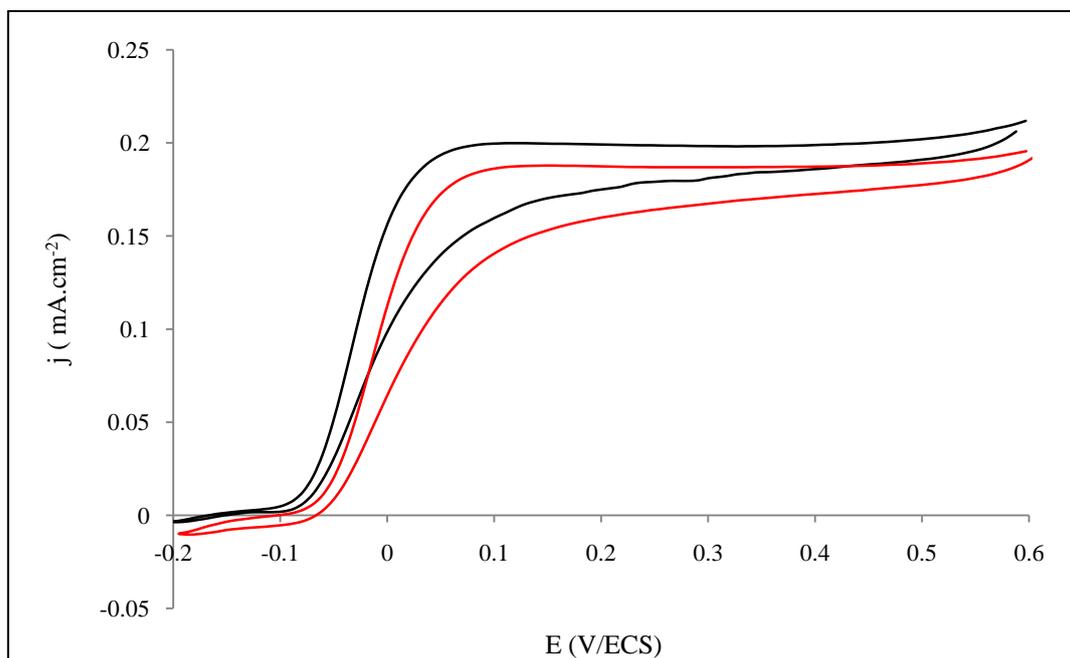


Figure IV.10. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide ascorbique à 1 mmol.L^{-1} sur des microélectrodes d'or massif (courbe noire) et intégrée (courbe rouge) fonctionnalisées par un film de PEDOT. Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

La figure IV.11 présente les résultats d'expériences analogues pour l'oxydation de l'acide urique à 1 mmol.L^{-1} sur les deux types de microélectrodes.

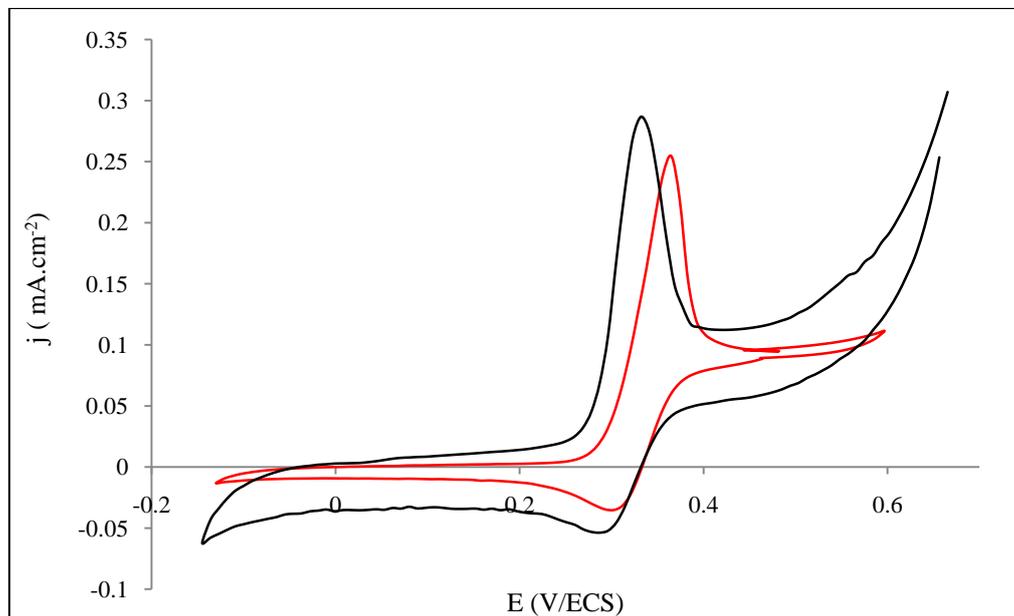


Figure IV.11. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant l'acide urique à 1 mmol.L^{-1} sur des microélectrodes d'or massif (courbe noire) et intégrée (courbe rouge) fonctionnalisées par un film de PEDOT. Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

Sur la microélectrode intégrée, l'oxydation de l'acide urique présente un pic d'oxydation à $0,36\text{ V}$ et une densité de courant égale à $0,25\text{ mA.cm}^{-2}$. Sur l'or massif, le pic d'oxydation est visible à $0,32\text{ V}$, avec une densité de courant de pic égale à $0,33\text{ mA.cm}^{-2}$. Bien que du même ordre de grandeur, les caractéristiques enregistrées sur l'électrode intégrée sont légèrement en retrait. Cette tendance est encore observée lors de l'étude du mélange des deux acides (figure IV.12), et peut être attribuée aux propriétés de surface des matériaux d'électrodes (arrangement atomique, rugosité...) induites par le type de dépôt métallique réalisé ^[7].

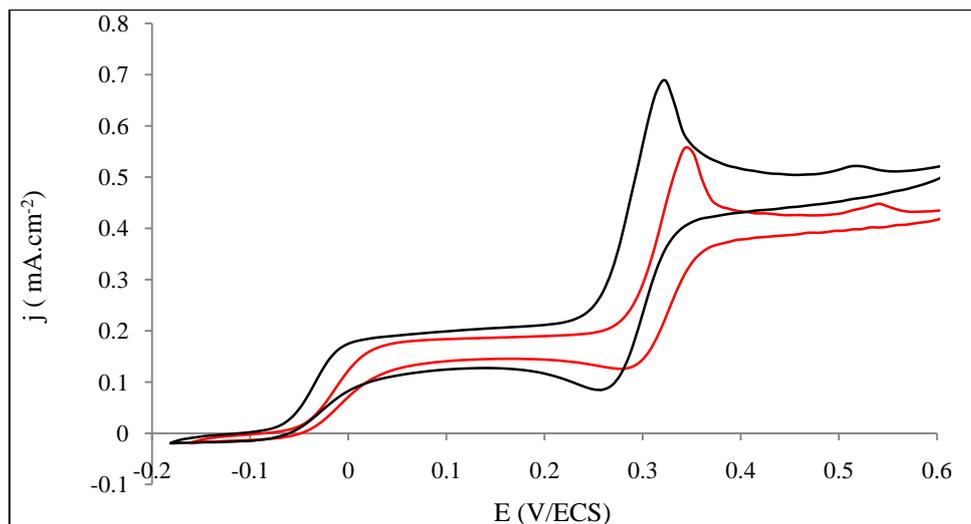


Figure IV.12. Voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution désaérée de tampon phosphate pH 7 contenant un mélange d'acides ascorbique et urique à 1 mmol.L^{-1} sur des microélectrodes d'or massif (courbe noire) et intégrée (courbe rouge) fonctionnalisées par un film de PEDOT. Vitesse de balayage des potentiels : 50 mV.s^{-1} .

IV.2.5. Performances analytiques du capteur

La dernière partie de l'étude consiste à déterminer les performances analytiques du capteur (seuil de détection, sensibilité et domaine de linéarité) dans des solutions modèles. La technique de voltammétrie impulsionnelle différentielle a été utilisée, avec les mêmes paramètres que ceux utilisés au chapitre II (paragraphe II.3.3.4). La figure IV.13 présente les voltammogrammes et les courbes d'étalonnage pour les deux acides. Le tableau IV.2 regroupe les résultats obtenus.

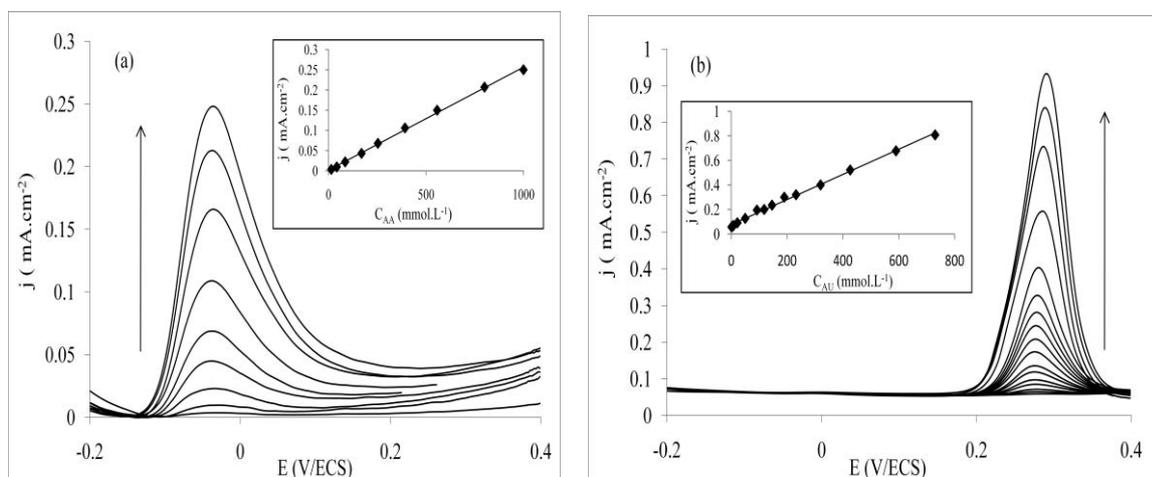


Figure IV.13. Courbes d'étalonnage obtenues pour le dosage de l'acide ascorbique (a) et de l'acide urique (b) sur des microélectrodes d'or intégrées sur silicium fonctionnalisées par un film de PEDOT.

paramètres	Or massif modifié au PEDOT	Or intégré modifié au PEDOT
E_p AA (mV)	-96	-57
E_p AU (mV)	228	277
$W_{1/2}$ AA (mV)	78	112
$W_{1/2}$ AU (mV)	62	65
Limite de détection AA (μ M)	2,5	12
Limite de détection AU (μ M)	1,5	0,5
Domaine de linéarité AA (μ M)	5 – 300	14 - 1300
Domaine de linéarité AU (μ M)	2 - 600	1 - 731
Sensibilité AA (μ A. μ mol ⁻¹ .L.cm ⁻²)	0,875	0,68
Sensibilité AU (μ A. μ mol ⁻¹ .L.cm ⁻²)	3,06	2,52

Tableau IV.2. Performances analytiques des microcapteurs fonctionnalisés pour le dosage des acides ascorbique et urique.

On retrouve dans les deux cas des performances analytiques du même ordre de grandeur. Toutefois, pour le microcapteur fabriqué en technologie silicium :

- les limites de détection sont plus élevées, surtout en ce qui concerne l'acide ascorbique
- les sensibilités de mesure sont moins importantes
- les pics d'oxydation d'acide ascorbique sont plus large, signe d'une cinétique de transfert électronique plus lente
- les domaines de linéarité sont étendus et comparables à ceux du matériau massif.

Conclusion

Cette étude a montré la possibilité de fonctionnaliser les surfaces de microélectrodes intégrées par un film de PEDOT. Les performances analytiques apportées par ce polymère en termes de séparation des pics d'oxydation et d'amélioration des sensibilités sont encourageantes même si elles sont moins bonnes que celles enregistrées sur le matériau massif. Pour amener des éléments d'explication plus pertinents, il semble important d'approfondir l'étude de l'influence de l'état de surface et des propriétés physicochimiques des matériaux sur les cinétiques électrochimiques. Pour compléter ce travail, il est d'abord envisagé d'utiliser le microdispositif d'une manière autonome pour des mesures dans le sérum sanguin.

La première étape nécessite de mettre au point et d'éprouver la microélectrode de référence intégrée sur la microcellule. Dans une seconde étape, il serait intéressant d'intégrer l'étape d'électropolymérisation du PEDOT dans le processus technologique de fabrication des microdispositifs pour une fonctionnalisation collective des microsursaces.

Références bibliographiques

- [1] C. Christophe. *Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies « Silicium et Polymères » pour l'étude du stress oxydant - Application à la biochimie cutanée*. Thèse de l'Université Paul Sabatier-Toulouse III (2010).
- [2] C. Spegel, A. Heiskanen, L. H. D. Skjolding , J. Emnéus ; *Chip based electroanalytical systems for cell analysis*. *Electroanalysis*, 20 (2008) 680-702
- [3] K. R. William, R. S. Muller ; *Etch rates for micromachining processing*. *J. Microelectromech Syst.*, 5 (1996) 256-269.
- [4] J. O. M. Bockris, B. E. Conway, S. Sarangapani, E. Yeager ; *Comprehensive treatise of electrochemistry*. Plenum Press. New York. (1983) 59.
- [5] A. Ruffien-Ciszak. *Potentialités des microélectrodes pour une évaluation directe et non invasive des propriétés antioxydantes du stratum corneum*. Thèse de l'Université Paul Sabatier-Toulouse III (2005).
- [6] A. J. Arvia, J. C. Bazan, J. S. W. Carroza ; *The diffusion of ferro- and ferricyanide ions in aqueous potassium chloride solutions and in solution containing CMC sodium salt*. *Electrochim. Acta*, 13 (1968) 81-90.
- [7] J. Cognard ; *Adhesion to gold*. *Gold Bull.*, 17 (1984) 131-139.

Conclusion Générale

Les principaux objectifs poursuivis pendant ce travail étaient les suivants :

- conception d'un microcapteur électrochimique spécifique des acides ascorbique et urique par fonctionnalisation de la surface de microélectrodes en or par un film de poly(3,4-éthylène dioxythiophène) PEDOT électrogénéré.
- fabrication et fonctionnalisation de microcapteurs intégrés sur substrat silicium par les procédés de microtechnologie.
- application à la détection et au dosage des espèces antioxydantes dans les milieux biologiques (sérum sanguin, sang, salive, épiderme,...)

Les travaux présentés dans ce mémoire ont montré une fois de plus les potentialités des interfaces modifiées pour garantir une mesure électrochimique sélective. La fonctionnalisation du capteur par un film de PEDOT électrodéposé a rendu possible la mesure simultanée des deux acides ascorbique et urique alors qu'elle était quasiment impossible avec des matériaux métalliques bruts. Elle a éliminé les risques d'interférences des réponses ampérométriques, non seulement entre les deux molécules en séparant leur signal d'oxydation de plus de 0,2 V, mais aussi avec d'autres molécules biologiques présentes dans les liquides physiologiques en déplaçant leur potentiel d'oxydation vers des valeurs plus cathodiques.

L'étude de l'influence des paramètres de dépôt sur les propriétés électrochimiques du capteur a montré que les propriétés catalytiques du PEDOT sont dictées par les conditions de l'électropolymérisation. L'optimisation de ces paramètres a permis d'améliorer les performances analytiques du capteur (potentiels d'oxydation, sensibilité, seuil limite de détection, domaine de linéarité). A notre connaissance, plusieurs d'entre elles sont parmi les meilleurs résultats rencontrés dans la bibliographie en ce qui concerne l'oxydation des acides ascorbique et urique sur des électrodes modifiées.

Cette étude a par ailleurs montré que la sensibilité du capteur vis-à-vis de l'acide urique dépend de la présence de l'acide ascorbique dans le milieu. Des travaux préliminaires ont permis d'émettre l'hypothèse d'un processus de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique et de proposer un mécanisme réactionnel de type EC'.

L'étude de répétabilité de la réponse du capteur a montré que la fonctionnalisation par un film de PEDOT élimine les phénomènes d'adsorption des produits d'oxydation à la surface des

électrodes qui constituaient une limitation majeure d'utilisation des matériaux conventionnels dans les milieux biologiques.

Une deuxième série de résultats concerne l'exploitation du microcapteur au dosage des deux antioxydants dans le sérum sanguin. Le capteur voltammétrique offre le même degré de sensibilité et de fiabilité que les méthodes analytiques classiques (HPLC et spectrométrie) tout en induisant un protocole opératoire plus simple, une mesure plus rapide et un matériel moins coûteux. Pour le dosage de l'acide ascorbique, certaines difficultés de justesse ont été rencontrées avec quelques sérums, les résultats du capteur présentant un écart important par rapport à ceux obtenus par HPLC. L'étude réalisée a conduit à l'hypothèse d'une consommation de l'acide ascorbique par des espèces oxydantes du sérum sanguin. La complexité du milieu étudié rend toutefois difficile d'incriminer une espèce précise. Pour aller plus loin, il est nécessaire d'effectuer une étude pas par pas sur l'influence des composants majeurs du sérum sanguin sur le dosage de l'acide ascorbique. Cette étude a déjà débuté sans pour autant donner des résultats probatoires.

Enfin, les résultats obtenus avec les microcapteurs intégrés sur silicium sont comparables à ceux obtenus avec le matériau massif. Ils démontrent la possibilité de fonctionnaliser la surface des dépôts métalliques sur substrat silicium, ouvrant ainsi la voie à la conception d'un réseau de microcapteurs « tout intégré ». Par manque de temps, cette étude n'a pas pu être menée jusqu'à l'application dans les liquides physiologiques où l'utilisation de ces dispositifs prend tout son sens, en prévision d'une analyse multi-éléments.

Les perspectives envisagées de ce travail concernent à très court terme la poursuite de la mise au point du microcapteur intégré sur silicium. Plusieurs points sont à aborder. Le premier consiste à intégrer l'étape de fonctionnalisation de la surface de l'électrode de travail dans le procédé technologique de fabrication collective. Il semble nécessaire pour cela de vérifier que :

- l'état de surface des électrodes auxiliaire (en platine) et de référence (en argent) ne sera pas altéré par l'adsorption des produits utilisés pour la fonctionnalisation de l'électrode de travail en or
- les dernières étapes du protocole de fabrication précédant la découpe des composants, telles que le dépôt d'une résine de protection, le pré-recuit et

son nettoyage post-découpe avec les différents solvants, ne modifieront pas sensiblement les propriétés chimiques et électriques du film de PEDOT.

Le deuxième point a pour objet de proposer in fine un microcapteur autonome. Cela passe par la réalisation d'une électrode de référence Ag/AgCl par oxydation électrochimique du matériau d'électrode en milieu chlorure. Plusieurs protocoles sont disponibles dans la bibliographie (électrolyse à potentiel constant ou à intensité constante, voltammétrie à balayage linéaire de potentiel) sans qu'aucune étude comparative n'ait jamais évalué leurs avantages et inconvénients. Cette étude doit être menée en premier lieu afin d'éprouver ensuite le microcapteur en fonctionnement autonome pour le dosage des deux molécules antioxydantes, non seulement dans le sérum sanguin mais aussi dans d'autres milieux biologiques (urine, salive, peau...)

Au-delà de l'évaluation des performances du microcapteur et de ses applications dans le domaine de l'analyse en biologie clinique, d'autres perspectives sont envisagées à moyen terme, qui s'intéressent aux réactions qui ont lieu à l'interface polymère-solution, voire même à l'intérieur du polymère. Deux objectifs sont poursuivis. Le premier concerne une meilleure connaissance des réactions ou interactions entre les acides ascorbique et urique et les centres redox et/ou hydrophobes du PEDOT. Cet aspect est important pour espérer améliorer encore la sélectivité de la mesure. Le deuxième volet a pour but de démontrer avec certitude l'existence d'un mécanisme de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique au voisinage de l'électrode, notamment par la détermination des profils de concentration des deux espèces et l'évaluation de la constante de vitesse. Ces deux processus seront étudiés localement à l'aide d'un microscope électrochimique à balayage (SECM) dont l'équipe vient de faire l'acquisition très récemment.

Abréviations & Symboles

Abréviations

Abréviation	Désignation
AA, AH ₂	Acide ascorbique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH ⁻	Anion ascorbate
AH [·]	Radical ascorbyl
ATP	Adénosine triphosphate
Allan	Allantoïne
AU	Acide urique
C	Réaction chimique
CoQH ₂	Coenzyme Q réduite
CoQ [·]	Coenzyme Q oxydée
Cys	Cystéine
ECS	Electrode au calomel saturée
ENH	Electrode normale à hydrogène
DAU	4, 5- diol de l'acide urique
DHA	Acide déhydroascorbique
Dop	Dopamine
DTA	démence de type Alzheimer
E	Etape de transfert électronique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSH-Px	Glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion oxydé

Abréviation	Désignation
G6PD	Glucose 6 phosphate déshydrogénase
HDL	High density lipoprotein ou lipoprotéines de haute densité
Hp	Haptoglobine
LDL	Low density lipoprotein ou lipoprotéines de basse densité
MADB	Disodique N,N-bis(4-sulfobutyl)-3,5-diméthylaniline
mb	Membrane
MDA	Malondialdéhyde
NAC	N- Acétyl-L- cystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée
NO	Nitric oxide
OPD	Ortho-phénylène diamine
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
R [·]	Radical alkyle
R.E.	Réticulum andoplasmatique
RNA	Acide ribonucléique
ROO [·]	Radical peroxyde
ROOH	Peroxyde lipidique
RPE	résonance paramagnétique électronique
SECM	Scanning electrochemical microscopy ou microscopie électrochimique à balayage
SOD	Superoxyde dismutase
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
TBA	Acide thiobarbiturique
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

Abréviation	Désignation
T.E.H	Transfert électronique hétérogène
TNF	Tumor necrosis factor
Xanth	Xanthine

Constante physique

Constante physique	Désignation	valeur
F	Constante de Faraday	96500 C.mol ⁻¹
R	Constante des gaz parfait	8,314 J.mol ⁻¹ .K ⁻¹

Indice

Indice	Désignation
a	Anodique
c	Cathodique
Ox	Oxydant
Red	Réducteur
Sol	Solution (en solution)
ele	Electrode (à l'interface électrode /solution)

Symboles

Symbole	Désignation	Unité
a_i	Activité de l'espèce	
C_i	Concentration de l'espèce	mol. cm ⁻³
D	Coefficient de diffusion	cm ² .s ⁻¹
E	Potentiel	V
E_{eq}	Potentiel à l'équilibre	V
E°	Potentiel standard	V
$E^{o'}$	Potentiel standard apparent	V
$E_{(I=0)}$	Potentiel à courant nul	V
E_i	Potentiel initial	V
E_p	Potentiel de pic	V
$E_{1/2}$	Potentiel de demi-vague	V
I	Intensité de courant	A
I_0	Courant d'échange	A
$I_{capacitif}$	Courant capacitif	A
$I_{faradique}$	Courant faradique	A
I_{lim}	Intensité limite	A
I_p	Intensité du pic	A
J	Densité de flux	mol. cm ⁻² .s ⁻¹
k	Constante de vitesse	cm. s ⁻¹

Symbole	Désignation	Unité
k°	Constante intrinsèque de la vitesse de transfert électronique hétérogène	cm. s ⁻¹
N	Nombre de moles d'espèces produites ou consommées	mol
n	Nombre d'électron échangé	
Q	Quantité de charge électrique	C
r_0	Rayon de l'électrode	cm
ν	Coefficient stœchiométrique	
η	Surtension	V
δ	Epaisseur de la couche de diffusion	cm

Voltammetric microsensor using PEDOT-modified gold electrode for the simultaneous assay of ascorbic and uric acids in human blood serum

Summary :

Ascorbic (AA) and uric (UA) acids are of a great biological interest considering the various physiological roles they play (antioxidants, cofactor of hydroxylation, marker of the purins metabolism). In medicine, the assay of both molecules contributes to the establishment of diagnosis and therapies. In alternative to the traditional methods currently used (high performance chromatography liquid and spectrometry), which are generally time consuming and often require costly materials, complex experimental protocols and sample pretreatment, the aim of this work is to develop a voltammetric microsensor functionalized by a electrogenerated conducting polymer (3,4-ethylenedioxythiophene) PEDOT.

This sensor made possible a selective and sensitive simultaneous detection of both acids. The study of the electropolymerization parameters (PEDOT film thickness, electropolymerization potential range, monomer concentration) and of the electrochemical measurements parameters (potential scan rate) allows the optimization of the analytical performances of the microsensor (sensitivity, limit of detection and linear range). The study highlighted also an EC' mechanism of regeneration of uric acid by ascorbic acid in the vicinity of the electrode.

Electrochemical assay of the two acids was finally performed in the human blood serum without any preparation of the sample. The results are in very good agreement with those of the standardized chromatographic and enzymatic methods.

Keywords :

Microsensors, modified electrode, conducting polymers, antioxidants, ascorbic acid, uric acid, human blood serum

Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylène dioxithiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin

Fadhila SEKLI-BELAIDI

Directeurs de thèse : Pierre GROS
Pierre TEMPLE-Boyer
Université Paul Sabatier, Toulouse

Résumé :

Les acides ascorbique (AA) et urique (AU) sont d'un grand intérêt biologique vu les différents rôles qu'ils jouent dans l'organisme (agents antioxydant, cofacteur d'hydroxylation, marqueur du métabolisme des purines). Chez les cliniciens, le dosage de ces deux molécules aide à l'établissement de diagnostics et aux suivis thérapeutiques. Face aux méthodes classiques actuellement utilisées (la chromatographie liquide à haute performance et la spectrométrie), qui nécessitent souvent des étapes de prétraitement de l'échantillon, l'objectif de ce travail est de mettre au point un microcapteur voltammétrique fonctionnalisé par un polymère conducteur électrogénéré le poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT.

Le capteur a permis de doser sélectivement et simultanément les deux acides. L'étude des conditions d'élaboration du film (paramètres d'électrolyse, épaisseur du dépôt) et des paramètres de mesure électrochimique a permis d'optimiser les performances analytiques du capteur (sensibilité, seuil limite de détection, domaine de linéarité) dans des solutions modèles. L'étude a mis en évidence un mécanisme EC' de régénération de l'acide urique par l'acide ascorbique au voisinage de l'électrode. Le capteur a ensuite été éprouvé directement dans le sérum sanguin sans aucune préparation de l'échantillon. Les résultats des dosages électrochimiques des deux acides sont en très bonne adéquation avec ceux des méthodes chromatographiques et enzymatiques.

Mots Clés :

Microcapteur électrochimique, modification de surface, polymères conducteurs, antioxydants, acide ascorbique, acide urique, sérum sanguin

Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement

Laboratoire de Génie Chimique UMR CNRS/INP/UPS 5503.
Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes LAAS-CNRS.