

*REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE*

*UNIVERSITE Mohammed Seddik Ben Yahia JIJEL
FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES*



Thèse

Présenté pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle

En :

GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Par :

Sarra BOURAOUI épouse DOUARA

THEME

Elaboration, étude et développement de capteurs (bio)chimiques à base de substances actives de plantes pour la détection sélective de quelques polluants dans les milieux hydriques.

Devant le Jury composé de :

- | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| • M. K. Rida | <i>Prof. Université de Jijel</i> | Président |
| • M. A. Zazoua | <i>Prof. Université de Jijel</i> | Rapporteur |
| • M. A. Soualah | <i>Prof. Université de Béjaia</i> | Examineur |
| • M. H. Khirredine | <i>Prof. Université de Béjaia</i> | Examineur |

Remerciements

*Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et notamment mon encadrant Monsieur le professeur **Ali ZAZOUA**, pour son intérêt et son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant ma recherche et la rédaction de ma thèse.*

*Je remercie vivement Monsieur le professeur à l'Université de Jijel **Kamel RIDA** pour m'avoir fait l'honneur d'être le président de jury.*

*Je suis très reconnaissante envers Monsieur **Ahcène SOUALAH**, professeur à l'université de Béjaia et Monsieur **Khiredine HAFIT**, professeur à l'université de Béjaia d'avoir bien voulu mobiliser leurs temps et leurs compétences pour juger ce travail.*

*Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux de **Mme N. JAFFREZIC-RENAULT**, Directrice de recherche CNRS au laboratoire de Science Analytique de l'université Claude Bernard Lyon 1, qui nous a accueillis à bras ouvert dans son laboratoire.*

*Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Je suis redevable à mon mari **Rochdi**, ma petite fille **Farah**, ma mère et ma famille, pour leur soutien moral et matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix.*

عرفت أجهزة الاستشعار البيوكيميائية تطورا ملحوظا في الآونة الأخيرة نظرا لسرعتها، دقتها، انتقائها وقلة تكلفتها كما انها لا تحتاج إلى وسائل ضخمة. الهدف من هذا العمل هو انجاز جهازين استشعاريين باستعمال خاصية التجميع التي تمتلكها البوليفينولات من اجل الكشف عن المعادن الثقيلة في الأوساط المائية. لقد قمنا باستخلاصها بواسطة النقاة بالأسيتون من قشور الرمان. النتائج المتحصل عليها جد مشجعة وتمكننا من تطوير هذا المجال واستخدام هذه الأجهزة من أجل الكشف عن مواد اخرى في مختلف المجالات.

كلمات دلالية: أجهزة الاستشعار، الرمان، بوليفينولات، معادن ثقيلة.

Abstract

Biosensors have been a remarkable development because it provides systems that are simple, reliable, fast and selective. This work presents the development of to sensor made from a gold electrode and a receiving membrane based on polyphenols extracted from the skin of *Punica granatum*. L (pomegranate) for real-time detection of heavy metals in a hydrous environment. The basic principle of this device is the complexing (chelating) of metal ions through the adjacent hydroxyl groups contained in the chemical structures of the polyphenols. The electrochemical characterisation was performed by using electrochemical impedance spectroscopy and square wave voltammetry. Other morphological and structural analyses were performed by using Fourier transform infrared spectroscopy and atomic-force microscopy.

Keywords: sensors; Pomegranate; polyphenols; heavy metals.

Résumé:

Les biocapteurs sont généralement des systèmes simples, constitués d'une couche sensible permettant la reconnaissance de l'espèce avec laquelle elle interagit et d'un système transducteur transformant l'interaction chimique en un signal électrique. Le but de ce travail est le développement de deux biocapteurs à base des des polyphénols extraits de l'écorce de *punica granatum*L. en vue de la détection de quelques métaux lourds. Ces capteurs sont caractérisés par deux méthodes électrochimiques à savoir l'impédancemetrie et la voltammétrie à onde carrée et deux méthodes morphologique et structurale en l'occurrence la microscopie à force atomique et la spectroscopie à transformée de fourier. Notre travail nous donne des résultats encourageants pour une analyse simultanée des eaux réelles contaminées par des métaux lourds avec une sélectivité et sensibilité très élevées est un temps de réponse petit.

Mots clés : biocapteurs ; Grenade ; polyphénols ; métaux lourds.

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
------------------------------------	---

Chapitre I : Partie théorique

Introduction.....	3
I.1 Généralités sur les biocapteurs.....	3
I.1.1. Définition.....	4
I.1.2 Historique.....	5
I.1.3. Structure d'un capteur.....	5
I.1.4. Qualités d'un biocapteur.....	6
I.1.5. Caractéristiques métrologiques d'un capteur.....	7
I.1.6. Différentes méthodes électrochimiques de détection	9
I.1.7. Le biorécepteur.....	12
I.2. Généralités sur les métaux lourds.....	14
I.2.1. Définition.....	14
I.2.2. Les Sources des métaux lourds.....	15
I.2.3. Les Propriétés physico-chimiques des métaux lourds.....	15
I.2.4. Effet des métaux lourds sur la santé et l'environnement.....	16
I.2.5. Paramètres influant sur la mobilité des métaux dans l'eau.....	16
I.2.6. Généralités sur les métaux utilisés.....	17
I.2.6.1. Le cuivre.....	17
I.2.6.2. Le nickel.....	19
I.2.6.3. Le plomb.....	21
I.2.6.4. Le cadmium.....	24
I.3. Les polyphénols de l'écorce de la grenade.....	28
I.3.1. Définition des polyphénols.....	28
I.3.2. Classification des polyphénols.....	29
I.3.2.1. Les acides phénoliques et les coumarines.....	29
I.3.2.2. Les flavonoïdes.....	31

I.3.2.3. Les tanins.....	33
I.3.3. <i>Punica granatum L.</i>	35
I.3.3.1. Description botanique du grenadier.....	36
I.3.3.2. L'écorce du fruit.....	36
I.3.4. Propriétés des polyphénols.....	38
I.3.4.1. Solubilité des polyphénols.....	38
I.3.4.2. Chélation des ions métalliques.....	38
I.4. Techniques électrochimiques.....	39
I.4.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).....	39
I.4.2. La voltamétrie cyclique.....	43
I.4.3. La voltamétrie à ondes carrées SWV.....	45
I.5. Etat de l'art.....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	51

Chapitre II : Partie expérimentale

Introduction.....	57
II.I. Caractérisation de molécules bioactives extraites de l'écorce de <i>Punica Granatum L.</i>	58
II.I.1 Préparation de l'échantillon.....	58
II.I.2. Préparation de l'extrait de l'écorce (Macération, évaporation et affrontement).....	58
II.I.3. Testes phytochimiques sur l'extrait.....	59
II.I.4. Méthodes d'extraction et de dosage des composés phénoliques.....	60
II.I.4.1. Préparation de l'extrait brute Acétonique.....	61
II.I.4.2. Rendement d'extraction.....	61
II.I.4.3. Détermination de la teneur en polyphénols.....	61
II.I.4.4. Extraction par les solvants.....	67
II.I.5. Méthodes et techniques d'analyse.....	70
II.I.5.1. Chromatographie sur couches minces (C.C.M).....	70
II.I.5.2. caractérisation par chromatographie liquide à haute performance.....	72
II.I.5.3. Caractérisation physico- chimiques de l'extrait par infrarouge FTIR.....	73
II.2. Etude de la réaction de complexation du cuivre par les polyphénols.....	74
II.2.1. Etude de la Cinétique de complexation.....	74
II.2.1.1. Etude du mécanisme cinétique de l'adsorption du cuivre.....	76
II.2.1.2.Processus de diffusion.....	76

II.2.2. Etude de l'équilibre d'adsorption.....	77
II.2.2.1. Modélisation des isothermes d'adsorption.....	78
II.2.3 Etude thermodynamique de l'adsorption du cuivre.....	80
II.3. Développement des biocapteurs.....	81
II.3.1. Le transducteur.....	81
II.3.2. Fonctionnalisation des électrodes.....	82
II.3.3. Caractérisation structurale et morphologique.....	83
II.3.4. Mesures électrochimiques.....	85
Références bibliographiques.....	88

Chapitre III : Résultats et discussions

Introduction.....	91
III.I. Caractérisation de molécules bioactives extraites de l'écorce de <i>Punica Granatum L.</i>	91
III.1.1. Rendement d'extraction.....	91
III.1.2 Screening phytochimique.....	92
III.1. 3. Détermination de la teneur en polyphénols.....	93
III.1. 4 Analyse chromatographique sur couche mince CCM.....	93
III.1. 5 Chromatographie liquide à haute performance.....	95
III.1.6. Caractérisation physico- chimiques de l'extrait par FTIR.....	97
III.2. Etude du mécanisme réactionnel du cuivre (II) avec les polyphénols.....	99
III.2.1. Etude cinétique.....	101
III.2.1.1. Effet de la concentration initiale du cuivre et du temps d'équilibre.....	101
III.2.1.2. Effet de la vitesse d'agitation.....	102
III.2.1.3. Effet de la température de la solution.....	102
III.2.1.4.Effet du pH de la solution.....	103
III.2.1.5. Effet de la quantité de l'adsorbant.....	104
III.2.2.Etude du mécanisme cinétique de l'adsorption du cuivre.....	105
III.2.2.1.Modèle du pseudo premier et pseudo deuxième ordre.....	105
III.2.2.2. Etude du processus de diffusion.....	106
III.2.3. Etude de l'équilibre d'adsorption.....	107
III.2.3.2. Modélisation des isothermes d'adsorption.....	108
III.2.4. Etude thermodynamique.....	109
III.2.4.1. Détermination de l'enthalpie ΔH^0 et de l'entropie ΔS^0 d'adsorption.....	109

III.3. Construction des biocapteurs.....	111
III.3.1 Construction du capteur à base de membrane polymérique (Capteur I).....	111
III.3.1.1 Caractérisation morphologique par AFM.....	111
III.3.1.2 Caractérisation électrochimique.....	112
III.3.1.3 Etude de la sélectivité du capteur I.....	119
III.3.1.5 Temps de réponse.....	120
III.3.2. Construction du capteur à base du gel (Capteur II).....	121
III.3.2.1 Caractérisation structurale par FTIR.....	121
III.3.2.2 Caractérisation électrochimique.....	122
III.3.2.3 Etude de la sélectivité du capteur II.....	130
III.3.2.4 Temps de réponse du capteur II.....	130
III.3.2.5 Comparaison entre la sensibilité des deux capteurs par SWV.....	131
III.3.3 Performance du dispositif II dans le milieu réel.....	132
III.3.3.1 Etude qualitative.....	132
III.3.3.2 Etude quantitative (Concentration des métaux lourds).....	133
Conclusion.....	135
Références bibliographiques.....	136
<i>Conclusion générale</i>	138

Liste des figures

Figure I.1 : Principe de fonctionnement des biocapteurs.....	04
Figure I.2. Structure d'un capteur.....	05
Figure I.3. Sélectivité d'un biocapteur.....	06
Figure I.4. Courbe d'étalonnage d'un capteur.....	07
Figure I.5. Principe de mesure potentiométrique : accumulation de charge électrique à la surface de l'électrode indicatrice.....	10
Figure I.6. Schéma de principe des mesures conductimétriques.....	11
Figure I.7. Schéma de principe des mesures impédimétriques.....	12
Figure I.8. Représentation schématique des différents biorécepteurs.....	13
Figure I.9: les sources d'émission des métaux lourds.....	15
Figure I.10: diagramme de spéciation du cuivre en fonction du Ph.....	19
Figure I.11 : Spéciation du Nickel.....	21
Figure I.12 : spéciation du plomb.....	24
Figure I.13 : spéciation du cadmium.....	27
Figure I.14. Différentes familles de polyphénols.....	30
Figure I.15. Acide gallique.....	30
Figure I.16. Acide ellagique.....	30
Figure I.17. Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques.....	30
Figure I.18. Structure chimique de quelques coumarines.....	31
Figure I.19. Squelette de base des flavonoïdes.....	31
Figure I. 20 : Structures chimiques de quelques flavonols.....	32
Figure I. 21 : Structure de quelques anthocyanidines.....	33
Figure I.22. Structure de l'acide gallique et ellagique.....	34
Figure I.23 : Unités des tanins condensés.....	35
Figure I.24. Principaux composés phénoliques du <i>malicorium</i>	37
Figure I.25 : Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (M^{n+}).....	38
Figure I.26 : Modélisation des différentes couches d'un capteur constitué d'une électrode conductrice en contact avec une solution électrolytique.....	40
Figure I.27 : La double couche électrique.....	42
Figure I.28 : Diagramme de Nyquist.....	43
Figure I.29 : Voltampérométrie cyclique.....	44

Figure I.30. Séquence de balayage de potentiel utilisée en SWV (gauche) et exemple de courbe courant-potential obtenue (droite).....	46
Figure II.1: protocole de dosage des polyphénols totaux.....	62
Figure II.2: protocole de dosage des flavonoïdes totaux.....	63
Figure II.3: protocole de dosage des tanins.....	65
Figure II.4: protocole de dosage des tannins condensés.....	66
Figure II.5: protocole de dosage des tanins hydrolysables.....	67
Figure II.6. Protocole d'extraction par affrontement.....	69
Figure II.7 : Dispositif expérimental de la réaction en régime statique.....	76
Figure II.8 : Processus de diffusion.....	77
Figure II.9 : Méthode de dépôt des membranes « spin coating ».....	82
Figure II.10 : caractérisation morphologique par Microscopie à Force Atomique.....	84
Figure II.11 : Image par microscopie électronique à balayage d'une pointe AFM.....	85
Figure II.12 : La cellule électrochimique.....	85
Figure II.13 : Dispositif de mesure électrochimique.....	86
Figure III.1 : Chromatogramme HPLC des extraits étudiés.....	96
Figure III.2 : Spectre FTIR de l'extrait.....	97
Figure III.3 : unités de base des polyphénols.....	98
Figure III. 4: le mécanisme réactionnel de fixation du cuivre.....	99
Figure III.5. : Différents modes de rétention d'un élément métallique au sein d'un solide.....	100
Figure III.6: Effet de la concentration initial du cuivre et du temps d'équilibre.....	102
Figure III.7: Effet du pH.....	103
Figure III.8: diagramme de spéciation du cuivre en fonction du pH.....	104
Figure III.9: Effet de la quantité de l'adsorbant.....	104
Figure III.10: Cinétique du pseudo premier ordre.....	105
Figure III.11 : Cinétique du pseudo deuxième ordre.....	105
Figure III.12: Processus de diffusion intra-particulaire.....	107
Figure III.13: Isothermes d'adsorption du cuivre à différents températures.....	108
Figure III.14: Variation de la constante d'adsorption en fonction de la température.....	109
Figure III.15 : Image AFM en mode contact	111
Figure III.16 : Voltamogramme de l'électrode d'or et d'électrode fonctionnalisée.....	112
Figure III.17 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour des mesures d'impédance dans Au/PVC-extrait pour différentes concentrations du métal.....	113
Figure III.18 : Circuit équivalent modélisant les diagrammes de Nyquist.....	114

Figure III.19 : Réponse du capteur I en fonction de la concentration en métal.....	116
Figure III.20: voltamogramme à ondes carrées pour différentes concentrations en cuivre, cadmium plomb et nickel dans 50 nM de PBS (pH 7) avec ces courbes de calibration.....	118
Figure III.21: voltamogramme à ondes carrées des quatre métaux en mixture.....	119
Figure III.22 : Les spectres FTIR après complexation.....	121
Figure III.23 : Voltamogramme de l'électrode d'or nue (a), l'électrode fonctionnalisée avec le Gel (b) et avec la membrane polymérique	122
Figure III.24 :Diagrammes de Nyquist obtenus pour des mesures d'impédance dans Au/Gel pour différentes concentrations du Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} et Ni^{2+}	123
Figure III.25 : Comparaison de la détection des quatre métaux par le biocapteur II.....	125
Figure III.26 : Square wave voltamogramme pour différentes concentrations en Cuivre, Cadmium Plomb et Nickel.....	126
Figure III.27 : Courbes d'étalonnage pour les ions Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} et Cd^{2+}	127
Figure III.28 : Comparaison de la détection des quatre métaux par SWV.....	128
Figure III.29: Détection simultanée par SWV obtenu avec le capteur II.....	129
Figure III.30: Superpositions des courbes de calibration SWV.....	131
Figure III.31 : SWV des échantillons réels.....	133

Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification périodique des Métaux lourds.....	14
Tableau I.2. : Propriétés physico-chimiques du cuivre.....	17
Tableau I.3. : Propriétés physico-chimiques du nickel.....	20
Tableau I.4. : Propriétés physico-chimiques du plomb.....	22
Tableau I.5. : Propriétés physico-chimiques du cadmium.....	25
Tableau III.1 : Le rendement d'extraction.....	91
Tableau III.2 : Métabolites secondaires mis en évidence au niveau de l'écorce de la grenade.....	91
Tableau III.3 : Dosage des composés phénoliques.....	93
Tableau III.4: Résultats de la CCM analytique.....	94
Tableau III.5 : Temps de rétention des témoins utilisés en HPLC.....	95
Tableau III.6: Effet de la vitesse d'agitation sur l'adsorption du cuivre.....	102
Tableau III.7: Effet de la température de la solution.....	103
Tableau III.8 : Paramètres caractérisant la cinétique d'adsorption.....	106
Tableau III.9 : Paramètres caractérisant chaque modèle en adsorption.....	108
Tableau.III.10: Paramètres thermodynamiques du processus d'adsorption.....	110
Tableau III.11 : Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le cuivre(I).....	115
Tableau III.12 Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le nickel(I).....	115
Tableau III.13 Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le plomb(I).....	115
Tableau III.14 : Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le cadmium.....	115
Tableau III.15 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration (capteurI)..	116
Tableau III.16 : Comparaison entre les rayons atomiques et ioniques et l'électronégativité des métaux étudiés.....	117
Tableau III.17 : Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le cuivre(II).....	124
Tableau III.18 : Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le cadmium(II).....	124
Tableau III.19 : Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le plomb(II).....	124
Tableau III.20 : Valeurs des éléments du circuit équivalent pour le nickel(II)	124
Tableau III.21 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration (capteurII).....	125
Tableau III.22 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration SWV.....	128
Tableau III.23 : Comparaison des coefficients de sélectivité des deux capteurs étudiés.....	130
Tableau III.24 : Concentration en métaux lourds des échantillons réels.....	132
Tableau III.25 : Valeurs des concentrations réelles et calculées des échantillons réelles.....	134

Liste des notations

SD : écart type de la réponse d'un capteur ;

s : la pente de la droite de calibration ;

S = LOD: la limite de détection d'un capteur ;

E₀ : le potentiel normal de l'électrode ;

R : la constante des gaz parfaits ;

n : la charge de l'espèce déterminant le potentiel ;

F : constante de Faraday ;

a_i : l'activité de l'espèce déterminant le potentiel ;

ADN : acide désoxyribonucléique ;

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé ;

pH : Le potentiel hydrogène ;

C.F.C : cubique à faces centrées ;

E : le potentiel ;

I : le courant ;

CEE : circuit électrique équivalent ;

R_s : la résistance de l'électrolyte ;

R_{tc} : la résistance de transfert de charge ;

C_{pe} : la capacité de double couche ;

Z_w : l'impédance de Warburg ;

ρ: la résistivité de la solution ;

A : la surface de l'électrode de travail ;

l : la distance entre l'électrode de travail et l'électrode de référence ;

T : la température ;

n_e : le nombre d'électrons transférés ;

i₀ : la densité de courant d'échange au potentiel d'équilibre ;

C_{dl} : la capacité de double couche ;

PIH : plan interne d'Helmholtz ;

PEH : plan externe d'Helmholtz ;

ϵ_0 : la permittivité du vide ;

ϵ_p : la permittivité relative de la couche ;

δ : l'épaisseur de la double couche ;

C : la concentration de l'espèce électrolysée au sein de la solution ;

EIS : spectroscopie d'impédance ;

SWV : la voltamétrie à ondes carrées ;

ETM : élément trace métallique ;

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la poudre végétale de départ ;

BSA : albumine de sérum bovin ;

TEA : Triéthanolamine ;

CCM : la chromatographie sur couche mince ;

HPLC : La chromatographie liquide à haute performance ;

FTIR: Fourier Transformed InfraRed spectroscopy ;

Q_t : la quantité du métal retenu par unité de masse d'adsorbant au moment t ;

R (%): l'efficacité d'élimination du cuivre ;

C_0 : la concentration initiale du cuivre ;

C_t : la concentration du cuivre à l'instant t ;

V : le volume de la solution ;

M : la masse de l'extrait ;

t : le temps ;

k_{WM} : la constante de la diffusion intra- particulaire ;

q_m : capacité maximale d'adsorption ;

k : constante d'équilibre de langmuir;

n_f, k_f: les constantes de Freundlich ;

K_{elov}: constante d'Elovich ;

K_o : constante d'équilibre ;

ΔQ : variation de la chaleur d'adsorption;

R : constante des gaz parfaits ;

K_{D-B} : constant liée à l'énergie moyenne de l'adsorption ;

K_{ads} : le coefficient de distribution ;

ΔH : l'enthalpie;

ΔS : l'entropie ;

ΔG⁰ : l'enthalpie libre standard;

PVC : polychlorure de vinyle ;

THF : Tetra-hydrofurane ;

DOP : Dioctyl phthalate ;

LAAS : laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes ;

AFM : microscopie à force atomique ;

PBS : Le tampon phosphate salin

rpm : rotation par minute ;

MALDI-TOF : spectromètre de masse.

Introduction générale

Dans les écosystèmes aquatiques naturels les métaux lourds se trouvent à de faibles concentrations généralement de l'ordre du nanogramme ou du microgramme par litre. Ces derniers temps la présence de métaux lourds contaminants et à des concentrations supérieures aux charges naturelles est devenue un problème de plus en plus préoccupant.

Contrairement à d'autres polluants les métaux lourds s'accumulent subrepticement pour finir par atteindre des seuils toxiques. L'exposition permanente des êtres vivants à des métaux lourds toxiques est un grave problème ne cessant de prendre de l'ampleur dans le monde entier. Elle s'est fortement aggravée au cours des cinquante dernières années avec l'augmentation exponentielle de l'utilisation de métaux lourds dans les processus et produits industriels.

Différentes techniques d'analyse destinées à la détection des métaux lourds ont été déposées comme la spectrométrie d'absorption atomique. Ces analyseurs sont généralement des systèmes relativement complexes associant différents éléments mécaniques, chimiques et électriques. L'ensemble est souvent coûteux, encombrant et énergivore, ce qui les rend peu aptes à des mesures sur sites. De plus, ces instruments sont souvent affligés d'un temps de réponse long soit par la technique de détection elle-même, soit par la nécessité de manipulation des échantillons.

Les capteurs chimiques ou biochimiques, quant à eux, sont généralement des systèmes simples, constitués d'une couche sensible permettant la reconnaissance de l'espèce avec laquelle elle interagit, et d'un système transducteur transformant l'interaction chimique en un signal électrique. Souvent, les deux fonctions sont intimement liées. Les avantages principaux des capteurs chimiques sont : leur faible encombrement, leur faible consommation énergétique, leur faible coût et des temps de réponse relativement courts. Tous ces avantages en font des instruments idéaux pour les mesures sur site et le contrôle de procédé en ligne.

Il existe plusieurs familles de capteurs chimiques qui se distinguent par le principe de transduction ou le type de couche sensible. Si ce dernier est un élément biologique, on parle d'un biocapteur dont ce terme est abrégé par « senseur biologique ». Ce dispositif se compose d'un transducteur et d'un élément biologique dans lequel une reconnaissance

biologiquement dérivée est accouplée à un transducteur pour permettre le développement quantitatif d'un certain paramètre biochimique complexe.

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur, il sert à identifier l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif conduisant à des changements de propriétés physiques, chimiques ou optiques. La difficulté majeure qui freine le développement des biocapteurs est liée aux problèmes de stabilité de la molécule biologique fixée sur la surface du transducteur au cours de l'étape de fonctionnalisation.

Dans la nature, il existe un grand nombre de biomolécules douées de fonction de reconnaissance. Ce sont d'ailleurs elles qui permettent la survie d'une espèce en assurant les fonctions vitales d'un organisme telles que les métabolites secondaires. Parmi ceux-ci les composés phénoliques qui sont des biocomplexants.

Notre travail de thèse porte sur le développement de deux capteurs en vue de la détection des métaux lourds en milieu hydrique. Ce manuscrit comprend 3 chapitres.

Le premier chapitre est constitué d'une revue bibliographique donnant une présentation générale des biocapteurs qui décrit brièvement les différentes composantes impliquées dans la construction des biocapteurs et les principaux mécanismes liés à leur fonctionnement. Il pose ainsi des rappels sur les métaux lourds en tant que polluants et leur impact sur la santé et l'environnement. Des notions générales sur la grenade et les polyphénols constituant son écorce sont également rappelées. On termine ce chapitre par la présentation d'un état de l'art sur les capteurs chimiques et les biocapteurs des métaux lourds. On s'est focalisée sur les polyphénols de l'écorce de la grenade qui forment des complexes avec les métaux lourds.

Dans le second chapitre, on détaille les techniques expérimentales mises en œuvre au cours de notre travail en allant de l'extraction des polyphénols de l'écorce de la grenade et leur identification par différentes méthodes jusqu'aux différentes caractérisations effectuées sur les deux capteurs, en passant par l'étude du mécanisme réactionnel des polyphénols avec les métaux lourds.

Le troisième chapitre englobe tous les résultats expérimentaux obtenus par les différentes techniques et leurs interprétations.

Nous finirons ce manuscrit par une conclusion générale récapitulant les principaux résultats.

Chapitre I
Partie théorique

Sommaire

Introduction.....	3
I.1 Généralités sur les biocapteurs.....	3
I.1.1. Définition.....	4
I.1.2 Historique.....	5
I.1.3. Structure d'un capteur.....	5
I.1.4. Qualités d'un biocapteur.....	6
I.1.5. Caractéristiques métrologiques d'un capteur.....	7
I.1.6. Différentes méthodes électrochimiques de détection	9
I.1.7. Le biorécepteur.....	12
I.2. Généralités sur les métaux lourds.....	14
I.2.1. Définition.....	14
I.2.2. Les Sources des métaux lourds.....	15
I.2.3. Les Propriétés physico-chimiques des métaux lourds.....	15
I.2.4. Effet des métaux lourds sur la santé et l'environnement.....	16
I.2.5. Paramètres influant sur la mobilité des métaux dans l'eau.....	16
I.2.6. Généralités sur les métaux utilisés.....	17
I.2.6.1. Le cuivre.....	17
I.2.6.2. Le nickel.....	19
I.2.6.3. Le plomb.....	21
I.2.6.4. Le cadmium.....	24
I.3. Les polyphénols de l'écorce de la grenade.....	28
I.3.1. Définition des polyphénols.....	28
I.3.2. Classification des polyphénols.....	29
I.3.2.1. Les acides phénoliques et les coumarines.....	29

I.3.2.2. Les flavonoïdes.....	31
I.3.2.3. Les tanins.....	33
I.3.3. <i>Punica granatum L.</i>	35
I.3.3.1. Description botanique du grenadier.....	36
I.3.3.2. L'écorce du fruit.....	36
I.3.4. Propriétés des polyphénols.....	38
I.3.4.1. Solubilité des polyphénols.....	38
I.3.4.2. Chélation des ions métalliques.....	38
I.4. Techniques électrochimiques.....	39
I.4.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).....	39
I.4.2. La voltamétrie cyclique.....	43
I.4.3. La voltamétrie à ondes carrées SWV.....	45
I.5. Etat de l'art.....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	51

Chapitre I

Partie théorique

Dans ce chapitre les bases théoriques fondamentales sur les biocapteurs et des généralités sur les métaux lourds seront présentées, ainsi qu'un rappel bibliographique sur les polyphénols de la grenade en détaillant la composition de son écorce. Les techniques expérimentales électrochimiques utilisées dans cette thèse seront aussi détaillées. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à une synthèse bibliographique pour pouvoir situer l'originalité et l'objectif de notre travail vis-à-vis de la bibliographie.

I.1. GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS

Les réglementations françaises et européennes imposent le respect d'un certain nombre de normes en matière des rejets de métaux lourds. Pour vérifier que ces normes sont appliquées il est nécessaire de concevoir des instruments mieux appropriés pour faire des analyses au laboratoire après prélèvement sur sites. A cet usage les biocapteurs sont adaptés à la détection des métaux lourds. Ce domaine a connu un développement remarquable du fait qu'il offre des systèmes simples, fiables, rapides et sélectifs [1].

Au cours des 20 dernières années, la recherche et le développement dans le domaine des biocapteurs ont augmenté de façon exponentielle que ce soit en termes d'investissements, de nombre de publications scientifiques ou de nombre de chercheurs travaillant sur la thématique. Cet intérêt croissant pour les biocapteurs peut être attribué aux progrès technologiques importants dans le domaine de la microélectronique, des matériaux et de la biologie moléculaire.

Le grand avantage des biocapteurs réside dans leur concept original autorisant la réalisation de systèmes de mesure intégrés, autofonctionnels, miniaturisables, aisés à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu ou pas de traitement de l'échantillon à analyser [2].

Cette partie est une synthèse sur les biocapteurs dont le but est de présenter le contexte et les enjeux de ces derniers et de positionner le travail qui a été réalisé au cours de cette thèse.

I.1.1. Définition

Plusieurs définitions et terminologies ont été utilisées pour définir un biocapteur [3,4]. De façon générale, un biocapteur biochimique ou capteur biologique est un dispositif analytique qui se situe à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Les composantes essentielles du biocapteur incluent un élément de reconnaissance moléculaire qui constitue le biorécepteur et une composante physique qui constitue ce qu'on appelle le transducteur. L'élément sensible est constitué par un matériau biologique chargé de reconnaître sélectivement l'espèce spécifique qu'on désire analyser (analyte). En outre, plusieurs entités biologiques sont susceptibles d'être employées telles que les enzymes, les anticorps, les antigènes, les cellules, les tissus, l'ADN...etc.

En général, le transducteur joue le rôle d'un convertisseur des interactions physico-chimiques entre le biorécepteur et la substance cible, en un signal électrique. (Figure I.1).

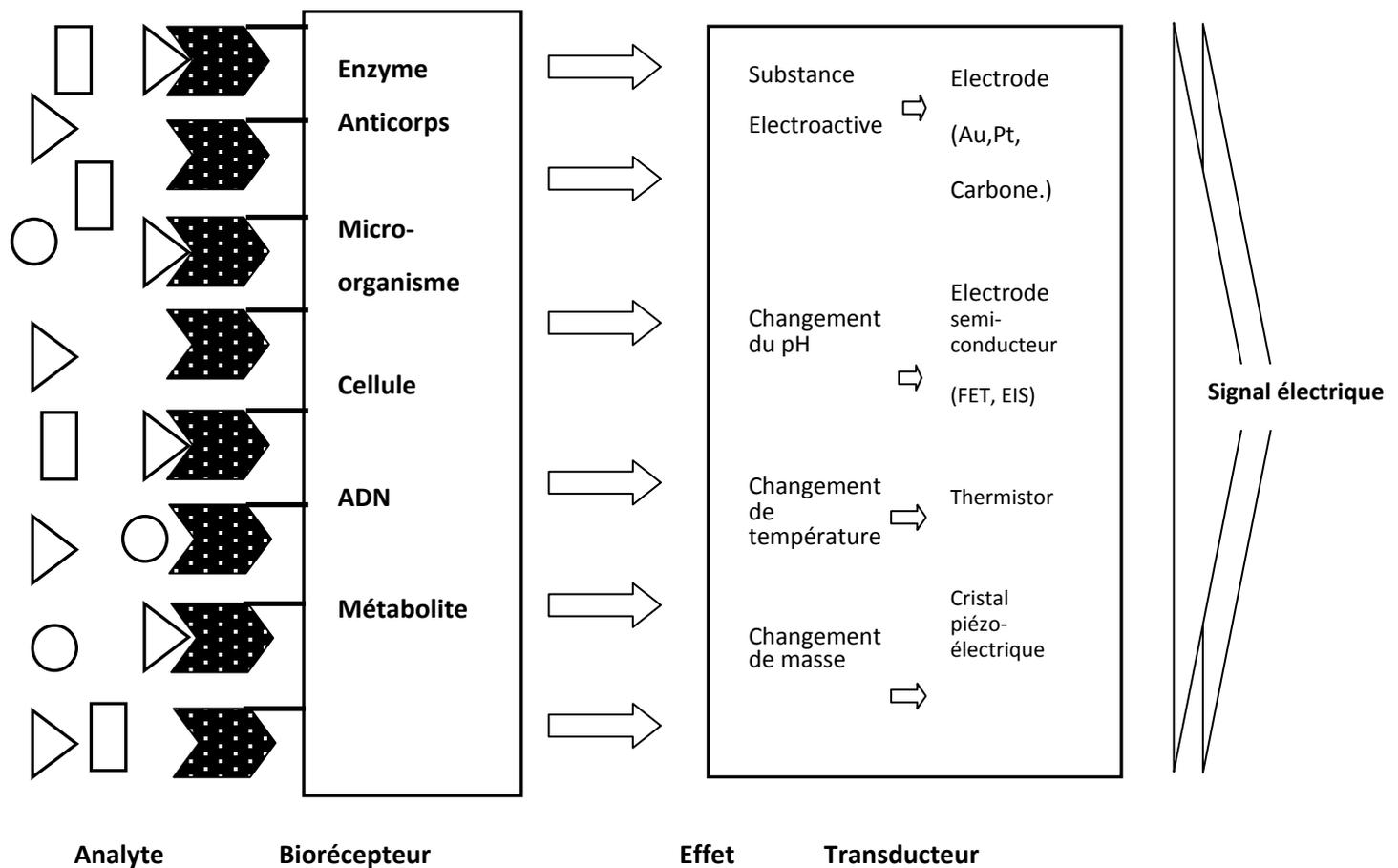


Figure I.1 : Principe de fonctionnement des biocapteurs [5].

I.1.2. Historique

Les premiers développements de biocapteurs ont été réalisés par Clark [6] en l'associant d'une membrane enzymatique contenant la glucose oxydase et une électrode à oxygène. En 1967, Updike et Hicks ont mis au point une électrode enzymatique permettant le dosage de glucose dans une solution biologique (La diminution de la concentration d'oxygène mesurée était proportionnelle à la concentration en glucose) [7]. Les idées de Clark sont devenues réalité commerciale en 1975 avec la relance réussie (premier lancement 1973) de l'analyseur de glucose par Yellow Springs Instrument Company (Ohio), basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène. Depuis ces premiers développements, l'intérêt porté aux biocapteurs ne cesse de grandir [2].

I.1.3. Structure d'un capteur

Les différentes parties constitutives d'un capteur sont décrites ci-dessous (figure I.2) :

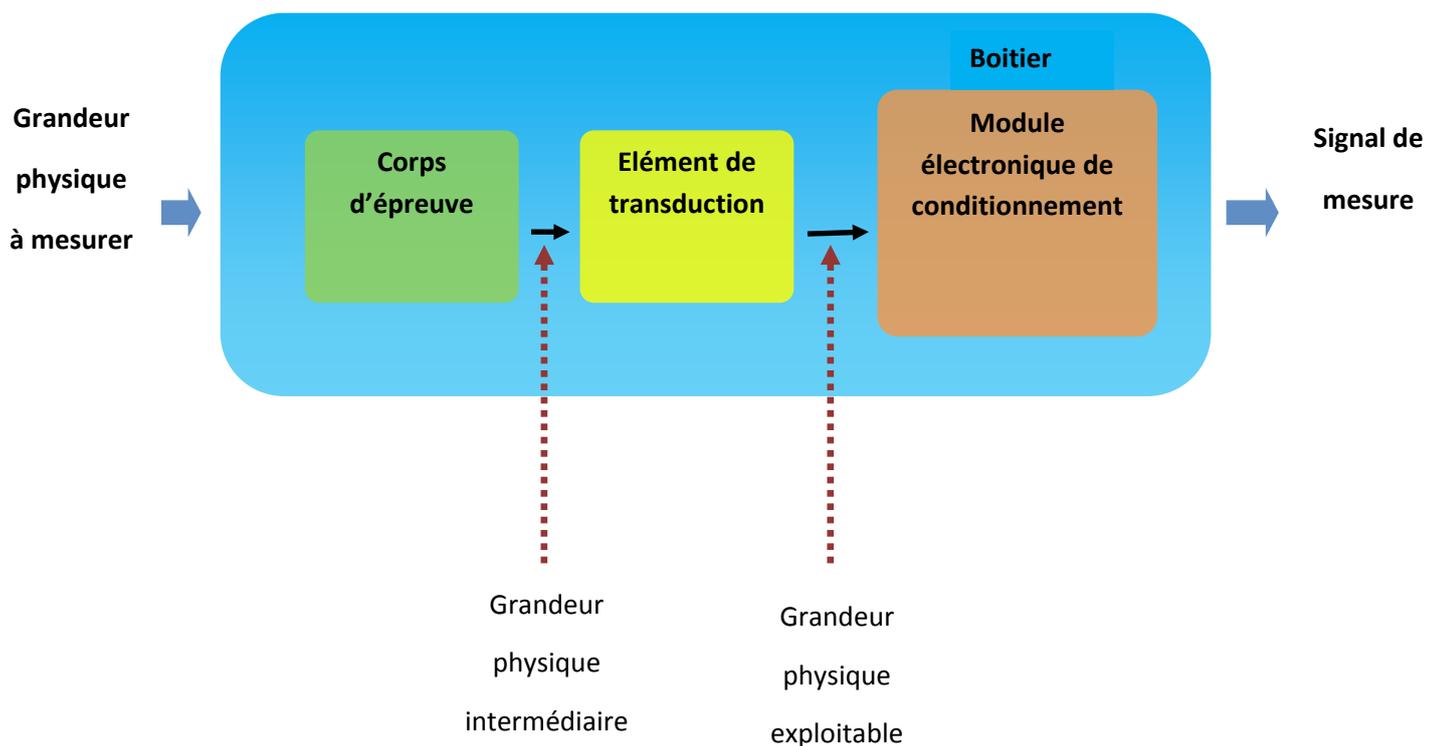


Figure I.2. Structure d'un capteur [8].

- **Le corps d'épreuve**

Le corps d'épreuve est un élément sensible qui réagit à la grandeur à mesurer. Il a pour rôle de transformer la grandeur à mesurer en une autre grandeur physique dite mesurable.

- **Transducteur**

Le transducteur est un élément sensible lié au corps d'épreuve. Il traduit les réactions du corps d'épreuve en une grandeur électrique constituant le signal de sortie.

- **Le boîtier**

Le boîtier est un élément mécanique de protection, de maintien et de fixation du capteur.

- **Module électronique de conditionnement**

C'est un dispositif qui convertit le signal de sortie du capteur en un signal de mesure standard. Il fait le lien entre le capteur et le système de contrôle commande. Il a pour rôle d'amplifier et de faire le traitement du signal électrique [8].

I.1.4. Qualités d'un biocapteur

Un biocapteur fiable doit être :

- **Sélectif** : ayant la capacité de distinguer entre des cibles différentes. C'est un paramètre qui dépend principalement du composant biologique, bien que parfois le choix du transducteur peut contribuer à la sélectivité (figure I.3).

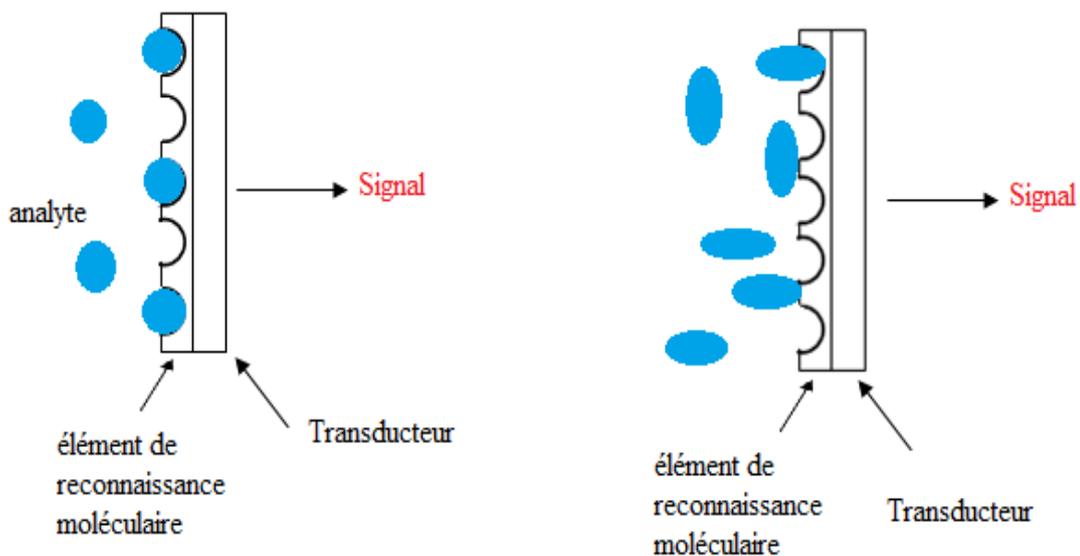


Figure I.3. Sélectivité d'un biocapteur [9].

- **Sensible** : Ce paramètre correspond au rapport entre l'augmentation de la réponse du capteur et la variation correspondante de la concentration de la cible.
- **Reproductible** : Capable de donner des réponses très voisines pour des mesures répétées de la même concentration de la cible.
- **Exact** : Permettant d'avoir un bon accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la concentration de la cible. L'écart est appelé **erreur absolue**.

- *Avoir une basse limite de détection* qui correspond à la valeur minimale de la concentration de la cible pouvant être détectée par le biocapteur de façon significativement différente du bruit de fond [9].

I.1.5. Caractéristiques métrologiques d'un capteur

Les caractéristiques métrologiques d'un capteur constituent les liens effectifs entre le capteur et la grandeur qu'il mesure.

a) L'étalonnage

L'étalonnage permet d'ajuster et de déterminer sous forme graphique la relation entre la mesurande et la grandeur électrique de sortie (figure I.4). Très souvent l'étalonnage n'est valable que pour une seule situation d'utilisation du capteur [8].

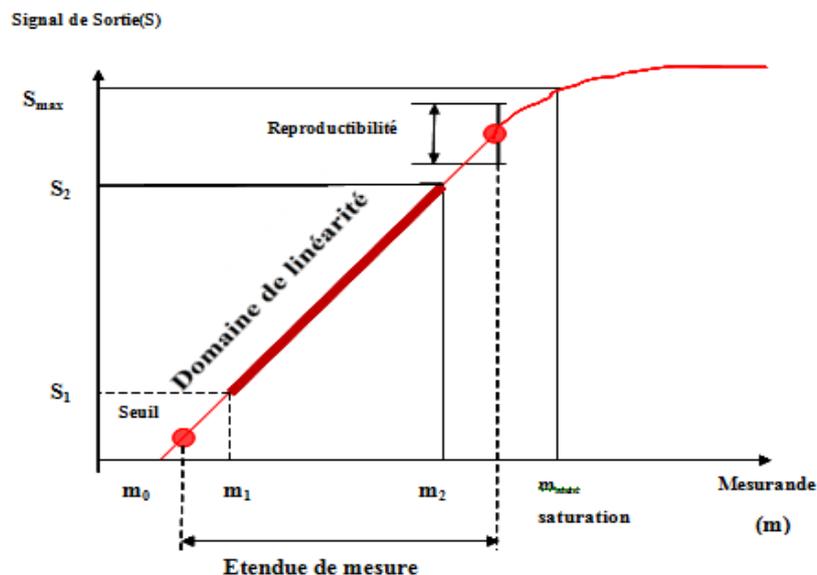


Figure I.4: Courbe d'étalonnage d'un capteur.

b) Étendue de mesure

L'étendue de mesure est définie sur la courbe d'étalonnage du capteur (figure I.4). A l'extérieur de cette zone se trouvent deux valeurs particulières: le seuil et la saturation. Le phénomène de saturation est fréquemment rencontré en physique. Même si la valeur de la mesurande augmente, la grandeur de sortie ne peut dépasser une valeur maximale S_{max} : pour $m > m_{max}$, $S = S_{max}$. On ne peut donc pas effectuer de mesurage pour des valeurs au dessus de m_{max} .

Le seuil ou limite de détection correspond à la valeur minimale de la mesurande nécessaire pour obtenir une grandeur de sortie non nulle : pour $m = m_0$, S correspond au bruit de fond de la mesure [8].

$$S = LOD = 3.3 * SD / s \dots \dots \dots \text{Eq.I.1.}$$

Avec SD : l'écart type de la réponse.

S : la pente.

En résumé, on ne peut mesurer que des mesurandes comprises entre m_0 et m_{\max} .

c) Domaine de linéarité

Dans ce domaine de linéarité, la variation de la grandeur de sortie est proportionnelle à la variation de la mesurande.

d) Sensibilité

La sensibilité (s) est une caractéristique importante pour l'exploitation et l'interprétation des mesures. Elle est définie comme étant la variation du signal de sortie (S) par rapport à la variation de la mesurande (m) (pente de la portion linéaire de la courbe d'étalonnage) et s'écrit :

$$S = \frac{\Delta S}{\Delta m} \dots \dots \dots \text{Eq.I.2.}$$

e) Le temps de réponse

La connaissance du temps de réponse d'un capteur est un élément essentiel lors de la réalisation de mesures [8]. La rapidité est caractérisée par le temps que met le capteur à réagir à une variation brusque de la mesurande. Cependant la valeur finale étant le plus souvent atteinte de manière asymptotique, elle correspond au temps nécessaire pour que le capteur délivre une certaine portion α de la pleine amplitude du signal. Le temps de réponse noté t_α est tel que α vaut généralement 90%.

f) Résolution - Précision

C'est la plus petite variation de la mesurande qui peut détecter le capteur [8].

g) Reproductibilité ou répétabilité

Ce paramètre est probablement le plus important, tant pour les capteurs physiques que chimiques. C'est l'aptitude d'un capteur à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines lors de la mesure répétée d'une même valeur de la mesurande. Pour une fabrication de capteurs, on définit la reproductibilité d'un capteur à l'autre [8].

I.1.6. Différentes méthodes électrochimiques de détection

Les capteurs électrochimiques sont classés selon leur mode de transduction : potentiométrique, ampérométrique, conductimétrique ou impédimétrique [10]. Le principe de base d'une mesure électrochimique repose sur le fait que certaines substances électroactives en solution (molécules ou ions) peuvent échanger des électrons avec une électrode et des ions avec une membrane. Ceci est possible dans des conditions analytiques bien définies en particulier par le potentiel auquel cet échange a lieu. Les différents principes exigent toujours une conception spécifique de la cellule électrochimique [8].

a. Capteur potentiométrique

Le principe de ce type de capteur implique la mesure à courant constant ou nul de la différence de potentiel qui s'établit entre une électrode de mesure et une électrode de référence de potentiel constant (le plus souvent on utilise l'électrode au calomel saturé avec $E^\circ = 244 \text{ mV}_{/ENH}$ ou l'électrode argent/chlorure d'argent avec $E^\circ = 222 \text{ mV}_{/ENH}$), ENH étant l'électrode normale à hydrogène. Cette différence de potentiel est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'espèce déterminant le potentiel. Elle est donnée par l'équation de Nernst:

$$E = E_0 + 2,3 \left(\frac{RT}{nF} \right) \log a_i \dots\dots\dots \text{Eq.I.3}$$

- Où: E_0 est le potentiel normal de l'électrode
 R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
 $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$, la température absolue
 n est la charge de l'espèce déterminant le potentiel
 F est la constante de Faraday ($96487 \text{ Coulomb.mol}^{-1}$)
 a_i est l'activité de l'espèce déterminant le potentiel

L'électrode potentiométrique la plus utilisée est l'électrode de pH. C'est la composition particulière de sa membrane constituée d'un verre spécial, échangeur de protons, qui lui confère sa sensibilité. En modifiant de façon adéquate la composition du verre, on peut obtenir des électrodes spécifiques à d'autres ions (Na^+ , K^+) [11].

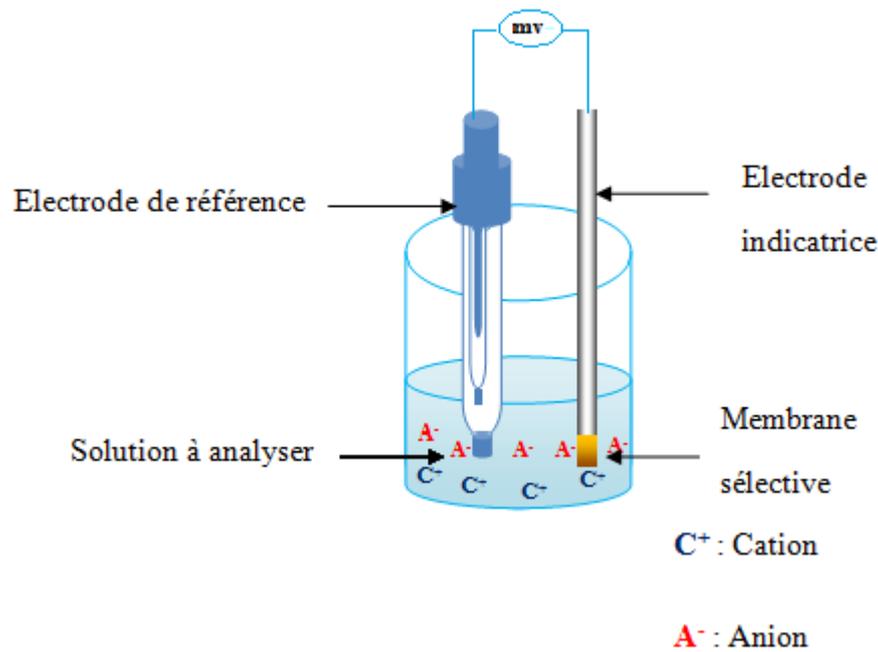


Figure I.5. Principe de mesure potentiométrique : accumulation de charge électrique à la surface de l'électrode indicatrice.

b. Capteur ampérométrique

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé. Elle est fonction de la concentration des espèces électroactives qui seront oxydées ou réduites à une électrode indicatrice. Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certaines espèces présentes, par la mesure de l'intensité [12].

Les biocapteurs ampérométriques consistent généralement en une électrode dont la surface est recouverte d'un bio-film dans lequel sont immobilisées des biomolécules. Dans ce système, l'électrode est maintenue à un potentiel constant permettant d'obtenir l'électro-oxydation (ou la réduction) de l'un des produits de la réaction enzymatique à la surface de cette dernière générant ainsi un courant électrique dont l'intensité, dans certaines conditions, est proportionnel à la concentration en solution de l'espèce à doser. L'ampérométrie est parmi les modes de transduction les plus utilisées pour la mise en œuvre des biocapteurs [12].

c. Capteur conductimétrique

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie. Son principe repose sur la mesure de la conductivité électrique d'une solution électrolytique contenant des charges électriques mobiles constituées par l'ensemble des ions. Pratiquement, la mesure de la

conductance d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes soumises à un signal électrique généralement alternatif et de fréquence choisie pour minimiser les effets dus aux polarisations. La surface S et la longueur l des électrodes sont déterminés par étalonnage dans une solution connue (Figure I.6).

La conductance électrique G inverse de sa résistance est proportionnelle à la surface S de la section perpendiculaire à la direction du courant et inversement proportionnelle à sa longueur [8].

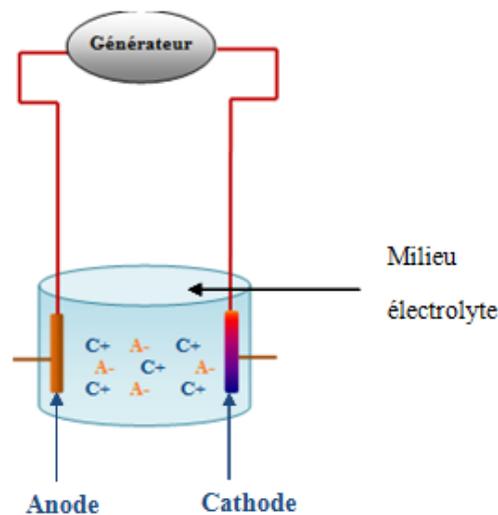


Figure I.6. Schéma de principe des mesures conductimétriques [8].

a. Capteur impédancemétrique (ou impédimétrique)

Le principe de ce type de capteur électrochimique repose sur la mesure de l'impédance d'une cellule électrochimique par la technique de spectroscopie d'impédance, dont le principe est détaillé dans le chapitre suivant. Cette technique permet de contrôler le processus de transfert de charge à l'interface électrode / électrolyte. Pratiquement, la mesure de l'impédance s'effectue dans une cellule à trois électrode, une électrode indicatrice sur laquelle est déposé l'élément sensible (biorécepteur), une électrode de référence et une électrode auxiliaire (figure I.7). En effet, un potentiel est imposé avec une perturbation sinusoïdale de faible amplitude, entre l'électrode indicatrice et l'électrode auxiliaire. Le rapport de la tension appliquée à l'intensité du courant mesuré définit l'impédance du système électrochimique. Cette impédance peut être représentée par un circuit équivalent selon le type de système (système faradique ou non faradique). Ce circuit permet d'exprimer les paramètres électriques qui définissent le phénomène de transfert de charge qui se produit à

l'interface électrode / électrolyte. Dans un système de biocapteur ces paramètres varient lorsqu'il y aura des changements interfaciaux provenant des interactions biomoléculaires à la surface de l'électrode indicatrice [8, 13].

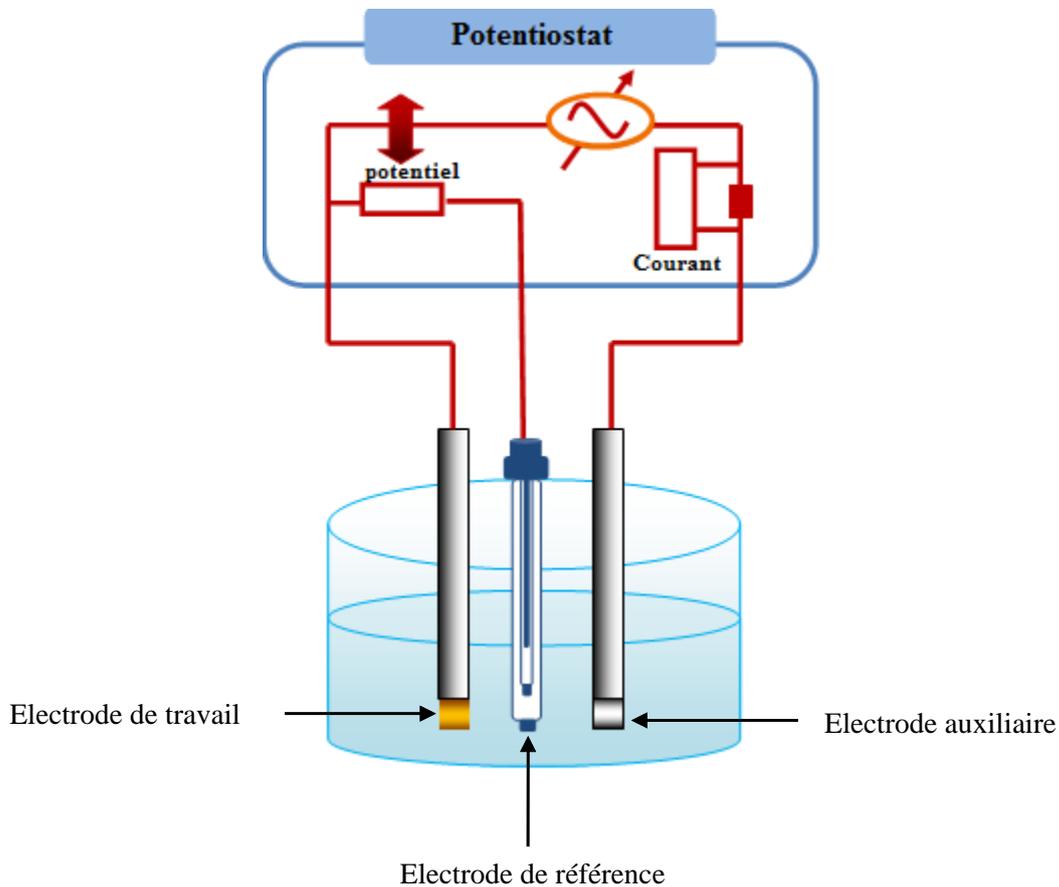


Figure I.7. Schéma de principe des mesures impédimétriques [8].

I.1.7. Le biorécepteur

Plusieurs biorécepteurs ont été utilisés comme élément de reconnaissance moléculaire pour le développement de divers biocapteurs (Figure I.8). L'élément de reconnaissance biologique (ou biorécepteur) peut être :

1. Un élément de reconnaissance biocatalytique : dans ce cas, la réponse du biocapteur est basée sur une réaction catalysée par les macromolécules qui sont présents dans leur environnement biologique naturel, qui ont été préalablement extraits ou qui ont été produits dans des microorganismes. Ainsi, la consommation continue des substrats est assurée par le biocatalyseur immobilisé à la surface du transducteur. Des réponses

dynamiques ou après que l'état stationnaire du signal soit atteint, sont enregistrées à l'aide du transducteur intégré [2].

2. Un élément d'affinité biologique ou de bio-complexation : dans ce cas la réponse du biocapteur est basée sur l'interaction de l'analyte avec des macromolécules. Ainsi, un équilibre est généralement atteint et il n'y a aucune autre consommation nette de l'analyte par l'agent complexant immobilisé. Ces réponses à l'équilibre sont aussi suivies par le transducteur qui est en contact étroit avec le biorécepteur. La plupart des biocapteurs se basant sur ce type de reconnaissance utilisent des systèmes anticorps/antigènes [14]. Cependant, plus récemment, des biocapteurs utilisant des systèmes récepteurs/antagoniste ont été développés (ex les chémorécepteurs) [2]. Les biocapteurs faisant intervenir un élément de reconnaissance de bio-complexation est le type auxquels on s'est intéressé dans notre travail.

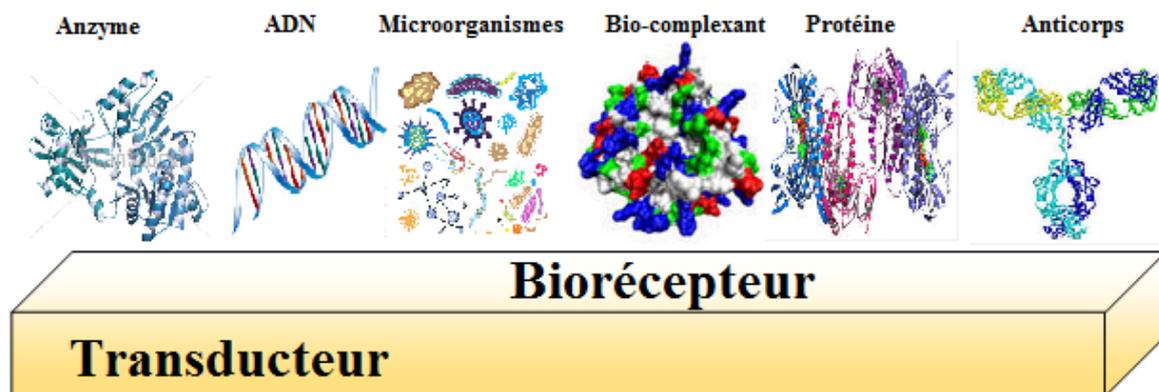


Figure I.8. Représentation schématique des différents biorécepteurs.

I.2. GENERALITES SUR LES METAUX LOURDS

Les métaux lourds sont des polluants engendrés par l'activité humaine qui ont un fort impact toxicologique. Les métaux toxiques sont nombreux mais on peut citer surtout l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure. Ils ont des impacts sur les végétaux, les produits de consommation courante et sur l'homme [15].

Il est donc très important d'avoir une vision nuancée de la problématique des métaux lourds et il n'est pas correct de voir dans chaque contamination un risque de toxicité. Néanmoins suivant le type de métal et la mesure dans laquelle celui-ci peut être assimilé par des organismes ou l'homme il peut y avoir des risques réels [16].

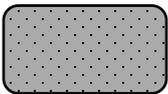
Pour cela des recherches scientifiques ont été développées afin de minimiser leurs concentrations [17].

Dans cette partie quelques généralités sont données sur les métaux lourds notamment leurs origines ainsi que leurs effets sur l'environnement et la santé.

I.2.1. Définition

On appelle métaux lourds les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5g/cm³. Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces tels que le mercure, le plomb, le cadmium, le cuivre, l'arsenic, le nickel, le zinc, le cobalt et le manganèse. Les plus toxiques d'entre eux sont le plomb, le cadmium et le mercure [18,19].

Tableau I.1: Classification périodique des Métaux lourds [20].

Bloc S			Métaux lourds de densité > 5										Bloc p					
H																		He
Li	Be												B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Bloc d										Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	SB	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Ti	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Bloc f															
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Cf	Bk	Es	Fm	Md	No	Lr		

I.2.2. Les Sources des métaux lourds

Une quantité importante de métaux lourds est introduite dans l'environnement par l'intermédiaire de sources naturelles et anthropiques. Cette contamination a plusieurs origines. La figure I.9 résume les sources d'émission des métaux lourds:

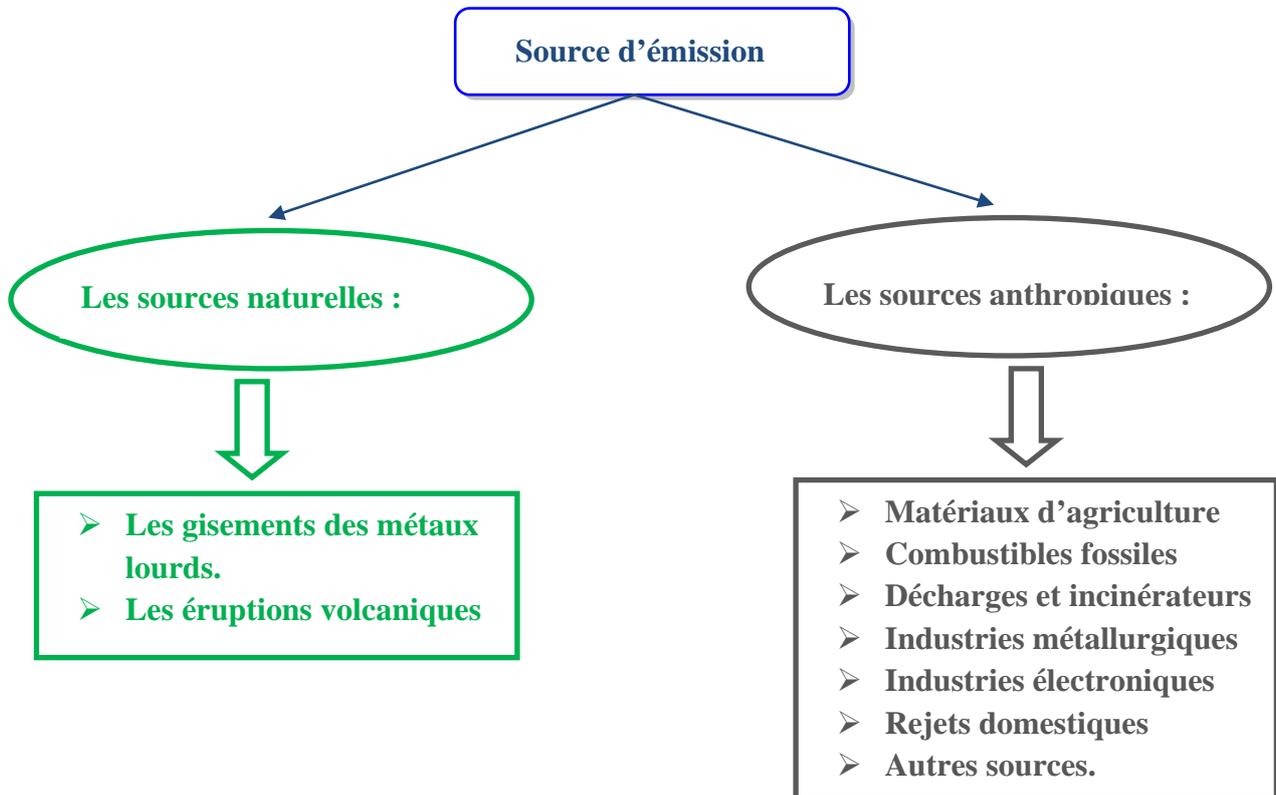


Figure I.9: les sources d'émission des métaux lourds [21].

I.2.3. Les Propriétés physico-chimiques des métaux lourds

Les métaux lourds possèdent les propriétés physiques générales des métaux (bonne conductivité thermique et électrique). Ils sont fortement électropositifs et donnent par perte d'électrons des cations métalliques de charge variable. Ces cations métalliques qui présentent à la fois des densités de charge élevées et un caractère électrophile peuvent former avec des ligands des liaisons ioniques covalentes ou intermédiaires et donnent naissance à des complexes plus ou moins stables [22].

I.2.4. Effet des métaux lourds sur la santé et l'environnement

- **Effet sur la santé**

Les métaux lourds s'accumulent dans l'organisme et provoquent des effets toxiques à court et/ou à long terme. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires [18].

- **Effet sur l'environnement**

La contamination de la faune par les métaux lourds entraîne des problèmes de santé et conduit à un risque de bioaccumulation dans de nombreuses espèces aquatiques y compris le poisson [23].

Dans les sols des concentrations élevées en métaux sont généralement associées à la présence d'eau souterraine contaminées ainsi qu'à l'utilisation de certains engrais et produits chimiques agricoles. Dans des conditions extrêmes les sols peuvent devenir impropres aux cultures destinées à la consommation humaine car ces cultures accumuleraient les métaux à des concentrations supérieures à celles considérées comme acceptables par l'Organisation Mondiale de la Santé OMS [20].

I.2.5. Paramètres influant sur la mobilité des métaux dans l'eau

La mobilité des métaux se traduit généralement par le passage de la forme colloïdale et particulaire à la forme dissoute (ionique ou adsorbée) et inversement. Le pH, la salinité, la dureté et la teneur en carbone organique sont des paramètres physico-chimiques qui influencent ce type d'échanges dans l'eau [24].

Lors d'une diminution de pH dans l'eau la concentration des métaux sous forme ionique augmente en raison de la compétition avec un nombre croissant d'ions hydrogène vis à vis des sites d'adsorption. Sa biodisponibilité augmente généralement dans le milieu lorsque le pH diminue.

L'augmentation de la salinité entraîne généralement la remobilisation des métaux associés aux particules en suspension et à la surface du sédiment en raison des phénomènes de compétition liés à la présence des ions magnésium et calcium [24, 25, 26]. Les métaux libérés (mobiles) vont généralement à former des chloro-complexes. Dans la phase dissoute cette réaction de complexation avec les ions chlorures aura tendance à diminuer la biodisponibilité du métal [24].

La présence de la matière organique influence la mobilité et la biodisponibilité des métaux à cause de la forte affinité entre eux engendrant des réactions de complexation [17].

I.2.6. Généralités sur les métaux utilisés

I.2.6.1. Le cuivre :

Le cuivre est un élément chimique métallique de transition, de couleur rouge-brun et de symbole Cu. Dans la nature il se trouve sous deux états d'oxydation : le cuivre (+I) et le cuivre (+II). Il existe également une forme instable de cuivre (+III) [27]. Le minerai le plus important est la chalcopirite (Cu_2S , Fe_2S_3). On le trouve également dans la malachite ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$), l'azurite ($2\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$), la chalcocite (Cu_2S) et la bornite (Cu_3FeS_4) [17].

I.2.6.1.1. Les Propriétés physico-chimiques du cuivre

Les propriétés physico-chimiques du cuivre sont représentées dans le tableau I.2 :

Tableau I.2. : Propriétés physico-chimiques du cuivre [29, 28].

Propriétés physico-chimiques	Le cuivre
Symbole chimique	Cu
Numéro atomique	29
Masse atomique	63,5
Configuration électronique	(Ar) $3d^{10}.4s^1$
Electronégativité	1,8
Degrés d'oxydation	+1 +2
Rayons atomiques (pm)	135
Rayons ioniques (en nm)	0,069
Système cristallin	C.F.C

I.2.6.1.2. Comportement du cuivre dans l'environnement

A travers les dépôts atmosphériques secs ou humides, les applications en agriculture, les déchets solides et les boues provenant des stations d'épuration le cuivre arrive en majeure partie dans le sol. Dans ce compartiment, sa plus grande partie est fortement adsorbée et

demeure dans les centimètres supérieurs du sol [30]. La nature de ce dernier conditionne de façon importante son transfert vers le milieu aquatique. Le lessivage et l'érosion des sols et aussi les rejets ponctuels sont à l'origine de la présence du cuivre dans l'eau.

Les eaux naturelles représentent un milieu chimique complexe elles contiennent un mélange de cations, des ligands inorganiques, des ligands organiques et des particules en suspension issues des sols et des sédiments ainsi que des particules d'origine biologique. Ces particules sont caractérisées par des surfaces d'échange variables tant en nature qu'en intensité. Dans le milieu aquatique le cuivre peut être présent sous différentes formes [31] :

- ions libres hydratés,
- complexé par des ligands inorganiques,
- complexé par des ligands organiques,
- adsorbé sur des colloïdes inorganiques et organiques,
- précipité,
- adsorbé sur des particules organiques en suspension,
- inclus dans la matrice de particules minérales.

I.2.6.1.3. Spéciation du cuivre

Les modèles chimiques pour les eaux naturelles montrent que le cuivre reste à l'état d'ion II^+ jusqu'à un pH égale à 6. Pour la plupart des eaux neutres $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$ et CuCO_3 sont également importants, le second est plus important entre pH 7 et 8. Ensuite, à pH au-dessus de 8 le complexe de dihydroxide de cuivre (II^+) prédomine. Il forme aussi plusieurs complexes avec des ligands organiques. Dans le cycle sédimentaire il est associé aux minéraux argileux et spécialement associé au carbone et manganèse. En conditions acides le cuivre est plus soluble que dans les milieux tamponnés. La malachite précipite dès que le pH est supérieur à 7. Toutefois, dans un milieu réducteur la phase minérale prédominante est le sulfure cuivreux ou chalcosine (Cu_2S) [32].

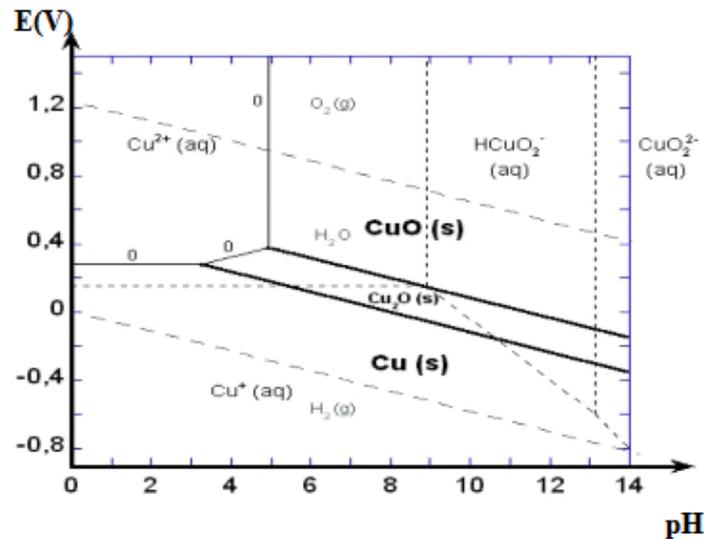


Figure I.10: diagramme de spéciation du cuivre en fonction du pH [33].

I.2.6.1.4. Effets toxiques sur les organismes vivants

Le cuivre présente la particularité d'être à la fois essentiel et toxique au-dessus d'une certaine concentration. Son caractère essentiel est lié à sa participation dans au moins 12 protéines importantes. Il joue en particulier un rôle important dans l'utilisation du fer pour la formation de l'hémoglobine. A titre d'exemple, la plupart des crustacés et des mollusques possèdent une protéine qui est l'hémocyanine qui contient du cuivre et représente leur principal transporteur d'oxygène. Dans le cas des végétaux le cuivre entre dans la composition de plusieurs enzymes qui interviennent dans le métabolisme des sucres, de l'azote et de la paroi cellulaire.

Les effets néfastes du cuivre sur les organismes vivants se traduisent généralement par des modifications des paramètres biochimiques et des fonctions physiologiques. Ils peuvent être observés à partir d'une concentration qui dépasse $1.6 \mu\text{g.L}^{-1}$. [34].

I.2.6.2. Le nickel

Le nickel est un élément chimique de symbole Ni et de numéro atomique 28. C'est un métal blanc argenté qui possède un éclat poli. Il fait partie du groupe des métaux non-ferreux. Le nickel est classé comme métal de transition et il est solide dur et ductile ou malléable [35].

I.2.6.2.1. Les Propriétés physico-chimiques du nickel

Les propriétés physico-chimiques du nickel sont représentées dans le tableau I.3 :

Tableau I.3. : Propriétés physico-chimiques du nickel [36, 37].

Propriétés physico-chimiques	Le nickel
Symbole chimique	Ni
Numéro atomique	28
Masse atomique	58,69
Configuration électronique	[Ar] 3d ⁸ 4s ²
Electronégativité	1,8
Degrés d'oxydation	+1 +2
Rayon atomique (en pm)	135
Rayon ionique (nm)	0.069
Système cristallin	C.F.C

I.2.6.2.2. Comportement du nickel dans l'environnement

Dans les systèmes aquatiques, le nickel existe généralement sous forme de Ni²⁺. La forme sous laquelle on le trouve dans l'eau dépend entre autres du pH. Les composés de nickel rencontrés dans le milieu aquatique sont généralement recensés et indiqués comme nickel global, ceci bien que la gamme des composés parvenant dans le milieu aquatique par suite de rejets anthropogènes englobe aussi bien des sels solubles que des oxydes insolubles ou encore des poussières de nickel métallique. En l'état des connaissances actuelles, il n'existe pas de composés de Ni qui soient présents exclusivement dans le milieu aquatique [38, 39].

Le nickel est surtout présent dans l'atmosphère sous forme d'aérosols. La forme métallique est stable. La détermination des composés de Ni spécifiques au milieu atmosphérique est extrêmement difficile car leur concentration y est assez faible et par ailleurs les diverses méthodes d'analyse ont pour effet de modifier les substances. [39].

Dans les sols, le nickel peut se présenter sous des formes diverses, par exemple sous forme de minéral cristallin inorganique ou précipité de chélates complexes ou d'ion libre. Le comportement des composés de nickel dans les sols dépend des propriétés des différents composés mais aussi du type de sol. C'est pourquoi il est impossible de généraliser. La désorption et la teneur en Ni dans la solution du sol tend à croître à mesure que le pH diminue [40].

I.2.6.2.3. Spéciation du nickel

Le diagramme de Pourbaix du système nickel/eau (figure II.3) montre que le nickel est oxydable par O_2 quelque soit le pH : cependant pour $6 < \text{pH} < 13$, l'espèce oxydée est très peu soluble (oxyde ou hydroxyde). Le solide forme se dépose en couche compacte et étanche à la surface du métal.

Il reste un désaccord considérable dans la littérature, concernant la nature et la structure du film passif notamment dans des solutions neutres et alcalines [41].

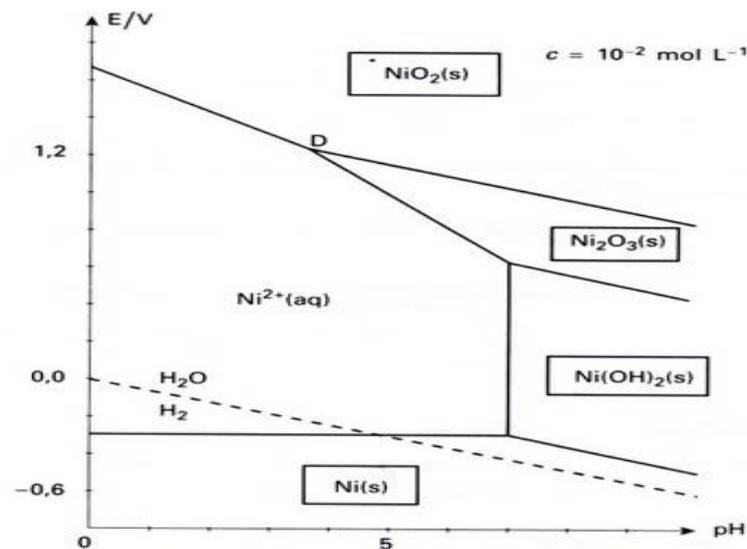


Figure I.11 : Spéciation du Nickel [41]

I.2.6.2.4. Effets toxiques du nickel sur la santé

Le nickel a une action sensibilisatrice sur la peau et sur le système respiratoire. Sa toxicité peut varier dans d'importantes proportions en fonction d'un certain nombre de facteurs : degré d'oxydation, formation de complexes ou biotransformation de l'espèce en cause. Concernant l'effet du nickel sur la santé il s'agit notamment des effets toxiques aigus, des effets allergiques, des effets toxiques sur la reproduction et la cancérogénicité [42].

I.2.6.3. Le plomb

Le plomb est l'élément chimique de numéro atomique 82 de symbole Pb. C'est un membre du groupe des cristallogènes. Le mot et le symbole viennent du latin *plumbum*. Le plomb est un métal gris bleuâtre blanchissant lentement en s'oxydant malléable. C'est un élément toxique, mutagène, et reprotoxique [43]. Le plomb est un contaminant de

l'environnement, toxique et écotoxique dès les faibles doses. Les maladies et symptômes qu'il provoque chez l'homme ou l'animal sont regroupés sous le nom de « saturnisme » [44].

I.2.6.3.1. Les Propriétés physico-chimiques du plomb

Les propriétés physico-chimiques du plomb sont représentées dans le tableau I.4 :

Tableau I.4. : Propriétés physico-chimiques du plomb [36].

Propriétés physico-chimiques	Le plomb
Symbole chimique	Pb
Numéro atomique	82
Masse atomique	207,2
Configuration électronique	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ²
Electronégativité	1,9
Degrés d'oxydation	+2 +4
Rayons atomiques (pm)	180
Rayons ioniques (en nm)	0,132
Système cristallin	C.F.C

I.2.6.3.2. Sources d'exposition du plomb

I.2.6.3.2.1. Sources naturelles

Le plomb est naturellement présent en moyenne à 0,002% dans la croûte terrestre généralement sous forme peu soluble. Des dérivés inorganiques sont présents dans les eaux, les sédiments, les sols, l'atmosphère et éventuellement en micro-traces chez les organismes vivants. Les sols non contaminés contiendraient de 10 à 30 mg.kg⁻¹.

A l'état naturel le plomb se trouve dans l'environnement sous forme de galène (sulfure de plomb), de cérusite (carbonate de plomb), et d'anglésite (sulfate de plomb) [45].

I.2.6.3.2.2. Sources liées aux activités industrielles

Les sources de plomb sont surtout constituées par les industries d'extraction minière, de métallurgie de métaux non ferreux, de fabrication d'accumulateurs et de récupération des métaux. Il est aussi utilisé dans la protection contre les radiations à cause de sa densité

importante. Il est utilisé dans l'industrie de verre et cristal pour assurer une meilleure transparence [46].

I.2.6.3.2.3. Sources liées aux activités domestiques

Avant 1948 les peintures contenant des sels de plomb étaient très utilisées dans les habitations lors de leur dégradation ces peintures s'écaillent et engendrent la création de poussières. Ces artefacts contiennent une grande concentration en plomb et peuvent provoquer d'importantes contaminations surtout chez les enfants. Des poussières riches en plomb peuvent exister dans les maisons. Elles sont dues à des rapports de plomb depuis l'extérieur par un milieu pollué ou ramenées par des personnes en contact avec le métal durant leur travail. Elles peuvent aussi être dues à des activités de loisirs (fabrication de plomb de chasse ou de pêche, poteries....).

La présence de plomb dans les eaux de distribution public provient très rarement de la ressource en eau. Cependant, en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, ces eaux peuvent se charger en plomb, par dissolution des tuyauteries ou des soudures contenant un alliage des tains et de [43].

I.2.6.3.3. Comportement du plomb dans l'environnement

La plupart des composés inorganiques du plomb(II) sont peu solubles dans l'eau, les acétates de plomb étant plus solubles. Dans le milieu aquatique le plomb a tendance à migrer vers les sédiments par adsorption. Sa mobilité dans le sol est très faible. Il a ainsi tendance à s'accumuler dans les horizons de surface. Il est adsorbé passivement par les racines et est rapidement immobilisé [39].

I.2.6.3.4. Spéciation du plomb

Le plomb peut se présenter sous de nombreuses formes chimiques, soit minérales comme le plomb élémentaire (Pb^0) soit sous forme ionisée cationique. L'espèce la plus courante étant le cation divalent (Pb^{2+}). D'autres états d'oxydation moins fréquents peuvent se rencontrer dans divers composés en particulier le cation trivalent (Pb^{3+}) et le cation tétravalent (Pb^{4+}) [47].

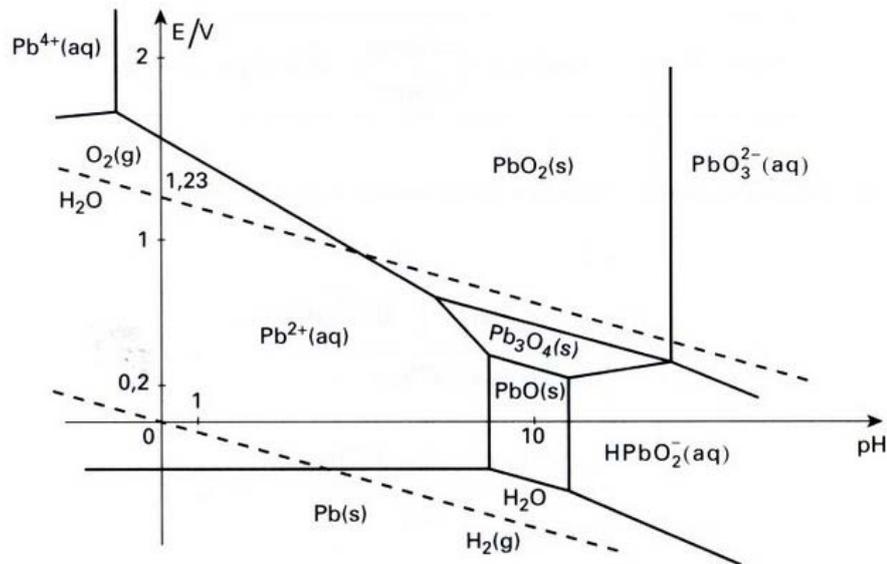


Figure I.12 : spéciation du plomb [47].

I.2.6.3.5. Effets toxiques du plomb sur la santé

Le plomb absorbé va être acheminé par voie sanguine jusque les os et les tissus mous où le plomb va s'accumuler si l'absorption dépasse l'élimination digestive et urinaire. En se fixant sur les globules rouges le plomb abime l'hémoglobine et en ralentit la production. Ainsi s'explique l'anémie saturnine. Une partie du plomb se stocke sur l'os en compétition avec le calcium. Le plomb agirait sur le système nerveux en détruisant les neurones [48].

Le plomb a trois cibles:

- **les enzymes** : surtout celles qui contribuent à la fabrication de l'hémoglobine et la respiration intracellulaire
- **Le calcium** : le plomb se comporte en compétiteur du calcium et bloque certains échanges cellulaires et les réactions intracellulaires calcium dépendantes.
- **L'ARN cellulaire** qui sert à la fabrication des protéines serait également perturbé.

L'intoxication aigue au plomb est rare, elle témoigne d'une exposition massive et elle se manifeste par un goût métallique dans la bouche, des douleurs abdominales avec vomissements et diarrhées. Ils peuvent également survenir des convulsions, une insuffisance rénale aigue voire un coma mortel [48].

I.2.6.4. Le cadmium

Le cadmium est l'élément chimique de numéro atomique 48 et de symbole Cd. C'est un élément toxique responsable de la maladie Itai-itai [49]. Il fut découvert en 1817 par l'Allemand Friedrich Stromeyer qui le prépara pour la première fois. Il vient du latin *cadmia*

« calamine » ancien nom donné au carbonate de zinc. C'est un métal blanc, mou et malléable et il ternit au contact de l'air [49].

I.2.6.4.1. Les Propriétés physico-chimiques du cadmium

Le cadmium est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celle du zinc.

Tableau I.5. : Propriétés physico-chimiques du cadmium [36].

Propriétés physico-chimiques	Le cadmium
Symbole chimique	Cd
Numéro atomique	48
Masse atomique	112,414
Configuration électronique	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ²
Electronégativité	1,69
Degrés d'oxydation	+2
Rayons atomiques(pm)	155
Rayons ioniques (en nm)	0,097
Système cristallin	hexagonal

I.2.6.4.2. Sources d'exposition du cadmium

I.2.6.4.2.1. Sources naturelles

Le cadmium est un élément relativement rare présent dans l'écorce terrestre à des concentrations faibles. Ces principales formes cristallines sont : le greenockite et l'hawleyite (CdS), l'otavite (CdCO₃), le montéponite (CdO) et la cadmosélite (CdSe). La source de dispersion naturelle du cadmium dans l'atmosphère est principalement liée à l'activité volcanique. L'enrichissement en cadmium des sols et des systèmes aquatiques résulte de l'altération des matériaux de la croûte terrestre et des retombés atmosphériques [50].

I.2.6.4.2.2. Sources liées aux activités industrielles

Les principales sources de dispersion du cadmium dans l'atmosphère, les sols et les systèmes aquatiques sont liées aux nombreuses activités industrielles et à l'épandage d'engrais phosphatés faisant intervenir cet élément. Les principaux domaines d'utilisation du

cadmium sont la galvanoplastie, les accumulateurs alcalins, les alliages et l'industrie nucléaire [50].

I.2.6.4.3. Comportement du cadmium dans l'environnement

Les principales formes du cadmium présentes en solution sont Cd^{2+} , CdSO_4 , CdCl^+ et CdHCO_3^+ en l'absence de ligands organiques. Le cadmium forme des complexes avec les principaux acides organiques carboxyliques susceptibles de se trouver dans les zones superficielles des sols cultivés. Ces associations modifient son comportement aux interfaces et peuvent faciliter dans certaines conditions son entraînement avec la phase liquide. Le très faible produit de solubilité du carbonate de Cd (CdCO_3) limite fortement la concentration du métal en solution dans les sols calcaires. Dans ce cas, les carbonates (CaCO_3 , $(\text{Ca}_x, \text{Mg}_y)\text{CO}_3\dots$) constituent également une phase de sorption dominante qui contrôle la distribution de l'élément et sa mobilité dans le milieu. L'importance du pH et de la composition cationique de la solution du sol (notamment Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} et Fe^{3+}) dans le contrôle de ces réactions aux interfaces solide/solution [50,51].

Dans les sols, le cadmium est considéré comme un élément relativement mobile par rapport à d'autres métaux en traces tels que le cuivre ou le plomb. Son comportement dans la solution du sol dépend d'un grand nombre de paramètres liés à la nature du sol, au contexte micro-biologique et aux formes chimiques du métal dans la solution du sol. En conséquence la distribution du cadmium dans le système et sa toxicité ne peuvent pas s'expliquer simplement par la connaissance de la concentration totale de cet élément dans le milieu [52].

Le cadmium et ses composés ne sont pas ou sont très peu volatils dans l'air. Il est présent sous forme particulaire, la principale forme étant l'oxyde de cadmium (les autres formes étant des sels de cadmium) [47].

I.2.6.4.4. Spéciation du cadmium

La spéciation du cadmium (Cd) est plus simple que celle du nickel ou du plomb car il ne possède qu'une seule forme ionique : le cation divalent : Cd^{2+} , formé par la perte de deux électrons au niveau de la couche périphérique de l'atome neutre (Cd^0).

Le cadmium à l'état élémentaire (atome) n'est pas toxique pour les organismes vivants mais le devient après transformation chimique ou biochimique à l'état d'entité ionisée (chargée positivement) le cation divalent Cd^{2+} [47].

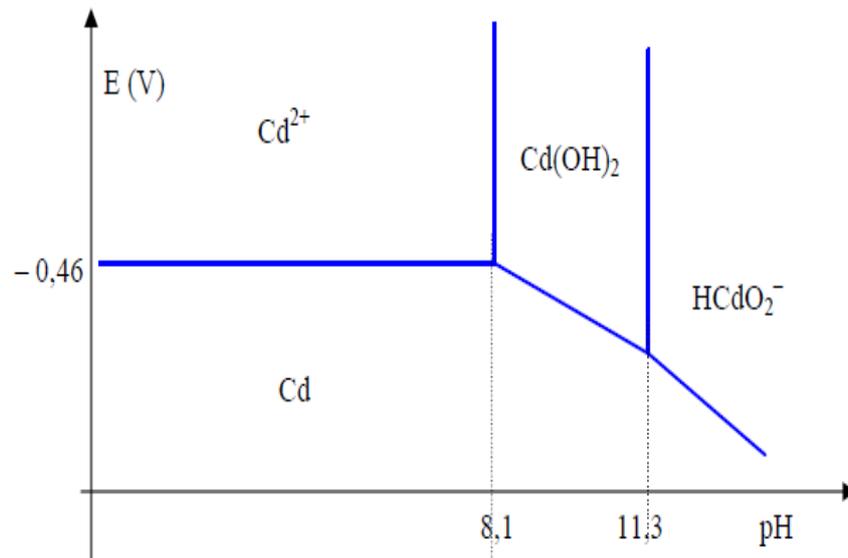


Figure I.13 : spéciation du cadmium [47].

I.2.6.4.5. Effets toxiques du cadmium sur la santé

Le cadmium est notamment présent dans l'eau de boisson, les aliments et la fumée de cigarette. Il présente de fortes capacités à se retrouver dans les fumées et s'accumule après inhalation. La demi-vie biologique chez l'homme est estimée à 20 ans. Les principaux sites d'accumulation et de toxicité sont les reins et le foie. Le cadmium s'accumule dans d'autres organes tels que la rate, le cerveau, les poumons, le muscle et le sang. La toxicité du cadmium est liée à la perturbation du métabolisme du zinc et secondairement d'autres éléments essentiels tels que le calcium, le fer et le cuivre. Le cadmium est aussi considéré comme un agent carcinogène [50].

I.3. LES POLYPHENOLS DE L'ECORCE DE LA GRENADE

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils prennent une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils sont également capables de chélater les métaux en d'autres termes de former des complexes.

La grenade (*Punica granatum L.*) ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs attire depuis quelques années l'attention des scientifiques en tant qu'agent protecteur contre les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Son extrait possède en effet de fortes capacités antioxydantes et anti-inflammatoires liées à la présence d'anthocyanes, de tanins ellagiques et de tannins hydrolysables.

I.3.1. Définition des polyphénols

Le terme « polyphénol » a été introduit en 1980, en remplacement de l'ancien terme de tannin végétal. L'expression « composés phénoliques » est aussi employée avec la même valeur. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [53].

Les polyphénols (8 000 composés connus) représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal (figure I.14). On y trouve :

- Les flavonoïdes (flavanols, flavonoïdes, chalcones et dihydrochalcones, anthocyanidines et tannins condensés) ;
- Les acides phénoliques de type benzoïque ou cinnamique et les tannins hydrolysables (gallo et ellagitannins) ;
- Les stilbènes ;
- Les lignines et subérines [54].

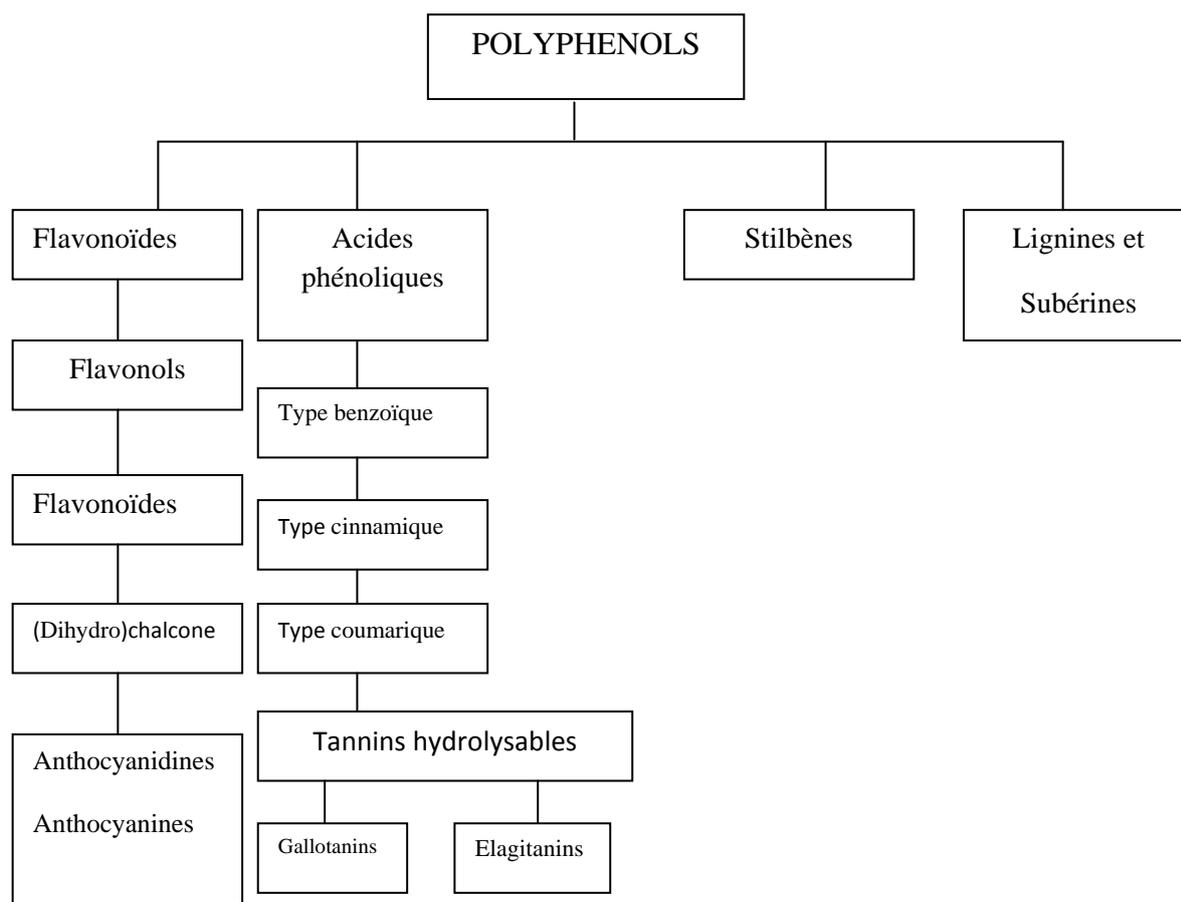


Figure I.14. Différentes familles de polyphénols [54].

I.3.2. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle en plus d'autres constituants [55]. Les polyphénols naturels vont de molécules simples comme les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Il existe différentes classes de polyphénols notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

I.3.2.1. Les acides phénoliques et les coumarines

- **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales [56]. Ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone et ils sont

principalement présents dans la grenade sous forme d'acide gallique et d'acide ellagique [57].

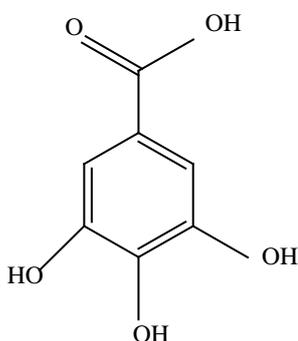


Figure I.15. Acide gallique.

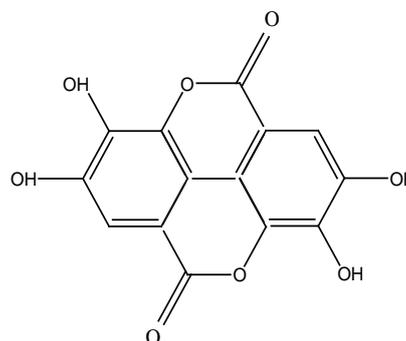
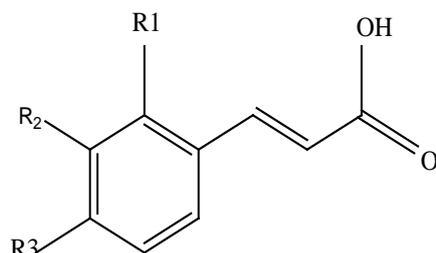


Figure I.16. Acide ellagique.

- **Les acides cinnamiques**

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *o*-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique [58].



Composés	R1	R2	R3
AC. cinnamique	H	H	H
AC. <i>o</i> -coumarique	OH	H	H
AC. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH
AC. caféique	H	OH	OH

Figure I.17. Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques [59].

- **Les coumarines**

Nous pouvons considérer que les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxyles, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide *o*-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbélliférone ou ombélliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent respectivement aux acides *p*-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnéline (Figure I.18) [59].

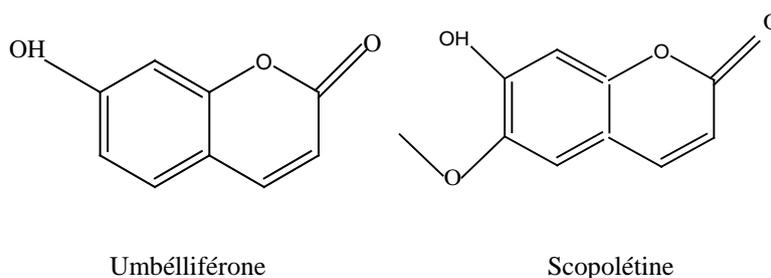


Figure I.18. Structure chimique de quelques coumarines [60].

I.3.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus* : jaune) sont des substances généralement colorées répandues chez les végétaux ; elles sont trouvées dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes [61]. Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes [62]. Ils ont une origine biosynthétique commune possédant un même squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques reliées par une chaîne en C3 [63].

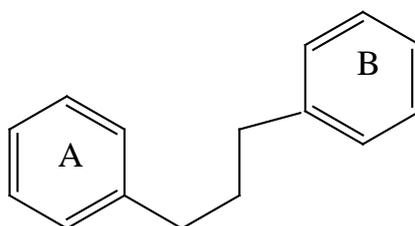


Figure I.19. Squelette de base des flavonoïdes.

Ils sont des pigments responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure mais aussi de l'acidité du milieu (pH). Les jaunes viennent des chalcones, auronnes et flavonols jaunes. Les rouges et les mauves des anthocyanosides. Les bleus trouvent leurs origines dans les co-pigments flavones-anthocyanosides.

L'absorption dans l'ultraviolet produit des motifs perceptibles par les insectes et capables de les guider vers le nectar [64]. Les pigments colorés des fleurs servent à attirer les insectes pollinisateurs. Ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs. On trouve ces pigments dans le rouge des pommes et des poires, dans les baies de genièvre, le miel, le raisin et le vin.

Les flavonoïdes sont naturellement présents dans les fruits et les légumes de notre alimentation. On les retrouve aussi dans de nombreuses boissons : vin, bière, lait de soja, thé et chocolat. Les études épidémiologiques suggèrent un effet protecteur des fruits et légumes contre les maladies cardiovasculaires et le cancer [65].

Les flavonoïdes agissent principalement comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces d'oxygénées réactives (ion superoxyde, radical OH^\bullet , oxygène singulet) ou encore chélater les métaux de transition [66].

Les flavonoïdes sont, *in vitro* des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine décarboxylase par le quercétol et naringénine, d'élastase et de la hyaluronidase par les flavones et les proanthocyanidols et de la catéchol-O-méthyltransférase.

- **Flavonols**

Les flavonols sont un sous-groupe de flavonoïdes dérivés de la 3-hydroxyflavone (3-hydroxy-2-phénylchromén-4-one ou flavonol c'est-à-dire des flavonoïdes possédant un hydroxyle phénolique en C3 et une fonction carbonyle C=O en C4 sur l'hétérocycle central du squelette de base des flavonoïdes. Ce sont des pigments végétaux de couleur jaune plus ou moins clair. Ils diffèrent par le nombre et la position d'hydroxyle phénolique -OH, parfois méthylés (groupes méthoxy). Les flavonols ne doivent pas être confondus avec les flavanols qui ne comportent pas en position 4 de fonction carbonyle C=O [60].

Parmi les flavonols les plus répandus, nous trouvons le kaempferol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5, 7). Ces deux flavonols sont incolores; le myricétol est l'isorhamétol. Pour le grenadier nous trouvons le kaempferol dans les feuilles et la quercétine dans le jus [67].

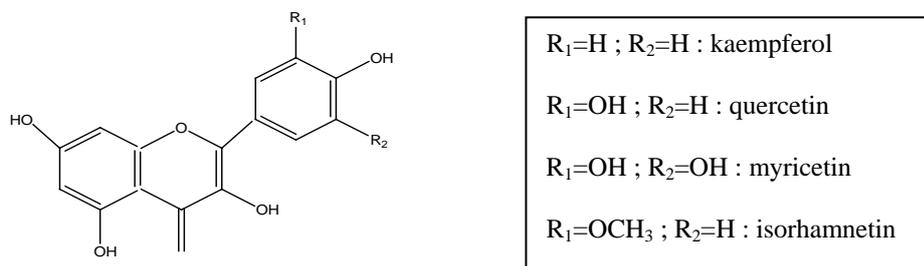


Figure I. 20 : Structures chimiques de quelques flavonols [67].

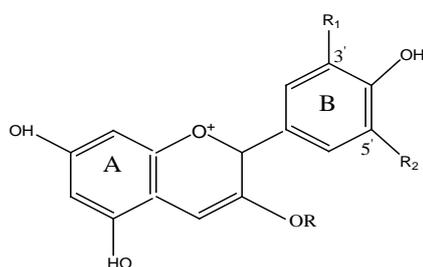
- **Flavanones**

La fonction hydroxylée C₃ est supprimée le reste de la molécule ne change pas. On trouve généralement en position 7 un disaccharide le rutinoside lié à un glucose. Cette

structure est responsable de l'amertume dégagée par certains végétaux. La naringine est détectée dans les feuilles du grenadier [60].

- **Anthocyanes**

Les anthocyanes (du grec *anthos* « fleur » et *kuanos* « bleu sombre ») ou anthocyanosides [64] sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits situés dans les vacuoles des cellules, solubles dans l'eau allant du rouge orangé au bleu pourpre dans le spectre visible. Ces composés existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique. En 2006, 539 anthocyanosides ont été recensés [68,69].



Anthocyanidines R=H	R ₁	R ₂
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Peonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Petunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

Si la forme est monoglucoside : R = glucose

Figure I. 21 : Structure de quelques anthocyanidine [70].

I.3.2.3. Les tanins

Les tanins sont connus depuis la plus haute Antiquité. Au Moyen Âge, pour la préparation du cuir. Le tannage s'obtient en établissant des liaisons entre les fibres de collagène de la peau qui transforme des peaux fraîches en cuir imputrescible. La première description chimique des tanins végétaux est redevable au chimiste allemand Emil Fischer (1852-1919) dans les premières décennies du XX^e siècle. En 1920, Karl Freudenberg distinguait les tanins hydrolysables et non hydrolysables. L'invention de la chromatographie sur papier durant la Seconde Guerre mondiale permit à Bate-Smith de mener un travail considérable d'identification de polyphénols chez les plantes. Il y aurait actuellement un millier de tanins naturels dont la structure aurait été déterminée de manière non ambiguë. Se sont des métabolites secondaires des plantes supérieures que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles et fruits) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites [71].

Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique :

- **Les tanins hydrolysables**

Ce sont des esters du glucose et d'acides phénoliques qui sont soit l'acide gallique et on parle de tanins galliques ou l'acide ellagique qui est un dimère de l'acide gallique et on parle alors de tanins ellagiques [72].

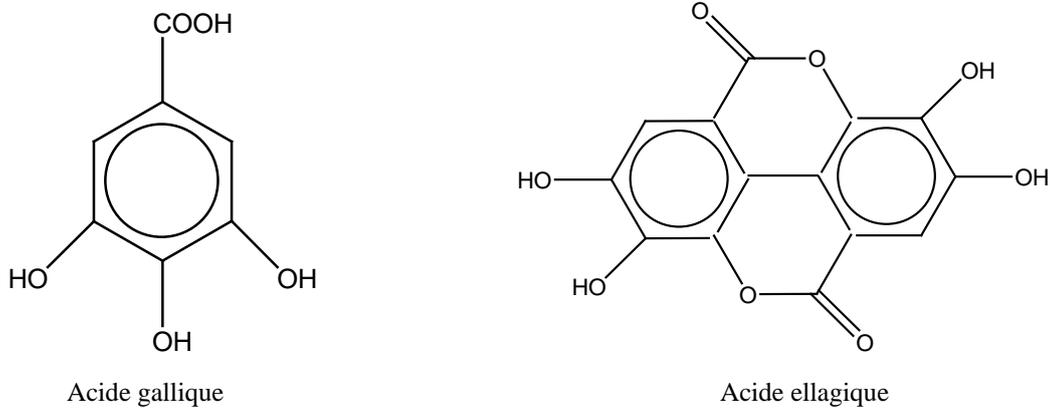
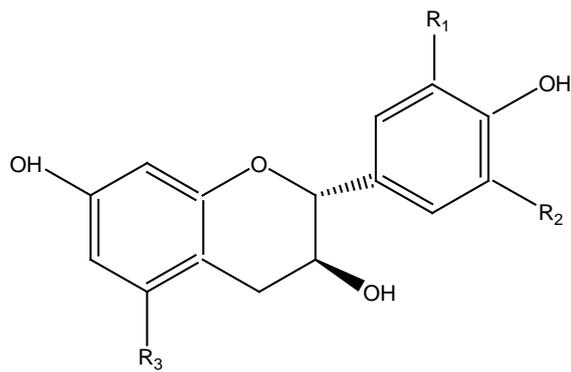


Figure I.22. Structure de l'acide gallique et ellagique [72].

- **Les tanins condensés**

Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type 4-8 ou 4-6. Ils sont très abondants dans certains végétaux consommés par l'homme comme les prunes, les fraises et les pommes et dans les boissons comme le vin. Leur aptitude à piéger les radicaux libres pourrait réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de cancer et ils accéléreraient de 50 % la vitesse de cicatrisation des plaies superficielles [73,74].

Il existe une douzaine d'unités monomères flavanols entrant dans la construction des tanins condensés. Elles peuvent en outre être substituées par l'acide gallique ou par des sucres, généralement en position 3 et parfois en position 5 et 7, la figure I.23 présente les principales unités des tanins condensés [75].



a) Flavan-3-ols et 5-désoxyflavan-3-ols

$R_2=R_3=H$; $R_1=OH$: (-)-fisétinidol

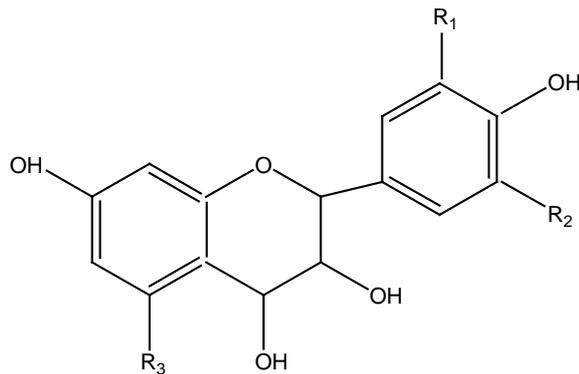
$R_1=R_3=OH$; $R_2=H$: (+)-catéchine

$R_1=R_2=R_3=OH$: (+)-gallocatéchine

$R_1=R_2=H$; $R_3=OH$: (+)-afzéléchine

$R_1=R_2=OH$; $R_3=H$: (-)-robinétinidol

$R_1=R_2=R_3=H$: (+)-guibourtinidol



b) Flavan-3,4-diols

$R_2=R_3=H$; $R_1=OH$: (-)-leucofisétinidine

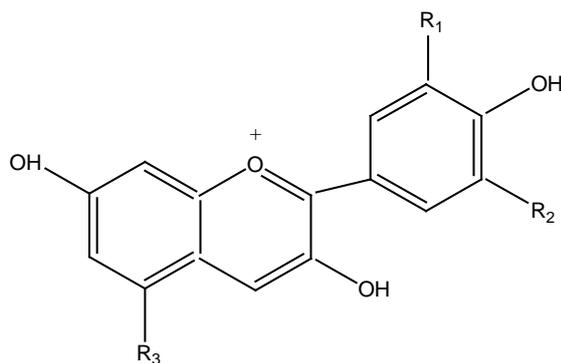
$R_1=R_3=OH$; $R_2=H$: leucocyanidine

$R_1=R_2=R_3=OH$: leucodelphinidine

$R_1=R_2=H$; $R_3=OH$: leucopélargonodine

$R_1=R_2=OH$; $R_3=H$: leucorobinétinidine

$R_1=R_2=R_3=H$: leucoguibourtinidine



c) Anthocyanidines

$R_2=R_3=H$; $R_1=OH$: fisétinidine

$R_1=R_3=OH$; $R_2=H$: cyanidine

$R_1=R_2=R_3=OH$: delphinidine

$R_1=R_2=H$; $R_3=OH$: pélargonodine

$R_1=R_2=OH$; $R_3=H$: robinétinidine

$R_1=R_2=R_3=H$: guibourtinidine

Figure I.23 : Unites des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-desoxyflavan-3-ols ;
(b) flavan-3-4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes.

I.3.3. *Punica granatum L.*

Le Grenadier ou *Punica granatum L.* est un arbre fruitier de la famille des Lythracées cultivé depuis la plus haute Antiquité. Connu depuis plus de 4000 ans, il n'a cessé de fasciner toutes les civilisations par sa beauté et la qualité de son fruit comestibles et ses grandes fleurs ornementales. Utilisé de façon générale dans les médecines traditionnelles pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Les fleurs fraîches du grenadier sont

utilisées en infusion contre l'asthme. L'écorce du fruit est utilisée contre la dysenterie et l'écorce du tronc et des fruits est utilisée comme plante tinctoriale. L'écorce des racines combat le ténia.

Les religions ont donné de nombreux surnoms à la grenade : fruit miracle, super-fruit et même fruit de Dieu. Depuis la nuit des temps elle est considérée comme un fruit possédant de grands pouvoirs. Il possède donc de nombreux symboles qui diffèrent en fonction des époques, religions ou régions du monde. La grenade a longtemps eu un usage religieux, notamment pour les Phéniciens : le fruit représentait à la fois la vie au même titre que l'olivier et la datte. C'est le fruit qui apparaît le plus souvent dans la Bible, les chrétiens voient en la grenade une union entre l'Eglise (l'écorce) et ses fidèles (les graines).

Dans la religion musulmane on raconte que le prophète Mohammed a encouragé ses disciples à manger la grenade pour chasser l'envie et la haine.

I.3.3.1. Description botanique du grenadier

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux au feuillage caduc et au tronc tortueux. Le fruit en forme de pomme passant avec le temps du vert au rouge orange doit être considéré comme un cas limite de baie puisque la pulpe n'est pas charnue mais elle n'est pas filandreuse non plus. Son diamètre peut atteindre 15 centimètres et elle est divisée par de nombreuses parois. Ainsi se forment des loges dans lesquelles se trouvent de nombreuses graines triangulaires mesurant jusqu'à 15 millimètres qui sont entourées d'une enveloppe (le sarcotest) translucide très juteuse de couleur rouge foncé à rose clair qui éclate à la moindre pression. En tout il y a à peu près 400 graines dans chaque fruit [76, 77].

I.3.3.2. L'écorce du fruit

L'écorce du fruit du grenadier est appelée *malicorium*. C'est la partie dure du fruit brunâtre ou vert rougeâtre à l'extérieur. Il est un peu verruqueux brillants et jaunâtres sur la face intérieure concave portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. Ces fragments sont de consistance coriace. Ils sont formés d'un parenchyme de cellules à parois minces. Au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et des faisceaux fibro-vasculaires. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente [78].

I.3.3.2.1. Composition de l'écorce du fruit du grenadier

L'écorce de la grenade constitue environ 50% du poids total du fruit [79], toutefois l'écorce du fruit contient des quantités considérables des composés phénoliques comprenant les tanins hydrolysables (punicalin, punicalagin, la granatine A et la granatine B) et les flavonoïdes (catéchine, epicatechine et rutine) [80, 81].

L'écorce du fruit contient aussi deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades [81].

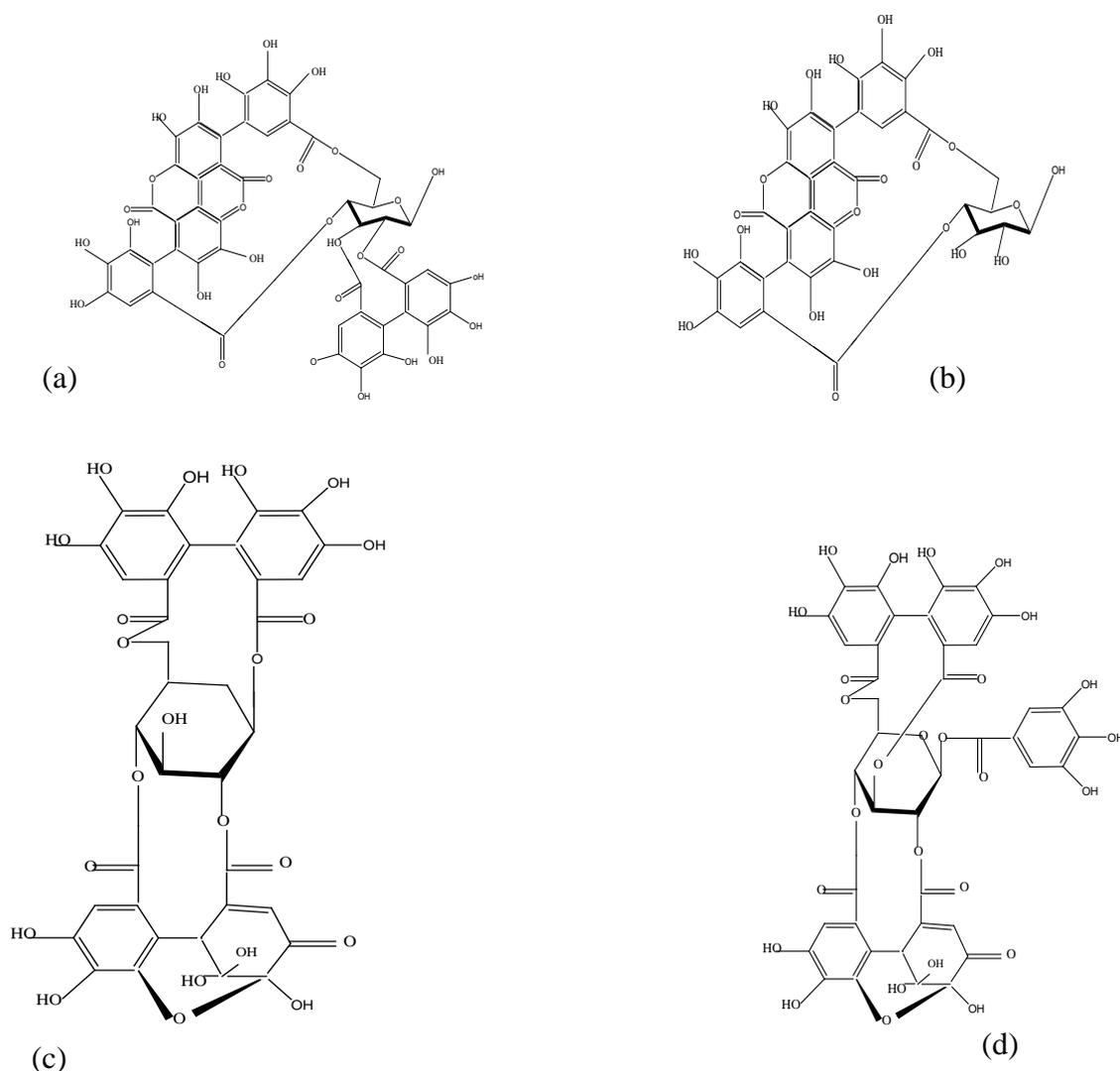


Figure I.24. Principaux composés phénoliques du *malicorium*.

(a) Punicalagine ; (b) : Punicaline ; (c) : Granatine A ; (d) : Granatine B.

I.3.4. Propriétés des polyphénols

La structure chimique des polyphénols présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec de nombreuses macromolécules telles que des protéines et des hydrates de carbones, ou encore avec des ions métalliques [82]

I.3.4.1. Solubilité des polyphénols

La solubilité des polyphénols dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation [83]. Ils sont également solubles dans l'acétone et les alcools. C'est pour cette raison que l'extraction des polyphénols est généralement réalisée par une solution acétone-eau ou méthanol-eau [84].

I.3.4.2. Chélation des ions métalliques

Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques [85, 86, 87]. Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (Figure I.25) [88]. Les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B, les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, les groupes 4-oxo et 5-hydroxy. Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace.

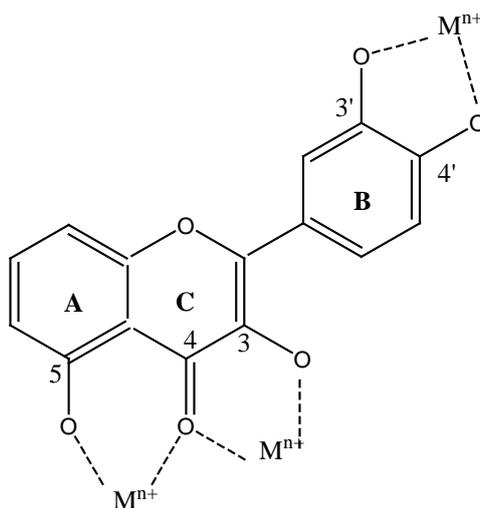


Figure I.25 : Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (M^{n+}) [88].

I.4. TECHNIQUES ELECTROCHIMIQUES

I.4.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

La spectroscopie d'impédance électrochimique s'impose de nos jours comme un outil analytique fiable et puissant permettant de caractériser les propriétés électriques de nombreux systèmes. Elle permet l'analyse simultanée des propriétés résistives et capacitives des matériaux conducteurs ou semi-conducteurs. On l'applique à l'étude des mécanismes réactionnels, à la caractérisation de couches superficielles et minces, à l'étude des phénomènes de corrosion, à la caractérisation de la conductivité électrique de matériaux solides et à la cinétique des électrodes et des batteries [89, 90]. Cette popularité est due à son aptitude à fournir un bon nombre d'information pour mieux compléter la compréhension d'un système électrochimique par apport aux autres techniques [91].

En pratique, la mesure d'impédance consiste à surimposer, à un point de fonctionnement stationnaire une perturbation sinusoïdale de potentiel ΔE de faible amplitude notée $|\Delta E|$ et de pulsation $\omega = 2\pi f$ (en rad.s^{-1}). Le potentiel imposé à l'électrode est égal à $E(t) = E + \Delta E$. Il en résulte alors un courant sinusoïdal ΔI de même pulsation ω superposé au courant stationnaire I d'où $I(t) = I + \Delta I$ mais avec un déphasage ϕ . L'impédance du système est le rapport du potentiel $\Delta E(\omega)$ sur le courant $\Delta I(\omega)$ à une gamme de fréquences déterminée par l'expérimentateur. L'impédance totale du système peut être présentée comme étant la somme d'une partie réelle, $Z_r(\omega)$ et d'une partie imaginaire, $Z_i(\omega)$ [92].

$$Z(j\omega) = \Delta E(\omega) / \Delta I(\omega) = Z_r(\omega) + j * Z_i(\omega) \dots \dots \dots \text{Eq.I.4.}$$

Où $j = \sqrt{-1}$ et $\omega = 2\pi f$, ω et f étant respectivement la pulsation (rad.s^{-1}) et la fréquence (Hz).

L'objectif de l'analyse d'un spectre d'impédance est de convertir chacune des étapes observables sur les diagrammes de Nyquist et/ou de Bode en des grandeurs physiques représentatives. Ceci peut être réalisé par la modélisation du diagramme en proposant un Circuit Electrique Equivalent (CEE) composé d'un certain nombre d'éléments simples. Les éléments les plus couramment utilisés sont :

- L'impédance correspondant à une résistance : R , uniquement modélisée par sa partie réelle (indépendante de la pulsation) ;
- L'impédance correspondant à une capacité : $Z_C = 1 / j * C\omega = -j / C\omega$;
- L'impédance équivalente à une inductance : $Z_L = j L\omega$.

L'interprétation des diagrammes par l'intermédiaire du CEE doit respecter deux conditions primordiales :

- Tous les éléments du circuit doivent avoir une signification physique précise, associée aux propriétés physiques du système ;
- Le diagramme simulé à partir du CEE doit être le plus fidèle possible au diagramme expérimental et l'erreur ne doit pas présenter de caractère systématique en fonction de la fréquence.

Un très grand nombre de circuits électriques sont proposés dans la littérature et ceux-ci dépendent principalement du transport des charges. Le circuit équivalent couramment utilisé est celui de Randles [93]. Il est présenté sur la figure I.26.

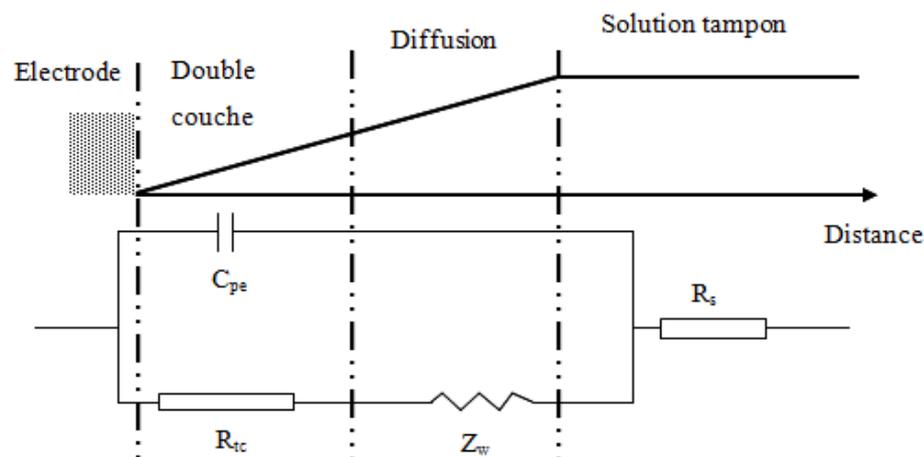


Figure I.26 : Modélisation des différentes couches d'un capteur constitué d'une électrode conductrice en contact avec une solution électrolytique.

Les différents éléments constituant ce circuit sont [94,95]:

- la résistance de l'électrolyte R_s .
- la résistance de transfert de charge R_{tc} .
- la capacité de double couche C_{pe} .
- l'impédance de Warburg Z_w .

a) La résistance de l'électrolyte R_s

La résistance de la solution est un facteur significatif à prendre en considération dans la spectroscopie d'impédance. Un système électrochimique à trois électrodes va permettre la compensation de la résistance de l'électrolyte entre l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire. Cependant, la résistance de la solution entre l'électrode de référence et celle de

travail doit être prise en compte pendant la modélisation. Cette résistance dépend, essentiellement, de la concentration et du type d'ions en solution ainsi que de l'aire et de la géométrie de l'électrode de travail. Elle est définie par la relation suivante :

$$R_s = \rho l / A \dots\dots\dots \text{Eq.I.5.}$$

Où ρ est la résistivité de la solution, et A la surface de l'électrode de travail et l la distance entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.

b) La résistance de transfert de charge R_{tc}

La résistance de transfert de charge permet d'avoir une idée sur la cinétique de transfert d'électrons du couple redox vers la surface de l'électrode. Ainsi, l'immobilisation de l'élément de reconnaissance à la surface de l'électrode va limiter la cinétique de transfert de charge car la valeur de la surface effectivement disponible pour l'échange des électrons est réduite. Cette résistance est définie par la formule suivante :

$$R_{tc} = R T / n F i_0 \dots\dots\dots \text{Eq.I.6}$$

Avec :

R : est la constante de gaz parfait ;

T : la température ;

n : le nombre d'électrons transférés ;

F : la constante de Faraday ;

i_0 : la densité de courant d'échange au potentiel d'équilibre.

c) La capacité de double couche C_{dl}

Lorsqu'un métal est placé en contact d'un électrolyte, une interface électrique est immédiatement développée. La zone de l'interface métal/solution où les espèces chargées s'organisent est appelée double couche électrique. A un potentiel donné l'interface électrode/solution est caractérisée par une capacité de double couche, C_{dl} . La double couche est constituée de plusieurs couches (figure I.27). On appelle couche d'Helmholtz, la couche la plus proche de l'électrode regroupant les molécules du solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbées. Le lieu des centres électriques spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH). La deuxième couche existe au sein même du solvant et contient les ions solvatés. Le lieu des centres des ions solvatés est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des ions solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH jusqu'au sein de la solution. L'expression de la capacité de la double couche

est donnée par l'équation ci-dessous, où $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ est la permittivité du vide, ϵ_p est la permittivité relative de la couche entre le PEH et la surface de l'électrode, δ l'épaisseur de cette couche et A est la surface de l'électrode.

$$C_{dl} = \epsilon_{dl} A / \delta \text{ avec } \epsilon_{dl} = \epsilon_0 \epsilon_p \dots \dots \dots \text{ Eq.I.7.}$$

Avec : δ L'épaisseur de la double couche.

Cette capacité ne couvre pas les imperfections de l'interface notamment de la rugosité et de l'inhomogénéité de la double couche. C'est par un élément à phase constante (CPE) que l'on rend compte des inhomogénéités. Un tel élément est décrit par $CPE = A^{-1} (j\omega)^{-\alpha}$.

Dans un système idéal d'accès uniforme à la surface active, le coefficient α vaut 1 et la modélisation physique se traduit par un condensateur plan.

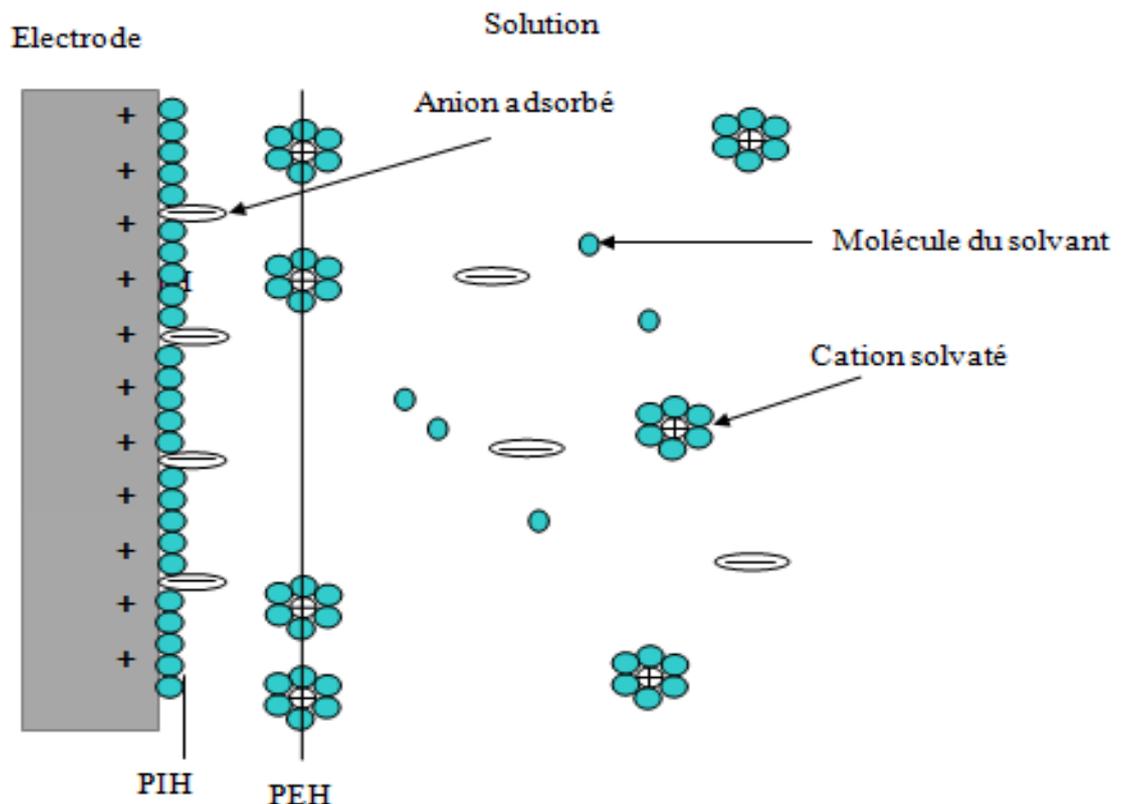


Figure I.27 : La double couche électrique.

d) L'impédance de Warburg Z_w

Si la fréquence d'excitation est élevée, les ions ne peuvent pas suivre l'oscillation du champ et l'impédance de diffusion tend vers zéro. Alors qu'en basses fréquences d'excitation, les ions peuvent diffuser plus loin, ce qui explique la contribution de cette impédance. Elle s'exprime par l'équation suivante :

$$ZW = RT / C n^2 F^2 A (j\omega D)^{0.5} \dots\dots\dots \text{Eq.I.8.}$$

Où C est la concentration de l'espèce électrolysée au sein de la solution (mol.mL^{-1}), A , la surface active (cm^2) et D , le coefficient de diffusion de l'espèce ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$). L'impédance de Warburg se représente, sur le diagramme de Nyquist (figure I.28) par une droite formant un angle de 45° par rapport à l'axe des réels. Généralement, elle est placée en série avec la résistance de transfert de charge puisque la diffusion et le transfert de charge sont deux phénomènes qui se produisent successivement. En effet, les charges doivent diffuser du volume vers l'interface pour participer aux réactions d'oxydo-réduction [96].

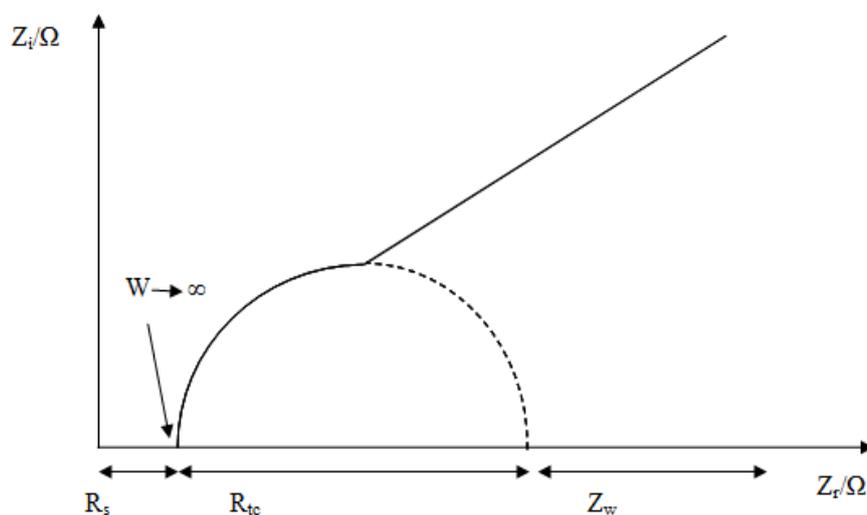


Figure I.28 : Diagramme de Nyquist

I.4.2. La voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique est sans aucun doute la plus universelle des méthodes électrochimiques, pouvant servir à la fois comme méthode d'élucidation de mécanismes de réactions ou comme technique analytique [97]. Cette technique est très utile pour déterminer la nature des phénomènes qui se produisent à l'électrode, les potentiels auxquels ils se produisent, ainsi que leur réversibilité. En outre, cela permet de déterminer la fenêtre de stabilité d'un matériau ou d'un électrolyte, ainsi que de mesurer la capacité d'une électrode [98].

La voltampérométrie consiste à appliquer une différence de potentiel variable, deux balayages linéaires (« aller »/« retour ») du potentiel en fonction du temps, entre une électrode de référence et une électrode indicatrice, au contact de laquelle va se produire une réaction

d'oxydoréduction ($\text{Ox} + n\text{e} \leftrightarrow \text{Red}$). La réponse du système est l'enregistrement du courant, en fonction de la tension appliquée. Cette réponse se présente sous la forme de la courbe $I = f(E)$, appelé voltammogramme, qui est une caractéristique de l'espèce électroactive (figure I.29).

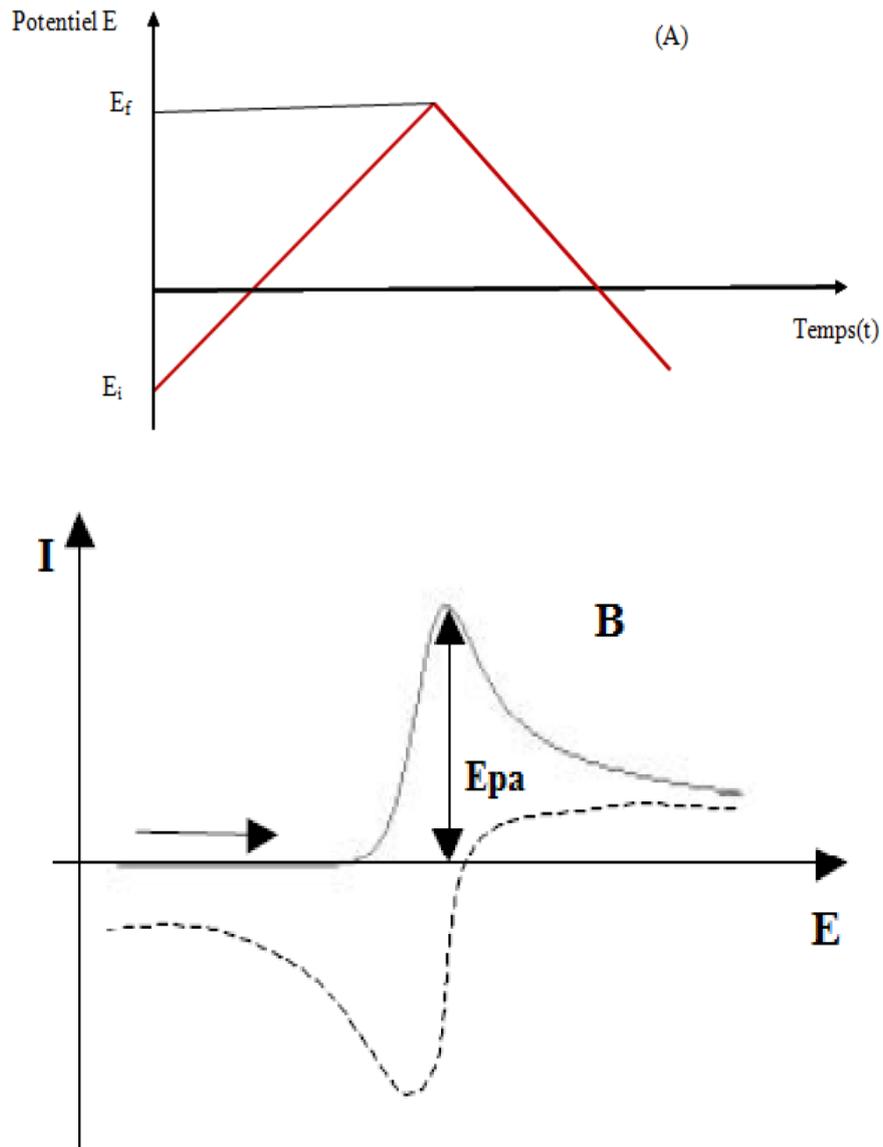


Figure I.29 : Voltampérométrie cyclique. (A): forme du potentiel imposé ($E = f(t)$), (B):réponse en courant

$$I = f(E).$$

Pour un système réversible lors du balayage « aller » on observe sur le voltampérogramme une croissance du courant situé entre le nanoampère et le microampère. Pendant cette période une réaction de réduction ($Ox + ne \rightarrow Red$) commence à se produire correspondant à l'accélération du processus par accroissement du potentiel. Suite à cette croissance le maximum du pic d'oxydation (E_{pa}) indique l'intensité du courant anodique pour l'espèce étudiée sur une électrode donnée. Puis une décroissance lorsque le ralentissement dû au phénomène de diffusion l'emporte.

Le balayage retour apporte des informations quant à la réversibilité de la réaction électrochimique par la position et l'intensité des courants faradiques enregistrés. Le tracé présentera un second pic (de réduction) indiquant l'intensité du courant cathodique issu de la réduction de l'espèce oxydée produite à l'aller et encore présente dans la couche de diffusion. Ces systèmes, qualifiés de réversibles, répondent en tout point du voltampérogramme à la relation de Nernst.

I.4.3. La voltamétrie à ondes carrées SWV

La voltamétrie à ondes carrées a reçu une attention croissante comme une technique voltampérométrique pour des analyses quantitatives fréquentes. Bien que la voltamétrie à ondes carrées était rapporté depuis 1957 par Barker [99]. L'utilité de la technique a été limitée par la technologie électronique. Les recherches récentes dans l'électronique analogique et numérique ont fait la possibilité d'incorporer cette technique dans des analyses polarographiques.

La voltamétrie à ondes carrée peut être utilisé pour effectuer des expériences beaucoup plus rapides que normale par rapport aux autres techniques d'impulsions différentielles avec une vitesse de balayage de 1 à 10 mV/sec. SWV emploie des vitesses de balayage jusqu'à 1 V / sec ou plus rapide, permettant de faire des analyses plus rapide. Une expérience typique nécessite trois minutes avec des techniques d'impulsions différentielles peut être réalisée en quelques secondes avec la voltamétrie à ondes carrées.

La voltampérométrie différentielle à onde carrée (SWV) est une variante de la Voltampérométrie différentielle à impulsions constantes surimposées où la durée de l'impulsion est égale à la moitié de la durée du palier de potentiel. Cependant, il est plus aisé de la considérer comme étant la surimposition d'une onde carrée à la rampe de potentiel, d'où son nom. Dans ce cas, chaque palier est constitué d'une impulsion de potentiel dans le même sens que le sens de balayage suivi d'une impulsion de même amplitude mais dans le sens

inverse au sens de balayage. La différence de courant reportée sur la courbe intensité-potentiel est alors $I = i_{\text{dir}} - i_{\text{inv}}$ avec i_{dir} le courant mesuré sur l'impulsion dans le même sens que le balayage (i_{dir} pour direct) et i_{inv} le courant mesuré sur l'impulsion dans le sens opposé (i_{inv} pour inverse). La Figure I.30 présente la séquence de balayage de potentiel utilisée en SWV ainsi qu'un exemple type de voltampérogramme obtenu.

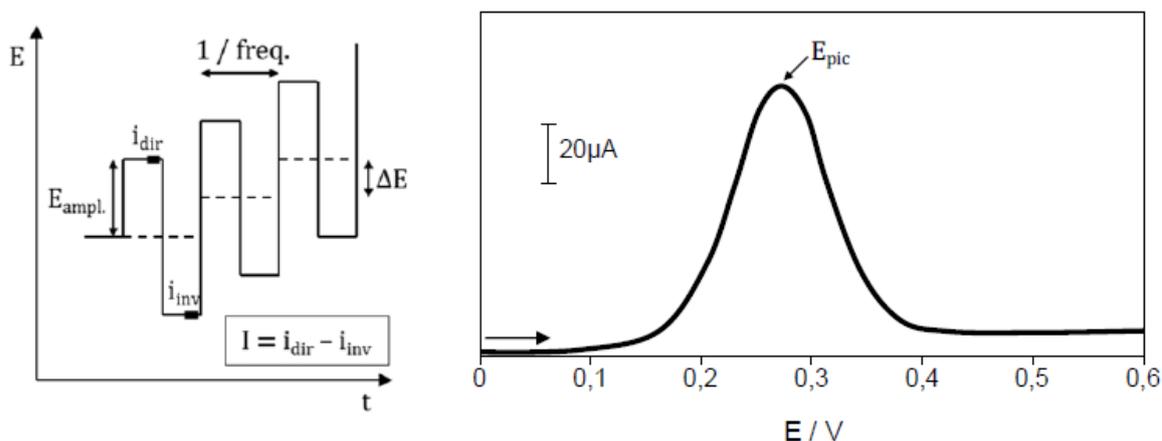


Figure I.30. Séquence de balayage de potentiel utilisée en SWV (gauche) et exemple de courbe courant-potentiel obtenue (droite).

L'interprétation des pics est la même qu'en DPV mais la SWV présente deux avantages majeurs comparée à elle. Tout d'abord, la vitesse de balayage qui est souvent présentée sous la forme d'une fréquence (vitesse de balayage = $\Delta E \times$ fréquence) peut être beaucoup plus élevée dans le cas de la SWV, de l'ordre de 10 mV/s à 5 V/s. L'autre avantage est que l'alternance de direction des impulsions permet d'effectuer des allers retours entre les états oxydé et réduit de l'espèce électrolysée (dans le cas d'un système réversible). De ce fait dans le cas d'une oxydation par exemple, i_{dir} est un courant positif alors que i_{inv} est un courant négatif correspondant à la réduction du produit immédiatement formé. Le courant différentiel I ($i_{\text{dir}} - i_{\text{inv}}$ est donc plus élevé que le courant direct i_{dir} . La SWV permet par conséquent d'obtenir des courants plus élevés qu'en DPV, ce qui la rend plus sensible [100].

I.5. ETAT DE L'ART

Le principe d'un capteur est de produire un signal proportionnel à la concentration de l'espèce à détecter avec laquelle réagit le récepteur. Ce dernier est capable de reconnaître spécifiquement la substance à doser dans un milieu complexe grâce à ses sites particulièrement sélectifs. Le choix d'une molécule de reconnaissance, spécifique de l'espèce à doser, constitue l'un des points les plus importants de la conception d'un capteur [101]. Ceci quelque soit d'ailleurs la nature du transducteur mis en jeu, c'est la qualité de sa fonctionnalisation qui conditionnera la sélectivité, la sensibilité, le temps de réponse, la durée de vie et la réversibilité [102].

Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé biorécepteur. Dans la nature, il existe un grand nombre de biomolécules douées de fonction de reconnaissance. Ce sont d'ailleurs elles qui permettent le survi d'une espèce en assurant les fonctions vitales d'un organisme telles que les métabolites secondaires qui jouent un rôle de défense contre les prédateurs et les pathogènes [103]. On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux ci les composés phénoliques qu'ils sont communément subdivisés en acides phénoliques, flavonoïdes et tanins [104].

L'écorce du fruit du grenadier (*Punica Granatum L.*) appelée malicorium, possède en effet de fortes capacités antioxydantes et anti-inflammatoires liées à la présence de polyphénols tels que les anthocyanes et les tannins ellagiques et les tannins hydrolysables qui forment des complexes avec les métaux lourds [103,105].

Plusieurs travaux ont été réalisés pour développer des capteurs chimiques de métaux lourds. En effet des capteurs enzymatiques ont été réalisés. Ce sont le plus souvent de transduction ampérométrique qui repose sur l'enzyme catalysant la réduction ou l'oxydation de l'analyte. Ces réactions redox peuvent être détectées soit directement, soit par l'intermédiaire des médiateurs redox qui facilitent le transfert de l'électron vers la surface de l'électrode. Parmi eux l'utilisation de l'acétylcholinestérase (AChE) immobilisée sur des électrodes de type sérigraphie par deux méthodes en utilisant deux médiateurs redox pour détecter le cadmium. Les capteurs obtenus par l'immobilisation sol-gel sont les plus sensibles que ceux par réticulation avec une limite de détection de l'ordre de 0.37 ppb [106]. De manière identique l'enzyme peroxydase de raifort a été immobilisée par polymérisation en utilisant le copolymère d'aniline et un dérivé de disulfure d'aniline comme médiateurs pour détecter le mercure, cadmium et plomb avec des limites de détection de l'ordre de 10^{-4} µg

[107]. On obtient ainsi des capteurs microbiens dont les bactéries et les levures sont souvent génétiquement modifiés pour exprimer des éléments qui facilitent la transduction. Par exemple l'utilisation de l'*Escherichia coli* immobilisée sur des nanobeads magnétiques pour la détection du mercure et du cadmium. Ce biocapteur a montré une bonne performance analytique avec une sensibilité très élevée et une limite de détection de l'ordre de 10^{-12} M [108].

Il existe un autre type de capteurs dont ces couches de reconnaissance sont des micro-algues comme le cas de *Chlorella vulgaris* qui ont été utilisées pour la détection du cadmium et du zinc dans des échantillons d'eau. Ces algues ont été immobilisées à l'intérieur des membranes d'albumine de sérum bovin réticulées avec des vapeurs de glutaraldéhyde déposées sur des électrodes conductimétriques interdigitées. Ces derniers présentent une très grande sensibilité et une limite de détection de l'ordre de 10 ppb [109].

Par ailleurs il existe des capteurs électrochimiques à base des membranes polymérisées contenant les Calix [4] arènes. Ce genre de capteurs ont été construit avec sucée pour la détection du cadmium avec des limites de détection de l'ordre 10^{-6} et 10^{-7} M [110,111]. Sur un autre plan, on trouve des électrodes à base de carbone qui occupent une position importante dans l'électroanalyse en raison de leur stabilité, leur facilité de manipulation et de conditionnement, leur faible coût et leur haute sensibilité. Plusieurs travaux ont décrit la possibilité de les utiliser comme des électrodes de travail dans la conception des capteurs. Citons l'utilisation de celle à pâte de carbones modifiés avec une résine thiolique pour le dosage du mercure inorganique et organique présents simultanément dans un échantillon, cette analyse donne une limite de détection de 4 $\mu\text{g/l}$ [112]. De même, le carbone simple a été réalisé pour la détermination électrochimique du cadmium avec une limite de détection de l'ordre de 0.08 $\mu\text{g/l}$ [113].

Tous ces capteurs nécessitent une modification et des traitements adéquats afin de pouvoir les construire. Leur mise en œuvre n'est par conséquent pas simple.

De nombreux travaux suggèrent que les composés phénoliques forment des complexes avec les métaux lourds, notamment pour le développement de nouveaux adsorbants dans les milieux hydriques. Pour preuve un tanin extrait de *Rhizophora apiculata mangrove* a été utilisé comme adsorbant pour éliminer les ions cuivre et plomb [114]. De même un autre travail a étudié un nouvel adsorbant du zinc à base des tanins [115]. Une autre étude a été réalisée dans laquelle a été utilisée les tanins à base de mousse rigides pour adsorber le cuivre et le plomb [116]. Il est ainsi possible de citer les travaux de Saranya Kuppusamy et al qui ont confirmé le rôle bioremédiable des polyphénols pouvant coaguler et décolorer l'eau

contaminée et chélater les métaux lourds par leur inactivation [118]. Il faut ainsi mentionner le mécanisme antioxydant des polyphénols par la chélation des métaux de transition qui conduit à des composés plus stables pour éviter leur participation dans des réactions de Fenton avec du peroxyde d'hydrogène formant des espèces d'oxygène très dangereuses [119].

Beaucoup d'auteurs ont confirmé que l'écorce de la grenade (malicorium) est très riche en composés phénoliques. Nous pouvons mentionner l'étude des actions antibactériennes contre les microorganismes de ces tanins [120]. De façon similaire une analyse des polyphénols totaux des écorces Tunisiennes en utilisant des méthodes colorimétriques et des analyses MALDI-TOF a identifié quatre types de tannins, ellagitanins tels que la punicaline et la punicalagine, la granatine A et la granatine B [121-124] et un nouveau glycoside d'acide gallique dimère nommé Humarain. De même, des analyses phytochimiques indiquent que l'activité anti-oxydante des extraits de malicorium a été corrélée avec sa teneur élevée en composés phénoliques totaux et les flavonoïdes [125- 127]. De manière identique Quatre grenades chinoises ont été analysées par HPLC qui a montré que ce fruit est une bonne source de flavonols et anthocyanes [128, 129].

Différentes classes de composés phénoliques ont été identifiées dans un extrait méthanolique de ces écorce. Cette teneur élevée en polyphénols joue un rôle important dans l'activité antifongique significative sur la croissance des champignons et des germes pathogènes [130]. Une autre identification par les méthodes de Folin-ciocalteu et DPPH respectivement indique la présence des anthocyanes, les catéchines, les tanins galliques et les acides ellagique. Cette richesse lui donne une activité antimicrobienne efficace contre deux agents pathogènes y compris *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui sont souvent impliqués dans des maladies d'origine alimentaire [131].

A la lumière de cette littérature, on constate que les polyphénols sont largement utilisés comme adsorbants des métaux lourds. Dans notre travail, nous avons exploré la possibilité de détection des ions cuivre, nickel, cadmium et plomb en utilisant les polyphénols de l'écorce de la grenade dont nous avons cité beaucoup de travaux qui suggèrent sa richesse en composés phénoliques.

Conclusion :

Ce chapitre nous a permis de définir les différents types de techniques convenables avec lesquels nous avons développé nos biocapteurs. Nous avons choisi d'utiliser des biocomplexants naturels en l'occurrence les polyphénols de l'écorce de la grenade dans la

construction des biorécepteurs pour détecter les métaux lourds. L'élaboration et la caractérisation de ces capteurs seront discutées dans le chapitre suivant.

Références bibliographiques :

- [1]: E. B. Bahadir, M. K. Sezginturk; Biosensors and Bioelectronics ; 68(2015) 62-71.
- [2]: M. Marrakchi ; thèse de doctorat; Ecole centrale de Lyon ; 2006.
- [3]: S. P. J. Higson, S. M. R. Reddy, P. M. Vadgama., Engineering Science and Education (1994) 41.
- [4]: C. R. Keese ; I. Giaever., IEEE Engineering in Medicine and Biology ; 435 (1994).
- [5]: H. Barhoumi ; thèse de doctorat ; Ecole centrale de Lyon ; 2006.
- [6]: L.C. Clark, C. Lyon; Annals of New York Academy Sciences;102 (1962) 29-45.
- [7]: S.J. Updike; Hicks. G; Nature ; 214 (1967) 986-988.
- [8]: I. Hafaiiedh ; thèse de doctorat ; INSA Lyon ; 2009.
- [9] : H. M. Walid ; thèse de doctorat; université de Claude Bernard Lyon 2; 2009.
- [10]: M. Mehrvar, M. Abdi ; Analytical sciences ; 20(2004) 1113-1126.
- [11]: S. Baliteau ; thèse de doctorat ; Université Joseph-Fourier Grenoble I, 2005.
- [12] : C.T.Minh ; Les biocapteurs : principes, construction et applications, Masson. 1991.
- [13]: B .Pejic; R.D .Marco; Electrochimica acta; 51(2006) 6217-6229.
- [14]: P.B. Luppa, L.J. Sokoll, D.W . Chan; Clinica chimica acta; 314(2001)1-26.
- [15] : M. Di Benedetto; Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne ; Dossier SAM 1997.
- [16] : J. Steketee ; cahier SKB ; 2010.
- [17] : L. Sahli ; thèse de Doctorat. Université de Constantine, 2012.
- [18] : J.F Fiset ; J.F Blais , R Dayal Tyagi ; revue des sciences de l'eau ; 13(2000) 325-349.
- [19] :Y.Wang, L.Yang, L.Kong, E.Liu; Catena journal; 125(2015)200-205.
- [20] : C.Christophoridis, D.Dedepsidis; Hazardous Materials journal; 168(2009)1082-1091.
- [21] : J.Bai, B.Chen, B.Zhang, K.Deng; Ecological Model; 222(2012)301-306.
- [22] : R. Prunet, D. Bourdin, D. Prevoeau ; Structure de la matière ; chimie inorganique ; premières terminales ; Dunod (1994).
- [23] : A. Burnol, L. Duro, M. Grive ; Guide méthodologie (2006).
- [24]: F. Uwittmann; journal of basic microbiology; 21(1981) 564.
- [25]: Z. Li, Feng; Y. Chu, Y. Dong, X. Li, J. Liu, K. Yang, L. Tang ; Ore Geology Reviews; 74(2016) 52-62.
- [26]: GD . Nielsen , U .Soderberg , PJ. Jorgensen , DM. Templeton , Rasmussen , SN. Andersen KE, P . Grandjean ; Toxicol Appl Pharmacol ; 164 (1999) 67-75 .
- [27] : V.Martyn, S.Micheal; Applied Catalysis A: General; 212(2001) 161-174.

- [28] : O. Joseph ; Thèse de doctorat ; institut national des sciences appliquées de Lyon ; (2009).
- [29] : Documentation propriétés du cuivre et alliages ; institut Européen du Cuivre (2016).
- [30]: D.C. Adriano; Springer Science Business Media, LLC ; Second Edition (2001).
- [31]: W. Stumm, J. J Morgan; Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters; third edition (1995).
- [32]: M. Miguel , S. Aranguren ; thèse de doctorat ; Université de Toulouse II (2008).
- [33] : M. I. Ghazala ; thèse de doctorat ; Université Mohammed V Agdal ; Faculté des Sciences ; Rabat (2009).
- [34] : JP Blanquet , L Meunier, A Morin ; Rapport Technique ; INERIS (2003).
- [35] : M Dubrunfaut ; Bulletin des sciences technologiques ; Tome 5 ; Paris 1825.
- [36] : M. Bramat, M. Villeneuve ; technologie des métaux, contrôles et essais des soudures ; de boeck, 2007.
- [37] : A. Penanguer, O. Jan , G ;Eramet des alliages des minerais et des hommes ; Paris 2014. [38]: N. Anyadike ; Nickel an industry on the brink of expansion; british library (2002).
- [39]: S. Bicochi, M. Boulinguez, K. Diard ; Les polluants et les techniques d'épuration des fumées ; 2^{ème} édition ; édition TEC et DOC ; Lavoisier, paris (2009).
- [40]: D. Baize; Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols; Cedex ; 2007.
- [41] : H. Ayoub ; thèse de doctorat ; L'université Pierre et Marie Curie ; 2012
- [42]: P. Apostoli ; IOMC; World health organization; University of Brescia; Italy; 2006.
- [43]: N. Hamadouche ; thèse de doctorat ; univrsité d'oran ; 2011.
- [44] : V. Cappuyns , R. Swennen , A. Vandamme , M. Niclaes ; Geochemical Exploration 88 (2006) 6-9.
- [45]: A. Facchinelli, E.Sacchi, L.Mallen; Environmental pollution; 114(2001)313-324.
- [46]: M. CECCHI ; thèse de doctorat ; Institut national polytechnique de Toulouse (2008).
- [47] : A. sbartai ;; Thèse en co-tutelle entre université Badji Mokhtar Annaba et université Claude Bernard Lyon1 ; 2014.
- [48] :P. Podevin ; intoxication du plomb en milieu professionnel ; Hôpital Pitié-Salpêtrière ; Mars 2010.
- [49] :J. F. Chiffolleau, J. L. Gonzalez ; Université de la Rochelle, laboratoire de biologie et biochimie (1999).
- [50] :A. Martin-Garin, O.Simon ; Direction de l'environnement et de l'intervention ; ISRN; 2004
- [51] : S. HUGUET ; thèse de doctorat; Université des Sciences et Technologies de Lille I ; 2009.

- [52] : P. H. Bourrelier, J Berthelin ; Académie des sciences, Rapport N° 42 <<tec et doc>>, Lavoisier ; Paris ; 440.
- [53] : S. Collin, J.n Crouzet ; édition Tec et doc lavoisier ; 2011.
- [54] : J.J Macheix., A Fleuriet, P.Sarni-Manchado ; édition Tec et Boc; Lavoisier; 2006.
- [55]: K Dattajirao . Salunkhe, R. Narayana , B. Babasaheb . Desai; Postharvestv Biotechnology of Flowers and Ornamental Plants ; Springer; 1990.
- [56]:J. Postova, M. Kolar, J. Sousak; Phytoterary research; 17(2003) 1082–1087.
- [57]: G. Mousavinejad, Z. Emam-Djomeh , K. Rezaei, M. H. Haddad Khodaparast ; Food Chemistry ; 115(2009) 1274–1278.
- [58]: G. Ribéreau-Gayon ; Phytochemistry ; 7(1968) 1471-1482.
- [59] : P. Rasoanaivo, A. Petitjean, S. Ratsimamanga-Urverg, A. Rakoto-Ratsimamanga ; Journal of Ethnopharmacology ; 37(1992) 117-127.
- [60]: I. Hmid; thèse de doctorat en cotutelle; L'UNAM et université de Beni Mellea Maroc; 2013.
- [61] : T. Muhizi, J. P. Sinumvayo, J. B. Nkurunziza, S. Grelier, V. Coma ; Rwanda Journal, 24(2011).
- [62]: H .Havsteen; Pharmacology and therapeutics; 96(2002)67-202.
- [63]: A. Marfak ; thèse de doctorat ; université de Limoges ; 2003.
- [64] : J. Bruneton ; Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales ; 5^{ème} édition ; TEC et DOC ; 2009.
- [65]: I. C.W Arts, P. C. Hollman ; The American Journal of Clinical Nutrition, 81(2005).
- [66]: P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 2006.
- [67]: E. Mansour, A. Ben Khaled, B. Lachiheb, M. Abid, Kh. Bachar, A. Ferchichi;. Agricultural Sciences; 15(2013)1393-1403.
- [68]: G. Kevin, D. Kevin M, Winefield, Chris; Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications; Springer, 2009.
- [69]: P Sarni-Manchado, V Cheynier, Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 2006.
- [70]: P. Markakis ; Anthocyanins as food colors ; Food science and technology; Ebook; 1982.
- [71]: J. Vercauteren, Catherine Chèze ; Polyphenols 96: 18th International Conference on Polyphenols; institut national de la recherche agronomique Bordeaux France; 1996.
- [72] : G. Jean-Marie, O. Anne-Marie ; Le préparateur en pharmacie ; 2^{ème} édition ; Tec et DOC.

- [73] : P. Sarni-Manchado, V. Cheynier ; Les polyphénols en agroalimentaire ; Lavoisier ; Editions Tec & Doc ; 2006.
- [74]: S. Buelga, C. Scalbert A; Journal of Science. Food Agriculture; 80 (2000) 1094-1117.
- [75]: E. Haslam; Bitterness and astringency;Cambridge university press; pp. 178-225(1998).
- [76] : A . Bartels ; Guide des plantes du bassin méditerranéen ; Editions Ulmer ; 1998.
- [77] : L. Courchet ; Editions Baillière ; 1897.
- [78] : G Planchon, E. Collin ; Librairie F. Savy ;Tome I ;1875.
- [79]: F.A. Al-Said, L.U. Opara; Journal of Food Engineering 90 (2009) 129–134.
- [80]: T. Ismail, P. Sestili, S. Akhtar; Journal of Ethnopharmacology 143 (2012) 397–405.
- [81]: E; P. Lansky , A .Robert. Newman ; Journal of Ethnopharmacology ; 109(2007) 177–206
- [82]: P. Frutos, G. Hervás, F. J. Giráldez, A. R. Mantecón; Spanish Journal of Agricultural Research 2(2004) 191-202.
- [83]: C. Martinez Ortiz De Montelano ; thèse de doctorat, université de Toulouse ; 2010.
- [84] : M. N. Mailoa, M. Mahendradatta, A. Laga, N. Djide , chemistry food; 2(2013) 2277-8616.
- [85]: R.C .Hider, L. Z. D, H. Khoder; Academic press INC, 335(2001) 190-203.
- [86]: J.E Brown, H. Khodr, R.C .Hider, C. Rice-Evans; Journal of Biochem; 330 (1998) 1173-1178.
- [87]: C.J .Morris, Earl J.R, C.W .Trenam, Blake D.R; Journal of Biochem; 27(1995) 109-122.
- [88]: Y.Zhen; Tea Bioactivity and therapeutic potential; CRC Press; (2002) 211-242.
- [89] : H. M . Walid ; thèse de doctorat ; Université Claude Bernard Lyon I ; 2009.
- [90]: B. Pejčić, R. Marco ; Journal of Electrochimica acta; 51(2006) 6271-6229.
- [91]: S.Hong, L. Tai-Chin; Electrochemical Impedance spectroscopy for battery Research and development; Rapport technique 31; Solartron; 1996.
- [92]: R. Maalouf ; Thèse de doctorat; Université Claude Bernard Lyon 1; 2006.
- [93]: Randles, J.B.B; Kinetics of rapid electrode reactions. Discuss. Faraday Soc; 1(1947) 11-19.
- [94]: L. Driver; A Primer; Gamry instruments INC, 2007.
- [95]: C . Gabrielli; Techniques de l'Ingénieur ; traités Analyse et Caractérisation Mesures et Contrôle ; 1994.
- [96]: N Kim, I.S Park, W.Y. Kim; Journal of Sensors and Actuators B Chemical; 121 (2007)606-615.

- [97]: H. Hubert, Girault; deuxième édition ; presses polytechniques et universitaires romandes ; 2007.
- [98] : J. Come ; thèse de doctorat ; université de Toulouse ; Décembre 2012.
- [99]: G. C .Barker; Congress on Analytical Chemistry in Industry St Andrews; 1957.
- [100]: S. DELILE ; thèse de doctorat ; Université François – Rabelais de Tours ; Décembre 2013.
- [101] : C .Fio ; thèse de doctorat ; Université de Paris VII ; Paris ; 1993.
- [102] : K.WAN ; thèse de doctorat ; Ecole centrale de Lyon; 1999.
- [103] : S. krief ; thèse de doctorat ; Muséum national d’histoire naturelle ;2003.
- [104] : S. Achat ; thèse de doctorat ; Université d'Avignon ; 2013.
- [105]: F. Afaq, M. Saleem, Christian, G. Krueger, D .Jess; International Journal of Cancer; 113(2005) 423-33.
- [106]: M. David, M. Badea, M. Florescu; Sensing in Electroanalysis; 6(2011) 337-346.
- [107]: B. Silwana, C. Van Der Horst, Emmanuel Iwuoha; Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering; Part A (2014) 49, 1501–1511.
- [108]: M. Souiri, D .Gammoudi X Ben Ouada, L. Mora, T. Jouenne, N. jaffrezic Renault, C.Dejous, A. Othmane, A.C. Duncane ; Procedia Chemistry; 1(2009) 1027-1030.
- [109]: C. Chouteau, S. Dzyadevych, C. Durrieu, J. M Chovelon ; Biosensors and Bioelectronics 21 (2005) 273–281.
- [110]: K. Morakchi, A. Hamel, R. Kherrat; Desalination and Water Treatment; 46(2012) 168-170 .
- [111]: C. Dernane , A. Zazoua , I. Kazane , N. Jaffrezic-Renault ; Materials Science and Engineering C 33 (2013) 3638–3643.
- [112]: M.T. Agraz, Sevilla , L. Hernandez ; Electroanalytical Chemistry 390 (1995) 47-57.
- [113]: A. Afkhami , H. Khoshsafar , H. Bagheri , T. Madrakian; Materials Science and Engineering C 35 (2014) 8–14.
- [114]: C.W. O,M.J. kassim, A. Pizzi;; industrial crops and products; 30(2009) 152-161.
- [115]: J. Shánchez-Martin, J. Beltran-Heredia, P. Gibello-Pérez; Chemical Engineering journal; 168(2011) 1241-1247.
- [116]: G.Tandi, C.W.A. Pizzi, A.Trosa, H.F.Thevenon; Industrial crops and products; 29(2009) 336-340.
- [117]: M. Ozacar, I. Ayhan Sengil, H. Türkmenler; Chemical Engineering Journal; 143(2008) 32-42.

- [118]: S. Kuppusamy, P. Thavamani, M. Megharaj, R. Naidu; *Environmental Technology & Innovation* 4 (2015) 17–28.
- [119]: M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano; *Food Chemistry* 125 (2011) 288–306.
- [120]: S. Glauce, B. Viana, S. Myalhaer, S. Menezes, N. Luciana, FJA. C. Matos; *Bioactive Foods in Promoting Health*; (2010) 57-459-478.
- [121]: H. Saad, F. Charrier Elbouhtoury, A. Pizzi, K. Rode, B. Charrier, N. Ayed; *Industrial Crops and Products*; 40(2012) 239-246.
- [122]: E.P. Lansky, R.A. Newman; *Ethnopharm*; (2007) 177-206.
- [123]: C. Satish, M.B. Kushwaha Bera, P. Kumar. *Asian Chemistry*; 27 (2015) 4320-4326.
- [124]: M. A. Tantray, S. Akbar, R. Khan; *Humarain*; *Fitoterapia* 80 (2009) 223–225.
- [125]: N. Belkacem, R. Djaziri, F. Lahfa, I.A. El-Haci, Z. Boucherit; *Phytothérapie* 12 (2014) 372-379.
- [126]: M. Zahin, F. Aqil, Iqbal Ahmad; *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 9(2010) 401879.
- [127]: S. Lairini, R. Bouslamti, F. Zerrouq et A. Farah; *Journal of Mater. Environmental Sciences* 5 (S1) (2014) 2314-2318.
- [128]: X. Zhao, Z. Yuan, Y. Fang, Y. Yin, and L. Feng; *European food research and technology*. 236 (2013) 109-117.
- [129]: X. Zhao, Z. Yuan, Y. Yin, L. Feng; *Acta horticulturae*; 1089 ISHS (2015) 83-89.
- [130]: A. Elsherbiny, H. Basma, A. Zakaria, A. Baka; *Postharvest Biology and Technology* 111 (2016) 256–263.
- [131]: C. Pagliarulo, V. De Vito, G. Picariello, R. Colicchio, G. Pastore, P. Salvatore, M. Grazia Volpe; *Food Chemistry* 190 (2016) 824–831.

Chapitre II

Partie expérimentale

Sommaire

Introduction.....	57
II.I. Caractérisation de molécules bioactives extraites de l'écorce de <i>Punica Granatum L</i>	58
II.I.1 Préparation de l'échantillon.....	58
II.I.2. Préparation de l'extrait de l'écorce (Macération, évaporation et affrontement).....	58
II.I.3. Testes phytochimiques sur l'extrait.....	59
II.I.4. Méthodes d'extraction et de dosage des composés phénoliques.....	60
II.I.4.1. Préparation de l'extrait brute Acétonique.....	61
II.I.4.2. Rendement d'extraction.....	61
II.I.4.3. Détermination de la teneur en polyphénols.....	61
II.I.4.4. Extraction par les solvants.....	67
II.I.5. Méthodes et techniques d'analyse.....	70
II.I.5.1. Chromatographie sur couches minces (C.C.M).....	70
II.I.5.2. caractérisation par chromatographie liquide à haute performance.....	72
II.I.5.3. Caractérisation physico- chimiques de l'extrait par infrarouge FTIR.....	73
II.2. Etude de la réaction de complexation du cuivre par les polyphénols.....	74
II.2.1. Etude de la Cinétique de complexation.....	74
II.2.1.1. Etude du mécanisme cinétique de l'adsorption du cuivre.....	76
II.2.1.2.Processus de diffusion.....	76
II.2.2. Etude de l'équilibre d'adsorption.....	77
II.2.2.1. Modélisation des isothermes d'adsorption.....	78
II.2.3 Etude thermodynamique de l'adsorption du cuivre.....	80
II.3. Développement des biocapteurs.....	81
II.3.1. Le transducteur.....	81
II.3.2. Fonctionnalisation des électrodes.....	82

II.3.3. Caractérisation structurale et morphologique.....	83
II.3.4. Mesures électrochimiques.....	85
Références bibliographiques.....	88

Chapitre II

Partie expérimentale

L'objectif de nos travaux est le développement de deux biocapteurs capables de détecter les métaux lourds nommés aussi les éléments traces métalliques (ETM), présents dans les milieux hydriques. Certains auteurs définissent les métaux lourds comme éléments métalliques ayant un numéro atomique élevé, en général supérieure à celui du sodium. En d'autres termes tout métal ayant une densité supérieure à 5 et tout métal pouvant être toxique pour les systèmes biologiques.

L'homme qui peut se trouver à tous échelons du cycle de répartition des métaux lourds dans l'environnement, va en absorber par différentes voies et devenir lui-même un réservoir avec des conséquences probables sur sa santé. Les métaux lourds peuvent atteindre l'homme par passage à travers la peau, par ingestion ou par inhalation.

La réglementation française impose le respect d'un certain nombre de normes en matière des rejets de métaux lourds. Pour vérifier que ces normes sont appliquées, il est nécessaire de concevoir des instruments mieux appropriés pour faire des analyses sur sites. Contrairement aux méthodes d'analyse classique, les capteurs offrent des systèmes simples, fiables, rapides et sélectifs.

Dans ce chapitre nous présenterons le développement et l'étude de deux biocapteurs à base d'extraits phénoliques de l'écorce de la grenade.

En effet les polyphénols sont largement présents dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques. Ces composés sont les produits des métabolites secondaires des plantes [1].

Le choix des polyphénols pour la conception de nos biocapteurs se justifie par leur capacité à former des complexes avec les métaux lourds [2]. Beaucoup d'auteurs ont confirmé que l'écorce de la grenade (*Punica granatum L.*) est très riche en polyphénols [3,4,5,6].

Dans la première partie de ce chapitre, on présentera l'ensemble des dispositifs expérimentaux permettant l'étude phytochimique et la caractérisation d'extraits de l'écorce de la grenade par différentes méthodes pour confirmer la présence des composés phénoliques dans ces extraits.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude cinétique et thermodynamique des procédés d'adsorption des métaux lourds sur la surface de nos composés phénoliques. Enfin nous présenterons les protocoles de fabrication de l'élément sensible (biorécepteur), la fonctionnalisation des électrodes et la caractérisation des dispositifs développés. Des analyses dans des milieux réels sont aussi réalisées.

II.I. CARACTERISATION DES MOLECULES BIOACTIVES EXTRAITES DE L'ECORCE DE *PUNICA GRANATUM L.*

Cette partie a été réalisée en 5 étapes :

- Préparation de l'échantillon ;
- Préparation de l'extrait de l'écorce ;
- Testes phytochimiques sur l'extrait ;
- Dosage des composés phénoliques de l'extrait ;
- Caractérisations par CCM, HPLC et FTIR.

II.I.1 Préparation de l'échantillon

La collecte du fruit de *Punica granatum L.* a été effectuée au cours du mois d'octobre 2015. son écorce a été séché, coupé finement puis conservé à l'abri de l'humidité et de la lumière.

II.I.2. Préparation de l'extrait de l'écorce (Macération, évaporation et affrontement)

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériau végétal en contact prolongé avec un solvant, pour extraire les principes actifs.

L'extraction des polyphénols à partir de 10 g de l'écorce se fait avec un solvant acétone/eau (70/30 : V/V) de 100 mL, en trois macérations successives de 24h chacune [7]. Le solvant a été ensuite filtré avec du papier filtre et évaporé à sec dans un évaporateur rotatif. Ce résidu sec est repris dans 300 mL d'eau bouillante. Après une décantation pendant toute une nuit, on récupère la phase limpide dégagée des produits impurs. Pendant cette opération, il a fallu assurer l'obscurité pour éviter l'oxydation des polyphénols.

Un affrontement avec l'éther du pétrole permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques) en particulier les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques.

L'extrait polyphénolique a été conservé au réfrigérateur à 4°C dans un flacon fumé jusqu'à son utilisation pour différentes applications [8].

II.I.3. Tests phytochimiques sur l'extrait

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), les saponines, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les hétérosides cardiotoniques, les huiles essentielles et les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages).

La présence de ces différents groupes est attestée par la formation d'un précipité en utilisant les réactions de précipitation ou le changement de coloration du milieu en utilisant des réactions de coloration.

II.I.3.1. Réaction de caractérisation (Screening phytochimique)

a. Solution à analyser : préparation de l'infusé à 5%

La préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de plante a été effectuée par la méthode d'infusion. On a projeté l'écorce de plante coupée finement dans de l'eau bouillante contenue dans un Erlenmeyer de 250 mL infusées pendant 15 min sous agitation. Les échantillons ont ensuite été filtrés (porosité de filtre : 0.22µm) et les filtrats sont complétés avec 100 mL de l'eau distillée et conservés à 4°C [9].

b. Tests phytochimiques

L'extrait préparé a fait l'objet de quelques tests phytochimiques afin de détecter la présence ou l'absence de certaines familles chimiques. Pour cela, nous avons réalisé sur notre extrait certains tests qualitatifs.

- **Les tanins**

Dans un tube à essai, nous avons introduit 5 mL d'infusé à 5% et ajouté 1 mL de solution aqueuse de FeCl₃ à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration : bleu-noire (tanins galliques), vert-noir (tanins catéchiques), noirâtre (mélange). Ces résultats ne suffisent pas et sont à confirmer par les révélateurs spécifiques [10].

- **Tanins catéchiques**

A 5 mL d'infusé à 5%, nous avons ajouté 5 mL d'HCl concentré. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 15 min puis filtré sur papier filtre. En présence de tannins catéchiques il y a formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamélique [10].

- **Tanins galliques : Réaction de Stiasny**

A 30 mL d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15mL de réactif de Stiasny (10 mL de formol à 40% et 5 mL d'HCl concentré) puis nous avons chauffé au bain marie à 90°C pendant 15 min environ. Après filtration, le filtrat a été saturé par 5 g d'Acétate de sodium pulvérisé. Nous avons ensuite ajouté 1 mL, goutte à goutte, d'une solution de FeCl₃ à 1%. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins gallique.

Nous avons filtré et saturer 10 mL du filtrat d'acétate de sodium en ajoutant quelques gouttes de FeCl₃ à 1%. Le développement d'une teinte bleu-noirâtre indique la présence de tanins gallique non précipité par le réactif de Stiasny [11].

- **Les flavonoïdes**

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mis en évidence par un test simple est rapide appelé « réaction de Shinoda » [12]. Le teste consiste à ajouter à 1 mL de chaque extrait quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et 0,5 g de magnésium métallique. Nous avons laissé agir 3 min tout en faisant attention au changement de couleur. La présence de flavonoïdes est confirmée par la coloration rouge orangée rosée ou rouge violacé [13].

- **Les Anthocyanes**

A l'infusion à 5%, l'extrait a présenté une coloration plus ou moins foncée. Nous avons ajouté un acide (5mL de H₂SO₄ à 10%) puis une base (NH₄OH). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacé en milieu basique, cela permet de conclure la présence d'anthocyanes [10].

II.I.4. Méthodes d'extraction et de dosage des composés phénoliques

L'extraction de principes actifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, est une étape très importante aussi bien dans l'isolement que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements en matière de composés phénoliques de source végétale. La solubilité des ces composés dépend de leur nature chimique dans la plante qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines et tanins. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante [14-16].

Différents auteurs ont mentionné que l'extraction idéale des composés phénoliques à partir de plantes est faite par l'acétone aqueuse à 70% [17,18].

II.I.4.1. Préparation de l'extrait brute Acétonique

Suivant le protocole d'extraction décrit dans la partie II.1.2 nous avons préparé l'extrait brut à doser.

II.I.4.2. Rendement d'extraction

L'extraction des composés phénoliques par le solvant acétone/eau (70/30:V/V) de l'écorce de la plante étudiée nous a permis de déterminer le rendement de leurs extraits bruts en calculant le rapport suivant:

$$\text{Rendement (\%)} = (P1 - P2 / P3) \times 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la poudre végétale de départ.

II.I.4.3. Détermination de la teneur en polyphénols

II.I.4.3.1. Dosage des composés phénoliques totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux a été réalisée par la méthode de Folin- Ciocalteu [19].

En effet le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu, donne un maximum d'absorption à 750 nm [19]. Le taux de composés phénoliques des deux extraits a été estimé par le réactif de Folin- Ciocalteu selon la procédure d'Othman et

al [19] avec quelques modifications. Le mode opératoire est schématisé sur la figure II.1:

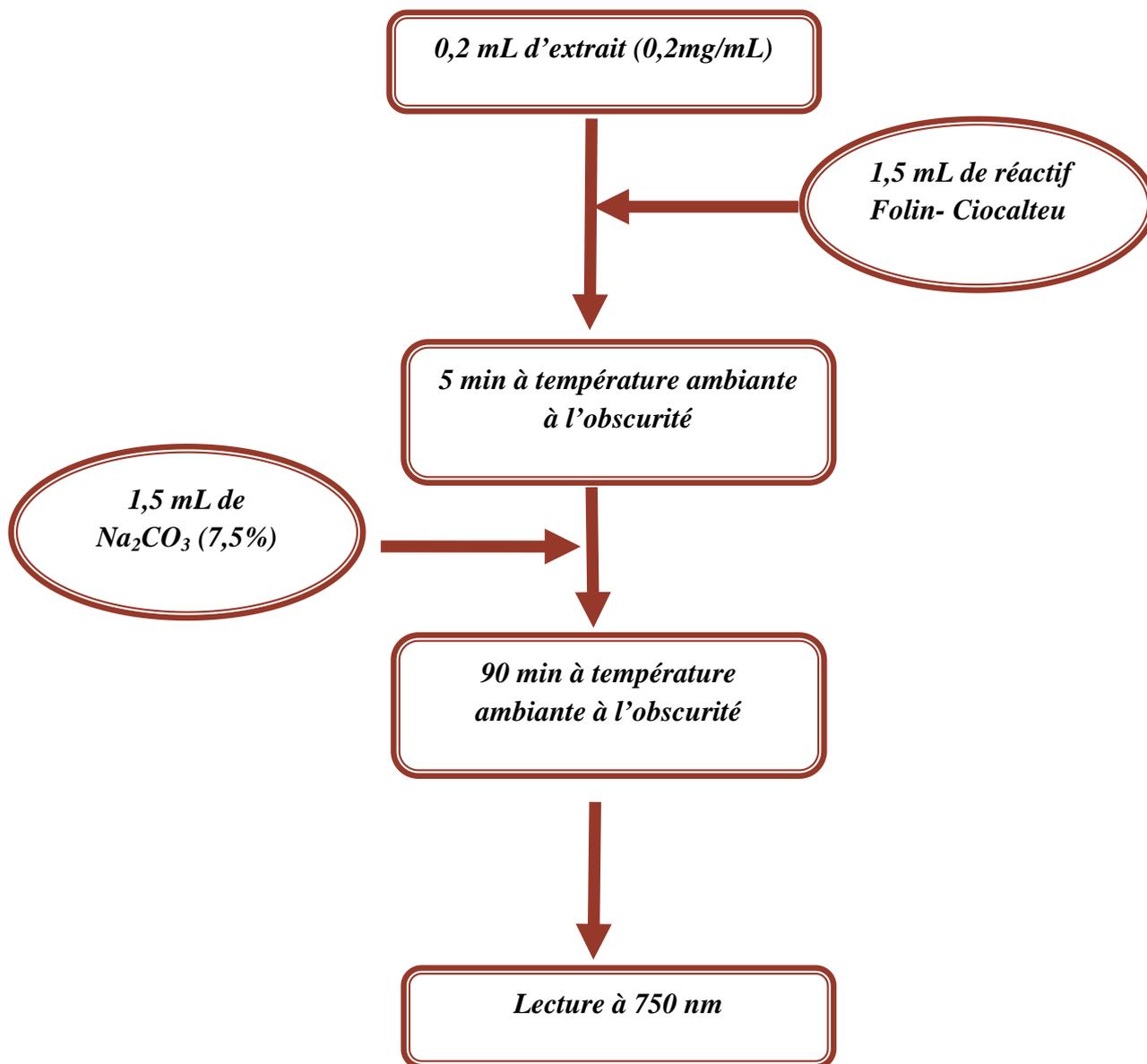


Figure II.1: protocole de dosage des polyphénols totaux.

La teneur moyenne en polyphénols est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait brut (mg éq AG/g EB). Elle a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage linéaire ($y=1,2715x + 0,0941$) (Figure I.1/ annexe) réalisée avec un extrait de référence qui est l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait brut (mg éq AG/g d'extrait brut). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation R^2

= 0,981. La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde $\lambda_{\max} = 750 \text{ nm}$. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I.1 (Annexe).

II.I.4.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont déterminés par la méthode de trichlorure d'aluminium AlCl_3 décrit par Maksilmovié et al [20]. 2 mL de l'extrait (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est ajouté à 1 mL de réactif de trichlorure d'aluminium AlCl_3 (133 mg de chlorure d'aluminium et 400 mg d'acétate de sodium cristalline dans 100 mL d'eau distillée). Après 10 min d'incubation, l'absorbance est observée à 430 nm. Le protocole est présenté dans la figure II.2 :

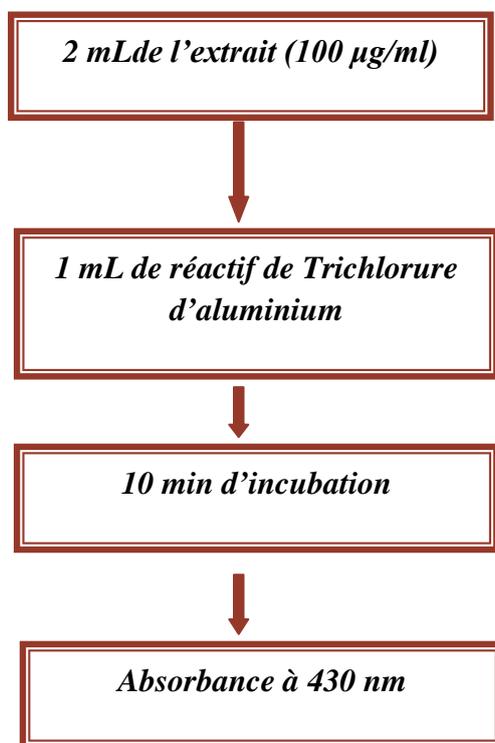


Figure II.2: protocole de dosage des flavonoïdes totaux.

La teneur de flavonoïdes a été calculée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=0,2115 x + 0,0755$) avec $R^2 = 0,9859$, réalisée par une solution étalon (Quercétine) à différentes concentrations en milligrammes équivalent en Quercétine par gramme de l'extrait brut. La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I.2 (Annexe).

II.I.4.3.3. Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de cette dernière à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré. L'absorbance est mesurée à 510 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère. Les quantités des tanins sont estimées en utilisant la méthode décrite par Julkunen-Titto [21] :

Dans un tube à essai, 1 mL de l'extrait acétonique (1mg/mL) est ajouté à 2 mL d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (1 mg / mL), préparée dans un tampon acétate (pH =4,9 ; 0,20 M). Le mélange est agité immédiatement et incubé à 4°C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite centrifugés à 5000 tours / min pendant 20 min. Le surnageant est jeté et le précipité est dissout dans 4 mL de la solution BSA/Triéthanolamine (TEA) (mélanger jusqu'à la dissolution du précipité). Ensuite, on a ajouté au mélange 1 mL de la solution FeCl₃ à 0,01 M dans HCl (0,01 N). Après une incubation de 15 min, la lecture est faite à 510 nm. Le protocole est illustré dans la figure II.3.

La teneur en tanins a été estimée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenu avec l'acide tannique ($y=0,296 x +0,113$) avec $R^2 = 0,9773$. Les concentrations sont exprimées en milligrammes équivalent de l'acide tannique par gramme de l'extrait brut.

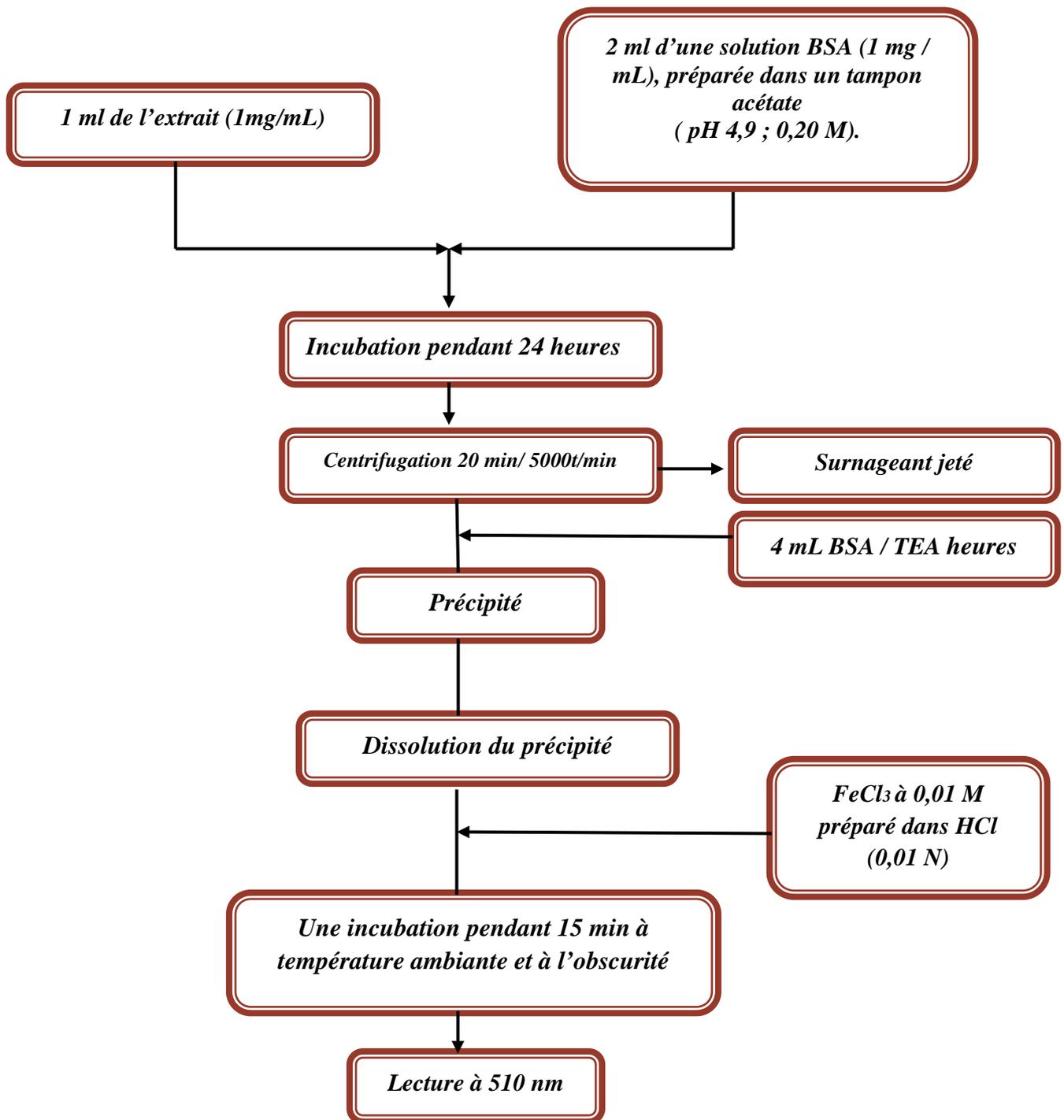


Figure II.3: protocole de dosage des tanins.

II.I.4.3.4. Dosage des tanins condensés

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode à la vanilline en milieu acide [22]. Un volume de 50 μL de l'extrait brut est ajouté à 1500

μL de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/V) ensuite mélangé à l'aide d'un vortex. 750 μL de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc. Le protocole de dosage est illustré comme suit :

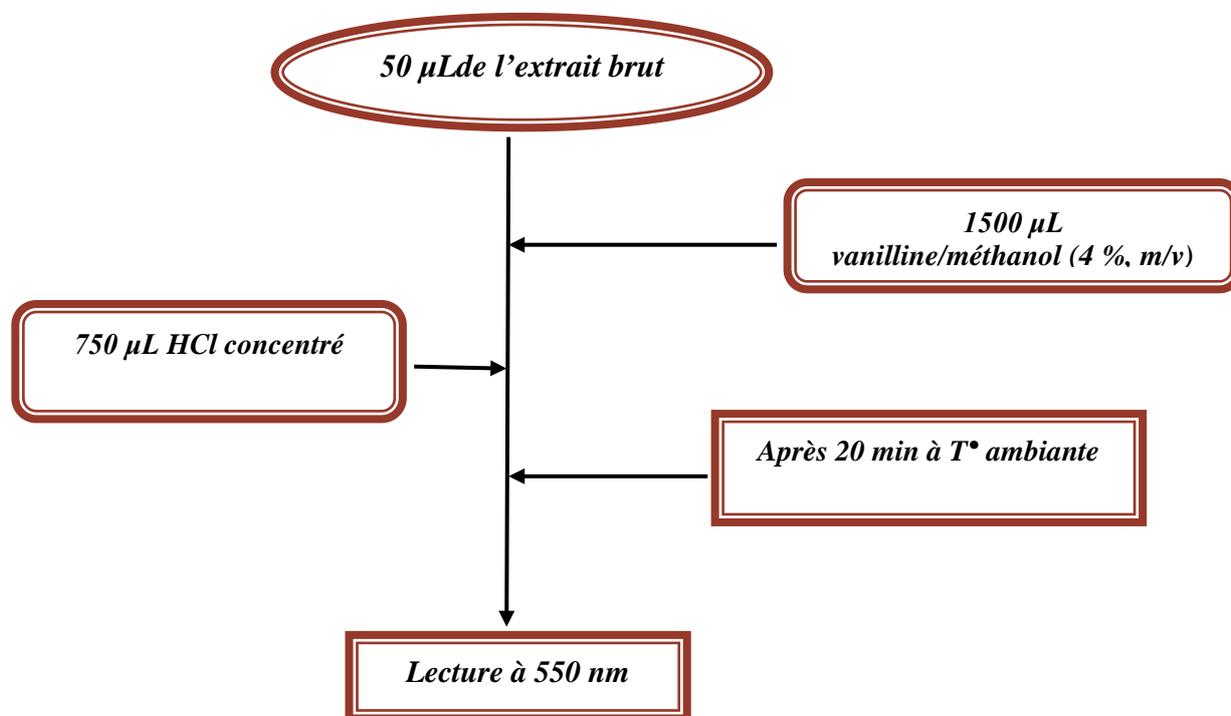


Figure II.4: protocole de dosage des tannins condensés.

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode à la vanilline en milieu acide. Elle est estimée en milligramme équivalents de catéchine par gramme du poids de l'extrait brut (mg éq Ca)/g EB) à partir de la courbe d'étalonnage ($y=1,4377x + 0,1269$) avec $R^2 = 0,9838$ (Annexe).

II.I.4.3.5. Dosage des tanins hydrolysables :

Le principe de ce dosage est basé sur la capacité de l'extrait de l'écorce à réagir avec l'iodure de potassium [23]. On mélange 50 μL de l'extrait avec 3 mL d'iodure de potassium. Après 10 min d'incubation, on fait la lecture de l'absorbance à 550 nm contre un blanc en l'occurrence le méthanol. Le protocole de dosage est illustré comme suit:

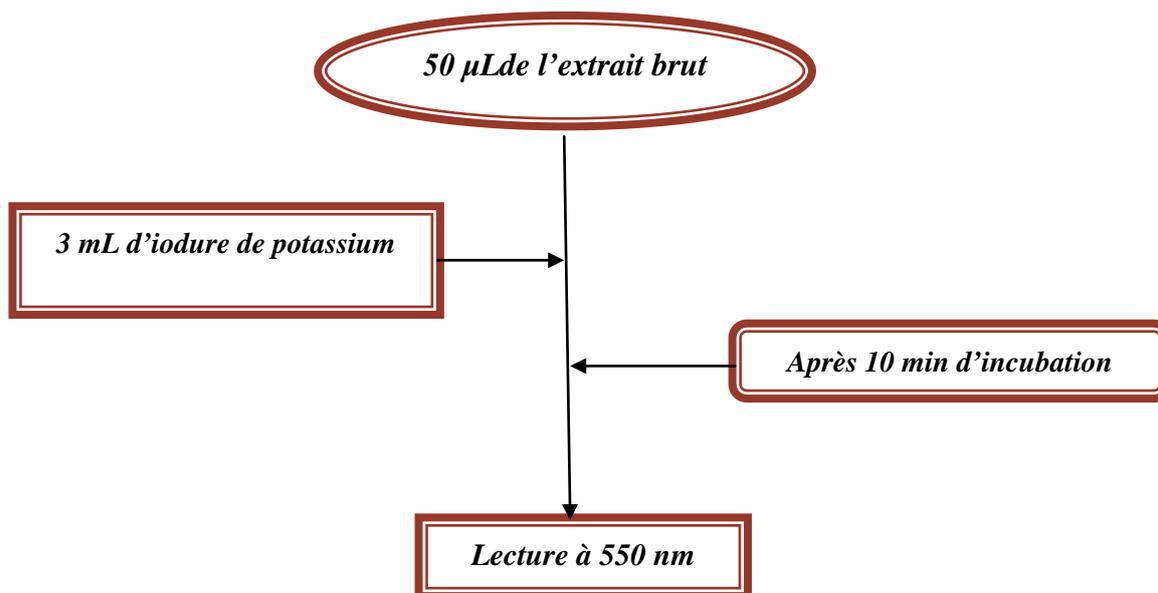


Figure II.5: protocole de dosage des tanins hydrolysables.

Les concentrations sont exprimées en milligrammes équivalent de l'acide tanique par gramme de l'extrait brut (Annexe) en se référant à la courbe d'étalonnage obtenu avec l'acide tanique ($y = 1,1069x + 0,0912$) avec $R^2 = 0,9961$.

II.I.4.4. Extraction par les solvants

II.I.4.4.1. Affrontements : partitions entre solvants

Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire. La phase aqueuse limpide issue des extractions successives est placée dans une ampoule à décanter afin de subir des affrontements successifs par différents solvants. 100 mL de phase aqueuse sont déversés dans une ampoule à décanter à laquelle on a ajouté 100 mL de solvant. Après une agitation énergique et un repos d'une demi-heure, on a observé deux phases : la phase de solvant supérieure et la phase aqueuse inférieure.

L'affrontement avec l'éther du pétrole permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques) surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques. En revanche, l'affrontement avec l'éther diéthylique soutire les tanins monomériques des extraits acétoniques.

Pour entraîner les tannins dimériques des extraits acétoniques on utilise l'affrontement avec l'acétate d'éthyle. Pour les extraits acétoniques et dans le but d'entraîner les tanins trimériques, oligomériques et une partie des tanins polymériques, on utilise l'affrontement avec le butanone (méthyl-éthyl-cétone (MEC)) et le butanol [24].

Pour chaque solvant (chaque partition), on refait deux à trois fois cette opération pour un entraînement optimal des groupes polyphénoliques séparés.

Les phases éther de pétrole ne renfermant pas de composés phénoliques sont rejetées. Quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec avec le rotavapeur et reprises dans du méthanol de 4 à 5 mL pour le diagnostic chromatographique.

Après plusieurs lavages, on a pris aussi 4 à 5 mL des phases aqueuses restantes contenant les flavonoïdes. Le schéma ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des différentes phases [24].

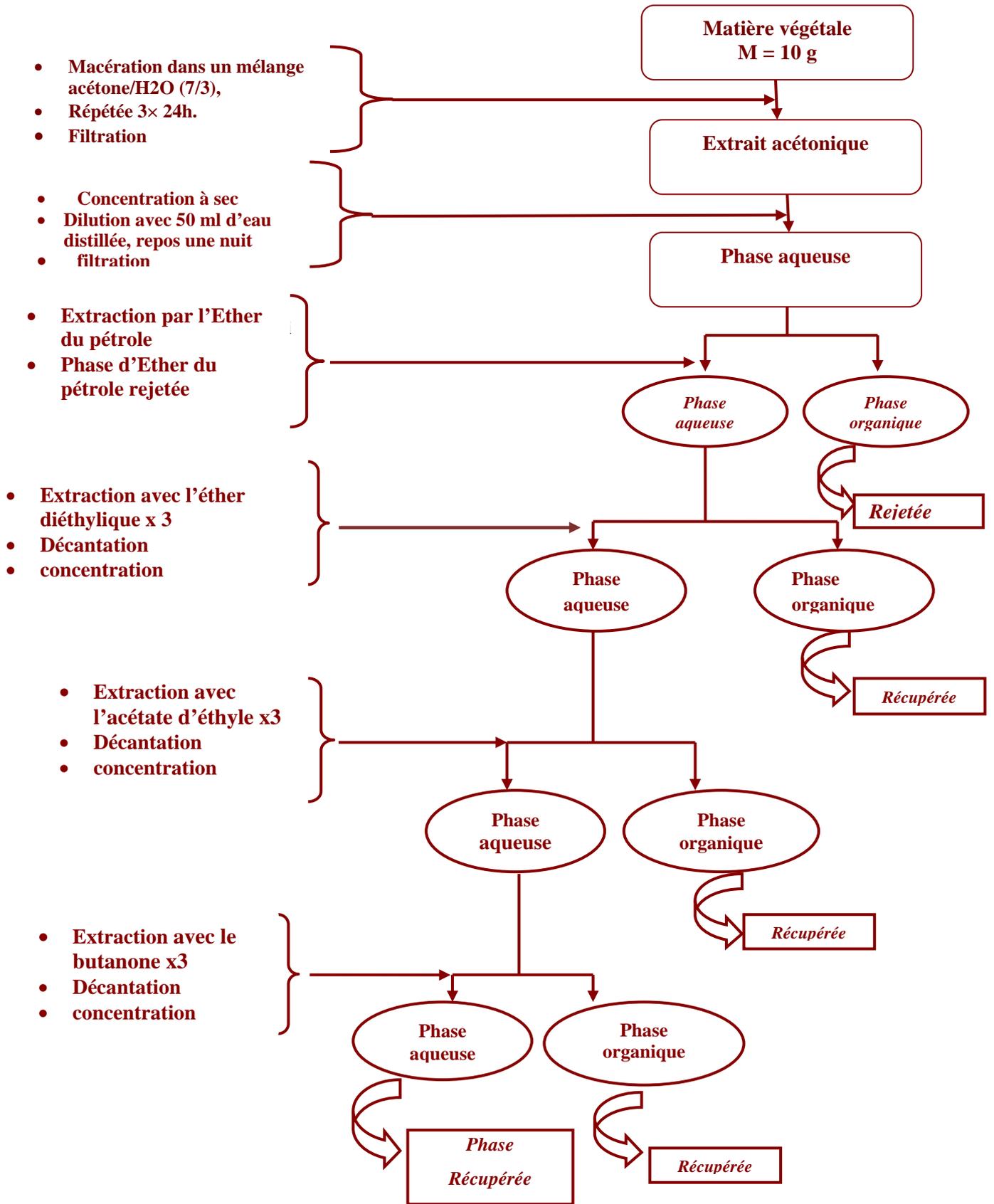


Figure II.6. Protocole d'extraction par affrontement.

II.1.5. Méthodes et techniques d'analyse

II.1.5.1. Chromatographie sur couches minces (C.C.M)

La chromatographie sur couche mince CCM, est une technique de chromatographie dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative). Dans notre cas nous avons fait une CCM analytique dont le but est la détermination de la présence ou l'absence des polyphénols dans les différents extraits de l'écorce du fruit de *Punica granatum.L*. Pour se faire, nous avons procédé de la manière suivante :

- La phase stationnaire : une couche mince gel de silice.
- La phase liquide, dite phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner les composés à se séparer le long de la phase stationnaire.

Cette technique de séparation est basée sur l'utilisation d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire dont la séparation dépend des phénomènes d'adsorption et de partage [25].

II.1.5.1.1. Constitution d'une plaque CCM :

Une plaque CCM est un support en verre, en aluminium ou en plastique sur lequel a été étalée une phase stationnaire en couche uniforme. L'épaisseur de cette couche est de l'ordre de 0,2 mm (200 μm) pour une plaque analytique et 1-3 mm pour une plaque préparative. Avant étalement, la phase stationnaire est une poudre fine et elle doit donc être mélangée à un liant qui assure la bonne cohésion de la couche et une bonne adhérence au support. On utilise le plus fréquemment un liant inorganique comme du gypse, du plâtre, du sulfate de calcium hémihydraté, ou un liant organique (par exemple l'alcool polyvinylique) notamment lorsque la phase stationnaire est hydrophobe.

On ajoute souvent un pigment fluorescent pour permettre une détection des produits à la lumière ultraviolette à 254 nm ou 366 nm ; à cette longueur d'onde, le pigment de la phase stationnaire émet une lumière, verte en général, sauf aux endroits où un produit absorbe le rayonnement UV ce qui provoque l'apparition de taches sombres [25].

II.I.5.1.2. Le rapport frontal :

Le rapport frontal (R_f) ou facteur de rétention d'un composé est le rapport de la distance ligne de dépôt-composé sur la distance ligne de dépôt-front de solvant. Il est compris entre 0 et 1, et est caractéristique du composé, du matériau de la plaque et du système d'éluant [25].

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et la tache du produit A}}{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant B}}$$

II.I.5.1.3 Mode opératoire :

II.I.5.1.3.1. Préparation de la phase stationnaire : La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice de dimension (20 cm x 20 cm).

II.I.5.1.3.2. Préparation de la phase mobile : La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes de solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

II.I.5.1.3.3. Préparation des extraits : les phases aqueuses utilisées pour cette étape sont celles obtenus par affrontements :

- La phase Ether diéthylique ;
- La phase Acétate d'éthyle ;
- La phase Butanone (méthyl-éthyl-cétone (MEC)) ;
- La phase aqueuse (EA) ;
- L'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme témoins.

Les systèmes solvants choisis à partir de la bibliographie sont utilisés comme des éluants des phases stationnaires (gel de silice). Leurs vapeurs doivent saturer l'atmosphère de la cuve. Ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

- Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau (v/v/v) (5/2/1) ;
- Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle (1 / 1) ;
- Acétate d'éthyle/acide acétique/Acide formique/ eau (v/v/v) (100/11/11/27) ;
- Chloroforme/Méthanol/Acide acétique (85/15/3) ;
- Chloroforme/ méthanol/ eau (50/40/10).

5 μL de chaque extrait et de témoin sont déposés et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par un système de révélation physique sous UV à 254 nm et 366 nm avant et après révélation par les réactifs appropriés. Après, on a déterminé pour chaque constituant son rapport frontal.

II.I.5.2. caractérisation par chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode séparative d'adsorption ou de partage où une phase mobile constituée par un mélange de solvants, tamponnée ou non, de force ionique variable, traverse une colonne contenant une phase stationnaire constituée de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux.

Le faible diamètre des particules conduit à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit de séparation adéquat.

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe HPLC-RP-C18 du laboratoire HPLC à l'université de Jijel, équipé des éléments suivants :

- Une colonne (d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse). Cette dernière est constituée de silice modifiée chimiquement par greffage de résidus (C-18). Ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques.
- Un système de pompage, Pompe: LC-20AT, pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars).
- Un injecteur : Varian 9100, pour introduire l'échantillon, dans le système à haute pression
- Un détecteur : Uv-vis
- Un logiciel informatique permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Débit: 0,5 mL/min
- Pression de travail : 100-150 bars
- Volume d'injection: 30 μL

- Longueur d'onde: 254 nm
- Concentration de l'échantillon: 1–5 mg/mL
- Temps d'analyse : 15 min

La phase mobile est de composition constante (mode isocratique). Elle est composée d'un mélange acétate d'éthyle-méthanol-eau (50 : 20: 10 V/V/V). Différentes substances sont identifiées dans nos extraits par comparaison des chromatogrammes des standards avec ceux des échantillons [26].

II.I.5.3. Caractérisation physico- chimiques de l'extrait par infrarouge FTIR

La caractérisation de l'extrait a été réalisée par la spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). L'appareil utilisé est le spectromètre FTIR-84005-SHIMADZU. Les mesures ont été réalisées au Laboratoire MPCA à l'université de Jijel.

II.I.5.3.1.Mode opératoire

Les échantillons ont été préparés en mélangeant intimement une quantité de notre extrait avec le KBr finement broyé. Le mélange a été déposé dans un moule et soumis à une très forte pression hydraulique.

II.I.5.3.1.2 Acquisition des spectres d'absorption FTIR

Le porte-échantillon contenant la pastille est placé dans le compartiment de mesure sur le trajet du faisceau incident. Le signal enregistré par le détecteur du spectrophotomètre prend en compte non seulement l'absorption du rayonnement IR par le produit à étudier, mais aussi par l'air présent dans le compartiment de mesure et éventuellement par le KBr. Le signal collecté est ensuite converti en spectre d'absorption par un traitement mathématique à transformée de Fourier.

II.2. ETUDE DE LA REACTION DE COMPLEXATION DU CUIVRE PAR LE GEL DE POLYPHENOLS

De nombreux travaux de recherche disponibles dans la littérature ont montré que la fixation des polluants métalliques peut être due à l'adsorption à la surface et/ou à l'intérieur du réseau poreux, mais aussi à la complexation ou un échange d'ions. Ces chercheurs trouvent que les mécanismes de fixation sont influencés à la fois par le type d'ion et les groupements fonctionnels des sites actifs. Ainsi, les fonctions carboxyliques sont particulièrement impliquées dans des réactions d'échange d'ions [27].

La structure chimique des polyphénols présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec de nombreuses macromolécules telles que des protéines et des hydrates de carbones, ou encore avec des ions métalliques [28].

Nous avons étudié la réaction de complexation mises en jeu au niveau de l'interface électrode-électrolyte du deuxième biocapteurs. Cette approche englobe une étude cinétique et thermodynamique, une étude d'équilibre d'adsorption avec modélisation des isothermes et enfin une caractérisation physico-chimique de l'extrait acétonique avant et après complexation par la spectrophotométrie infrarouge.

II.2.1. Etude de la Cinétique de complexation

L'étude de la réaction du cuivre avec les polyphénols ainsi que l'influence des différents paramètres a été réalisée en régime statique dans un bain thermostaté dans lequel on plonge des erlenmeyers contenant les mélanges réactionnels (solution du cuivre) (Figure II.7). Le choix du cuivre dans cette étude est justifié par sa grande capacité à former des complexes plus stables à cause de son rayon ionique le plus petit et son électronégativité la plus grande par rapport aux autres métaux.

Les polyphénols sont solubles dans l'eau, par conséquent, il a fallu réaliser un traitement adéquat pour empêcher leur solubilité hydrique. Le traitement en question est une gélification, effectuée comme suit :

Dans un premier temps, on a dissous 5g d'extrait dans 23 mL de NaOH (0.125M) et 30 mL d'eau distillée à 80 C° jusqu'à homogénéisation du mélange. Quelques gouttes de Formaldéhyde (35%) ont été ajoutées. Le mélange est laissé en agitation dans les mêmes conditions opératoires pendant 8 heures.

Une deuxième évaporation a été réalisée en utilisant le même évaporateur pour sécher l'extrait qui est devenu gélatineux. Ce dernier a été lavé successivement avec l'eau distillée et l'acide nitrique pour éliminer les sels [29-31].

Nous avons procédé par la suite à la séparation des deux phases solides et liquides par centrifugation. Les différents échantillons prélevés ont été analysés par spectrométrie d'absorption UV-Visible à la longueur d'onde 600 nm. L'évolution de la concentration au cours de l'analyse a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe).

La quantité de métal retenue par unité de masse d'adsorbant au moment t , q_t (mg / g) et l'efficacité d'élimination du cuivre, R ont été calculées comme suit [32,33] :

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)}{M} \cdot V \dots \dots \dots \text{Eq.II.1.}$$

$$R = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \cdot 100 \dots \dots \dots \text{Eq.II.2.}$$

où C_0 est la concentration initiale du cuivre (mg / L), C_t la concentration du cuivre à l'instant t , V le volume de la solution (L) et M la masse de l'extrait (g) .

Afin d'étudier l'effet de la concentration en Cu^{+2} , nous avons procédé par la préparation de différentes solutions en variant les concentrations du métal : 0.249 ppm, 24.96 ppm et 2496 ppm.

L'effet de la vitesse d'agitation a été réalisé en mélangeant 0.05 g de l'extrait avec des solutions de cuivre de 50 mL. Nous avons ainsi varié la vitesse d'agitation de 50 à 500 rpm dans les conditions opératoires suivantes : $[\text{Cu}^{+2}] = 10^{-4}$ M ; pH= 7 ; Temps = 1 heure ; T_{ambiante} .

Nous avons étudié l'influence de la température avec des solutions de cuivre (50 mL) pour les températures suivantes : 20, 30, 50, 60°C avec $[\text{Cu}^{+2}] = 10^{-4}$ mol/L ; $V_{\text{agitation}} = 200$ rpm ; Temps = 1 heure ; pH = 7.

Le pH a une influence remarquable sur la réaction des cations métalliques dans les solutions aqueuses par complexation car il influe directement sur la charge de la surface et la nature des espèces ioniques. C'est dans cette optique que l'effet du pH sur la cinétique de la rétention a été étudié pour les valeurs : 2, 4, 6 et 8.

L'étude de l'influence de la quantité de l'extrait sur le taux de rétention a conduit à faire varier la masse initiale de l'extrait.

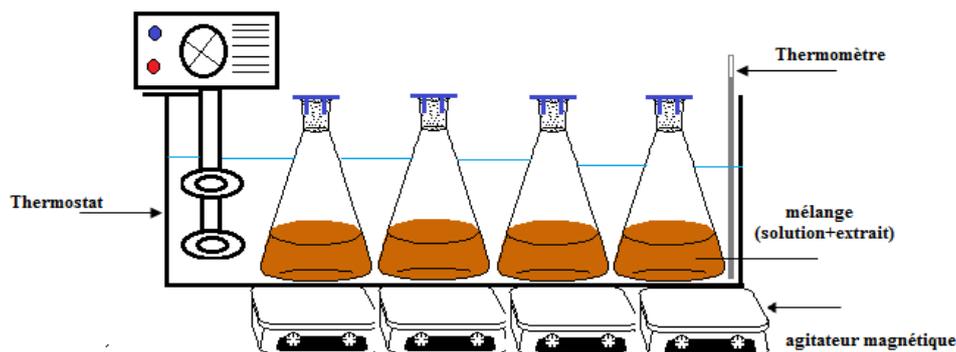


Figure II.7 : Dispositif expérimental de la réaction en régime statique.

II.2.1.1. Etude du mécanisme cinétique de l'adsorption du cuivre

L'ordre de la réaction est un paramètre très important dans la détermination des mécanismes réactionnels. Les ordres concernant l'adsorption sur les biomasses les plus cités dans la littérature sont le modèle du pseudo premier et pseudo deuxième ordre. En effet l'équation du modèle cinétique du *pseudo premier ordre* est de la forme [34]:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 \cdot t \dots \dots \dots \text{Eq.II.3.}$$

Avec q_e , q_t (mg.g^{-1}) représentant respectivement la quantité de soluté adsorbée à l'équilibre et au temps t et k_1 constante cinétique de pseudo premier ordre (min^{-1}).

Le tracé de $\ln(q_e - q_t)$ en fonction du temps pour les concentrations initiales du cuivre égale à 2496, 24,96 et 0.2496 ppm, donne une forme linéaire.

- Les valeurs de K_1 ont été calculées à partir des pentes des différentes droites.
- La constante K_2 a été déterminée à partir de la droite t/q_t en fonction du temps.

L'équation du modèle cinétique de *pseudo second ordre* et de la forme [35]:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \dots \dots \dots \text{Eq.II.4.}$$

A partir de la pente de la droite $\frac{t}{q_t}$ en fonction de t , on peut déterminer la constante de vitesse de pseudo second ordre k_2 ($\text{g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

II.2.1.2.Processus de diffusion

Le transfert d'un soluté d'une phase aqueuse (le cuivre dans notre cas) sur une phase solide suit généralement quatre étapes, pouvant être soit indépendantes les unes des autres, ou simultanées. La première représente la migration du soluté à partir de la phase aqueuse vers la surface du solide. La deuxième représente la diffusion à travers les espaces interparticulaires (diffusion externe). La troisième concerne la diffusion intraparticulaire, et enfin, la réaction

chimique de surface entre les fonctions de surface de l'adsorbant et le cuivre. Il est à noter que la première étape peut être maîtrisée à partir d'une bonne agitation, alors que la dernière est plutôt rapide, ce qui laisse supposer que les processus de diffusion sont les plus susceptibles d'être des étapes limitatives qui contrôlent l'adsorption [36].

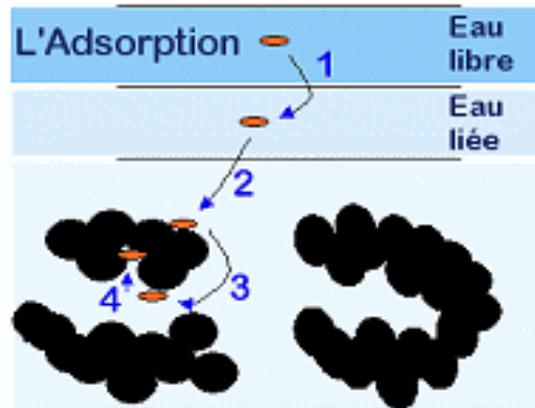


Figure II.8 : Processus de diffusion.

II.2.1.2.1. Application du modèle de diffusion intra-particulaire

Concernant le processus de diffusion des molécules du cuivre dans les pores de l'adsorbant, celui-ci pourrait être étudié simplement par l'équation mathématique de Weber-Morris :

$$q_t = K_{WM} \cdot t^{0.5} + C_b \dots \dots \dots \text{Eq.II.5.}$$

Avec k_{WM} : la constante de la diffusion intra-particulaire en $(\text{mg/g min}^{1/2})$. Elle est déduite de la pente de la partie linéaire de l'équation représentant ce modèle [36].

II.2.2. Etude de l'équilibre d'adsorption

La modélisation des équilibres d'adsorption consiste à décrire les résultats expérimentaux à l'aide d'équations mathématiques théoriques ou semi-empiriques et vise à dégager des paramètres permettant de comparer l'efficacité de différents matériaux.

Les isothermes d'adsorptions sur le cuivre à différentes températures ont été déterminées dans les conditions opératoires suivantes :

pH=2 ; $[\text{Cu}^{+2}] = 10^{-4} \text{ M}$; V=50ml ; $V_{\text{agitation}} = 200 \text{ rpm}$; $M_{\text{adsorbant}} = 0.05 \text{ g}$; t = 1 heure.

II.2.2.1. Modélisation des isothermes d'adsorption

Pour modéliser nos isothermes expérimentales, nous avons testés cinq modèles classiques : Langmuir, Freundlich, Temkin, Elovish et Dubinin-Radushkevich.

II.II.2.2.1.1. Modèle de Langmuir

L'équation de l'isotherme de Langmuir est la suivante [37]:

$$q_e = q_m \cdot \frac{k \cdot c_e}{1 + k \cdot c_e} \dots\dots\dots \text{Eq.II .6.}$$

La linéarisation de l'équation :

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m \cdot k} \left(\frac{1}{c_e} \right) + \frac{1}{q_m} \dots\dots\dots \text{Eq.II.7.}$$

On constate que l'équation II.7 est celle d'une droite de pente $\frac{1}{q_m \cdot k}$; d'ordonnée à l'origine $\frac{1}{q_m}$ permet de déterminer les 2 paramètres d'équilibre de la relation : q_m et k .

q_e : quantité adsorbée à l'équilibre « capacité d'adsorption », en (mg/g) ;

q_m : capacité maximale d'adsorption, en (mg/g) ;

C_e : concentration en adsorbat à l'équilibre en (mg/L) ;

k est la constante d'équilibre de Langmuir ($L \cdot g^{-1}$) ;

II.II.2.2.1.2. Modèle de Freundlich :

Le modèle simple et empirique de Freundlich (1926) est le plus communément utilisé. On considère qu'il s'applique à de nombreux cas notamment dans le cas de l'adsorption en multicouches avec possibles interactions entre les molécules adsorbées [38].

$$q_e = k_f \cdot c_e^{\frac{1}{n_f}} \dots\dots\dots \text{Eq.II.8.}$$

La forme linéaire de l'équation de Freundlich donne :

$$\ln q_e = \ln k_f + \frac{1}{n_f} \ln c_e \dots\dots\dots \text{II.9.}$$

En traçant le graphe $\ln q_e$ en fonction de $\ln c_e$ on obtient une droite dont la pente est $\frac{1}{n_f}$ et l'ordonnée à l'origine $\ln k_f$, d'où on tire les constantes de Freundlich: n_f et k_f

q_e : quantité adsorbée à l'équilibre « capacité d'adsorption », en (mg/g) ;

q_m : capacité maximale d'adsorption, en (mg/g) ;

C_e : concentration en adsorbat à l'équilibre en (mg/l) ;

n_f, k_f : les constantes de Freundlich ;

II.II.2.2.1.3 Modèle d'Elovich

La base de l'hypothèse de Modèle d'Elovich, est que les sites d'adsorption augmentent exponentiellement avec l'adsorption, ce qui implique une adsorption multicouche. Il est exprimé comme par la relation suivante [38]:

$$\frac{q_e}{q_m} = \theta = K_{elov} \cdot C_e \exp\left(-\frac{q_e}{q_m}\right) \dots\dots\dots \text{II.10.}$$

Le tracé de $\ln(C_e/q_e)$ en fonction de q_e permet d'obtenir q_m et K_{elov} selon l'expression suivante:

$$\ln \frac{q_e}{q_m} = \ln(K_{elov} \cdot q_m) - \frac{q_e}{q_m} \dots\dots\dots \text{II.11.}$$

q_e : quantité adsorbée à l'équilibre « capacité d'adsorption », en (mg/g) ;

q_m : capacité maximale d'adsorption, en (mg/g) ;

C_e : concentration en adsorbat à l'équilibre en (mg/l) ;

K_{elov} : constante d'Elovich (L.mg⁻¹) ;

II.II.2.2.1.4 Modèle de Temkin

Temkin se base sur le fait que la chaleur d'adsorption varie linéairement en fonction de Q [40]. La linéarisation du modèle de Temkin donne l'équation suivante [39]:

$$\frac{q_e}{q_m} = \frac{RT}{\Delta Q} \cdot \ln K_0 + \frac{RT}{\Delta Q} \ln C_e \dots\dots\dots \text{Eq.II.12.}$$

Si on trace $q_e = f(\ln C_e)$, on obtient une droite de pente et d'ordonnée à l'origine qui nous permettent le calcul de K_0 et ΔQ .

q_e : quantité adsorbée à l'équilibre « capacité d'adsorption », en (mg/g) ;

q_m : capacité maximale d'adsorption, en (mg/g) ;

C_e : concentration en adsorbat à l'équilibre en (mg/l) ;

K_0 : constante d'équilibre ;

ΔQ : variation de la chaleur d'adsorption (KJ/ mol) ;

R : constante des gaz parfaits ;

II.II.2.2.1.5 Modèle de Dubinin-Redushkevich

L'isotherme de Dubinin-Radushkevich et de la théorie de remplissage des pores qui repose sur le fait que le potentiel d'adsorption est variable et que l'enthalpie libre d'adsorption est reliée au degré de remplissage des pores. Il est donné par l'équation suivante [39]:

$$\ln q_e = \ln q_m - k_{D-B} \varepsilon^2 \dots\dots\dots \text{Eq.II.13.}$$

Où :

q_e : quantité adsorbée à l'équilibre « capacité d'adsorption », en (mg/g) ;

q_m : capacité maximale d'adsorption, en (mg/g) ;

K_{D-B} : constant liée à l'énergie moyenne de l'adsorption ($\text{mg}^2.\text{KJ}^{-2}$) ;

II.2.3 Etude thermodynamique de l'adsorption du cuivre

Le coefficient de distribution K_{ads} peut être calculé pour chaque température à partir de la relation suivante [40] :

$$K_{ads} = \frac{[q(\frac{m}{v})]}{[C_0 - q(\frac{m}{v})]} = C_0 / C_0 - C_e \dots\dots\dots \text{EqII.14.}$$

Nous pouvons écrire :

$$\text{Ln } K_{ads} = - \Delta G^0 / R.T \dots\dots\dots \text{Eq.II.15.}$$

II.2.3.1. Détermination de l'enthalpie ΔH^0 et de l'entropie ΔS^0 d'adsorption

La constante d'équilibre évolue en fonction de la température suivant la relation précédente. Pour les paramètres thermodynamiques : enthalpie (ΔH) et entropie (ΔS) de l'adsorption, on peut les calculés par une simple application de l'équation suivante [40]:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \dots\dots\dots \text{Eq.II.16.}$$

Donc :

$$-R.T.\ln K_{ads} = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \dots\dots\dots \text{Eq.II.17.}$$

$$\ln K_{ads} = -\Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R \dots\dots\dots \text{Eq.II.18.}$$

$$\ln K_{ads} = -(\Delta H^0 / R) 1/T + \Delta S^0 / R \dots\dots\dots \text{Eq.II.19.}$$

II.3. DEVELOPPEMENT DES BIOCAPTEURS

Dans cette partie nous présenterons en premier lieu l'élaboration d'un biocapteur à base des extraits phénoliques de l'écorce de la grenade dont l'élément sensible du capteur (biorécepteur) a été préparé en diluant l'extrait de l'écorce mélangé avec le PVC (polychlorure de vinyle) dans le Tetra-hydrofurane (THF). Il y a un intérêt dans l'utilisation des films polymérisés en tant que couche insoluble dans les solvants puisque le polymère jouera le rôle d'une matrice. En effet le polychlorure de vinyle (PVC) est un polymère polaire isolant. Ce dernier possède une permittivité relative et un indice de pertes diélectriques élevé [41], c'est dans ce contexte que l'élément sensible du deuxième capteur a été préparé et déposé sans polymère. La partie sensible du second capteur développé est déposée sous forme de gel pour éviter tout décollement ou détérioration.

II.3.1. Le transducteur

Nous avons utilisés des transducteurs en or d'épaisseur 300 nm. Ces électrodes sont fournies par le laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Toulouse, France. Une couche de résine est déposée sur la surface d'or afin de la protéger durant la découpe et le stockage. La surface active de ces électrodes lorsqu'elles sont fixées grâce à un joint torique sur la cellule électrochimique est de l'ordre de 0.19 cm^2 .

II.3.1.2. Nettoyage de la surface des électrodes :

Le premier nettoyage consiste à enlever la couche de résine déposée sur la surface des électrodes. L'électrode est mise ensuite dans un bac à ultrasons pendant 10 minutes puis séchée sous flux d'azote (N_2). Une attaque par une solution piranha (3 mL de H_2O_2 , 7 mL de H_2SO_4) pendant une minute est réalisée afin d'activer la surface. Ce nettoyage est très exothermique.

Les électrodes sont rincées à l'eau ultrapure puis à l'éthanol et séchées sous un flux d'azote [42].

II.3.2. Fonctionnalisation des électrodes

II.3.2.1. Elaboration du biocapteur à base de membrane polymérique:

La membrane est préparée en diluant l'extrait naturel avec le PVC dans le Tetrahydrofurane (THF) et le DOP. Une quantité de 15 μL de la mixture est déposée par "spin-coating" à 2000 rpm sur la surface de l'électrode préalablement nettoyée et activée. La surface est ensuite séchée à l'air libre pendant 15 heures [43].

Toutes les manipulations électrochimiques sont réalisées dans l'électrolyte support PBS à 5 mM et pH 7.

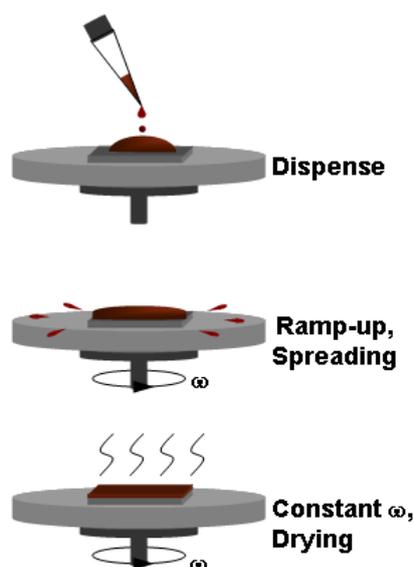


Figure II. 9 : Méthode de dépôt des membranes « spin-coating »

II.3.2.2. Elaboration du biocapteur à base de gel:

L'intérêt de l'élaboration de ce biocapteur est de fonctionnaliser l'électrode avec l'extrait sans polymère et faire une étude comparative entre les deux capteurs. Une quantité de 15 μL de l'extrait sous forme de gel est déposée par "spin-coating" à 2000 rpm sur la surface de l'électrode. La surface est ensuite séchée à l'air libre pendant 15 heures.

Toutes les manipulations électrochimiques sont réalisées dans l'électrolyte support PBS à 50 mM et pH égale à 2.

II.3.3. Caractérisation structurale et morphologique

II.3.3.1. Comparaison par spectroscopie IR entre l'extrait avant et après complexation par le cuivre, le nickel, le plomb et le cadmium

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la comparaison des bandes IR des échantillons de l'extrait avant et après la fixation des métaux étudiés. Elle permet ainsi d'identifier la nature des sites actifs et les éventuels déplacements chimiques suite aux différentes réactions analyte/polyphénols.

II.3.3.2. Etude morphologique de la membrane polymérique par microscopie à force atomique AFM

Nous avons étudié par imagerie AFM (microscopie à force atomique) la morphologie de la membrane polymérique déposée sur une surface en or.

Le microscope à force atomique (AFM pour atomic force microscope) est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Ce type de microscopie repose essentiellement sur l'analyse d'un objet point par point au moyen d'un balayage via une sonde locale, assimilable à une pointe effilée. Ce mode d'observation permet alors, de réaliser la cartographie locale des grandeurs physiques.

Le microscope à force atomique permet donc de balayer la surface d'un échantillon grâce à une pointe en silicium de forme rectangulaire très fine (MikroMasch NSC18/A1BS, fréquence de résonance 75 kHz) est fonctionnalisée par l'octadecyltrichlorosilane (OTS) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$; 387.94 g/mol; Aldrich Chemical Co.) pour éviter l'adhérence entre cette dernière et le substrat. Elle est positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible permettant son déplacement dans toutes les directions de l'espace grâce à un tube piézoélectrique. Toutes les images sont réalisées en mode tapping.

La caractérisation morphologique est réalisée à l'air ambiant dans une enceinte de température à une humidité relative autour de 30%. Les images sont traitées et analysées à l'aide du logiciel WSxM v4.0 de Nanotec Electrónica, (Espagne).

La pointe dont il est question ci-dessus, mesure environ 4mm et se trouve fixée à un petit levier élastique (env. 0,2 mm) le «Cantilever» et est déplacée au-dessus de la surface à observer. Ce «Cantilever» possède au dessus de la pointe une petite surface réfléchissante qui sert à dévier un rayon laser de façon telle que même une flèche infime soit détectée à l'aide

d'une photodiode à quatre quadrants. Grâce à ce dispositif la distance (d) entre la pointe et la surface peut être mesurée.

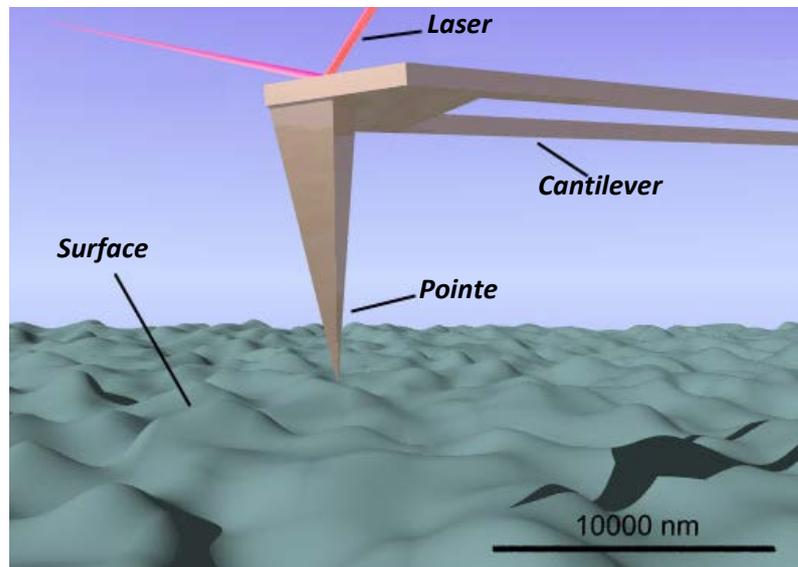


Figure II.10 : schéma d'une caractérisation morphologique par Microscopie à Force Atomique

Pour maintenir la distance (d) constamment dans le domaine nanométrique, il faut un entraînement de très haute précision, capable de déplacer la pointe dans le domaine mentionné. Un montage en régulation se charge du bon fonctionnement, c'est-à-dire du maintien constant de la distance (d). Pour un premier ajustement, il faut encore un entraînement micrométrique motorisé. La pointe palpe la surface à examiner point par point et ligne par ligne, si bien qu'une image de la surface mesurée peut être établie dans le domaine micrométrique. Un ordinateur traite les données et représente la surface à l'écran, sous forme d'une image en couleurs fausses, laquelle, selon les besoins, sera traitée plus avant. Les différentes hauteurs sont représentées par des luminosités différentes. La couleur la plus lumineuse représente une hauteur plus élevée.

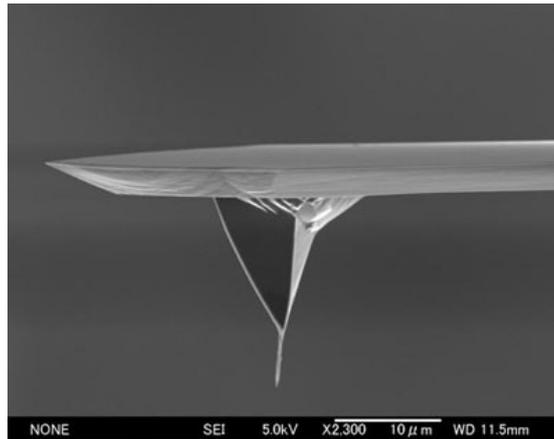


Figure II. 11: Image par microscopie électronique à balayage d'une pointe AFM

II.3.4. Mesures électrochimiques

Les mesures d'impédance, de voltamétrie cyclique et de voltamétrie à onde carrée ont été effectuées dans une cellule en plexiglas, à trois électrodes : Une électrode de travail en or fonctionnalisée par la membrane ;

Une électrode de référence au calomel saturé dont le potentiel est connu et constant qui permet de contrôler l'électrode de travail ;

Une électrode auxiliaire en platine appelée contre-électrode qui permet de boucler le circuit électrique dans la cellule électrochimique.

Cette cellule est conçue de façon à maintenir une distance fixe entre les trois électrodes.

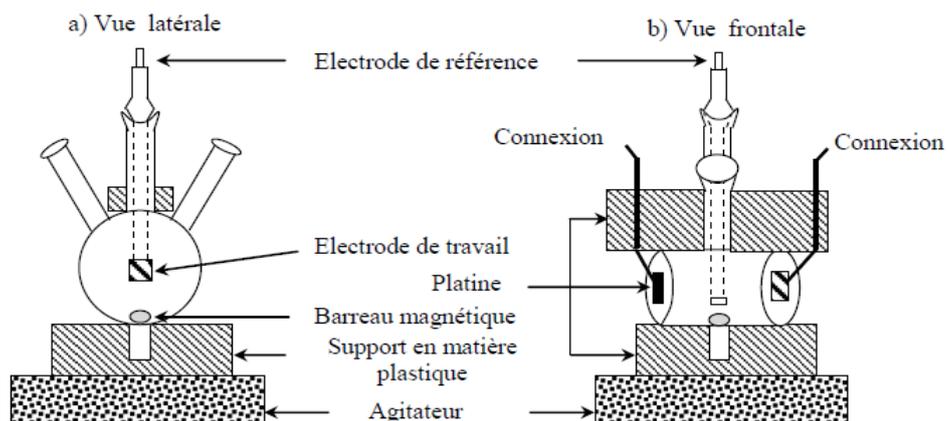


Figure II.12 : La cellule électrochimique

II.3.4.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique

Le potentiel de polarisation est choisi de façon à obtenir un courant très faible dans la cellule. Techniquement, pour que l'électrode de référence conserve un potentiel constant, son impédance d'entrée doit être très grande ($>10^7\Omega$). Le passage du courant dans la cellule se fait donc à travers la contre électrode. Celle-ci a souvent une surface très importante par rapport à celle de l'électrode de travail (au minimum deux fois plus grand) et donc son impédance peut être négligée dans le calcul de l'impédance totale de la cellule.

Pour satisfaire la condition de linéarité de la réponse du système électrochimique étudié, il faut que l'amplitude de la tension perturbatrice (DE) soit assez faible (pour toutes les expériences une valeur de 10 mV a été choisie) dans l'électrolyte support PBS (Le tampon phosphate salin) 5mM.

II.3.4.1.1. Instrumentation :



Figure II.13 : Dispositif de mesure électrochimique.

Toutes les mesures électrochimiques ont été conduites en utilisant l'analyseur d'impédance "Voltalab 40" de Radiomètre Instrument Analytiques S.A. PCZ 301, piloté par un logiciel. Il permet d'appliquer une tension alternative d'amplitude -200mV et d'effectuer un balayage dans la gamme de fréquences comprises entre 100 mHz et 100 kHz. Cet appareil permet aussi de fixer la tension de polarisation de la structure à zéro volt.

La cellule électrochimique est placée dans une cage de Faraday afin de minimiser l'interférence des ondes électromagnétique.

II.3.4.2. La voltamétrie cyclique :

Les mesures de voltamétrie cycliques sont réalisées dans la cellule à trois électrodes décrite précédemment. Pour la réalisation de ces mesures, nous avons utilisé 1mL d'une solution de ferri-ferrocyanure dans le PBS (0,1M, pH 7.2). Nous avons travaillé dans une gamme de potentiel allant de -700 à 700 mV et une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

II.3.4.3. La voltamétrie à ondes carrées :

Les mesures de voltammétrie à onde carrée sont réalisées dans la même cellule dans une gamme de potentiel de -1200 à 1200 mV dans l'électrolyte support PBS à 50 mM.

Références bibliographiques :

[1]: C.Lacoste, M.C.Basso, A.Pizzi, A Celzard, M-P-Laborie; Industrial Crops and products; 73(2015) 41-48.

[2]: O. Verhe; Food chemistry; 98(2006) 23-31.

[3]: G .S, B.Viana, S. Myalhaer, S. Menezes, Luciana N. Cordeiro, FJA. Matos; Bioactive Foods in Promoting Health (2010) 457-459-478.

[4]: L. He, H. Xu, X. Liu, W. He, F. Yuan, Z. Hou, Y. X. Gao; Food Research International; 44(2011) 1161-1167.

[5]: H.Saad, F.Charrier Elbouhtoury, A. Pizzi, K .Rode, B .Charrier, N .Ayed,; Industrial Crops and Products; 40(2012) 239-246.

[6]: Lansky, E.P, Newman R.A; journal of Ethnopharm; 109(2007)177-206.

[7]: M. N. Mailoa, M. Mahendradatta, A. Laga, N. Djide ISSN, chemistry food, 2(2013)2277- 8616.

[8]: J.J. Vargas-Magaña, J.F.J. Torres-Acosta, A.J. Aguilar-Caballero, C.A. Sandoval-Castro, H. Hoste, J.I. Chan-Pérez; chemistry food, 206(2014) 322-327.

[9]: S. Cleach ; Gestion & Marketing ; Université de Rennes 1 ; UFR SVE ; 2015.

[10]: R. Paris; H. Moyse; Paris et Moyse : Précis de matière médicale .édition Print book; 1965.

[11] : N. Rhazi, H. Hannache, M. Oumam, A. Sesbou, B.Charrier, A. Pizzi, F. Charrier-El Bouhtoury Arabian Journal of Chemistry ; 2015.

[12] : S. BV, D. Senthil Kumar GP; Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, ISSN: 0975-8585.

[13]: N R. Krishnaswamy; A labortory handbook; universities Press; india; 2003.

[14] : C. Bonnaille, M. Salacs, E. Vassiliova et I. Saykova ; Revue de génie industriel ; 7(2012) ISSN 1313-8871.

[15]: S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić and S. Tomas; Food Sciences; 28 (2010) 206-212.

[16]: E. Koffi, T. Sea, Y. Dodehe and S. Soro; Journal of Animal & Plant Sciences; 5. (2010) 550-558.

[17]: M. N. Mailoa, M. Mahendradatta, A. Laga, N. Djide ; ISSN; chemistry food, 2(2013) 2277-8616.

- [18]: J.J. Vargas-Magaña, J.F.J. Torres-Acosta, A.J. Aguilar-Caballero, C.A. Sandoval-Castro, H. Hoste, J.I. Chan-Pérez; *chemistry food*, 206(2014) 322-327.
- [19]: Ribereau-Gayon P., Glories Y., France *Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, 2nd Edition.
- [20]: Ricco R. A; Wagner M. L., Gurni A. Á; *Dinámica de polifenoles de Cedrón (Aloysia citrodora Palau-Verbenaceae-) en relation al desarrollo foliar*; *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*; 2011.
- [21]: Julkunen-Tiitto Riitta; *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2 (1985) 213–217
- [22]: Hagerman Ann E; *Food chemistry*, 50(2002) 1785-1790.
- [23]: Frutos P., Hervás G., Giráldez F. J. et Mantecón A. R., 2004 ; *Spanish Journal of Agricultural Research*; 2(2004) 191-202.
- [24]: F. Beddou ; thèse de doctorat ; Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen Algérie ; 2015.
- [25]: J. Sherma, B. Fried ; *Handbook of thin layer chromatography* ; Third edition; Marcell Dekker; USA; 2005.
- [26]: D.Tang, X.Zheng, X.Chen; *Journal of Pharmaceutical Analysis*; 4(2014)96-106.
- [28]: Chapitre 8, Les tanins pharmacognosie, faculté de pharmacie de Monastir-DCPE1, 2013-2014.
- [29]: G. Amaral-Labat; thèse de doctorat; université de Lorraine; 2013.
- [30]: G. Palmaa, J. Freerb, Jaime Baezab ; *Water Research* 37 (2003) 4974–4980 .
- [31]: I. Ayhan S, Engil, Mahmut Ozacar;; *Hazardous Materials* 166 (2009) 1488–1494.
- [32]: Z; Zhou, F; Liu, Yong Huang, Z; Wang, G; Li; *International Journal of Biological Macromolecules*; 77 (2015) 336–343.
- [33]: M. Maria Rahman, N. Akter, M. R. Karim, N. Ahmad, M. M. Rahman, I.A. Siddiquey, N. M. Bahadur, M.A. Hasnat ; *Environmental Chemical Engineering* 2 (2014) 76–83.
- [34]: G; Song, X; Zhu, R; Chen, Q; Liao, Y; Ding, L; Chen ; *Chemical Engineering Journal*; 283(2016) 175–183.
- [35]: Y.S Ho, G; McKay ; *Conservation and Recycling* ; 25(1999) 171–193.
- [36]: V. Fierro, V. Torné-Fernández, D. Montané, A. Celzard ; *Microporous and Mesoporous Materials*; 111(2008) 276–284.
- [37]: H; Chung, W; Kim, J; Park, J; Cho, T; Jeong, P; Park ; *Industrial and Engineering Chemistry Volume 28*(2015) 241–246.
- [39]: I. G. Coronilla, L. M. Barrera, E. C. Urbina ; *Environmental Management* ; 152(2015) 99–108.

- [39]: I. D. Mall, V. C. Srivastava, N. K. Agarwal ; Dyes and Pigments; 69(2006) 210–223.
- [40]: R; Shan, L; Yan , K. Yang, Y. Hao, Bin Du ; Hazardous Materials; 299 (2015) 99–108.
- [41]: Boutamine Meriem; thèse de doctorat ; université de Constantine ; 2014.
- [42] : C. Dernane , A. Zazoua , I. Kazane , N. Jaffrezic-Renault ; Materials Science and Engineering; 33 (2013) 3638–3643.
- [43]: S. Zougar , K. Morakchi , A. Zazoua , S. Saad , R. Kherrat , N. Jaffrezic-Renault; Materials Science and Engineering; 28 (2008) 1020–1023.

Chapitre III

Résultats et discussions

Sommaire

Introduction.....	91
III.I. Caractérisation de molécules bioactives extraites de l'écorce de <i>Punica Granatum L.</i>	91
III.1.1. Rendement d'extraction.....	91
III.1.2 Screening phytochimique.....	92
III.1. 3. Détermination de la teneur en polyphénols.....	93
III.1. 4 Analyse chromatographique sur couche mince CCM.....	93
III.1. 5 Chromatographie liquide à haute performance.....	95
III.1.6. Caractérisation physico- chimiques de l'extrait par FTIR.....	97
III.2. Etude du mécanisme réactionnel du cuivre (II) avec les polyphénols.....	99
III.2.1. Etude cinétique.....	101
III.2.1.1. Effet de la concentration initiale du cuivre et du temps d'équilibre.....	101
III.2.1.2. Effet de la vitesse d'agitation.....	102
III.2.1.3. Effet de la température de la solution.....	102
III.2.1.4.Effet du pH de la solution.....	103
III.2.1.5. Effet de la quantité de l'adsorbant.....	104
III.2.2.Etude du mécanisme cinétique de l'adsorption du cuivre.....	105
III.2.2.1.Modèle du pseudo premier et pseudo deuxième ordre.....	105
III.2.2.2. Etude du processus de diffusion.....	106
III.2.3. Etude de l'équilibre d'adsorption.....	107
III.2.3.1.Etablissement des isothermes d'adsorption.....	107
III.2.3.2. Modélisation des isothermes d'adsorption.....	108
III.2.4. Etude thermodynamique.....	109
III.2.4.1. Détermination de l'enthalpie ΔH^0 et de l'entropie ΔS^0 d'adsorption.....	110

III.3. Construction des biocapteurs.....	111
III.3.1 Construction du capteur à base de membrane polymérique (Capteur I).....	111
III.3.1.1 Caractérisation morphologique par AFM.....	111
III.3.1.2 Caractérisation électrochimique.....	112
III.3.1.3 Etude de la sélectivité du capteur I.....	119
III.3.1.4 Temps de réponse.....	120
III.3.2. Construction du capteur à base du gel (Capteur II).....	121
III.3.2.1 Caractérisation structurale par FTIR.....	121
III.3.2.2 Caractérisation électrochimique.....	122
III.3.2.3 Etude de la sélectivité du capteur II.....	130
III.3.2.4 Temps de réponse du capteur II.....	130
III.3.2.5 Comparaison entre la sensibilité des deux capteurs par SWV.....	131
III.3.3 Performance du dispositif II dans le milieu réel.....	132
III.3.3.1 Etude qualitative.....	132
III.3.3.2 Etude quantitative (Concentration des métaux lourds).....	133
Conclusion.....	135
Références bibliographiques.....	136

Chapitre III

Résultats et discussions

Ce chapitre s'articule autour de trois parties dans lesquelles les résultats seront d'abord présentés puis discutés. La première partie est une étude phytochimique avec caractérisation de l'extrait étudié pour réaliser nos biorécepteurs. Le mécanisme réactionnel entre les polyphénols de l'écorce de la grenade et le cuivre sera étudié dans la deuxième partie de ce chapitre. Ces polyphénols seront utilisés pour développer deux capteurs utilisés dans la détection et la quantification des métaux lourds dans les milieux hydriques. L'ensemble de ces résultats conduira à préciser l'utilité de nouvelles méthodes pour l'amélioration des performances des biocapteurs de métaux lourds.

III.1. CARACTERISATION DE MOLECULES

BIOACTIVES EXTRAITES DE L'ECORCE DE *PUNICA*

GRANATUM L.

III.1.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des composés phénoliques dans l'extrait est reporté sur le tableau III.1. Chaque essai a été répété trois fois. Ainsi, chaque valeur dans ce tableau est une moyenne.

Tableau III.1 : Le rendement d'extraction.

Masse de ballon avec l'extrait (g)	Masse de ballon Vide (g)	Masse végétale de départ (g)	Rendement %
289,5	275,5	10	14 %

Il ressort à travers l'observation des résultats d'extraction du tableau III.1 que l'acétone donne un rendement d'extraction de l'ordre de 14 %. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Mahmoudi S et al sur *Cynara scolymus L.* En revanche, ils sont inférieurs à ceux trouvés par Ozsoy et al. sur *Smilax excelsa* [1, 2].

III.1.2 Screening phytochimique

Le résultat de criblage phytochimique est résumé dans le Tableau III.2. Il révèle la présence ou l'absence des groupes de métabolite secondaire.

Tableau III.2 : Métabolites secondaires mis en évidence au niveau de l'écorce de la grenade. : (+) : Présence faible (++) : Présence moyenne (+++) : Présence forte (-) : Absence.

Espèce étudié Famille chimique recherché	Ecorce de « <i>punica granatum l</i> »
Polyphénols totaux	+++
Flavonoïdes	+
Anthocyanes	-
Tannins	+++
Tannins condensés	+
Tannins galliques réaction de Stiasny après filtration	+
Tannins gallique (coloration)	+++

On constate d'après ces résultats que l'extrait étudié est riche en polyphénols, flavonoïdes ainsi qu'en tanins hydrolysables et peu de tanins condensés. En revanche, on remarque l'absence des anthocyanes. La présence de ces métabolites a été observé par test colorimétrique avec des proportions variables. Les tanins sont présents en quantité importante avec une coloration bleu noire révélant l'existence des tanins galliques et des flavonoïdes.

III.1. 3. Détermination de la teneur en polyphénols

Le tableau III.3 représente les résultats du dosage des polyphénols dans l'échantillon analysé.

Tableau III.3 : Dosage des composés phénoliques.

- (a) mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg éq AG/g d'extrait) ;
 (b) mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mg éq Q/g d'extrait) ;
 (c) mg d'équivalent de l'acide tannique par g d'extrait (mg éq AT/g d'extrait) ;
 (d) mg d'équivalent de catéchine par g d'extrait (mg éq Ca/g d'extrait).

Extrait	Polyphénols totaux (a)	Flavonoïdes totaux (b)	Tanins totaux (c)	Tanins condensés (d)	Tanins Hydrolysable (d)
Ecorce de <i>Punica Granatum l</i>	1829,5 ± 8,011	588 ± 5,96	805 ± 4,04	85,91 ± 2,06	597,25 ± 0,57

Ces résultats montrent que l'extrait est riche en polyphénols avec une teneur de 1829,25 ± 8,011 mg éq AG/g EB. Ils sont confirmés par l'étude réalisée par Scalbert et al qui révèle l'existence des stérols, des flavonoïdes, des triterpènes, des phénols et de 25 % de tanins dans des extraits ethanologiques de l'écorce de la grenade [3]. De même et selon Ranade et al, les écorces de la grenade de l'Inde sont très riche en tanins et flavonoïdes [4]. Ces résultats sont aussi supérieurs à ceux trouvés par d'autres études qui ont montré que la quantité en polyphénols totaux dans l'écorce de la grenade est de 274, 298.0 et 290.1 mg éq AG /g EB, respectivement [5,6,7].

D'après la littérature, la différence perçue dans la quantité de polyphénols serait expliquée par plusieurs facteurs. En effet des études réalisées ont montré que les facteurs tels que la géographie, le climat, le type des plantes étudiés, les facteurs génétiques et également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [8,9].

III.1. 4 Analyse chromatographique sur couche mince CCM

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de notre extrait, on a utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM), qui est une méthode simple de séparation. Nous avons utilisé plusieurs systèmes d'élution de polarité différente.

Suivant la révélation des plaques CCM, les spots ont été visualisés sous une lampe UV à deux longueurs d'ondes 254 et 366 nm. La première longueur d'onde a révélé les taches non fluorescentes et visible. La seconde, des tâches fluorescentes. Après migration, nous avons

remarqué uniquement un seul système, l'acétate d'éthyle/Méthanol/Eau (v/v/v) (5/2/1), qui génère une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots. Ces résultats sont résumés dans le tableau III.4 représentant les rapports frontaux des constituants chimiques, leur comportement à la lumière UV (254 nm et 366 nm) et leur coloration après révélation.

Tableau III.4: Résultats de la CCM analytique.

Système de solvant	Les phases	Nombre de tache	R _f	Couleur de taches
Acétate d'éthyle /Méthanol/ Eau 5V/2V/1V	Ether d'éthyle	3	0.861 0.287 0.038	Jaune clair Jaune Jaune foncé
	Acétate d'éthyle	5	0.939 0.917 0.895 0.458 0.116	Marron clair Marron Jaune clair Jaune Marron jaune
	H ₂ O	3	0.668 0.541 0.386	Jaune clair Marron foncé Jaune vert
	Butanone (MEC)	5	0.994 0.950 0.933 0.911 0.320	Jaune clair Jaune Marron clair Marron foncé Jaune vert
	L'acide gallique	1	0.23	-
	La quercétine	1	0.86	-

La majorité des spots apparaissant à 254 nm sont sombres. A l'œil nu, les spots apparaissent en jaune et en marron. Tout ce nombre de couleurs variés constitue une indication sur la présence de plusieurs types de substances chimiques (composés polyphénoliques). Selon Bruneton, la révélation sous UV à 254 nm pourrait indiquer la présence des coumarines, des stérols ou des terpènes. La couleur jaune intense peut représenter les flavonoïdes [10]. Par calcul des rapports frontaux et leur comparaison avec ceux des témoins, on a pu identifier quelques composés présents dans l'extrait. A l'aide des témoins utilisés, nous avons confirmé la présence d'un acide phénolique et d'un flavonoïde. Le résultat de la CCM a été obtenu après la migration des extraits sur la plaque de silice. Les tâches formées par les extraits de l'écorce du fruit ont le même niveau de migration que celui

formé par l'acide gallique et la quercétine, ce qui indique la présence de ces derniers. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Fournier et al, qui ont montré la présence des polyphénols dans l'écorce du fruit de *Punica granatum.L* [11].

Les valeurs de Rf du contenu phénolique ainsi que les taches observées sont représentées dans le Tableau III.4. Ces valeurs montrent clairement que la quasi-totalité des composés phénoliques présents dans les extraits bruts de la grenade sont épuisés par les solvants organiques au cours du fractionnement et réparties dans la fraction acétate d'éthyle et/ou butanolique.

Notons que la présence de certaines tâches qui ne correspondent pas aux témoins revient à d'autres métabolites secondaires.

III.1. 5 Chromatographie liquide à haute performance

La phase mobile est composée d'un mélange acétate d'éthyle-méthanol-eau (50 : 20: 10 V/V/V).

Les extraits analysés sont ceux obtenus par affrontements :

- La phase Ether diéthylique ;
- La phase Acétate d'éthyle ;
- La phase Butanone (méthyl-éthyl-cétone (MEC) ;
- La phase aqueuse (EA).

La quercétine, l'acide gallique, l'acide tanique ont été utilisées comme témoins dans l'analyse chromatographique. Le tableau II.5 montre le temps de rétention pour chaque témoin utilisé relevé à partir des chromatogrammes.

Tableau III.5 : Temps de rétention des témoins utilisés en HPLC.

Témoins	Temps de rétention
L'acide gallique	2,283 min
L'acide tanique	2,241 min
La quercetine	2,325min 4,050 min

Les chromatogrammes des témoins sont représentés dans les Figures I.6, I.7 et I.8 respectivement (Annexe), alors que les profils chromatographiques des extraits sont représentés dans le Figure III.1.

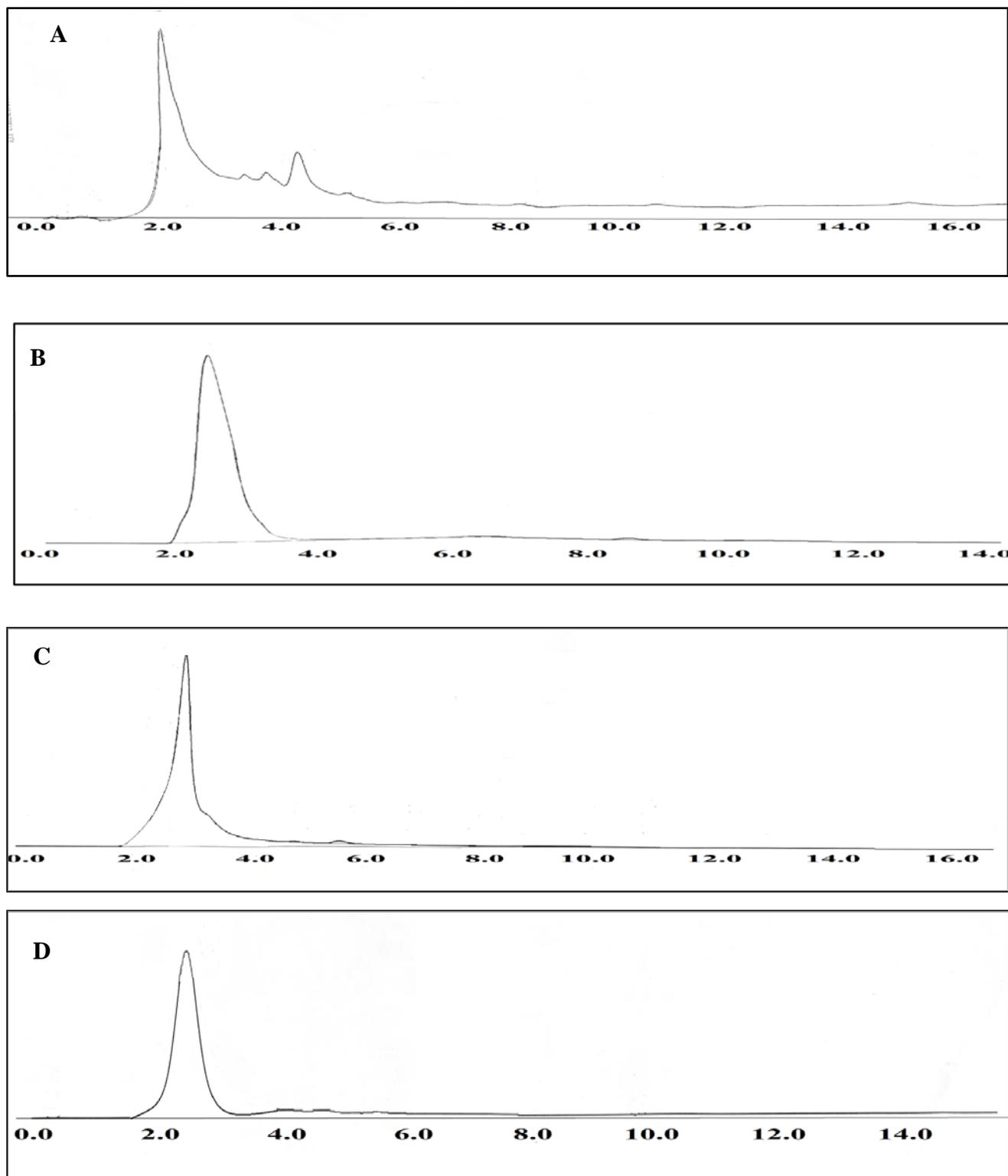


Figure III.1 : Chromatogramme HPLC des extraits étudiés.
A : Phase Ether diéthylique ; B : Phase acétate d'éthyle ; C :Phase butnone ; D : Phase aqueuse.

Après comparaison des temps de rétention des extraits avec ceux des témoins, trois composés phénoliques ont été identifiés à savoir : l'acide tannique dans la phase éther diéthylique et la phase d'eau, l'acide gallique dans les phases acétate d'éthyle et butanone et la quercétine dans la phase éther diéthylique.

En comparant nos résultats avec la littérature, l'analyse HPLC réalisée par Singh et al, a montré que l'extrait éthanolique des écorces de grenade contient des composés mineurs mais principalement des composés phénoliques majeurs que sont l'acide gallique, l'acide ellagique et les ellagitanins. Ces derniers sont représentés essentiellement par les punicalagins [12].

III.1.6. Caractérisation physico- chimiques de l'extrait par FTIR

Le spectre d'analyse par infrarouge de l'extrait est représenté sur la figure III.2. Il présente plusieurs zones qui comprennent un très grand nombre de bandes [13]:

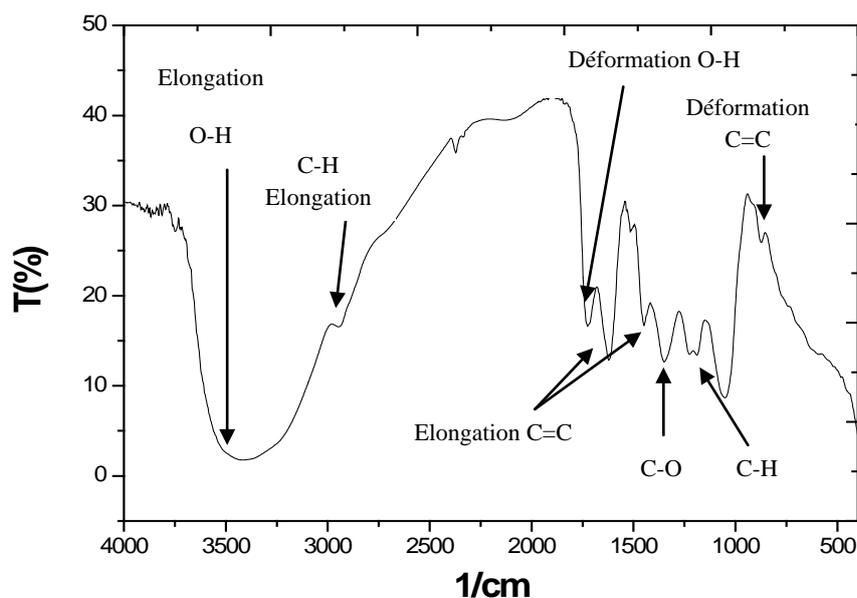


Figure III.2 : Spectre FTIR de l'extrait.

- Elongation O-H : pont d'hydrogène intermoléculaire entre $3600-3000\text{ cm}^{-1}$;
- Elongation C-H aromatique entre $3000-2000\text{ cm}^{-1}$;
- Déformation angulaire O-H dans le plan $1800-1600\text{ cm}^{-1}$;
- Elongation C=C du cycle entre $1600-1400\text{ cm}^{-1}$;
- Elongation C-O entre $1400-1200\text{ cm}^{-1}$;
- Déformation angulaire dans le plan C-H entre $1200-1000\text{ cm}^{-1}$;
- Déformation angulaire hors du plan C=C du cycle entre $900-800\text{ cm}^{-1}$.

Ces résultats nous indiquent les bandes caractéristiques des principaux groupements fonctionnels de la molécule phénol, retrouvés sur le spectre infrarouge. Ces groupements sont C=C du cycle et C-H aromatiques.

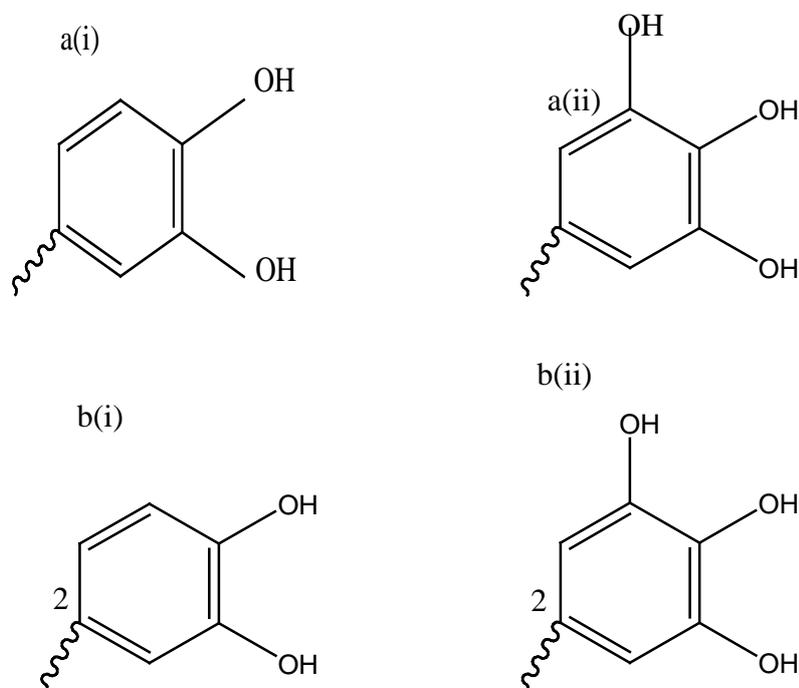


Figure III.3 : unités de base des polyphénols.

a(i) : Cathecol group_ion échange ;a(ii) :Pyrogallol group-ion échange ;

b(i):Cathecol group-complexation;b(ii): Pyrogallol group-complexation. [14].

III.2. ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL DU CUIVRE

(II) AVEC LES POLYPHENOLS

La complexation de surface concerne principalement les associations entre les métaux et les composés organiques ou, plus rarement, entre deux composés organiques. Pour beaucoup de molécules, la complexation consiste en un remplacement de deux atomes d'hydrogène émanant des groupes hydroxyles (-OH), par un cation métallique bivalent.

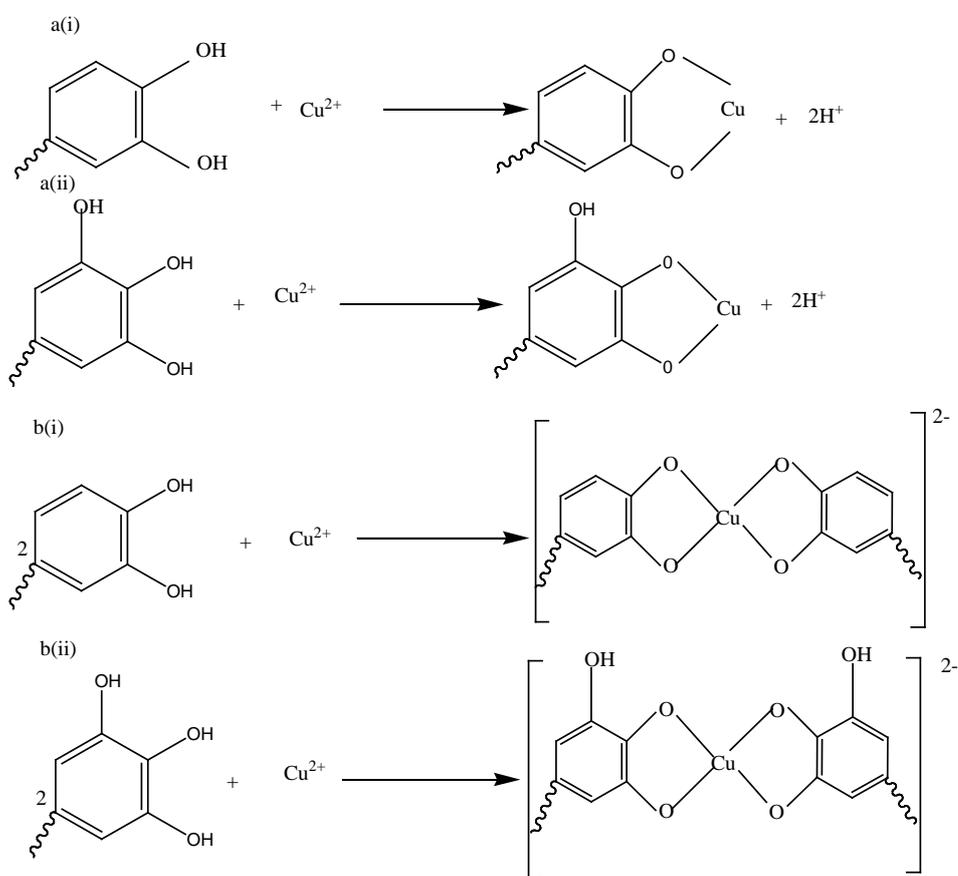


Figure III. 4: le mécanisme réactionnel de fixation du cuivre.

a(i) : Cathécol group-ion échange ;a(ii) :Pyrogallol group-ion échange ;

b(i):Cathécol group-complexation;b(ii): Pyrogallol group-complexation. [14].

En raison de la similitude avec de nombreuses réactions mettant en jeu des surfaces solides qui font intervenir des fonctions (-OH), les réactions de surface sont souvent analysées

à l'aide de la théorie de la complexation, appelée "complexation de surface". Il existe deux grands types de réactions de complexation :

1. L'échange d'ions en sphère externe où les complexes de sphère externe mettent en jeu des interactions électrostatiques, qui peuvent être intégralement décrites par la charge et le rayon des ions impliqués [15]. En effet lors de la complexation électrostatique l'existence au moins d'une molécule d'eau s'interpose entre le groupement fonctionnel de surface et la molécule ou l'ion auquel il est lié ; elle est assimilable à la physisorption [16].
2. L'échange d'ions en sphère interne qui dépend des caractéristiques de l'adsorbant (texture, chimie de surface) et aussi des propriétés de l'adsorbat (type de polluant, structure, polarité) et des paramètres de la solution (pH, température, concentration). Cependant elle est fortement dépendante du pH qui est relié à l'hydrolyse des ions métalliques (avec libération d'ions hydroniums). Ce phénomène correspond à la formation d'une liaison électrostatique forte entre le cation et la surface solide.

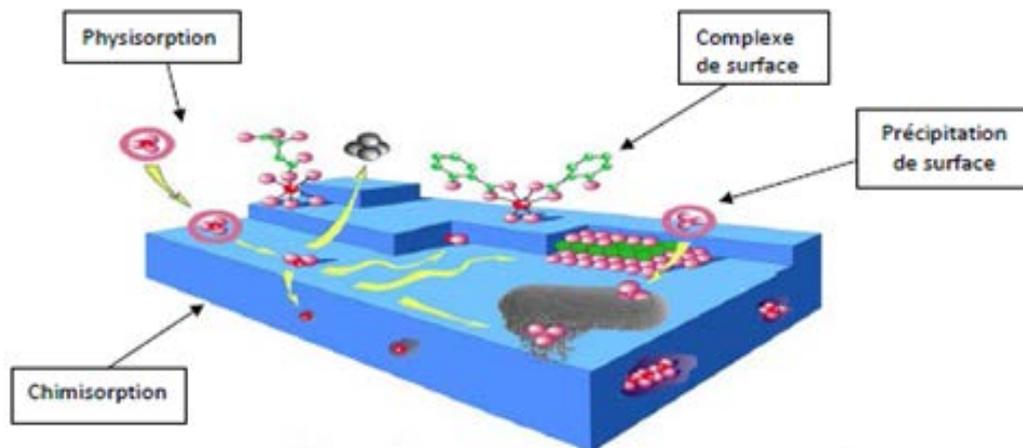


Figure III.5 : Différents modes de rétention d'un élément métallique par un solide [17].

Selon le pH de la solution et l'affinité de la surface pour les protons, les fonctions -OH peuvent jouer le rôle de base, en retenant un proton présent en solution pour donner $2H^+$, ou un acide en libérant un proton donnant ainsi $-O^-$. Par ailleurs, les fonctions -OH peuvent aussi échanger leur H^+ contre un autre cation et former ainsi une liaison du type $=O-Me^{n+}$. Ce type de complexe peut comprendre une liaison chimique covalente entre un atome de la surface et un cation métallique [54].



Les phénomènes de complexation faisant intervenir les métaux sont gouvernés par un ensemble de paramètres physico-chimiques. Ceux-ci modifient la spéciation des métaux, c'est à dire ils influent sur la répartition des différentes formes chimiques métalliques, mais agissent également sur l'assimilation par les biosorbants. Parmi ces paramètres, on peut citer le pH, le potentiel d'oxydoréduction et bien sûr la quantité de ligands disponible (aussi appelée capacité complexante).

III.2.1. Etude cinétique

III.2.1.1. Effet de la concentration initiale du cuivre et du temps d'équilibre

L'étude de la réaction du cuivre avec les polyphénols a été réalisée dans un bain thermostaté dans lequel on plonge des erlenmeyers contenant des solutions du cuivre mélangées avec l'extrait polyphénolique.

Nous avons constaté que le pH du surnageant a diminué de 6.76 à 6.12. Ce phénomène peut être expliqué par la libération des ions H^+ à partir des sites adjacents des polyphénols. En effet, d'après le mécanisme réactionnel de la figure III.4, on remarque que les polyphénols contenant six carbones aromatiques liés à un ou plusieurs groupements hydroxyle forment des complexes stables avec le cuivre et libèrent des ions H^+ [18].

La courbe obtenue (Figure III.6) représentant la cinétique d'adsorption, a la forme typique d'une courbe de saturation caractérisée par une forte adsorption des premières minutes (5 minutes). Après 20 minutes, l'équilibre est atteint et le cuivre est adsorbé à 41% pour la concentration 2496 ppm, 60% pour 24.96 ppm et 63% pour 0.249 ppm.

On remarque qu'à de faible concentration, le rendement de rétention du cuivre est élevé. Ceci peut être expliqué par le fait que le rapport entre les sites actifs de la surface et les ions du cuivre totaux dans la solution sont élevés, et donc tous les ions du cuivre peuvent être retenus par l'adsorbant et par conséquent, ils seront éliminés totalement de la solution. Par contre pour les concentrations élevées, les sites actifs de l'adsorbant sont saturés donc une quantité des ions restent libres en solution.

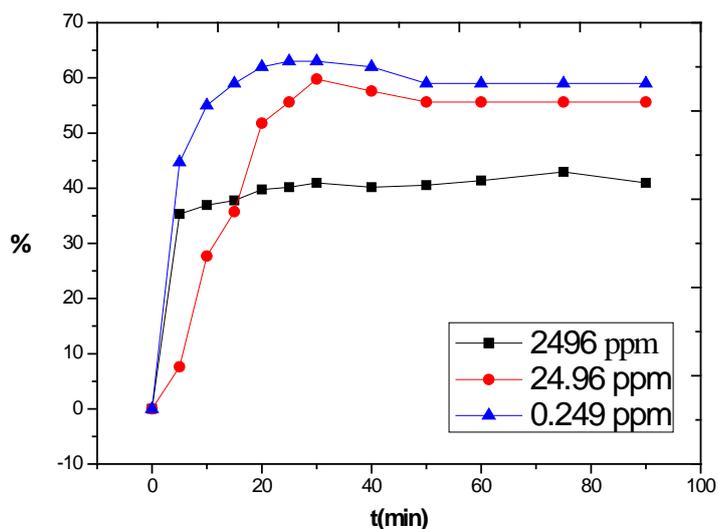


Figure III.6: Effet de la concentration initial du cuivre et du temps d'équilibre; $V = 50\text{ml}$; $V_{\text{agitation}} = 200\text{ rpm}$; $\text{pH} = 6.76$; $T = 20^{\circ}\text{C}$.

III.2.1.2. Effet de la vitesse d'agitation

D'après les résultats obtenus sur le tableau III.6, nous avons constaté que l'effet de la vitesse d'agitation a peu d'influence sur la capacité de rétention du Cu (II). Néanmoins, notre choix sera fixé sur la valeur 200 rpm.

Tableau III.6: Effet de la vitesse d'agitation sur l'adsorption du cuivre.

$V_{\text{agitation}}(\text{rpm})$	50	200	400	500
%	50.35	59.8	51.8	55.6

III.2.1.3. Effet de la température de la solution

D'après les résultats obtenus, on constate que l'augmentation de la température de la solution pendant le procédé a peu d'influence sur le taux d'adsorption du cuivre (Tableau III.7).

Tableau III.7: Effet de la température de la solution $[Cu^{+2}] = 10^{-4}$ mol/l ; $V = 50$ ml ; $V_{agitation} = 200$ rpm ; Temps=1heure ; pH=7.

Température (°C)	20	30	50	60
%	68.9	73	58.04	56.3

III.2.1.4.Effet du pH de la solution

La figure III.7 représente l'effet du pH sur la réaction du cuivre avec les polyphénols. D'après la courbe, la capacité d'adsorption du cuivre est au maximum à pH=2.

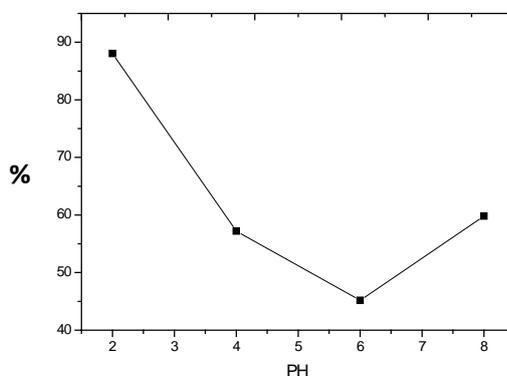


Figure III.7: Effet du pH à $[Cu^{+2}] = 10^{-4}$ mol/l ; $V = 50$ ml ; $V_{agitation} = 200$ rpm ; Temps=1heure ; $T = 20^{\circ}C$.

En effet le cuivre est généralement plus soluble et plus mobile à pH acide. Il se trouve sous forme d'ion libre. Alors qu'une augmentation progressive du pH (concentrations en ions hydroxyles) provoque la formation des complexes métalliques hydroxyles dans l'ordre suivant : Cu^{+2} , $CuOH^{+}$, $Cu(OH)_2$, $Cu(OH)_3^{-}$, $Cu(OH)_4^{-2}$ ce qui empêche la complexation du métal étudié [19].

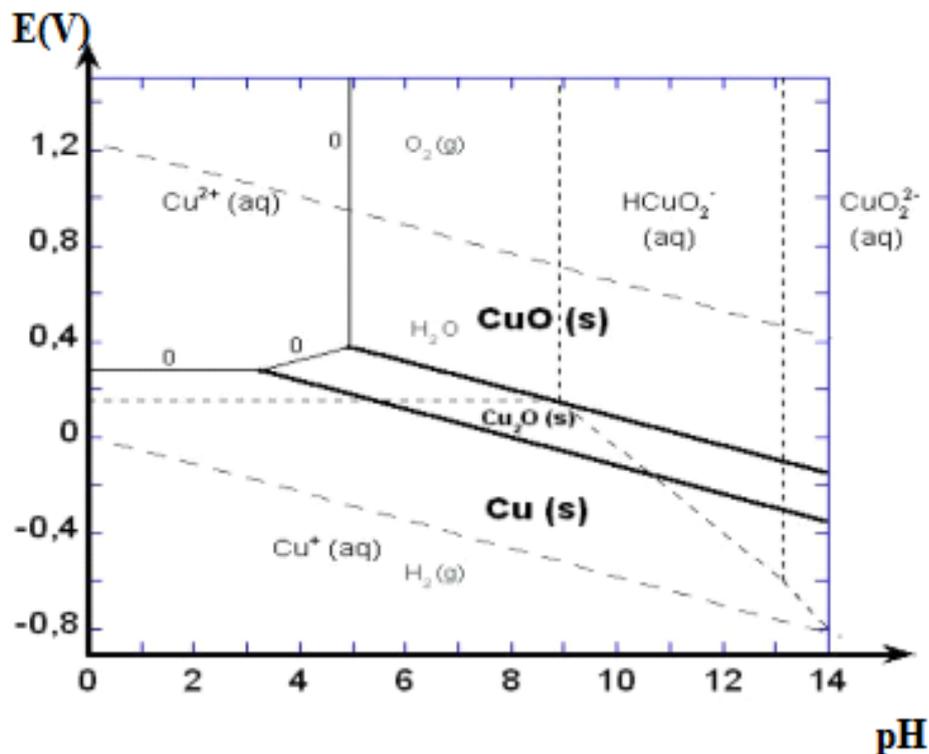


Figure III.8: diagramme de spéciation du cuivre en fonction du pH.

III.2.1.5. Effet de la quantité d'adsorbant

La figure III.9 représente l'effet de la quantité d'adsorbant sur la capacité de rétention du cuivre par les polyphénols.

Nous avons constaté et confirmé que l'augmentation de la masse de l'adsorbant, augmente le rendement d'adsorption. Le pourcentage de rétention augmente jusqu'à 94% pour une masse d'adsorbant égale à 0.07g.

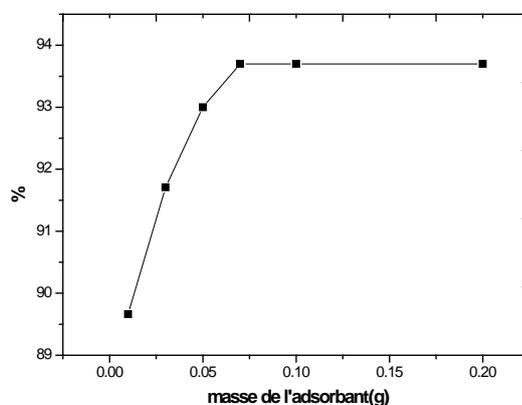


Figure III.9: Effet de la quantité de l'adsorbant à $[Cu^{+2}] = 10^{-4}$ mol/l ; pH = 2. $V_{d'agitation} = 200$ rpm ; Temps = 1 heure ; $T = 20^{\circ}C$.

III.2.2. Etude du mécanisme cinétique de l'adsorption du cuivre

III.2.2.1. Modèle du pseudo premier et pseudo deuxième ordre

Les résultats expérimentaux à différentes concentrations initiales du cuivre sont reportés sur la figure (III.10) pour le modèle du pseudo premier ordre et sur la figure (III.11) pour le modèle du pseudo deuxième ordre :

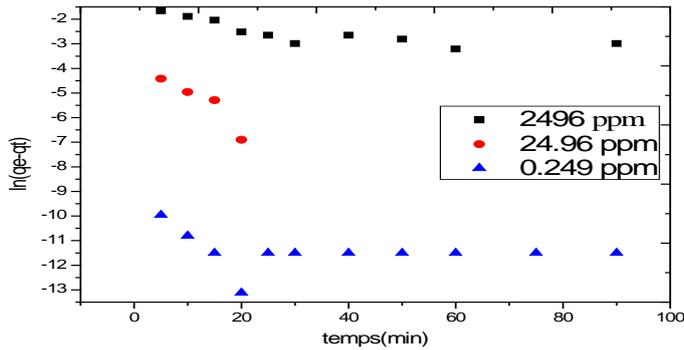


Figure III.10: Cinétique du pseudo premier ordre.

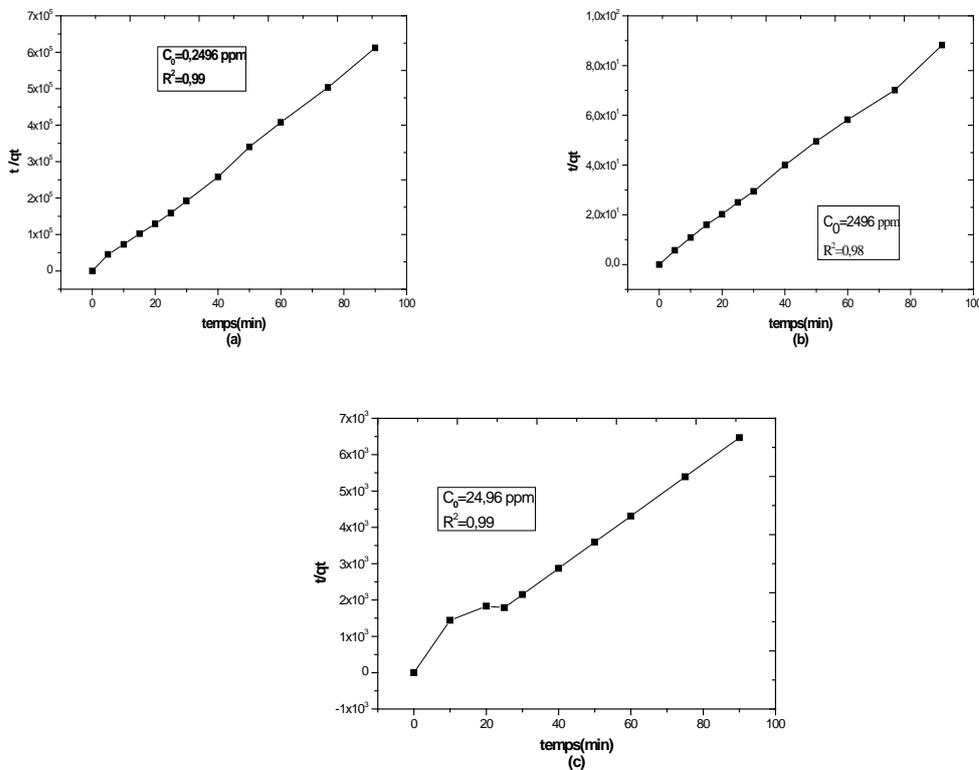


Figure III.11 : Cinétique du pseudo deuxième ordre ; (a) : $C_0 = 0,2496$ ppm, (b) : $C_0 = 2496$ ppm, (c) : $C_0 = 24,96$ ppm

Les valeurs des paramètres caractéristiques pour chaque modèle sont regroupées dans le tableau (III.8) :

Tableau III.8 : Paramètres caractérisant la cinétique d'adsorption.

C ₀ (ppm)	q _{e,exp} (mg/g)	Pseudo premier ordre			Pseudo deuxième ordre			
		k ₁ (min ⁻¹)	q _{e,cal} (mg/g)	R ²	k ₂ (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	q _{e,cal} (mg/g)	R ²	Δ q _e
0.249	1.57 10 ⁻⁴	0.015	0.135	0.57	6.03	1.4 10 ⁻⁴	0.99	0.17 10 ⁻⁴
24.96	0,0139	0.0054	0.0132	-	19.13	0.014	0.98	0.0001
2496	1,02	0.155	0.0317	0.82	0.9	1.05	0.99	0.03

Les résultats indiquant que les valeurs du coefficient de corrélation (R²) pour le modèle du pseudo deuxième ordre est plus proche à 1 par rapport à ceux du modèle du pseudo premier ordre. De plus la valeur Δq_e montre que le modèle du pseudo deuxième ordre donne une meilleure description de la cinétique d'adsorption par rapport au modèle du pseudo premier ordre par rapport à l'adsorbant.

III.2.2.2. Etude du processus de diffusion

III.2.2.2.1. Application du modèle de diffusion intra-particulaire

La figure III.12 représente le processus de diffusion intra-particulaire :

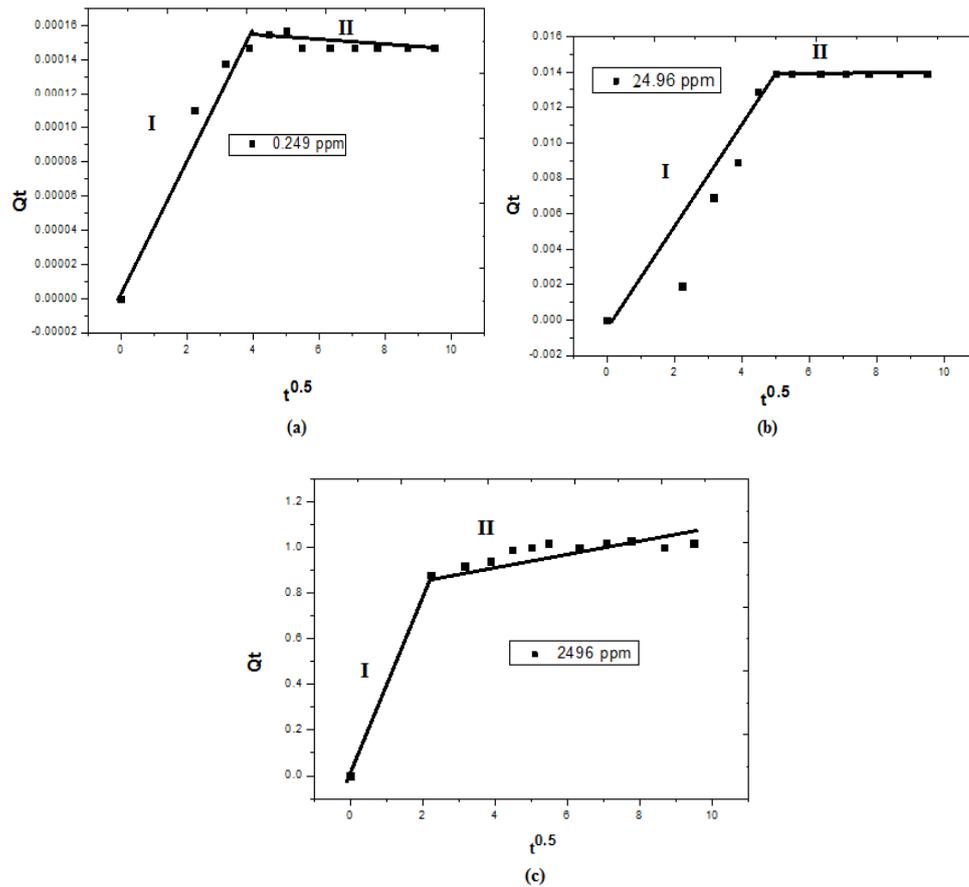


Figure III.12: Processus de diffusion intra-particulaire ; (a): 0.2496 ppm, (b) : 24.96 ppm , (c) :2496 ppm.

D'après les résultats de la figure III.12 on observe deux phases :

- Une première phase qui correspond à une diffusion rapide du cuivre à travers la texture de l'adsorbant.
- Une deuxième phase qui révèle le ralentissement de la vitesse de diffusion au fur et à mesure que l'on se rapproche du remplissage des pores de l'adsorbant.

III.2.3. Etude de l'équilibre d'adsorption

III.2.3.1. Etablissement des isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorptions du cuivre sur les polyphénols à différentes températures ont été déterminées dans les conditions opératoires suivantes :

pH=2 ; $[Cu^{+2}] = 10^{-4}$ M ; V=50ml ; $V_{agitation} = 200$ rpm ; $M_{adsorbant} = 0.05$ g ; t = 1 heure.

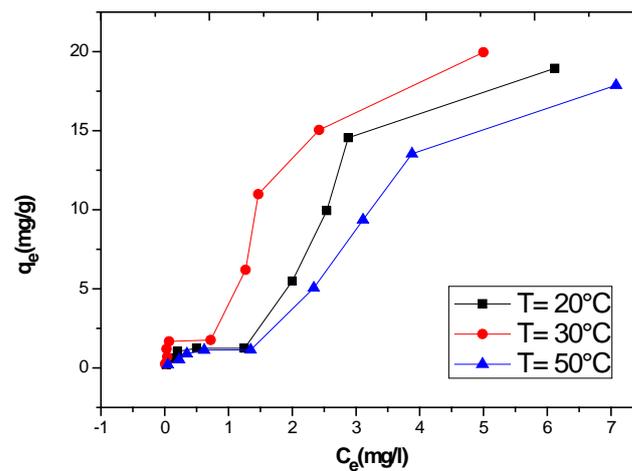


Figure III.13: Isothermes d'adsorption du cuivre à différentes températures.

Suite à l'allure des courbes à différentes température, on constate qu'il s'agit d'une adsorption de type S d'après la classification de Giles et al [20]. Ce type d'isotherme indique une adsorption à plat de molécule bifonctionnelle.

III.2.3.2. Modélisation des isothermes d'adsorption

Pour modéliser nos isothermes expérimentales, nous avons testés cinq modèles classiques : Langmuir, Freundlich, Temkin, Elovish et Dubinin-Radushkevich.

Tableau III.9: Paramètres caractérisant chaque modèle en adsorption.

Température (°C)	$Q_{m_{exp}}$ (mg/g)	Langmuir			Freundlich			Elovich		
		Q_m (mg/g)	K (L/g)	R^2	K_f (mg/l)	N (L/mg)	R^2	Q_m	K_{elov}	R^2
20°C	18.94	13.23	1.28	0.953	3.31	1.22	0.868	10.13	2.34	0.6726
30°C	19.95	12.59	3.20	0.958	6.25	1.59	0.880	-	-	-
50°C	17.83	14.19	3.95	0.952	2.33	1.05	0.908	68.59	0.066	-

Température (°C)	Q _{m,exp} (mg/g)	Temkin			Dubinin et Radushkevich		
		K _{Tem}	ΔØ (Kj/mol)	R ²	Q _m	K _{D-B}	R ²
20°C	18.94	5.4	13.70	0.614	4.90	4.46 10 ⁻⁸	0.524
30°C	19.95	23.93	16.28	0.561	7.92	2.69 10 ⁻⁸	0.753
50°C	17.83	38.44	17.81	0.666	4.39	5.51 10 ⁻⁸	0.506

D'après la linéarisation des résultats, il peut être conclu que le mécanisme de rétention du cuivre par les polyphénols est celui représenté par le modèle de Langmuir qui repose sur les hypothèses suivantes [21]:

- Il n'y a qu'un composé qui peut s'adsorber;
- Les molécules sont adsorbées sur des sites identiques ;
- Les molécules sont adsorbées seulement en une seule couche;
- L'adsorbant comporte un nombre déterminé et constant de sites d'adsorption;
- Il n'y a pas d'interactions entre les molécules adsorbées.

III.2.4. Etude thermodynamique

III.2.4.1. Détermination de l'enthalpie ΔH^0 et de l'entropie ΔS^0 d'adsorption

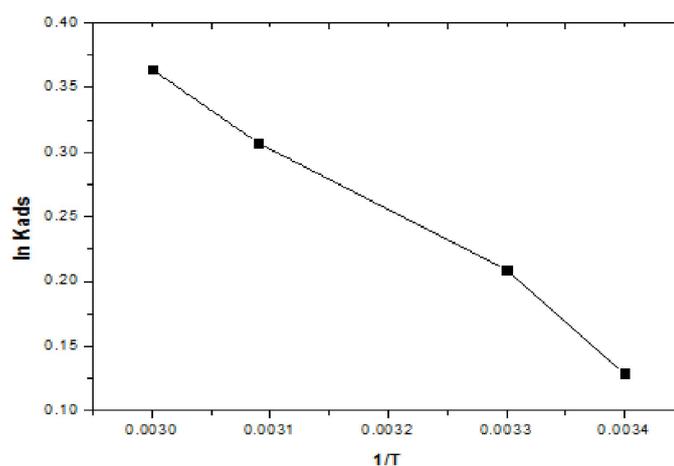


Figure III.14: Variation de la constante d'adsorption en fonction de la température.

Les résultats trouvés sont résumés dans le tableau III.10 :

Tableau.III.10: Paramètres thermodynamiques du processus d'adsorption.

Température(K)	Kd	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (j/mol.K)	R ²
293	1.44	-4.81	56.68	177.02	0.989
303	1.36	-3.04			
323	1.69	-2.57			
333	1.04	-2.26			

Les valeurs négatives de ΔG^0 obtenus pour les différentes températures confirment que le processus de rétention est spontané.

$\Delta H^0 > 50$ kJ/mol ce qui nous renseigne sur la nature de l'adsorption, il s'agit bien une chimisorption où les liaisons formé lors de l'adsorption sont des liaisons chimique (liaisons fortes).

III.3. CONSTRUCTION DES BIOCAPTEURS

III.3.1 construction du capteur a base de la membrane polymérique (capteur I)

La membrane a été préparée en diluant l'extrait de l'écorce de la grenade mélangé avec le polychlorure de vinyle (PVC) dans le THF pour obtenir un film polymérique insoluble dans les solvants. Ensuite le mélange a été déposé par spin-coating sur des électrodes en or bien nettoyées. En effet, la durée de vie du capteur développé par cette technique est de quelques jours.

III.3.1.1 Caractérisation morphologique par AFM

Nous avons étudié par imagerie AFM (microscopie à force atomique) la morphologie de la membrane polymérique sur l'or.

La figure III.15 représente les images AFM en mode 2D et 3D pour l'électrode nue et l'électrode fonctionnalisée par la membrane polymérique.

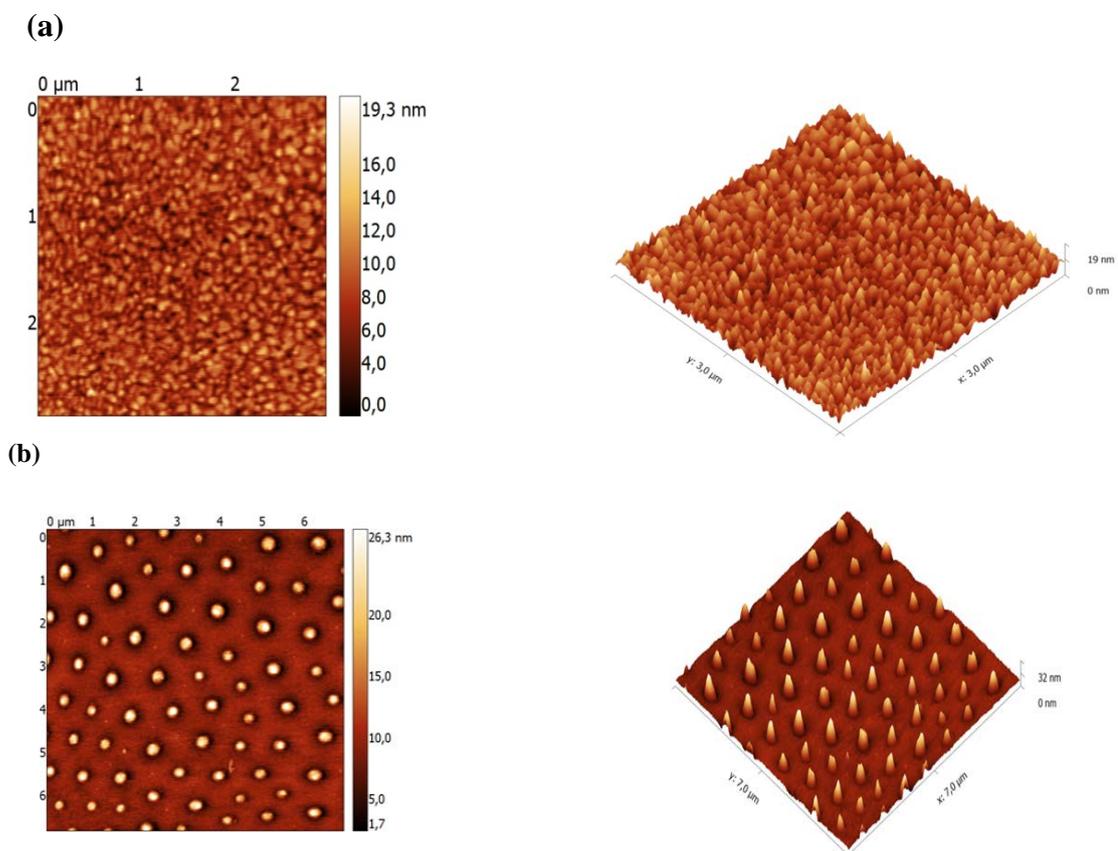


Figure III.15 : Image AFM en mode 2D et 3D ; (a) : électrode nue ; (b) : électrode après fonctionnalisation.

D'après la figure III.15 et à une échelle micrométrique la couche de la membrane polymérique présente une surface uniforme avec une distribution de petites vallées nanométriques. En outre la profondeur moyenne des vallées est de l'ordre de 0.51 nm, ce qui conduit à un facteur de rugosité RMS égale à 0.21 nm. Ces données topographiques indiquent que la couche polymérique est très lisse.

III.3.1.2 Caractérisation électrochimique

III.3.1.2.1 Voltamétrie cyclique

Les voltamogrammes de l'électrode d'or nue (a) et l'électrode fonctionnalisée par la membrane polymérique (b) sont présentés sur la figure III.16.

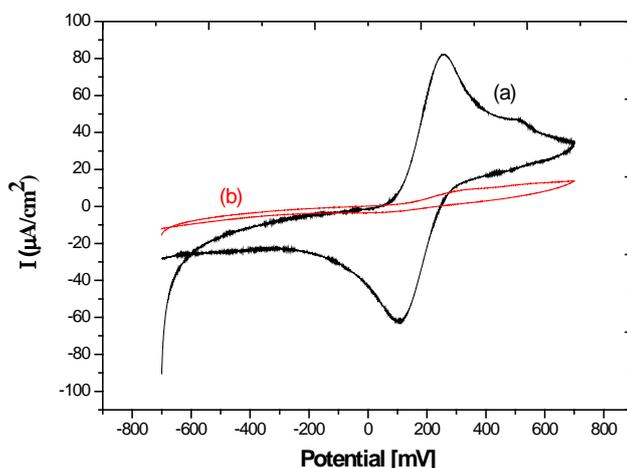


Figure III.16 : Voltamogramme de l'électrode d'or nue (a), l'électrode fonctionnalisée avec la membrane polymérique (b).

La caractérisation de la surface de l'électrode nue après nettoyage est effectuée par la voltamétrie cyclique. L'électrode d'or possède un voltammogramme réversible indiquant la propreté de la surface de l'électrode et donc l'efficacité du traitement piranha. Les deux pics indiquant le potentiel d'oxydo-réduction du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ sont clairs et distincts, la différence de potentiel séparant les deux pics est de 0,19 V avec un rapport I_a / I_c de 1,16 confirmant la bonne qualité de nettoyage de l'électrode d'or. On remarque que les pics d'oxydation et de réduction ont la même hauteur, ce qui explique que le processus en question est un processus réversible.

L'analyse des voltamogrammes après fonctionnalisation de l'électrode par la membrane polymérique montre une diminution des pics d'oxydoréduction (presque une disparition totale). Ceci indique que cette couche est quasi-bloquante aux transferts électroniques.

III.3.1.2.2 Spectroscopie d'impédance

Afin d'étudier les phénomènes à l'interface polyphénols/ions métalliques et dans le but de tester la sensibilité de notre capteur vis-à-vis des ions cuivre, plomb, cadmium et nickel, nous avons procédé par l'injection des différents analytes à différentes concentrations et de manière séparée.

La figure III.17 représente le comportement des impédances de l'électrode fonctionnalisée en fonction des ajouts successifs en Cu (II), Cd (II), Pb (II) et Ni (II) respectivement.

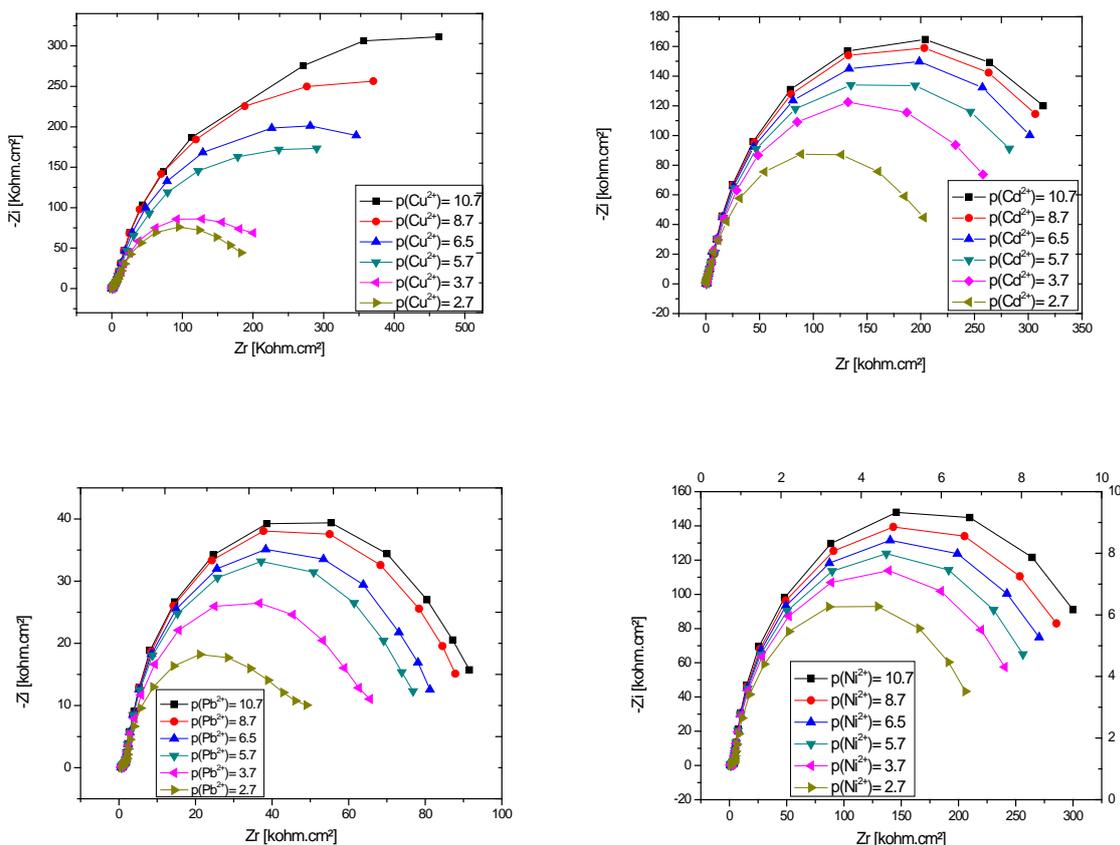


Figure III.17: Diagrammes de Nyquist (-Zim vs. Zr) à -0.2 V par rapport l'électrode au calomel saturée dans le PBS 50mM, pH 7) obtenus pour des mesures d'impédance dans Au/PVC-extrait pour différentes concentrations du Cuivre, cadmium, Plomb et Nickel.

Nous avons remarqué d'après les tracés de Nyquist de la figure III. 17, la présence d'un demi-cercle représentant la résistance de transfert de charge R_{tc} . Ce diamètre diminue avec l'augmentation de la concentration en analyte. Ce phénomène peut être expliqué par une pénétration des ions métalliques dans la membrane.

Ces diagrammes ont été modélisés en utilisant le circuit équivalent représenté sur la figure III.18 :

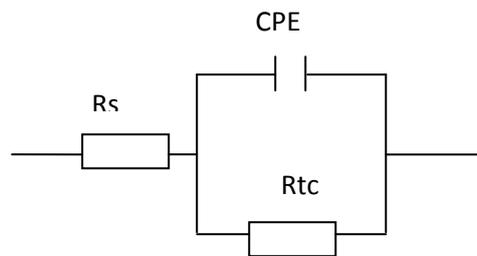


Figure III.18 : Circuit équivalent modélisant les diagrammes de Nyquist

R_s , R_{tc} et CPE représentent respectivement : la résistance de l'électrolyte, la résistance du transfert de charge et l'élément de la constante de phase.

La théorie de la spectroscopie d'impédance montre que la capacité de la double couche pour une cellule électrochimique réelle se comporte comme un élément de la constante de phase CPE. Cette constante de phase prend en considération les irrégularités interfaciales (porosité, géométrie, rugosité, diffusion,...etc). Elle est définie par une capacité CPE et un nombre αCPE qui peut prendre les valeurs -1, 0, 0.5 ou 1, qui correspondent respectivement à une inductance, impédance pure, termes de Warburg ou capacitance [22].

En effet, le transfert ionique à l'interface s'accroît avec la concentration des métaux causant ainsi une diminution de la résistance du transfert de charge [23].

Par ailleurs, tous ces diagrammes ont été modélisés en utilisant le circuit équivalent représenté sur la figure III.18. Les paramètres électriques sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau III.11 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du cuivre

[Cuivre]	$R_s(\Omega)$	CPE ($\mu F/cm^2$)	n (αCPE)	$R_{tc}(\Omega)$	χ^2
0	555.2	2.51	0.1	280.73	0.006
$1.99 \cdot 10^{-11}$	547.6	2.62	0.1	596.64	0.006
$1.99 \cdot 10^{-9}$	534.7	2.62	0.12	772.20	0.008
$1.99 \cdot 10^{-7}$	524.7	2.5	0.15	938.37	0.009
$1.99 \cdot 10^{-6}$	498.5	2.6	0.12	996.5	0.007
$1.99 \cdot 10^{-4}$	496.9	2.5	0.2	1106	0.01

Tableau III.12 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du cadmium

[Cadmium]	$R_s(\Omega)$	CPE ($\mu F/cm^2$)	n (αCPE)	$R_{tc}(\Omega)$	χ^2
0	572.4	1.83	0.005	224.52	0.006
$1.99 \cdot 10^{-11}$	583	1.79	0.007	304.25	0.006
$1.99 \cdot 10^{-9}$	594.3	1.83	0.009	352.86	0.008
$1.99 \cdot 10^{-7}$	588.9	1.86	0.009	393.78	0.009
$1.99 \cdot 10^{-6}$	481.1	1.82	0.01	413.54	0.007
$1.99 \cdot 10^{-4}$	474.7	1.85	0.01	435.8	0.01

Tableau III.13 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du plomb

[Plomb]	$R_s(\Omega)$	CPE ($\mu F/cm^2$)	n (αCPE)	$R_{tc}(\Omega)$	χ^2
0	810.9	3.89	0.33	110.53	0.02
$1.99 \cdot 10^{-11}$	819.2	3.97	0.348	106.38	0.02
$1.99 \cdot 10^{-9}$	824.4	4.03	0.342	97.94	0.02
$1.99 \cdot 10^{-7}$	823	4.14	0.323	91.36	0.02
$1.99 \cdot 10^{-6}$	820.6	4.39	0.309	84.77	0.019
$1.99 \cdot 10^{-4}$	821.5	4.25	0.321	80.61	0.019

Tableau III.14 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du nickel

[Nickel]	$R_s(\Omega)$	CPE ($\mu F/cm^2$)	n (αCPE)	$R_{tc}(\Omega)$	χ^2
0	137	3.34	2.67	317.67	0.04
$1.99 \cdot 10^{-11}$	138	2.64	2.35	338.62	0.04
$1.99 \cdot 10^{-9}$	138.4	2.55	2.32	367.08	0.04
$1.99 \cdot 10^{-7}$	139	2.47	2.3	390.15	0.03
$1.99 \cdot 10^{-6}$	139.2	2.4	2.32	414.32	0.04
$1.99 \cdot 10^{-4}$	139.2	2.33	2.32	440.26	0.04

Pour tracer la courbe de calibration, nous avons présenté la variation de la résistance de transfert de charge en fonction du logarithme de la concentration des différents ions métalliques [Me] (figure III.19).

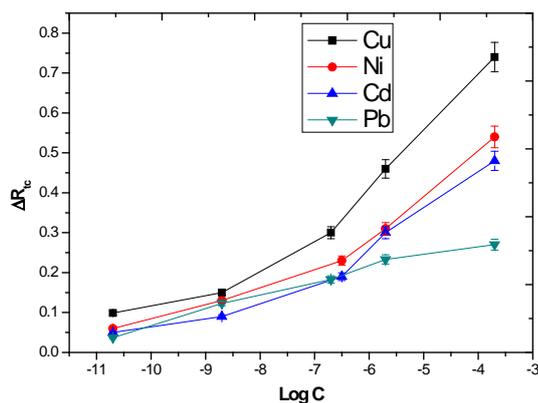


Figure III.19 : Réponse du capteur I en fonction de la concentration en métal.

Tableau III.15 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration des métaux.

Métal	Gamme de concentration	La pente de la droite	Coefficient de corrélation
Cuivre	10^{-11} _10 ⁻⁷	0.05	0.95
	10^{-7} _10 ⁻⁴	0.14	0.99
Cadmium	10^{-11} _10 ⁻⁷	0.03	0.92
	10^{-7} _10 ⁻⁴	0.1	0.98
Plomb	10^{-11} _10 ⁻⁴	0.034	0.97
Nickel	10^{-11} _10 ⁻⁷	0.04	0.99
	10^{-7} _10 ⁻⁴	0.11	0.99

D'après ces courbes (figure III.19), on constate que la diminution de la résistance de transfert de charge présente deux domaines de linéarité en fonction du logarithme de la concentration en ions métalliques.

La limite de détection, calculée par la méthode LOD est de l'ordre de 10^{-8} M pour tous les métaux. La comparaison entre la pente relative des courbes de calibration révèle une bonne sensibilité du capteur vis-à-vis du cuivre par rapport aux autres métaux, cela peut être lié à la différence entre le rayon ionique et l'électronégativité des métaux étudiés [24].

En effet le cuivre possède une grande attraction pour former des complexes plus stables à cause de son rayon ionique le plus petit et l'électronégativité la plus grande par rapport aux autres métaux étudiés.

Electrostatiquement parlant les ions les plus petit ont des constantes Kf (constantes de formation ou constantes de stabilité) plus grande : les charges métal-ligand sont proches, par

conséquent l'énergie d'interaction électrostatique (inversement proportionnelle à la distance d entre métal et ligand) est forte [13].

Le tableau III.16 représente la différence entre les caractéristiques des quatre métaux :

Tableau III.16 : Comparaison entre les rayons atomiques et ioniques et l'électronégativité des métaux étudiés.

ions	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺
Rayons atomiques(PM)	135	135	180	155
Rayons ioniques (nm)	0.069	0.069	0.132	0.097
Électronégativité	1.9	1.8	1.8	1.7

Les valeurs des rayons atomiques et de l'électronégativité des métaux représentées dans le tableau III.16 confirment que le cuivre possède le rayon ionique le plus petit et l'électronégativité la plus élevée.

III.3.1.2.3 Voltamétrie à ondes carrées SWV

Après optimisation des conditions expérimentales, les mesures voltamétriques à onde carrées (SWV) ont été effectuées pour les quatre métaux à différentes concentrations.

La Figure III.20 représente les voltamogrammes à ondes carrées pour les différentes concentrations en cuivre, cadmium plomb et nickel dans 50 nM de PBS à pH 7.

On remarque clairement que les courbes à différentes concentrations ont le même optimum correspondant à un potentiel. L'intensité optimale du cuivre correspond au potentiel $E = + 0.26$ V, celles du cadmium au potentiel $E = + 0.38$ V, du plomb au potentiel $E = + 0.45$ V et du nickel au potentiel $E = - 0.61$ V.

On constate que l'intensité du courant augmente avec la concentration des ions métalliques. Ceci est bien illustré dans les courbes de calibration de chaque métal (Figure III.20). Ces courbes ont montré une réponse linéaire entre 10^{-8} et 10^{-4} M et une limite de détection de l'ordre de 10^{-10} M pour tous les métaux.

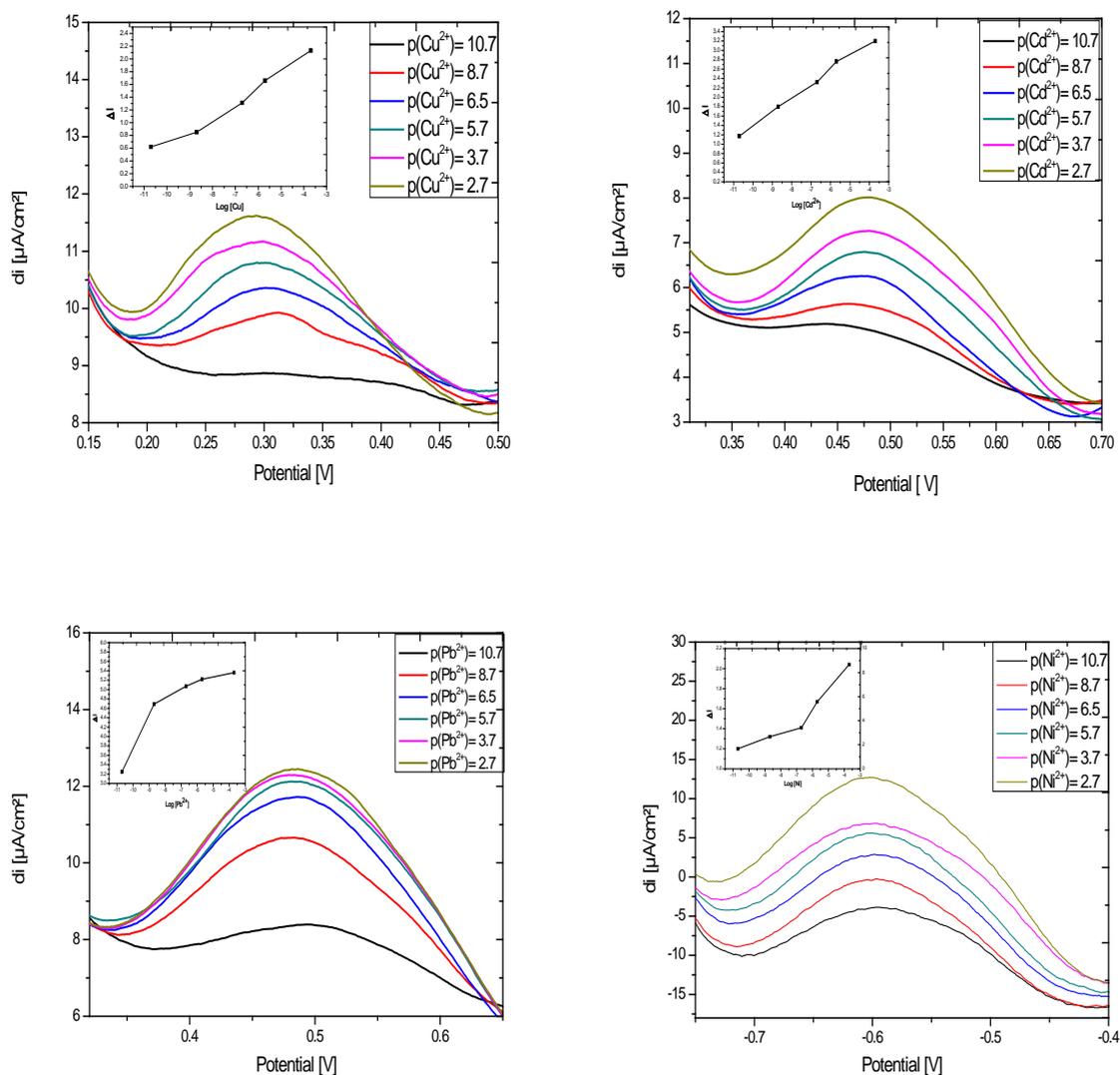


Figure III.20: voltammogrammes à ondes carrées pour différentes concentrations en cuivre, cadmium plomb et nickel dans 50 mM de PBS (pH 7) avec ces courbes de calibration.

- **Détection simultanée des métaux en mixture :**

Pour étudier la possibilité de détecter les métaux en mixture nous avons effectué un essai en utilisant un mélange contenant $1.42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en cuivre, $2.3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ en cadmium, $4.36 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ en plomb et $1.75 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en nickel dans une solution tampon PBS 50 nM à pH 7.

Les caractérisations ont été effectuées en faisant varier le potentiel de -1200 à $+1200 \text{ mV}$ avec une vitesse de balayage et une impulsion égale respectivement à 50 mV / s et 40 mV . La courbe III.21 représente le voltammogramme à onde carrée du mélange.

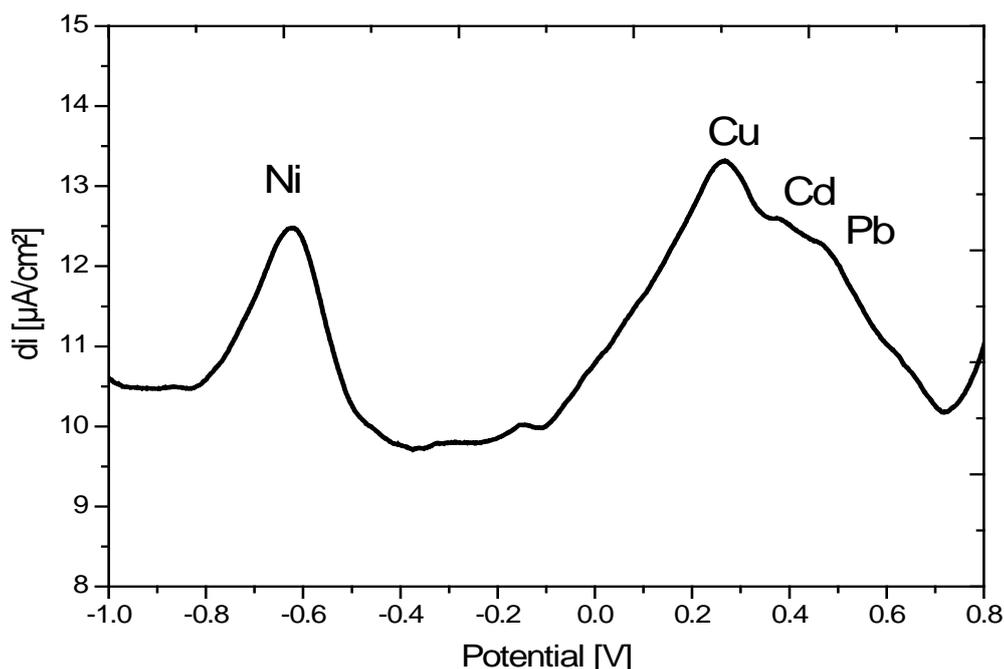


Figure III.21: voltammogramme à ondes carrées des quatre métaux en mixture.

Nous avons remarqué l'apparition de quatre sommets à différents potentiels. Comparant ces résultats avec ceux obtenus individuellement nous avons pu identifier à chaque métal un potentiel correspondant. Ainsi, il y a une occurrence du nickel au potentiel $E = -0.63$ V, le cuivre au potentiel $E = +0.27$ V, le cadmium au potentiel $E = 0.39$ V et le plomb au potentiel $E = 0.48$ V.

III.3.1.3 Etude de la sélectivité du capteur I

Lorsque le dispositif est d'avantage sensible à une espèce qu'à une autre, il est caractérisé par une dimension supplémentaire de sélectivité. C'est une propriété extrêmement importante dans les analyses, plus particulièrement en solution où l'on rencontre une grande variété d'espèces simultanément.

La méthode de détermination des coefficients de sélectivité dans notre cas est celle des solutions mixtes. Elle est recommandée par l'IUPAC. Elle correspond mieux aux situations réelles, c'est-à-dire lorsque le capteur est soumis à l'espèce primaire en présence de l'espèce interférente. Il y a alors compétition entre les deux espèces. La sélectivité d'une membrane vis-à-vis des autres ions i en solution pouvant interférer avec la mesure de l'ion p , est

quantifiée habituellement par ses coefficients de sélectivité K_{pi} . Ce coefficient s'exprime comme le rapport de la réponse de la membrane pour un ion interférent à sa réponse de l'ion à mesurer [25].

Une membrane est dite sélective à un ion lorsque son coefficient de sélectivité s'approche de zéro. Dans notre cas l'espèce primaire ou cible (p) est le cuivre, les espèces interférentes (i) sont le nickel, le plomb et le cadmium.

Les valeurs de $K_{Cu,Ni}$, $K_{Cu,Cd}$, $K_{Cu,Pb}$ sont 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-3} M respectivement. Nous pouvons conclure au terme de ces valeurs que la membrane polymérique présente une bonne sélectivité envers le cuivre et celui-ci peut être détecté en présence d'un interférent ou plus.

III.3.1.4 Temps de réponse

Plusieurs définitions pratiques ont été proposées sur le temps de réponse d'un capteur, celle de l'IUPAC (1976) : le temps de réponse est le temps au bout duquel le potentiel de l'électrode éloigné de 1 mV de son potentiel d'équilibre [26]. Dans ce cas le temps de réponse est égal à 48s.

III.3.2 construction du capteur a base du gel (capteur II)

La partie sensible de ce capteur a été déposée sous forme d'un gel pour éviter tout décollement ou détérioration. Ce gel a été préparé par un traitement de gélification exercé sur les composés phénoliques de l'écorce de la grenade. Il a été déposé sur l'électrode en or par spin-coating.

III.3.2.1 Caractérisation structurale par FTIR

Les bandes d'absorption infrarouge de l'extrait avant et après complexation par les ions métalliques sont représentés sur la figure III.22 :

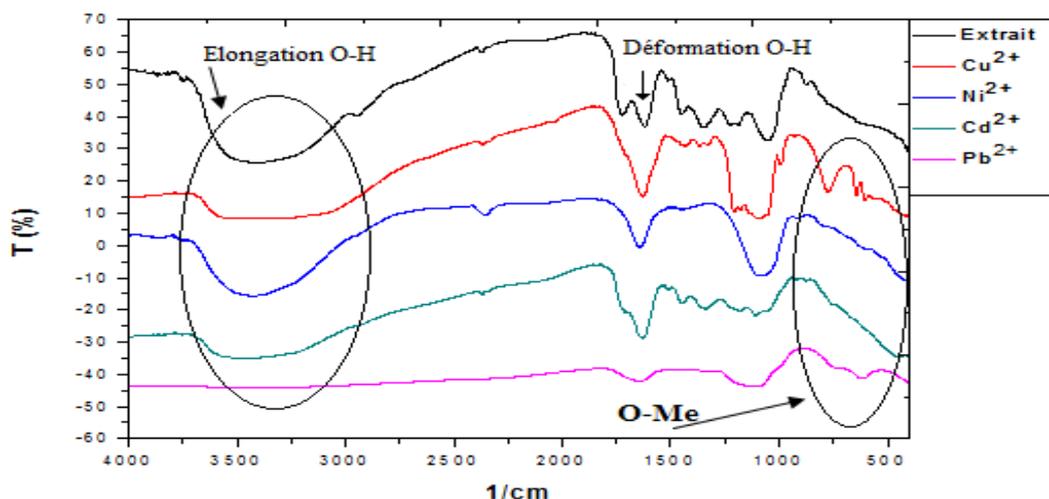


Figure III.22: Les spectres FTIR après complexation

Après réaction polyphénols/Me (II) nous avons remarqué :

- la disparition de deux bandes :
 - La première est la bande d'élongation O-H entre $3600-3000\text{ cm}^{-1}$.
 - La deuxième est celle de la déformation angulaire O-H dans le plan $1800-1600\text{ cm}^{-1}$ [27].
- L'apparition des nouvelles bandes entre $1000\text{ et }500\text{ cm}^{-1}$ correspondent à la liaison O-Me [27].

Ces variations montrent clairement que la complexation des métaux avec les polyphénols a lieu au niveau des sites adjacents (disparition des bandes O-H) et il n'y a pas de participation du cycle aromatique dans le processus parce que le spectre FTIR ne montre pas une variation au niveau des bandes C-H et C=C aromatiques.

III.3.2.2 Caractérisation électrochimique

III.3.2.2.1 Voltamétrie cyclique

Les voltamogrammes de l'électrode d'or nue (a), l'électrode fonctionnalisée avec le gel (b) et avec la membrane polymérique (c) sont présentés sur la figure III.23.

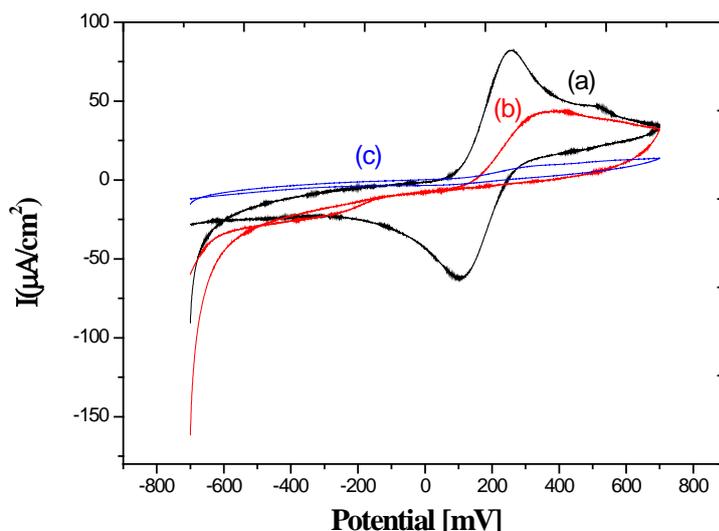


Figure III.23 : Voltamogramme de l'électrode d'or nue (a), l'électrode fonctionnalisée avec le Gel (b) et avec la membrane polymérique (c).

L'analyse des voltamogrammes après fonctionnalisation de l'électrode par le gel montre une diminution des pics d'oxydoréduction mais non une disparition totale. Ceci indique que cette couche est non bloquante aux transferts électroniques.

III.3.2.2.2 Spectroscopie d'impédance

La figure III.24 représente une comparaison des diagrammes de Nyquist pour les différentes concentrations des métaux étudiés, en présence de l'électrode fonctionnalisée par le gel à pH 2 (d'après l'optimisation). La résistance du transfert de charge diminue en fonction de l'augmentation de la concentration des métaux permettant de conclure à un transfert de charge vers la couche du gel.

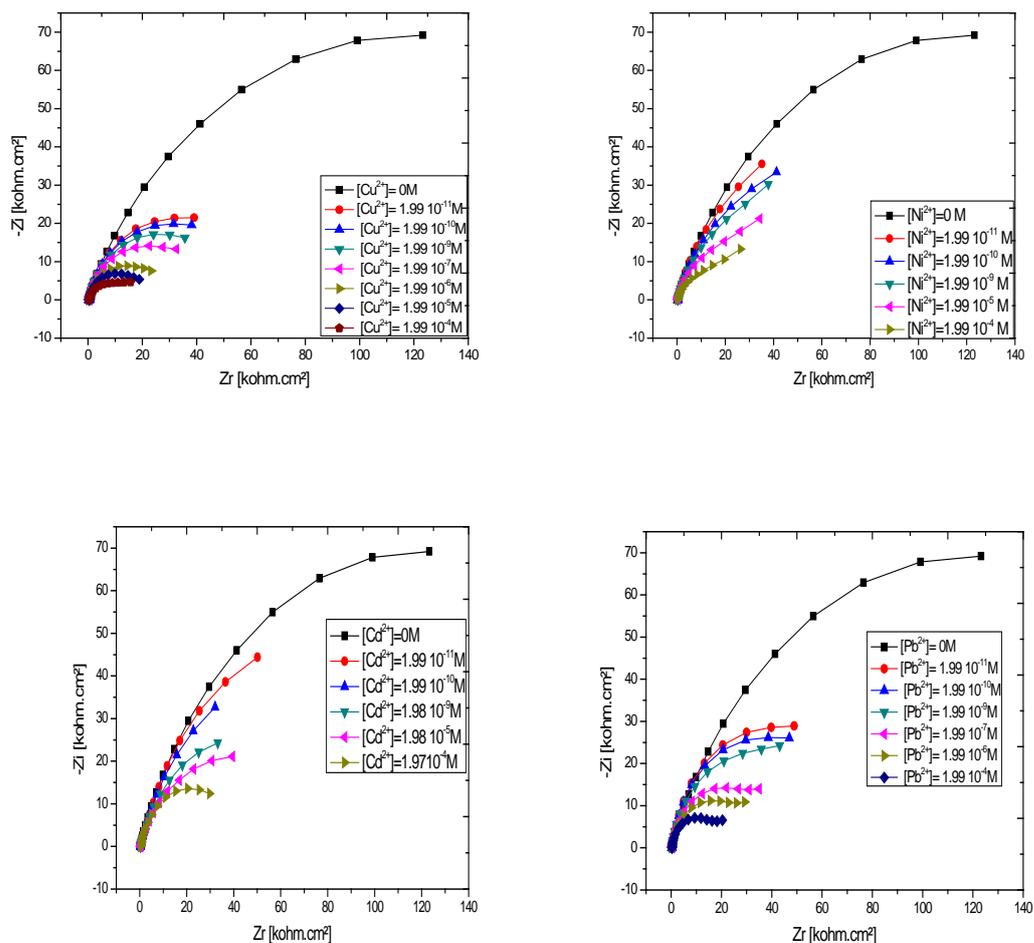


Figure III.24 Diagrammes de Nyquist ($-Z_{im}$ vs. Z_r à -0.2 V par rapport l'électrode au calomel saturée dans le PBS 50mM, pH 2) obtenus pour des mesures d'impédance dans Au/Gel pour différentes concentrations du Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} et Ni^{2+} .

Le modèle du circuit électrique équivalent proposé pour le capteur II est donné par la figure III.18. Ce circuit équivalent comporte une résistance R_s qui regroupe les résistances de connexions électrique et celle de l'électrolyte. A cette résistance on associe le model de Randles, incluant la capacité de la double couche CPE et la résistance de transfert de charge R_{tc} . Les valeurs des paramètres des circuits équivalents de chaque métal sont représentées dans les tableaux III.17-III. 20.

Tableau III.17 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du cuivre

Cuivre]	RS(Ω)	CPE (μF/cm ²)	n (αCPE)	Rtc(Ω)	x ²
0	250.5	1.11	0.23	170.84	0.003
1.99 10 ¹¹	412.8	1.39	0.04	55.47	0.0008
1.99 10 ¹⁰	420.1	1.36	0.04	52.08	0.0008
1.99 10 ⁹	427.3	1.35	0.04	45.81	0.0008
1.99 10 ⁷	433.5	1.39	0.05	38.77	0.0008
1.99 10 ⁶	434.4	1.56	0.05	25.56	0.0009
1.99 10 ⁵	428.7	1.73	0.05	19.81	0.0009
1.99 10 ⁴	416.8	1.86	0.13	14.8	0.002

Tableau III.19 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du plomb

[Plomb]	RS(Ω)	CPE (μF/cm ²)	n (αCPE)	Rtc(Ω)	x ²
0	250.7	1.11	0.23	170.84	0.003
1.99 10 ¹¹	284.7	1.91	0.04	92.02	0.0008
1.99 10 ¹⁰	282.9	1.71	0.07	67.43	0.001
1.99 10 ⁹	281.2	1.75	0.08	60.82	0.001
1.99 10 ⁵	280.9	1.77	0.08	46.56	0.001
1.99 10 ⁴	281.4	1.32	0.3	25.68	0.005

Tableau III.18 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du cadmium

[Cadmium]	RS(Ω)	CPE (μF/cm ²)	n (αCPE)	Rtc(Ω)	x ²
0	250.7	2.11	0.23	170.84	0.003
1.99 10 ¹¹	269.7	2.58	0.02	163.27	0.0003
1.99 10 ¹⁰	279.3	2.42	0.03	116.49	0.0005
1.99 10 ⁹	266.1	2.1	0.01	68.591	0.0002
1.99 10 ⁵	271.8	1.87	0.06	66.7	0.001
1.99 10 ⁴	266.2	1.85	0.01	38.39	0.0002

Tableau III.20 : Valeurs respectives aux différents éléments du circuit équivalent correspondant aux diagrammes Nyquist des différentes concentrations du nickel

[Nickel]	RS(Ω)	CPE (μF/cm ²)	n (αCPE)	Rtc(Ω)	x ²
0	250.7	1.11	0.23	170.84	0.003
1.99 10 ¹¹	269.1	1.18	0.83	74.49	0.0002
1.99 10 ¹⁰	271.6	1.82	0.02	68.07	0.0003
1.99 10 ⁹	274.4	1.08	0.07	56.09	0.001
1.99 10 ⁷	283.5	0.88	0.09	37.46	0.001
1.99 10 ⁶	284.1	0.942	0.1	30.05	0.001
1.99 10 ⁴	283	1.13	0.11	19.47	0.001

Les meilleurs résultats du fit sont obtenus avec une erreur moyenne de l'ordre de $x^2 = 10^{-4}$. En effet l'élément de la constante de phase CPE qui caractérise la morphologie de la membrane reste quasiment constant. Par ailleurs la résistance de transfert de charge diminue avec l'augmentation de la concentration en ions métalliques indiquant la migration des ions vers la membrane donc une augmentation de la conductivité ionique.

La figure III.25 représente une comparaison de la variation de la résistance de transfert de charge en fonction du logarithme des concentrations en métaux lourds à pH égale 2.

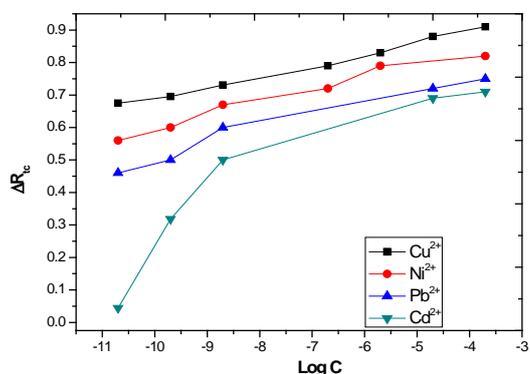


Figure III.25 : Comparaison de la détection des quatre métaux par le biocapteur II.

Comme dans le premier cas, ce biocapteur présente la meilleure sensibilité vis-à-vis du cuivre par rapport aux autres métaux avec une limite de détection de l'ordre de 10^{-10} M.

Les courbes de calibration donnent un domaine linéaire entre le ΔR_{tc} et le logarithme de la concentration des métaux détectés.

Les valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration des métaux sont présentées dans le tableau III.21 :

Tableau III.21 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration des métaux.

Métal	Gamme de concentration	La pente de la droite	Coefficient de corrélation	La limite de détection
Cuivre	10^{-11} - 10^{-7}	0.02	0.99	10^{-10}
	10^{-7} - 10^{-4}	0.04	0.99	
Cadmium	10^{-11} - 10^{-9}	0.27	0.99	10^{-8}
	10^{-9} - 10^{-4}	0.02	0.99	
Plomb	10^{-10} - 10^{-5}	0.02	0.97	10^{-8}
Nickel	10^{-11} - 10^{-7}	0.04	0.99	10^{-9}
	10^{-7} - 10^{-4}	0.02	0.96	

La réponse du deuxième capteur montre une linéarité entre le ΔR_{tc} et le logarithme des concentrations en métaux étudiés dans deux gammes pour le cuivre, cadmium et nickel avec des limites de détection de l'ordre de 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M respectivement et dans une seule

gamme pour le plomb avec une limite de détection de l'ordre de 10^{-8} M avec des coefficients de corrélation de l'ordre de 0.99.

III.3.2.2.3 Voltamétrie à onde carrée SWV :

Avant d'établir les courbes d'étalonnage des métaux à pH = 2 nous avons procédé par la détection des métaux séparément. Les voltamogrammes sont représentés sur la figure III.26 :

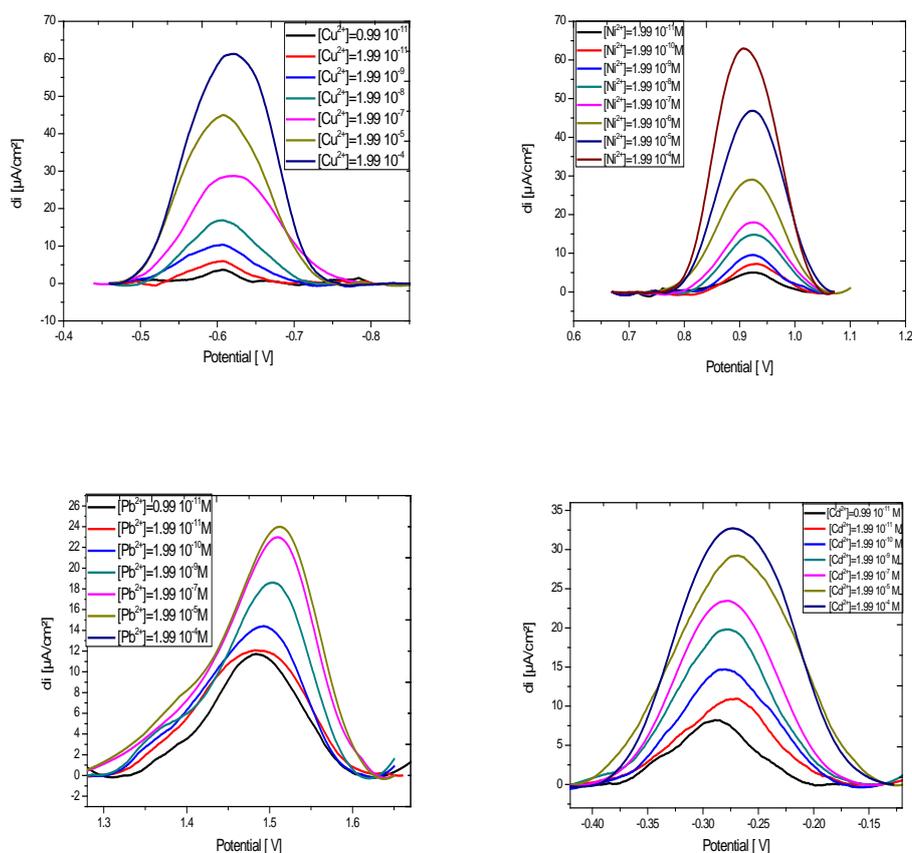


Figure III.26 : Square wave voltamogramme pour différentes concentrations en Cuivre, Cadmium Plomb et Nickel dans 50 nM de PBS (pH 2)

L'augmentation de l'intensité du courant en fonction des concentrations en ions Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} et Cd^{2+} est observée dans les voltamogrammes est nettement remarquée. Ces résultats sont confirmés par les courbes de calibration de chaque métal qui sont représentées sur la figure III.27 et dont des gammes de linéarité ont été obtenues pour les quatre métaux.

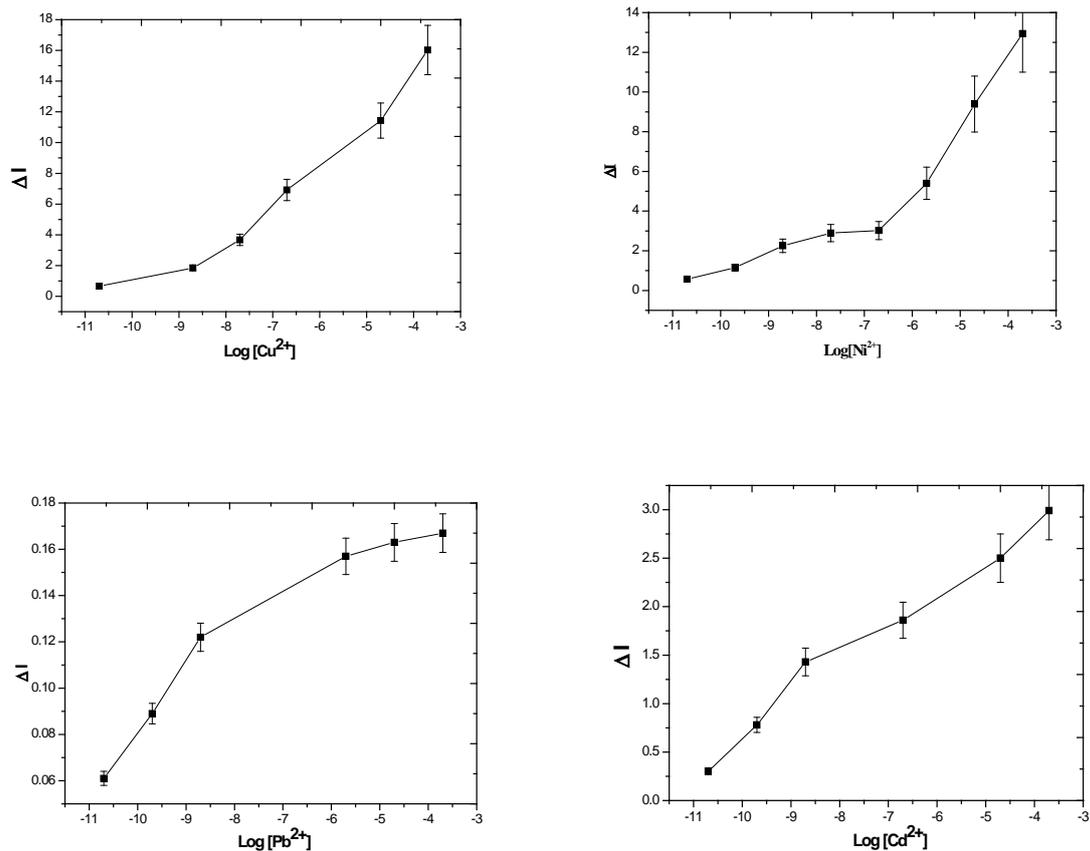


Figure III.27 : Courbes d'étalonnage pour les ions Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} et Cd^{2+} à pH 2

Les limites de détection calculées à partir des différentes courbes sont respectivement $\text{Cu (II)} = 10^{-12} \text{ M}$; $\text{Ni (II)} = 10^{-10} \text{ M}$; $\text{Pb (II)} = 10^{-8} \text{ M}$, et $\text{Cd (II)} = 10^{-8} \text{ M}$.

Les valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration sont présentées dans le tableau III.22 :

Tableau III.22 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation des droites de calibration SWV.

Métal	Gamme de concentration	La pente de la droite	Coefficient de corrélation
Cuivre	10^{-11} _ 10^{-7}	1.47	0.95
	10^{-7} _ 10^{-4}	2.92	0.96
Cadmium	10^{-11} _ 10^{-9}	0.56	0.99
	10^{-9} _ 10^{-4}	0.3	0.95
Plomb	10^{-11} _ 10^{-9}	0.03	0.99
	10^{-9} _ 10^{-4}	0.0094	0.96
Nickel	10^{-11} _ 10^{-7}	0.8	0.98
	10^{-7} _ 10^{-4}	2.37	0.99

La linéarité a été obtenue pour les quatre métaux dans deux domaines distincts avec des coefficients de corrélation proche à 1. La comparaison entre la détection des quatre métaux du capteur II est représentée sur la figure III.28 :

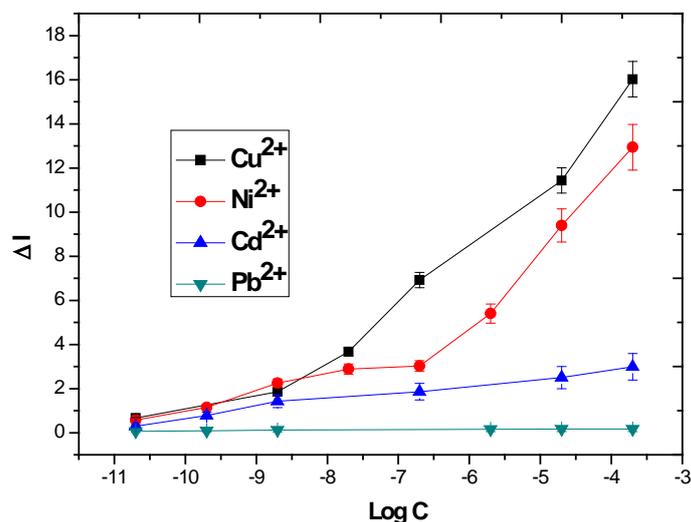


Figure III.28 : Comparaison de la détection des quatre métaux par SWV.

La figure III. 28 représentant la comparaison entre les pentes relatives des courbes de calibration SWV révèle des résultats plus clairs que ceux réalisés par spectroscopie

d'impédance confirmant la sensibilité élevée de nos capteurs vis-à-vis du cuivre par rapport aux autres métaux.

- **Détection simultanée des métaux en mixture :**

L'étude de la détection des métaux en mixture a été effectuée par l'injection des solutions standards en Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+} dans la cellule électrochimique contenant une solution tampon PBS 50 mM à pH égale à 2.

Les caractérisations de détection ont été effectuées en faisant varier le potentiel de -1200 à +1200 mV avec une vitesse de balayage et une impulsion égale respectivement à 50 mV / s et 40 mV. La courbe III.29 représente le voltamogramme à onde carrée du mélange.

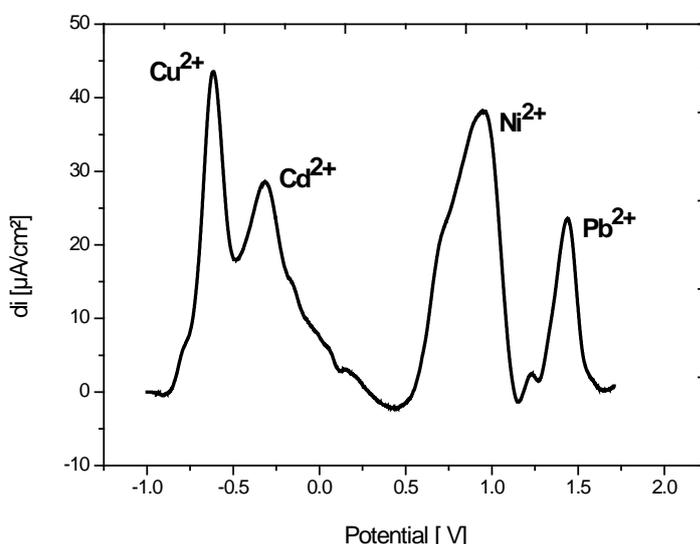


Figure III.29: Détection simultanée par SWV obtenu avec le capteur II

Cu^{2+} ($5.10 \cdot 10^{-5}\text{M}$), Ni^{2+} ($2.96 \cdot 10^{-4}$), Pb^{2+} ($1.92 \cdot 10^{-4}\text{M}$), Cd^{2+} ($4.9 \cdot 10^{-4}\text{M}$) dans le PBS à pH=2.

Nous avons observé à partir du voltamogramme de la figure III.29 des pics clairs et bien séparés par rapport à ceux obtenus en utilisant la membrane polymérique. Cette différence est due à la présence du PVC qui limite le transfert de charge vers la membrane au niveau du capteur I.

L'apparition de quatre sommets à différents potentiel identiques à ceux obtenus individuellement nous a permis de reconnaître le potentiel de détection de chaque métal. Le cuivre est apparu au potentiel $E = -0.61 \text{ V}$, le cadmium au potentiel $E = -0.31 \text{ V}$, le plomb

au potentiel $E = 1.43 \text{ V}$ et le nickel au potentiel $E = 0.95 \text{ V}$. Ces potentiels sont différents à ceux obtenus dans le premier capteur, cela peut être expliqué comme suit :

Le pH du milieu de test des deux capteurs étant différents, la forme chimique des métaux en solution n'est pas la même. En effet, les métaux lourds en milieu acide (capteur II) se trouvent sous forme d'ions libres, alors qu'une augmentation progressive du pH (donc des concentrations en ions hydroxydes) provoque la formation de complexes métalliques hydroxylés dans l'ordre suivant : M^{2+} , MOH^+ , $M(OH)^2$, $M(OH)^3$ et $M(OH)^4$. M^{2+} représentant des cations divalents tels que Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} et Ni^{2+}) [28]. Le potentiel redox est fonction du pH et peut modifier directement leur degré d'oxydation en fonction du pH [29, 30]. La composition de la membrane peut aussi influencer la valeur du potentiel.

III.3.2.3 Etude de la sélectivité du capteur II

Les valeurs de $K_{Cu,Ni}$, $K_{Cu,Cd}$, $K_{Cu,Pb}$ sont 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-6} M respectivement. En comparant ces valeurs avec celles du capteur I nous avons conclu que le deuxième capteur est plus sélectif.

Tableau III.23 : Comparaison des coefficients de sélectivité des deux capteurs étudiés.

Coefficients de sélectivité (M) Capteur	I	II
$K_{Cu,Ni}$	10^{-2}	10^{-4}
$K_{Cu,Cd}$	10^{-3}	10^{-6}
$K_{Cu,Pb}$	10^{-3}	10^{-6}

III.3.2.4 Temps de réponse du capteur II

Le temps de réponse du dispositif N°2 est de l'ordre de 15 s, ce qui indique qu'il est plus rapide que le premier.

III.3.2.5 Comparaison entre la sensibilité des deux capteurs par SWV :

La comparaison entre la sensibilité des deux capteurs s'effectue par la superposition des courbes de calibration SWV. La courbe ayant la pente de droite la plus grande représente la meilleure détection.

La figure III.30 représente la superposition des courbes de calibration SWV des quatre métaux.

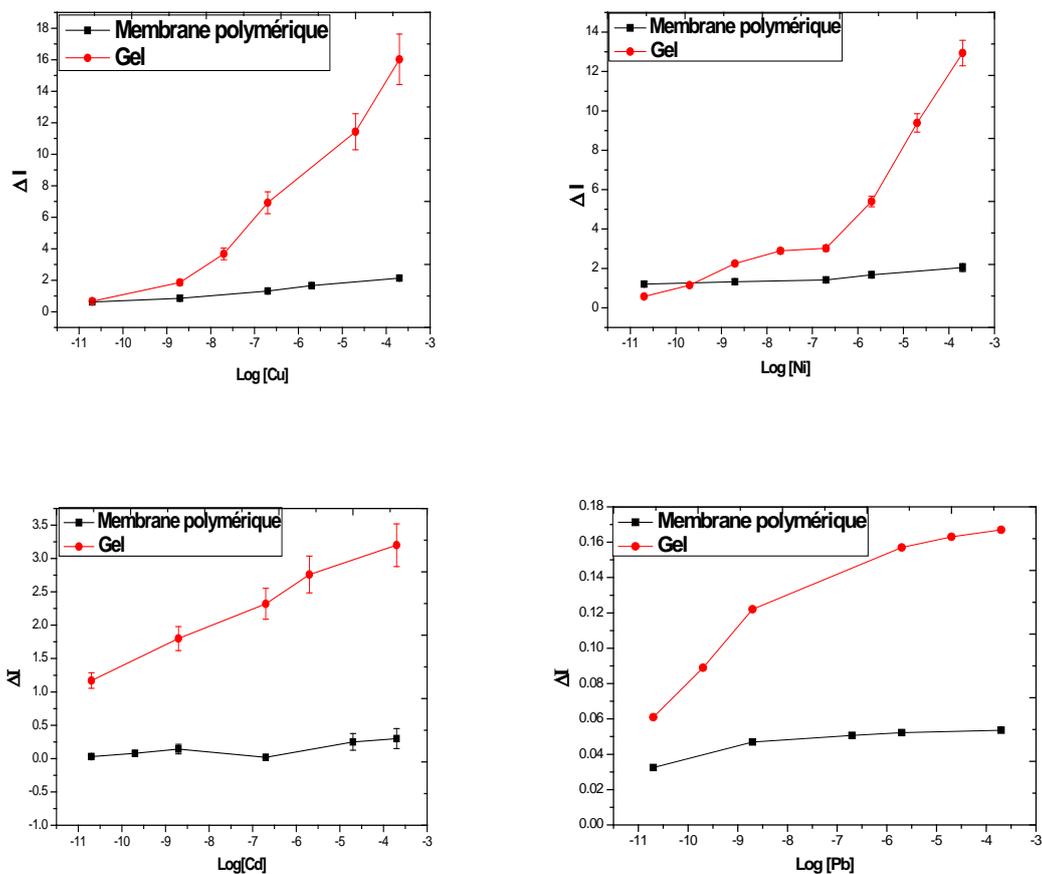


Figure III.30: Superposition des courbes de calibration SWV.

D'après les pentes des droites de calibration, on constate qu'il y a un écart relativement important entre la détection des deux biocapteurs, ces résultats confirment la grande sensibilité du capteur à base de gel par rapport au premier avec une matrice polymère.

D'après l'étude comparative réalisée sur les deux systèmes développés au cours de notre travail, nous pouvons constater que le capteur à gel est le plus fiable.

III.3.3 Performance du dispositif 2 dans le milieu réel

III.3.3.1 Etude qualitative

Pour évaluer les performances du capteur choisi vis-à-vis de différents échantillons réels nous avons contaminés l'eau de robinet par les métaux lourds avec les concentrations suivantes :

Tableau III.24 : Concentration en métaux lourds des échantillons réels.

Numéro d'échantillon	Métal	Concentration (mol/l)
I	Cuivre	$3.5 \cdot 10^{-4}$
	Nickel	$3.7 \cdot 10^{-5}$
	Cadmium	$6.35 \cdot 10^{-5}$
	Plomb	$3.34 \cdot 10^{-4}$
II	Cuivre	$3.35 \cdot 10^{-4}$
	Nickel	$1.49 \cdot 10^{-4}$
	Cadmium	$3.5 \cdot 10^{-5}$
	Plomb	$1.19 \cdot 10^{-3}$
III	Cuivre	$1.28 \cdot 10^{-4}$
	Nickel	$7.33 \cdot 10^{-5}$
	Cadmium	$5.76 \cdot 10^{-5}$
	Plomb	$9.1 \cdot 10^{-4}$
IV	Cuivre	$2.79 \cdot 10^{-5}$
	Nickel	$1.18 \cdot 10^{-4}$
	Cadmium	$1.44 \cdot 10^{-4}$
	Plomb	$1.2 \cdot 10^{-4}$

Les résultats d'identification des métaux lourds dans les échantillons réels sont illustrés sur la figure III.31.

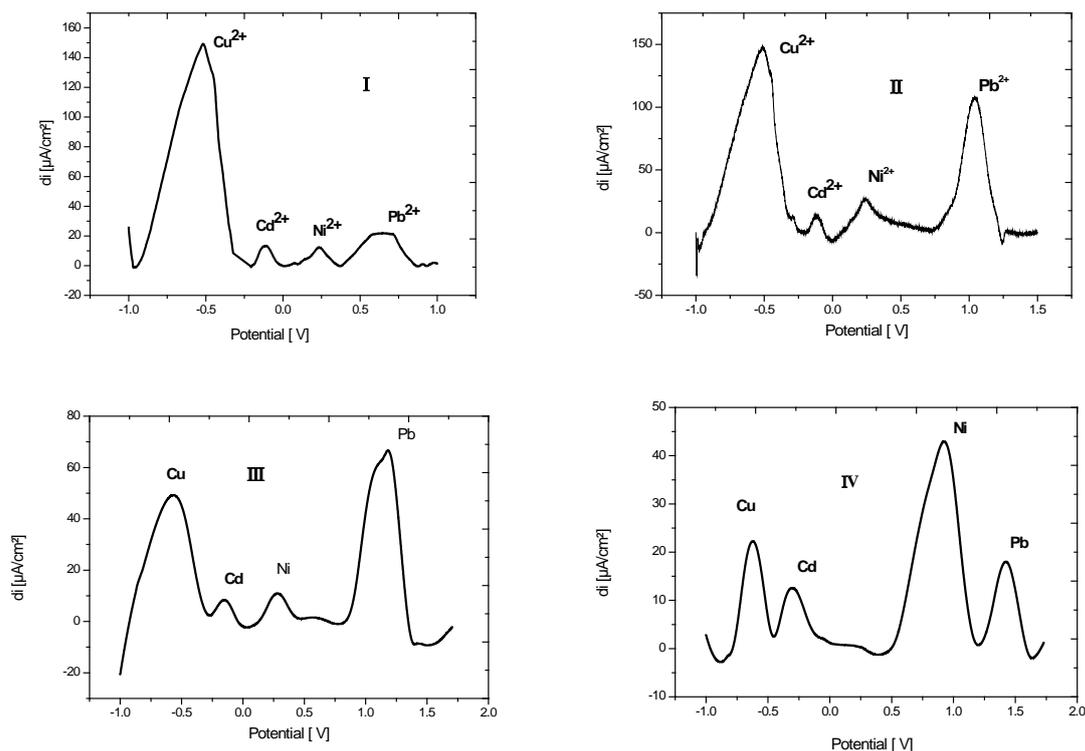


Figure III.31 : SWV des échantillons réels.

Sur cette représentation, une meilleure identification du Cu(II), Cd(II), Pb(II) et Ni(II) a été observée. L'apparition de quatre pics à différents potentiel nous a permis de reconnaître chaque analyte dans le milieu. Le cuivre est apparu au potentiel $E = -0.61$ V, le cadmium au potentiel $E = -0.31$ V, le plomb au potentiel $E = 1.43$ V et le nickel au potentiel $E = 0.95$ V.

III.3.3.2 Etude quantitative (Concentration des métaux lourds)

L'étude quantitative est basée sur le calcul de l'aire des pics de chaque métal dans les échantillons réels.

Le but de ce calcul est de trouver une proportionnalité entre la concentration de l'ion métallique et l'aire du pic de sa courbe SWV. Par une simple règle de trois on peut calculer la concentration de ce métal dans un échantillon réel inconnu. L'erreur représente la différence entre la concentration réelle et celle calculée à partir des aires.

On remarque d'après le tableau III.24 que les erreurs sont négligeable ce qui confirme la sensibilité élevée de notre biocapteur vis-à-vis les métaux étudiés.

Tableau III.25 : Valeurs des concentrations réelles et calculées des échantillons réelles.

Pb	Cd	Ni	Cu	Me
1.89 10 ⁴	2.03 10 ⁴	4.27 10 ⁴	1.42 10 ⁵	Air du pic de 1mol/l en métal (cm ²)
3.34 10 ⁻⁴	6.35 10 ⁻⁵	3.7 10 ⁻⁵	3.5 10 ⁻⁴	injectée [Me]
3.36 10 ⁻⁴	6.39 10 ⁻⁵	3.67 10 ⁻⁵	3.45 10 ⁻⁴	calculée Echantillon I
± 2 10 ⁻⁶	± 4 10 ⁻⁷	± 3 10 ⁻⁷	± 5 10 ⁻⁶	Erreur
1.19 10 ⁻³	3.5 10 ⁻⁵	1.49 10 ⁻⁴	3.35 10 ⁻⁴	injectée [Me]
1.12 10 ⁻³	3.3 10 ⁻⁵	1.45 10 ⁻⁴	3.32 10 ⁻⁴	calculée Echantillon
± 7 10 ⁻⁵	± 2 10 ⁻⁷	± 4 10 ⁻⁶	± 3 10 ⁻⁶	Erreur
9.1 10 ⁻⁴	5.76 10 ⁻⁵	7.33 10 ⁻⁵	1.28 10 ⁻⁴	injectée [Me]
9.15 10 ⁻⁴	5.74 10 ⁻⁵	7.29 10 ⁻⁵	1.21 10 ⁻⁴	calculée Echantillon
± 5 10 ⁻⁵	± 2 10 ⁻⁷	± 4 10 ⁻⁷	± 6 10 ⁻⁶	Erreur
1.2 10 ⁻⁴	1.44 10 ⁻⁴	1.18 10 ⁻⁴	2.79 10 ⁻⁵	injectée [Me]
1.17 10 ⁻⁴	1.41 10 ⁻⁴	1.13 10 ⁻⁴	2.73 10 ⁻⁵	calculée Echantillon IV
± 3 10 ⁻⁶	± 3 10 ⁻⁶	± 5 10 ⁻⁶	± 6 10 ⁻⁷	Erreur

Conclusion :

Dans ce chapitre nous avons utilisé une nouvelle méthode dans la conception d'un capteur pour métaux lourds qui consiste à transformer un composé phénolique extraits à partir d'un déchet agro-alimentaire à savoir l'écorce de la grenade en gel, par traitement de gélification pour dispenser à l'utilisation du polymère dans la fabrication de l'élément sensible (biorécepteur). Ce traitement rend les polyphénols insolubles dans l'eau. Cette propriété nous a permis de faire une étude cinétique et thermodynamique à l'échelle macromoléculaire pour étudier le mécanisme réactionnel mis en jeu au niveau de l'interface biocapteur/analyte. Ce biocapteur présente une meilleure sensibilité, sélectivité et rapidité vis-à-vis les métaux lourds par apport au dispositif réalisé à base d'une membrane polymérique.

Références bibliographiques :

- [1]: M. Souhila, K. Mustapha, M. Nacéra ; Nature et technologie ; (2012) 35-40.
- [2]: N. Ozsoy, A. Can, R. Yanardag and N. Akev; Journal of Food chemistry.; 110(2008) 571-583.
- [3]: K. Skorkowska-Telichowska, K. Hasiewicz-Derkacz, T. Gębarowski, A. Kulma, H. Moreira, K. Kostyn ; Oxidative Medecine and cellular longevity; 1155(2016) 7510759.
- [4]: S. A. Ranade, T. S. Rana, D. Narzary; Physiology and molecular biology of plants; 15(2009) 61-70.
- [5]: M; S. Shiban, Mutlag M. A, N; S. Al-Zoreky; Food and nutrition sciences; 3(2012) 991-996.
- [6]: Middha Sushil Kumar, Usha Talambedu, Pande Veena; Excli Journal; 13(2014) 323-324.
- [7] : Hadrich F, Cher S, Gargouri YT, Adel S ; Oleo sciences Journal; 63(2014) 515-525.
- [8]: Aganga, A.A., Mosase, K.W; Animal Feed Science and Technology; 91(2001)1-114.
- [9]: Pedneault, K., Leonhart, S., Angenol, L., Gosselin, A., Ramputh, A. et Arnason, J.T; Texte de conférence, 5ème colloque sur les produits naturels d'origine végétale ; Université Laval, Qc, Canada ;(2015) 1-5.
- [10] : Bruneton J. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2ème Ed Tec&Doc. Paris ; (1993).
- [11] : Fournier P., 1948. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Editeur Paul le chevalier, Tome II, 504 pages, Pages 286 - 291.
- [12] : S ; S ; R.M., B ; G.C, M ; T.C ; Identification Spectrométrique de composés organiques, traduction de la cinquième édition américaine; De boeck; 1991.
- [13]: D.F.Shriver, P.W.Atkins, Chimie inorganique ; Traduction Française ; De Boeck. Université de paris.2001.
- [14] : J. Sanchez. Martin, J. Beltan-Haredr, Victor ; Journal of hazardous materiel;164(2009)713-719.
- [15] : R. Kumar, M.A. Barakat. Chemical Engineering Journal; 226(2013) 337-383.
- [16] : M. Ghaedi, H. Hosseinian. M.Montazerozohori; Desalination; 281(2011)226-233.
- [17] : K. Slimane; thèse de doctorat ; université de Tizi ouzou; 2013.
- [18]: J. Sanchez. Martin; thèse de doctorat; University of estremadura ; Spain ; 2011.
- [19] : S. Amel ; thèse de doctorat en co-tutelle entre université de Bordj Badji Mokhtar Annaba et université de Claude Bernard Lyon I; 2014.

- [20]: Charles H Giles, A. P D. Slivan, I. A. Easton; Journal of Colloid and Interface Science ; 47(1974) 589-805.
- [21] : A. ELY; Thèse de doctorat ; Université de Limoges ; 2010.
- [22]: A. Zazoua, R. Kherrat, D. Caballero, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, F. Bessueille, D. Léonard, Sens. Lett., 7 (2009) 1-6.
- [23] : H. Barhoumi, A. Maaref, R. Mlika, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, L. Ponsonnet, Material Sciences Engineering. C, 25 (2005) 433-548.
- [24] : R.M.silver stein, G.C. basler, T.C.Morill ; Identification Spectrométrique De Composés Organiques ; traduction de la cinquième édition américaine ; De boeck ; 1991.
- [25] : R.M.SILVER STEIN, G.C. BASLER, T.C.Morill ; Identification Spectrométrique De Composés Organiques ; traduction de la cinquième édition américaine ; De boeck ; 1991.
- [26] : B. Nigovic, M. Marusic, S. Juric; Electroanalytical chemistry; 633(2011) 1-227.
- [27] : N, Guigues ; S,Roy ; L,Vaute ; Projet de recherche 2001-MET-D04 ; BRGM; 2002.
- [28]: Hahne,H .C.H., Kroontje ; W. Journal of Environmental Quality; 2(1973) 345-350.
- [29]: Schmitt,H .W, Sticher H; New York, Basel Cambridge 3 (1991).
- [30]: Sposito G; Applied environmental geochemistry, Academic Press London; 1(1983).

Conclusion générale

L'objectif général de ce travail était la conception et le développement d'un biorécepteur pour la détection des métaux lourds dans les milieux hydriques réels.

Nous avons confirmé dans la première partie la présence des composés phénoliques dans l'écorce de *Punica Granatum L.* Ainsi nous avons obtenu un rendement d'extraction par acétone de l'ordre de 14%. De plus, les valeurs des résultats montrent la contenance d'une grande quantité en polyphénols. Les analyses qualitatives effectuées par chromatographie sur couche mince ont montré la présence d'une multitude de variétés de composés phénoliques.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin Ciocalteu a révélé la présence de quantités moyennement importantes en polyphénols. Le dosage des flavonoïdes et des tanins nous a mené à conclure l'existence de ces composés dans l'écorce de la plante. Ces résultats ont été confirmés par la technique chromatographique à haute performance (HPLC). Il ressort de ces analyses que notre écorce est riche en composés phénoliques.

La seconde partie de ce manuscrit a été consacrée à l'étude du mécanisme réactionnel du cuivre avec les polyphénols extraits. Nous avons étudié l'influence de quelques paramètres physicochimiques sur la réaction de complexation qui dépend beaucoup plus du pH de la solution. En revanche et d'après les résultats, les autres paramètres influencent peu le phénomène réactionnel. Nous avons pu démontrer au cours de cette étude l'absence de participation du cycle aromatique dans le processus de complexation qui a eu lieu au niveau des sites adjacents des polyphénols.

Dans la troisième partie, nous avons développé deux biorécepteurs pour la détection des ions métalliques. La partie réceptrice du premier a été réalisée en associant les polyphénols

avec un film polymérique mince jouant le rôle de matrice. Le deuxième en déposant sur les électrodes la partie sensible sous forme de gel après un traitement adéquat.

Les performances de ces capteurs ont été explorées par deux techniques électrochimiques à savoir la technique des impédances électrochimique et la voltammétrie à ondes carrées.

L'étude des phénomènes à l'interface polyphénols/ions métalliques et dans le but de tester la sensibilité des deux capteurs vis-à-vis des ions cuivre, cadmium, nickel et plomb par la spectroscopie d'impédance a révélée une diminution de la réponse du capteur proportionnellement à l'augmentation de la concentration en ions métalliques indiquant la migration des ions vers les membranes donc une augmentation de la conductivité ionique.

La validité de cette sensibilité a été vérifiée par la voltammétrie à ondes carrées qui a montré en premier lieu que l'intensité du courant augmente avec la concentration des ions métalliques. La détection simultanée des métaux en mixture a révélée l'apparition de quatre sommets à différents potentiel. Comparant ces résultats avec ceux obtenus individuellement nous avons pu identifier le potentiel correspondant de chaque métal.

Une comparaison entre la fiabilité et les performances des deux dispositifs a été réalisée. Les résultats ont montrés que le deuxième capteur est le meilleur du point de vue sélectivité, sensibilité et rapidité. Il a révélé d'excellents résultats du point de vu performances par rapport aux analyses effectuées sur différents échantillons réelles. Ainsi, face à toutes les difficultés rencontrées dans la détection simultanée, et en dépit de toutes les complexités possibles, nous avons réussi à l'aide de ce biocapteur à identifier quatre métaux lourds parmi les plus dangereux.

Ces résultats originaux sont très encourageants dans le domaine des capteurs électrochimiques. En toute modestie, on estime que nous avons ajouté un petit plus dans le domaine de la chimie analytique en développant ce genre de dispositifs bon marché, rapides, fiables et précis.

Cette étude ne doit pas s'arrêter là. Les dispositifs doivent être développés encore pour améliorer leur efficacité. De plus et dans un second temps, une amélioration du design est souhaitable pour une éventuelle commercialisation.

I. Caractérisation de molécules bioactives extraites de l'écorce de *Punica Granatum L.***I.1 Dosage des polyphénols totaux « l'acide gallique a été utilisé comme témoins »**

C (g/l)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	0.1
A (nm)	0.1068	0.1438	0.175	0.209	0.23	0.247	0.2659

I.2 Dosage des flavonoïdes « la quercétine a été utilisé comme témoins »

C (g/l)	0.5	1	1.5	2	2.5	3
A (nm)	0.1712	0.3262	0.3705	0.4755	0.6101	0.72006

I.3 Dosage des tanins « l'acide tanique a été utilisé comme témoins »

C (g/l)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
A (nm)	0.1381	0.2299	0.3152	0.3856	05006	0.5115

I.4 Dosage des tanins condensés « la catéchine a été utilisé comme témoins »

C (g/l)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
A (nm)	0.2951	0.3568	0.5846	0.7291	0.8212	0.994

I.5 Dosage des tanins hydrolysables « l'acide tanique a été utilisé comme témoins »

C (g/l)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
A (nm)	0.2087	0.3136	0.4158	0.5162	0.6648	0.7527

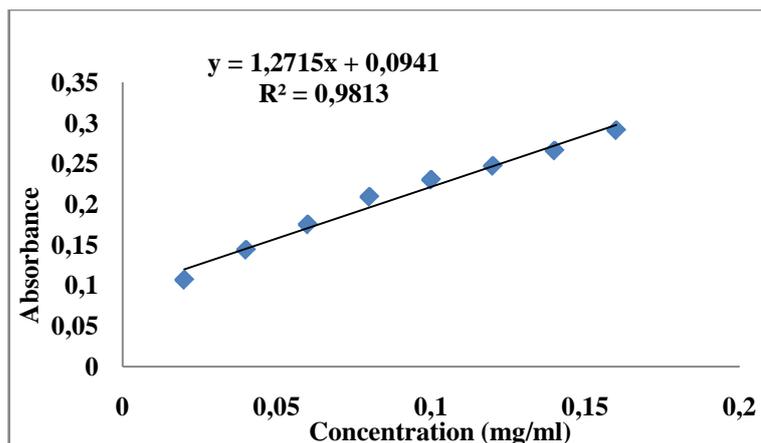


Figure I.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

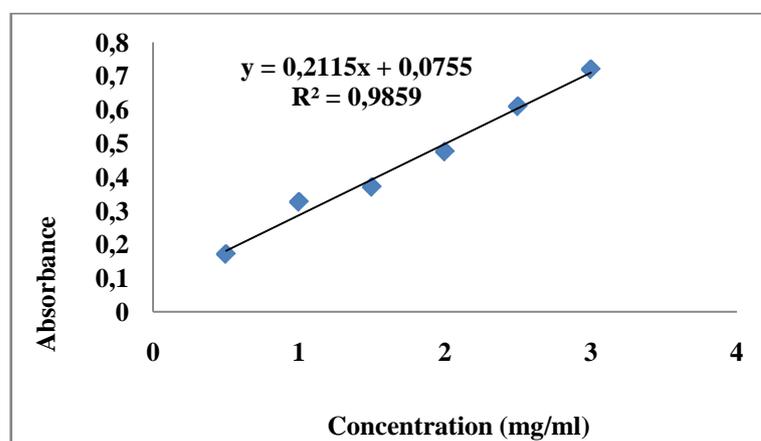


Figure I.2: Courbe d'étalonnage de La quercetine.

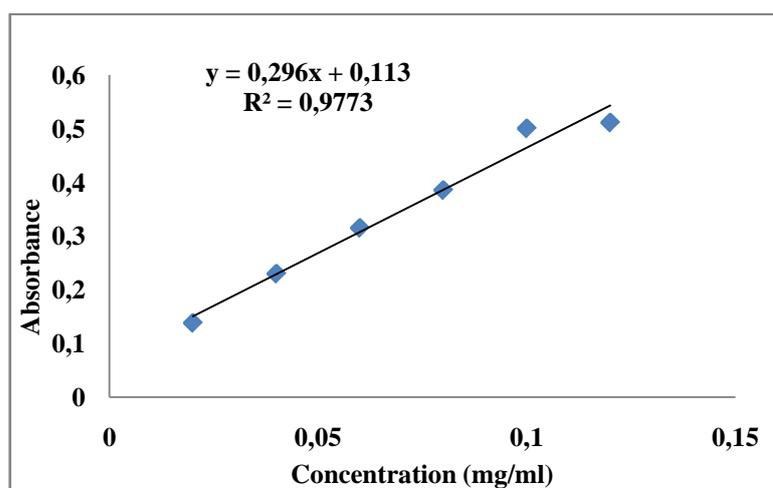


Figure I.3 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

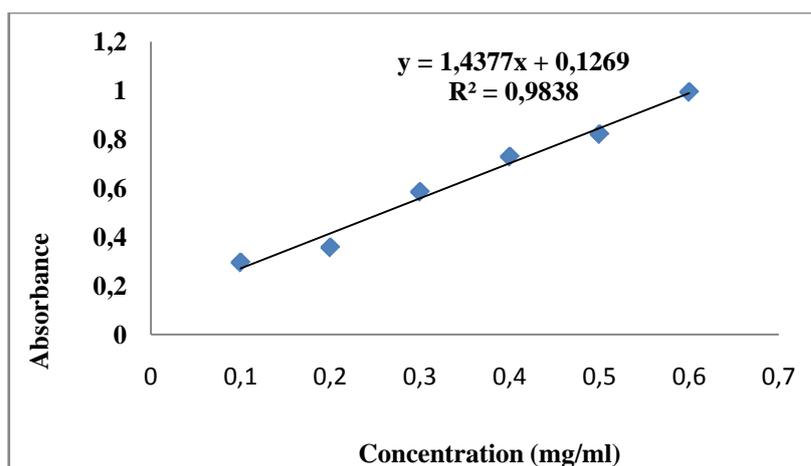


Figure I.4 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

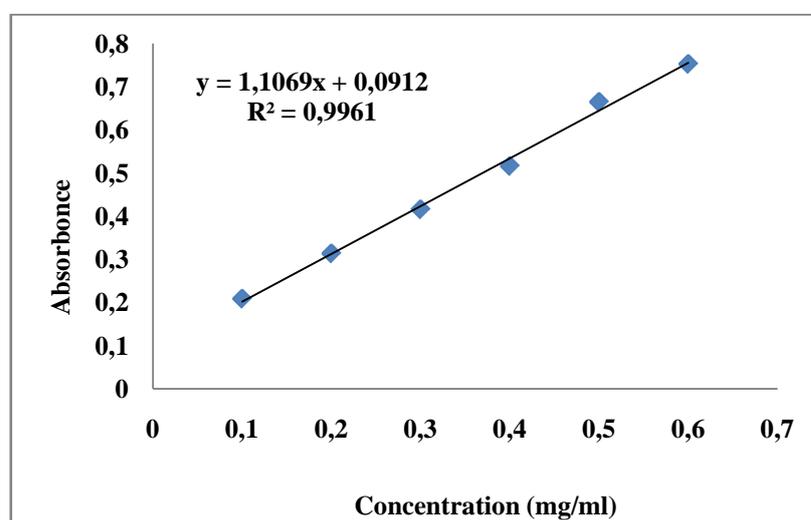


Figure I.5 : Courbe d'étalonnage de l'acide tanique.

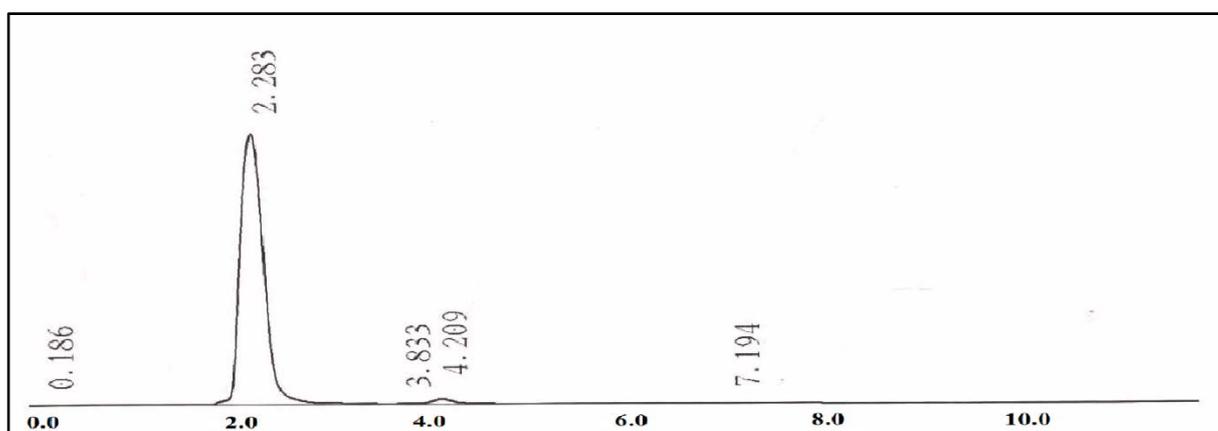


Figure I.6 : Profil de Chromatogramme HPLC de l'acide gallique.

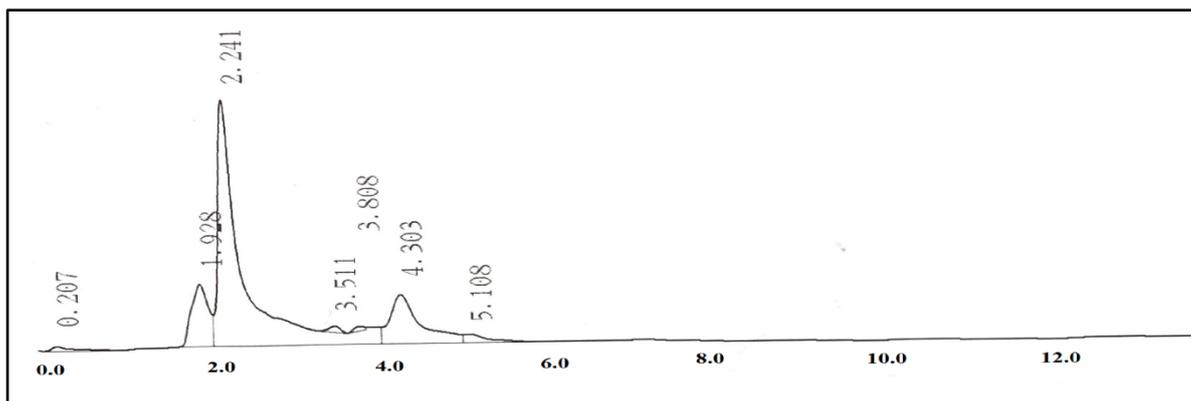


Figure I.7 : Profil de Chromatogramme HPLC de l'acide tanique.

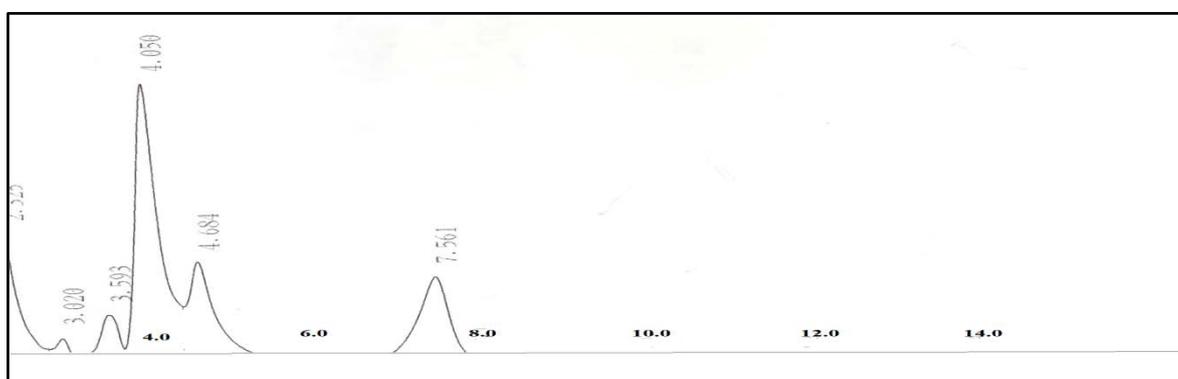


Figure I.8 : Profil de Chromatogramme HPLC de la quercétine.

II. Etude du mécanisme réactionnel entre le gel de polyphénols et le cuivre

II.1. Etablissement de la courbe d'étalonnage du cuivre

Dans des fioles de 50 ml, les solutions étalons ont été préparées à partir d'un volume V_i (ml) prélevé de la solution mère (10^{-1} mol/l) du cuivre.

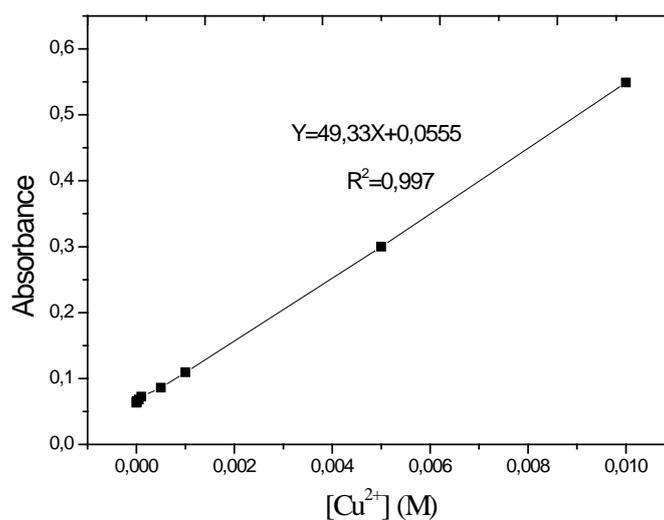
Nous avons fait une séparation des deux phases solide et liquide par centrifugation. Les différents échantillons prélevés, ont été analysés par spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible à la longueur d'onde 600 nm. L'évolution de la concentration au cours de l'analyse est calculée à partir de la courbe d'étalonnage. Pour favoriser la lecture de l'absorbance UV du cuivre, il faut ajouter à la solution 2 ml d'ammoniac [7 M] et 1.5 ml de chlorure d'ammonium pour former un complexe de couleur bleu foncé.

Les valeurs des concentrations C_i des étalons sont présentées sur le tableau

TableauII.1 : Etablissement de la courbe d'étalonnage.

Concentration (M)	10^{-6}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}
Absorbance	0.0642	0.0654	0.0681	0.0724	0.0851	0.1094	0.2999	0.5491

On utilisant la longueur d'onde maximale et on trace la courbe d'étalonnage.
 $\lambda_{\max} = 600 \text{ nm}$

**FigureII.1** : courbe d'étalonnage du cuivre au maximum d'absorption.**TableauII.2** : Effet de la concentration initiale en cuivre et du temps d'équilibre.

		t(min)	0	5	10	15	20	25
Co=2490 ppm	q_t	-	0	0.88	0.92	0.94	0.99	1
Co=20.9 ppm	q_t	-	0	0.0019	0.0069	0.0089	0.0129	0.0139
Co=0.249 ppm	q_t	-	0	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$1.37 \cdot 10^{-4}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	$1.55 \cdot 10^{-4}$	$1.57 \cdot 10^{-4}$
		30	40	50	60	75	90	
		1.02	1	1.01	1.03	1.07	1.02	
		0.0139	0.0139	0.0139	0.0139	0.0139	0.0139	
		$1.57 \cdot 10^{-4}$	$1.55 \cdot 10^{-4}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	

Tableau II.3: Les isothermes d'équilibre aux différentes températures.

Ce (mg/l)	0.025	0.14	0.2	0.5	1.25	2	2.54	2.88	6.12
qe(mg/l) T=20°C	0.22	0.6	1.04	1.24	1.24	5.49	9.94	14.55	18.94
qe(mg/l) T=30°C	0.009	0.04	0.03	0.07	0.72	1.27	1.47	2.42	5
qe(mg/l) T=50°C	0.24	0.7	1.2	1.67	1.77	6.2	10.98	15.05	19.95

Tableau II.4: Linéarisation du modèle de Langmuir à T=20°C

$\frac{1}{c_e}$	40	7.14	5	2	0.8	0.5	0.39	0.35	0.16
$\frac{1}{q_e}$	4,55	1,67	0,96	0,81	0,81	0,18	0,1	0,07	0,05

Tableau II.5 : Linéarisation du modèle de Langmuir à T=30°C

$\frac{1}{c_e}$	111,11	25	33,33	14,28	1.38	0.78	0.68	0.41	0.2
$\frac{1}{q_e}$	4,17	1,43	0,83	0,59	0,56	0,16	0,09	0,07	0,05

Tableau II.6 : Linéarisation du modèle de Langmuir à T=50°C

$\frac{1}{c_e}$	20	4,3	2,86	1,6	0.74	0.43	0.32	0.26	0.14
$\frac{1}{q_e}$	5,03	1,29	1,11	0,89	0,88	0,19	0,11	0,07	0,06

Tableau II.7 : Linéarisation du modèle de Freundlich: à T=20°C

Ln Ce	-3,69	-1,97	-1,61	-0,69	0,22	0,69	0,93	1,05	1,81
Ln qe	-1,05	-0,5	0,04	0,22	0,22	1,7	2,29	2,68	2,94

Tableau II.8 : Linéarisation du modèle de Freundlich: à T=30⁰C

Ln Ce	-4,7	-3,2	-3,51	-2,66	-0,38	0,24	0,39	0,88	1,61
Ln qe	-1,43	-0,36	0,18	0,51	0,57	1,82	2,39	2,71	2,99

Tableau II. 9: Linéarisation du modèle de Freundlich: à T=50⁰C

Ln Ce	-2,99	-1,47	-1,05	-0,48	0,3	0,85	1,13	1,36	1,96
Ln qe	-1,6	-0,65	-0,11	0,11	0,13	1,62	2,24	2,61	2,88

Tableau II.10 : Linéarisation du modèle de Temkin : à T=20⁰C

Ln Ce	-3.69	-1.97	-1.61	-0.69	0.22	0.69	0.93	1.05	1.88
Qe	0.22	0.6	1.04	1.24	1.24	5.49	9.94	14.55	18.94

Tableau II.11 : Linéarisation du modèle de Temkin : à T=30⁰C

Ln Ce	-4.7	-3.2	-3.51	-2.66	-0.33	0.24	0.39	0.88	1.61
Qe	0.24	0.7	1.2	1.67	1.77	6.2	10.98	15.05	19.95

Tableau II.12 : Linéarisation du modèle de Temkin : à T=50⁰C

Ln Ce	-2.99	-1.47	-1.05	-0.48	0.3	0.85	1.13	1.36	1.96
Qe	0.199	0.52	0.9	1.12	1.14	5.06	9.37	13.54	17.88

Tableau II.13 : Linéarisation du modèle d'Elovish : à T=20⁰C

Qe	0.22	0.6	1.04	1.24	1.24	5.49	9.94	14.55	18.94
Ln (Qe/Ce)	2.17	1.46	1.65	0.91	-8.03	1.01	1.36	1.62	1.13

Tableau II.14 : Linéarisation du modèle d'Elovish : à T=30⁰C

Qe	0.24	0.7	1.2	1.67	1.77	6.2	10.98	15.05	19.95
Ln (Qe/Ce)	3.28	2.86	3.69	3.17	0.89	1.59	2.01	1.83	1.38

Tableau15 : Linéarisation du modèle d'Elovish : à T=50⁰C

Qe	0.199	0.52	0.9	1.12	1.14	5.06	9.37	13.54	17.88
Ln (Qe/Ce)	1.38	0.82	0.94	0.95	-0.17	0.77	1.1	1.25	0.93

Tableau16 : Linéarisation du modèle du Dubinin et al à T=20⁰C

Ln Ce	-3.69	-1.97	-1.61	-0.65
ϵ^2	$8.18 \cdot 10^7$	$2.61 \cdot 10^7$	$1.91 \cdot 10^7$	$7.16 \cdot 10^6$

0.22	0.69	0.39	1.05	1.81
$2.05 \cdot 10^6$	$9.76 \cdot 10^5$	$6.54 \cdot 10^5$	$5.27 \cdot 10^5$	$13.6 \cdot 10^4$

Tableau II.17: Linéarisation du modèle du Dubinin et al à T=30⁰C

Ln Ce	-4.7	-3.2	-3.51	-2.66
ϵ^2	$1.41 \cdot 10^8$	$6.74 \cdot 10^7$	$7.94 \cdot 10^7$	$4.72 \cdot 10^7$

-0.33	0.24	0.39	0.88	1.61
$4.81 \cdot 10^6$	$2.14 \cdot 10^6$	$1.71 \cdot 10^6$	$7.6 \cdot 10^5$	$2.11 \cdot 10^5$

Tableau II.18 : Linéarisation du modèle du Dubinin et al à T=50°C

Ln Ce	-2.99	-1.47	-1.05	-0.48
ϵ^2	$6.68.10^7$	$2.03.10^7$	$1.31.10^7$	$6.65.10^6$

0.3	0.85	1.13	1.36	1.96
$2.22.10^6$	$9.13.10^5$	$5.61.10^5$	$3.97.10^5$	$1.26.10^5$