



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL

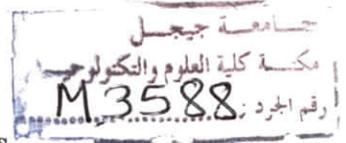
01/09

FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DE GENIES DES PROCÉDES

Mémoire pour l'obtention de Master en Génie des procédés

Option : Génie de l'environnement



Thème : Extraction des alcaloïdes et leur utilisation comme biocapteur pour la détection de l'urée.

Réalisé par : A. ABBACI

Encadré Par :

Professeur : A.ZAZOUA



Devant le jury composé de :

BELFERDI. Fatiha Université de JIJEL Présidente.

BOUFLIGHA. Sadek Université de JIJEL Examineur

Année universitaire 2016- 2017

Remerciements.

Je tiens à remercier notre promoteur Monsieur ZAZOUA Ali Professeur à l'université de JIJEL, pour la qualité de son encadrement, ses orientations et ses conseils, sa disponibilité et son esprit d'écoute et de communication, sont d'un apport conséquent dans la réalisation de ce modeste travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier madame BOURAOUI Sara et mademoiselle BOUBEZARI Imène Doctorantes au département génie des procédés de la faculté sciences et technologies de l'université de JIJEL, pour leurs soutiens, leurs orientations et surtout leurs disponibilités tout le long de cette période du projet de fin de formation,

Quelles trouvent ici mes vives remerciements et gratitude.

Son oublier M. HAROUCHE Kamel Docteur et chef de département au niveau du département Science de la matière pour sa disponibilité et son soutien.

Mes gratitude s'adressent également aux membres de jury :

- Madame BELFERDI Fatiha*
- Monsieur, BOUFLIGHA Sadek*

Pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie également tous les ingénieurs et techniciens des laboratoires.



Résumé

Le besoin en capteurs biochimique se fait de plus en plus ressentir, surtout dans le domaine biologique. Ces derniers permettent la détection précise et rapide d'une espèce chimique ou biologique ainsi que l'évaluation de sa qualité et de sa concentration.

Dans ce travail, nous avons essayé de développer un biocapteur à base d'alcaloïdes pour détecter l'urée. L'alcaloïde utilisé est la théobromine. Cette dernière a été extraite du cacao poudre et a été immobilisée sur une électrode en or comme partie sensible (biorécepteur).

La théobromine extraite a fait l'objet d'une caractérisation par :

- Infrarouge.
- Température de fusion.
- Chromatographie sur couche mince CCM.

Avant d'être utilisé sur le biocapteur, une étude cinétique de la réaction urée théobromine a été réalisée et les résultats ont montré une affinité entre la théobromine et l'urée.

Cette affinité a été confirmée par IR (spectre avant et après réaction).

La technique utilisée pour le dépôt de cet alcaloïde sur le biocapteur est la centrifugation (spin coating).

La théobromine ; avant d'être déposée a été mélangée avec d'autres additifs qui constituent en effet la membrane à déposer.

Les différentes membranes utilisées sont :

1. Cas de la membrane composée de (Théobromine extraite+ PVC+DOP solubilisés dans THF).
2. Cas de la membrane composée de (Théobromine extraite sans PVC+DOP solubilisés dans THF).
3. Cas de la membrane composée de (Théobromine commerciale sans PVC+DOP solubilisés dans THF).

Les voltamogrammes obtenus pour les différents biocapteurs ainsi que les courbes de calibrations, nous ont montrés clairement qu'une bonne sensibilité vis-à-vis de l'urée de la

membrane préparée à base de la théobromine extraite est meilleure par rapport aux autres membranes.

Aussi, et pour cette même membrane, la présence du PVC a diminué le transfert électronique à travers l'électrode et par la même l'activité de la membrane. Cette diminution se manifeste par un domaine d'intensité faible à différentes concentrations d'urée (Fig III.26) par rapport à la même membrane sans PVC.

La comparaison de la sensibilité vis-à-vis de l'analyte testé (urée) entre la théobromine extraite et celle commerciale, montre aussi que la membrane à base de la théobromine extraite est plus sensible comparativement à celle commerciale. La théobromine commerciale est à 99% pure.

Cette différence de sensibilité confirme la présence d'autres métabolites mélangés avec la théobromine extraite à partir du cacao. Ces métabolites ont réagi avec l'urée qui engendre une augmentation de la sensibilité de la membrane relative à la théobromine extraite.

Ces métabolites peuvent être des polyphénols par exemple qui sont présents dans le cacao.

Mots clés : Alcaloïde, théobromine, biocapteurs, urée.

Liste des Abréviations:

UV : Ultraviolet.

IR : Infrarouge.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

ECS : Electrode au Calomel Saturée.

MeOH : Méthanol.

nm : Nanomètre.

μL : Microlitre.

mV : Millivolt.

g : Gramme.

H_2SO_4 : Acide sulfurique.

-P[C] : -LOG[C].

EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy *ou* spectroscopie d'impédance Electrochimique.

E : potential.

PBS : Phosphate Buffer Solution *ou* solution de tampon phosphate.

PCR : Polymerase Chain Reaction *ou* réaction en chaîne par polymérase.

PPD : Poly (o-PhénylèneDiamine).

PVC : PolyVinylchloride.

DOP : Dioctylphtalate.

THF : Tétrahydrofurane.

ϵ_{sc} : Permittivité relative du semi-conducteur.

ϵ_0 : Permittivité relative du vide.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique.



Listes des abréviations

SWV : Voltamétrie à ondes carrées (square wave voltametry).

SWV : Electrode de travail (work electrod).

RE : Electrode de référence.

CE : Contre électrode.

Na₂HPO₄.2 H₂O : sodium phosphate dibasique di hydraté.

Na₂HPO₄. H₂O : sodium phosphate monobasique monohydrate.

F: constante de Faraday= 96500C.mol⁻¹.

R : la constante des gaz parfaits (8.314JK⁻¹.mol⁻¹).

E_P : représente le potentiel du couple redox.

E°_{Ox/Red} : le potentiel normal standard du couple redox.

q : représentant la charge par unité de surface (en Coulombs. Cm²).

Liste des figures :

Chapitre I: Partie Théorique

Fig I.1. Catharanthusroseus ou Pervenche de Madagascar dont les racines, contient raubasine possède des propriétés vasodilatatrices	4
Fig I.2. Structures chimiques de Colchicine.....	6
Fig I.3. Noyau purine.	6
Fig I.4. Structure de la caféine.....	6
Fig I.5: Structure chimique de la théobromine a) En 3D, b) Structure linéaire.	9
Fig I.6. Structure et représentation de la purine.....	10
Fig I.7. Le cacaoyer (Theobroma cacao)et ses graines dont contient 1-3% de la théobromine.....	11
Fig 1.8. Guarana Plante où la théobromine est présente en quantité minime, avec environ 5 mg pour 100 graines	11
Fig 1.9. La yerbamate, parfois appelée « thé du Paraguay », « thé des Jésuites » ou « thé du Brésil.....	11
Fig I.10. Schéma générale de spectrophotomètre UV-visible doubles fiscaux.	18
Fig I.11. Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire.	18

Chapitre II : Les Biocapteurs

Figure II.1. Schéma représentatif du principe d'un capteur.	23
Fig II.2. Principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	27
Figure II.3. La double couche électrochimique : distribution des charges, variation du potentiel électrique.	232
Figure II.4. Schéma d'une fonction de transfert	33
Figure II.5. Représentation des courants capacitif et courant faradique d'un métal dans une solution de NaCl et imposons à cette électrode un potentiel tel que sa charge soit négative	36

Figure II.6. Circuit équivalent de Randle.	36
Figure II.7. Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps.	40
Figure II.8. Voltamogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.	41

Chapitre III : Partie expérimentale

Fig III.1. Pesées du cacao et d'hydroxyde de magnésium.	45
Fig III.2. Evaporation du méthanol et l'eau.	45
Fig III.3. Agitation après ajout du DCM avec un agitateur magnétique pendant trois heures.	46
Fig III.4 Filtration sur Büchner et lavage avec 25 ml du DCM.	46
Fig III.5. Evaporation du DCM.	46
Fig. III.6. Théobromine Extraite à partir du Cacao qui constitue le rétentat du filtre.	43
Fig III.7. Fusiomètre utilisé pour la mesure de la température de fusion de la théobromine extraite.	48
Fig III.8. A. la pastilleuse utilisée en infrarouge.	49
Fig III.8 B. Appareil IR.	49
Fig III.9. Spectre Infrarouge de la théobromine extraite.	50
Fig III.10. Théobromine commerciale 99% pure.	51
Fig III.11. Caractérisation de la théobromine par la méthode CCM.	52
Fig III.12. Réaction de 0.05g d'urée et 0.1 g de la théobromine.	55
Fig III.13 Coloration des échantillons étalons	57
Fig III.14. Coloration des échantillons de la cinétique à intervalles du temps.	57
Fig III.15. Courbe d'étalonnage absorbance en fonction de la concentration.	58
Fig III.16. Pourcentage en concentration d'urée réagit sur théobromine en fonction du temps.	59
Fig III.17. Réaction urée théobromine.	60
Fig III.18. Spectre Infrarouge de la théobromine et de la théobromine après réaction avec l'urée.	60

Fig III.19. Dépôt de la membrane contenant la théobromine sur l'électrode d'or par spin coating.....	63
Fig III.20. La cellule électrochimique	64
Fig III.21. Dispositif de mesure électrochimique.....	65
Fig III.22 : Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composée de la théobromine extraite avec pvc suite à l'injection des concentrations croissantes d'urée.....	66
Fig III.23. Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite avec PVC.	66
Fig III.24. Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composée de la théobromine commerciale sans pvc suite à l'injection des concentrations croissantes d'urée.	67
Fig III.25. Courbe de calibration correspondante de la théobromine commerciale sans PVC.	68
Fig III.26. Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composée de la théobromine extraite sans pvc suite à l'injection des concentrations croissantes d'urée.	69
Fig III.27. Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite sans PVC.	70
Fig III.28. Les courbes de calibration superposées correspondants aux trois membranes.	71
Fig III.29. Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composée de la théobromine extraite sans pvc suite à l'injection d'un mélange d'urée et de la créatine 10^{-4} et 10^{-6} respectivement.	72
Fig III.30. Pics séparés relatifs au Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composée de la théobromine extraite sans pvc suite à l'injection d'un mélange d'urée et de la créatine 10^{-4} et 10^{-6} respectivement.....	72

Liste des Tableaux :

Chapitre I: Partie Théorique

Tableau I.1 : Contenu en théobromine en mg pour 1 g de produits 12

Chapitre III : Partie expérimentale

Tableau III.1 : .préparation de la solution d'urée pour tracer la courbe d'étalonnage 54

Tableau III.2 : Absorbance en fonction de la concentration de la courbe d'étalonnage 57

Tableau III.3 : Absorbance en fonction du temps 58

Tableau III.4 : Tableau récapitulatif de la cinétique (Urée/Théobromine)..... 59

Tableau III.5 : Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite avec PVC 66

Tableau III.6. : Courbe de calibration correspondante de la théobromine commerciale sans PVC 68

Tableau III.7: Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite sans PVC 69

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------------	---

CHAPITRE I

Généralités sur Alcaloïdes

I. Généralités sur Alcaloïdes	3
I.1 Introduction	3
I.2. Origine des alcaloïdes	4
I.3. Historique des alcaloïdes	5
I.4. Constitution chimiques et classification	6
I.4.1. Alcaloïdes non hétérocyclique.....	6
I.4.2. Alcaloïdes hétérocycliques.....	6
I.5. Caractéristiques des alcaloïdes	6
I.5.1. Propriétés physico-chimiques.....	6
I.5.2. Intérêt des alcaloïdes	7
I.5.3. Extraction des alcaloïdes.....	8
I.5.3.1. Par solvant apolaire en milieu alcalin.....	8
I.5.3.2. Par solvant polaire (acide, alcool).....	8
I.5.4. Réaction de précipitation des alcaloïdes.....	9
I.6. La Théobromine	9
I.6.1 Définition de la Théobromine.....	9
I.6.2. Effets thérapeutiques et effet indésirables.....	12
I.6.3. Propriétés physico-chimiques de la théobromine.....	12
I.6.4. Solubilité de la théobromine.....	13

I. 7. Extraction de la Théobromine	13
I.7.1. Principe de l'extraction solide/liquide	13
I.7.2. Protocole d'extraction de la Théobromine	14
I.8. Caractérisation de la théobromine extraite	14
I.8.1. Caractérisation par mesure de la température de fusion	14
I.8.2. Caractérisation par spectroscopie Infrarouge	15
I.8.3. Caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)	15
I.8.3.1. Définition	15
I.8.3.2. Principe de la technique	16
I.8.3.3. Applications de la CCM	16
I.8.4. Spectrophotométrie UV-Visible	17
I.8.4.1. Définition et principe de la spectroscopie UV-Visible	17
Références Bibliographiques	19

CHAPITRE II

Les Capteurs Chimiques (Biocapteurs)

II. Les Capteurs Chimiques (Biocapteurs)	22
II.1 : Généralités sur les capteurs chimiques/Biocapteurs	22
II.1.1. Définition d'un capteur chimique	22
II.1.2. Principe et fonctionnement	23
II.1.3 Constitution d'un capteur	23
II.2. Les différents types des capteurs chimiques	24
II.2.1. Les capteurs électrochimiques	24
II.2.2. Les capteurs potentiométriques	24
II.2.3. Les capteurs ampérométriques	25
II.2.4. Les capteurs conductimétriques	25

II.2.5. Capteur impédimétrique.	26
II.2.6. Les capteurs optiques.	26
II.2.7. Les capteurs thermiques.	26
II.3. Les biocapteurs.	27
II.3.1. Paramètres & caractéristiques des biocapteurs.	28
II.4. Méthodes de caractérisation.	29
II.4. 1. Méthodes de caractérisation électrochimiques.	29
II.4.1.1. Comportement d'un métal seul.	29
II.4.1.2. Interface électrode/électrolyte.	30
II.4.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique conventionnelle ou SIE.	33
II.4.2.1. Définition et principe.	33
II.4.2.2. Variation du potentiel et mesure du courant.	35
II.4.2.3 Circuit électrique équivalent.	36
II.4.2.3.1 Les éléments d'un circuit équivalent.	36
II.4.2.3.2. Représentation graphique de l'impédance.	39
II.4.3 Voltamétrie à signaux carrés de potentiel (Square Wave Voltammetry, SWV).	39
Références bibliographiques.	42

Chapitre III

Partie Expérimentale

III.1 Introduction.	44
III.2 Extraction de la théobromine.	45
III.2.1 Protocole d'Extraction.	45
III.2.2 Caractérisation de la théobromine extraite.	48
III.2.3.1 Mesure du point de fusion.	48

III.2.3.2 Spectroscopie infrarouge.....	49
III.2.3.3 Chromatographie sur couche mince.....	51
III.3 Etude cinétique de la réaction théobromine /urée.	53
II.3.1 Introduction.....	53
III.3.2 Solution Tampon phosphate.....	53
III.3.2.1 Préparation de la solution tampon phosphate (phosphate Buffer PH 5.8 – 8.0 à 25C°).....	53
III.3.3 Préparation de la solution urée pour la courbe d'étalonnage.	54
III.3.4 L'étude cinétique de la réaction urée théobromine.....	55
III.3.4.1 La réaction d'urée avec la théobromine	55
III.3.4.2 Dosage de l'urée par la méthode de Berthelot modifiée.	56
III.3.5 Lecture de l'absorbance des différents échantillons sur Spectrophotométrie UV-Visible, longueur d'onde 590 nm.....	57
III.3.5.1 Courbe d'étalonnage.	57
III.3.5.2 Résultats de la cinétique théobromine/urée.....	58
III.4 Fonctionnalisation des électrodes (Théobromine comme partie sensible d'un biocapteur biologique)	61
III.4.1. Nettoyage des électrodes.....	61
III.4.2. Préparation de la membrane et conception du capteur.....	61
III.4.3 Dépôt d'une quantité du mélange sur l'électrode en OR, méthode de spin-coating.	62
III.4.4 Caractérisation électrochimiques.....	63
III.4.4.1 Cellule électrochimique.....	63
III.4.4.2 Montage expérimental des caractérisations électrochimiques.....	64
III.5 Sensibilité du capteur Au/membrane déposée vis-à-vis de l'urée en utilisant la technique de voltamétrie à ondes carrées SWV	65
III.5.1 Cas de la membrane composée de (Théobromine extraite+ PVC+DOP solubilisés dans THF).	65
III.5.1.1 Courbes obtenues par la technique du voltamétrie à ondes carrées (SWV).....	65
III.5.1.2 Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite avec PVC.....	66

III.5.2 Cas de la membrane composée de (Théobromine commerciale sans PVC+DOP solubilisés dans THF).	67
III.5.2.1 Courbes obtenues par la technique du voltamétrie à ondes carrées (SWV).....	67
III.5.2.2 Courbe de calibration correspondante de la théobromine commerciale sans PVC.	68
III.5.3 Cas de la membrane composée de (Théobromine extraite sans PVC+DOP solubilisés dans THF).	68
III.5.3.1 Courbes obtenues par la technique du voltamétrie à ondes carrées (SWV).....	69
III.5.3.2 Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite sans PVC.	69
III.5.4 Les courbes de calibrations superposées.....	70
III.6 Teste de la membrane composée de la (Théobromine extraite sans PVC+DOP solubilisés dans THF) sur un mélange d'analytes.	71
Références Bibliographiques.....	73
Conclusion et perspectives.....	74

Introduction générale :

L'évolution de la recherche scientifique et de la technologie ne cessent de trouver des solutions ou de faciliter la résolution des problèmes qui sont considérés auparavant comme complexe ou difficile à résoudre. A titre d'exemple, on cite l'évolution des capteurs chimiques et leurs applications dans différents domaines.

Ces derniers permettent la détection d'une espèce chimique ou biologique ainsi que l'évaluation de ses qualités et de sa concentration.

La nouveauté des capteurs d'une manière générale réside dans leur précision, leurs rapidité d'exécution et à moindre coûts comparativement aux instruments classiques d'analyses qui sont généralement, complexes, coûteux, volumineux et sont souvent difficile à mettre en œuvre.

Les capteurs constituent donc une solution alternative intéressante par rapport aux techniques d'analyses traditionnelles comme la chromatographie la spectrophotométrie....etc.

De nos jours, les progrès de recherches dans les domaines chimiques, biologiques et microélectroniques ont permis de mettre en œuvre de nouveaux capteurs de plus en plus performants, en particulier les capteurs biologiques qui suscitent un intérêt particulier de par leurs champs d'applications divers et variés dans les domaines médicaux, agroalimentaires et environnementales.

En effet, la performance des biocapteurs réside dans leur partie sensible qui sera en contact avec l'espèce à analyser et qui constitue le plus d'intérêt. La priorité est ainsi de développer des biocapteurs présentant une grande sensibilité.

C'est dans cet esprit, que nous avons essayé d'utiliser un alcaloïde comme partie sensible d'un biocapteur. L'alcaloïde a été déposé sur une électrode en or afin de tester sa sensibilité envers certains analytes. Nous avons pris l'urée comme référence, car sa détection et son analyse quantitative constituent une importance capitale dans le domaine médical.

Nous avons pris comme alcaloïde la théobromine. Notre choix est motivé par les bonnes caractéristiques chimiques et thérapeutiques de cette dernière.

Il est à signaler que la norme de concentration d'urée chez l'homme est de 0.5 g/L.



Notre alcaloïde (théobromine) a été extraite du cacao poudre et a été déposée sur l'électrode en or par la méthode de spin coating.

Ce manuscrit est composé de trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à un recueil bibliographique donnant une présentation générale des alcaloïdes, leurs caractéristiques, leurs extractions et les méthodes de leurs caractérisations.

Dans le second, nous présentons un recueil bibliographique sur les capteurs, types et caractéristiques.

Enfin, le dernier chapitre, englobe tous nos résultats concernant le mode de caractérisation ainsi que la sensibilité des biocapteurs développés à base d'alcaloïdes (théobromine envers les analytes considérés).



Chapitre I : **Partie théorique**

Chapitre I : Partie Théorique

I. Généralités sur Alcaloïdes:

I.1. Introduction :

Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétale, azotés basiques (ordinairement hétérocycliques), de propriétés physiologiques et toxicologiques remarquables. Leur constitution est d'une variété exceptionnelle. Le défi que présentaient ces systèmes cycliques complexes, tant du point de vue de leur constitution que de leur synthèse, a fait l'objet des recherches approfondies d'une foule de chercheurs de grand talent [1]. On estime actuellement que plus de 8 000 composés naturels ont été identifiés comme alcaloïdes.

Chaque année, une centaine de nouvelles molécules seraient ajoutées par les scientifiques du monde entier [2], leur nom peut être décomposé par la racine alcali* signifiant "base ou à caractère alcalin ou basique" et le suffixe -oïde* signifiant, "semblable à, de même forme, de même comportement". Le suffixe d'origine gréco-romaine dérive du grec "forme". La racine vient de l'arabe al-qétiyi par sa forme commune al qate, al qaly "la soude" – fait référence à leur caractère « alcalin » ou « basique »[3].

En général les alcaloïdes sont des substances:

- Azotées,
- À caractère basique,
- Presque toujours hétérocycliques (azote dans le cycle),
- À structure souvent complexe,
- Le plus souvent d'origine végétale mais aussi issues de microorganismes, d'organismes marins et d'animaux,
- dont l'activité physiologique et pharmacologique est souvent marquée.

Tous les noms d'alcaloïdes portent une terminaison commune en « -ine », comme la nicotine, la caféine, l'atropine, l'ibogaïne, l'émétine, l'ergine ou la morphine.

Pour être rangée parmi les alcaloïdes, une substance doit répondre à cinq **critères** :

- ✓ Rattachement aux molécules organiques ;
- ✓ présence d'azote, formation de sels ;

- ✓ activité physiologique, obtention de dérivés insolubles avec certains réactifs dits « réactifs généraux des alcaloïdes » ;
- ✓ La formation de sels n'est pas rigoureusement respectée : ainsi la caféine et la colchicine, non salifiables, sont cependant assimilées aux alcaloïdes par la plupart des chimistes [4] ;
- ✓ Les molécules d'alcaloïdes à l'état pur, les plus connues, sont souvent hautement toxiques comme la strychnine, l'aconitine, l'atropine, la cocaïne... mais certaines, du fait de leur action physiologique puissante, sont efficacement employées en dosage mesuré et contrôlé dans la médecine ou thérapeutique moderne. Il s'agit, par exemple, de propriétés analgésiques avec la morphine ou la codéine [5].

I.2. Origine des alcaloïdes :

La source principale des alcaloïdes est les plantes, dans une seule plante on peut trouver 100 alcaloïdes [6].

La teneur en alcaloïdes se différencie d'une partie à une autre et selon la période de récolte et les conditions de croissances, ainsi que la région (influence du sol, climat, ...).

En général les alcaloïdes ne se concentrent pas dans une seule partie de la plante. Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles.



Fig I.1. Catharanthus roseus ou Pervenche de Madagascar dont les racines, contiennent la Raubasine possède des propriétés vasodilatatrices.

I.3. Historique des alcaloïdes :

- La connaissance et l'usage des plantes à alcaloïdes, comme le pavot à opium ou l'aconit, sont très anciens, mais la connaissance de leurs substances actives ne date que du **début du XIXe siècle** [7].
- **1803** Charles Derosne, pharmacien et industriel français est le premier à isoler un alcali végétal en extrayant de l'opium un mélange de narcotine et de morphine. Mais il attribue la nature alcaline de son extrait à des résidus de préparation.
- **1804** Armand Seguin rapporte avoir trouvé un procédé de préparation de la morphine, mais il ne publie ses résultats qu'en 1814.
- **1805** En Westphalie, un assistant en pharmacie, Friedrich Sertürner, reconnaît la nature alcaline du principe somnifère de l'opium. Une dizaine d'années plus tard, il le nommera morphium en référence à Morphée, divinité des rêves dans la Grèce antique. Passées inaperçues à l'époque, ces découvertes faites en France et en Allemagne ne sont reconnues qu'en 1817, avec la preuve apportée par Sertürner que la morphine réagit avec l'acide pour former un sel [8].
- **1817-1820** Deux pharmaciens français, Pelletier et Caventou, découvrent une impressionnante série de composés actifs : caféine, émétine (de l'ipéca), strychnine (de la noix vomique), quinine et cinchonine (de l'écorce de quinquina). à partir de ce moment, les recherches sur l'isolement des alcaloïdes vont se développer.
- **1819** Le terme "alcaloïde" est créé par un pharmacien de Halle, Wilhelm Meissner (1792-1853).
- **1837**, le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius, dans son dictionnaire de chimie, accorde une partie aux "sels des bases végétales" où les alcaloïdes étaient désignés sous forme de symboles.
- **1870** l'élucidation des structures chimiques des alcaloïdes débute seulement avec celle de la plus simple, la coniine, par Schiff, et certains ne révéleront leur structure qu'à la fin du XXe siècle. Maurice-Marie Janot et ses élèves en isoleront, analyseront et synthétiseront plus d'une centaine, dont en 1953, la structure de la corynanthéine, étape majeure dans le progrès de la chimie des alcaloïdes.

I.4. Constitution chimiques et classification :

Selon que l'azote soit engagé dans un cycle ou non on a:

I.4.1. Alcaloïdes non hétérocycliques: Ils sont rares, on cite à titre d'exemples la colchicine.

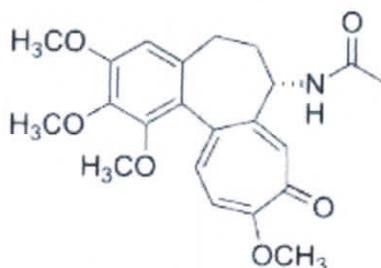


Fig I.2. Structures chimiques de Colchicine.

I.4.2. Alcaloïdes hétérocycliques : Ils sont plus nombreux, ils peuvent être mono ou polycycliques. A titre d'exemple on cite les dérivées purines.

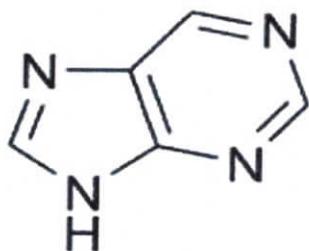


Fig I.3. Noyau purine.

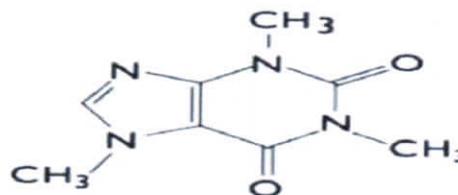


Fig I.4. Structure de la caféine.

I.5. Caractéristiques des alcaloïdes :

I.5.1. Propriétés physico-chimiques :

- ✓ La masse moléculaire des alcaloïdes varie entre 100 et 900 g/mol [9].
- ✓ Les alcaloïdes et leurs sels sont en général des produits solides cristallisés caractérisés par un point d'ébullition propre. Certains alcaloïdes sont amorphes se trouvant sous forme de cires. D'autres alcaloïdes de faibles points d'ébullitions sont à l'état liquide sous forme d'huiles dont la viscosité variante.
- ✓ Les alcaloïdes dans le cas général sont des produits incolores, sans odeurs spécifique, particulièrement ceux qui ayant de faible points d'ébullition [10].
- ✓ L'amertume est un caractère quasi constant qu'il n'est cependant pas recommandé de vérifier en raison de la toxicité des produits.

- ✓ Les alcaloïdes sont, en général, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants dits « organiques » (alcools, acétone, chloroforme, oxyde d'éthyle, etc.) tandis que leurs sels ont des caractères de solubilité inverses [11].
- ✓ La plupart des alcaloïdes sont basiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent fixer un proton (ion H⁺) sur un atome d'azote.

I.5.2. Intérêt des alcaloïdes :

Du fait de leurs rôles physiologiques ou de leurs activités biologiques spécifiques, les molécules alcaloïdes restent des importants réactifs biologiques. Elles présentent un intérêt toujours actuel en thérapeutique [12].

Si la recherche des principes actifs continue activement en ce qui concerne les plantes médicinales et/ou toxiques, les alcaloïdes connus sont des produits de base de la pharmacie [13].

- Parmi les effets physiologiques que l'on peut noter pour certains d'entre eux, on trouve :
 - des effets sur l'activité cérébrale et le système nerveux : stimulant, euphorisant, excitant, hallucinogène, antalgique, hypnotique, paralysant, tétanisant, dilatateur ou constricteur de la pupille, vomitif...
 - des effets sur le système cardio-vasculaire : régulateur de la tension sanguine (hypertension, hypotension), anti arythmique, bronchodilatateur....
 - Mais aussi, sans action directe sur le système nerveux : lutte contre le paludisme inhibiteur de division cellulaire....

A titre d'exemple on peut citer :

- La colchicine du colchique est un remède anti-inflammatoire spécifique des accès douloureux de la goutte.
- La nicotine est un insecticide végétal naturel, ses effets sont multipliés si le composé toxique de la nicotine est ajouté à une émulsion d'huile végétale, dite huile blanche. L'ensemble est assez vite biodégradable.
- Aussi, la ryanodine a été employée comme insecticide végétal [14].



I.5.3. Extraction des alcaloïdes :

Les alcaloïdes se trouvent le plus souvent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques, et parfois leur combinaison (notamment les tanins), on pulvérise les plantes avec un alcalin. Leur mode d'extraction est très variable selon la nature de l'alcaloïde, mais on trouve habituellement deux schémas d'extraction :

I.5.3.1. Par solvant apolaire en milieu alcalin :

La plante sèche est pulvérisée et humectée avec une solution aqueuse alcaline (chaux, l'ammoniaque NH_4^+OH^- , soude pour déplacer les bases fortes).

- Extraction avec un solvant organique non polaire.
- Le marc (résidu) est éliminé.
- La solution organique (alcaloïdes, lipides, pigments...) est conservée.
- Concentration par un chauffage doux, ou par un évaporateur rotatif.
- On réalise sur le concentré un épuisement par un acide dilué (généralement on utilise l'acide sulfurique 0.5N), puis on procède à une extraction (liquide-liquide).
- La solution aqueuse acide est alcalisée.
- Réalisation d'un nouvel épuisement par un solvant organique non miscible (éther, chloroforme, xylène).
- On obtient une solution organique alcaloïde, qu'il faut alors concentrer par évaporation.
- On obtient alors un résidu d'alcaloïdes bruts.

I.5.3.2. Par solvant polaire (acide, alcool) :

- La plante sèche est pulvérisée en présence d'alcool acide.
- On procède à une lixiviation (technique d'extraction de produits solubles par un solvant, et notamment par l'eau).
- Le marc est rejeté.
- La solution extraite (alcaloïdes, amines, résines, pigments) est évaporée.
- Cette solution est reprise par un acide dilué (la solution aqueuse acide obtenue contient des sels d'alcaloïdes impurs).
- La solution aqueuse acide est alors alcalinisée pour saponifier les sels d'alcaloïdes.
- On procède ensuite à l'épuisement par un solvant non miscible (éther, xylène, chloroforme).
- On sépare la solution organique d'alcaloïdes.
- On évapore cette solution pour obtenir un résidu d'alcaloïdes bruts.

Pour terminer, on procède aux réactions de précipitation des alcaloïdes pour vérification.

I.5.4. Réaction de précipitation des alcaloïdes :

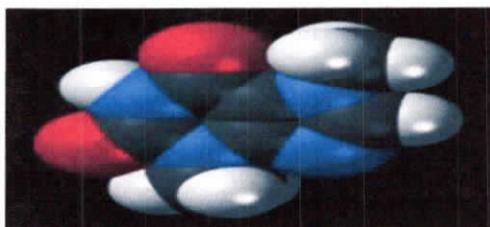
Les alcaloïdes précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes » [15].

Cette réaction est fondée sur la capacité des alcaloïdes à se combiner aux métaux lourds (Bismuth, Mercure, Iode...) en milieu **aqueux légèrement acide**, Il en existe plusieurs types :

- Réactif de Valser-Meyer (tétra-**iodomercure**de potassium): précipité blanc jaunâtre
- Réactif de Dragendorff (tétra **iodobismuthate**de potassium): précipité rouge orangé
- Réactif de Bouchardat (**Iodoiodurée**de potassium): précipité brun
- Réactif de Bertrand (réactif **Silicotungustique**) : précipité blanc jaunâtre
- **Acide picrique** et les tanins.

I.6. La Théobromine :

a)



b)

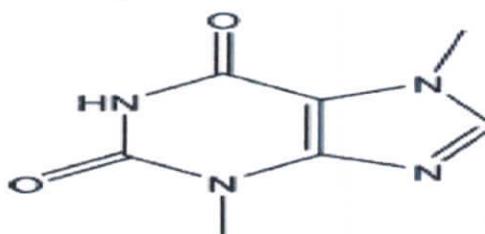


Fig I.5: Structure chimique de la théobromine

a) En 3D, b) Structure linéaire.

I.6.1 Définition de la Théobromine :

La théobromine est un alcaloïde qui fait parti de la famille **des Purines Xanthines** : caféine, théobromine, théophylline de la famille des méthylxanthines dont la structure est similaire au caféine et à la Théophillyne [16].

La purine est une molécule azotée hétérocyclique constituée d'un cycle pyrimidine fusionné à un cycle imidazole. C'est l'hétérocycle azoté le plus répandu dans la nature [17].

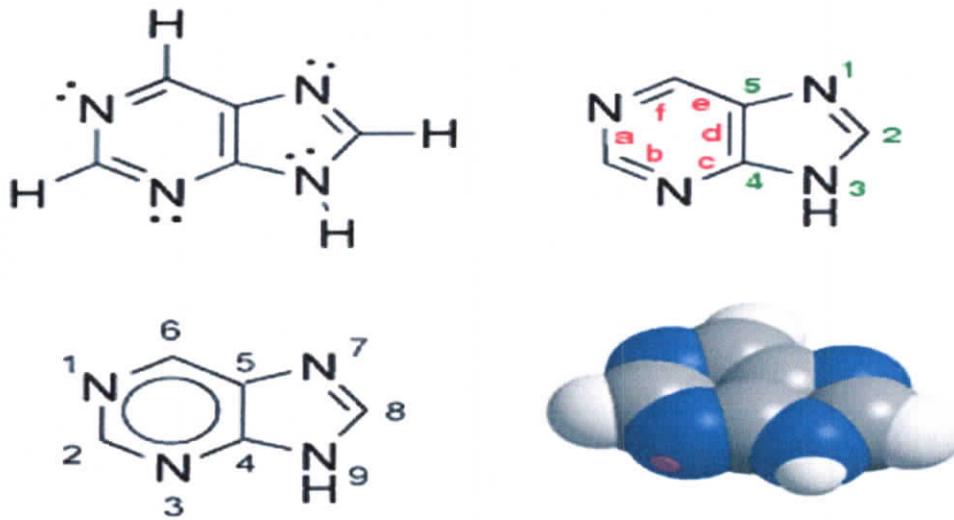


Fig I.6. Structure et représentation de la purine

En dépit de son nom, ce composé ne contient pas d'atomes de brome. L'éthymologie de son nom est Theobroma, mot grec constitué des racines suivantes :

Theo : Dieu et Bromo : nourriture, soit « nourriture des dieux », à quoi est ajouté le suffixe « -ine » caractéristique des alcaloïdes.

La théobromine est une substance présente dans le chocolat et elle est responsable des effets du chocolat sur notre humeur. En effet, elle bloque les récepteurs de l'adénosine contenus dans le cerveau (tout comme la caféine et la théophylline) et stimule les influx nerveux (un peu comme le cannabis, lequel est classée dans les **drogues** dans de nombreux pays).

Elle possède un pouvoir diurétique et stimulant.

Le chocolat noir (le vrai) en contient entre 0,04 et 0,50 g pour 100 g ref. Si pour les humains la théobromine est sans danger, car nous possédons des enzymes capables de la dégrader, il n'en n'est pas de même pour certains animaux, tels que les chiens et chats. C'est pour cette raison qu'il ne faut pas leur donner de chocolat : ils l'aiment mais elle est mortelle pour eux.

La théobromine est l'alcaloïde principal du cacao ; il stimule les activités physiques et intellectuelles avec des effets bénéfiques pour la santé. C'est un stimulant cérébral qui fournit de l'énergie et favorise un état de bien-être.

Aujourd'hui cette molécule est utilisée en médecine tant qu'un diurétique, vasodilatateur et cardio-stimulant.

La molécule de la théobromine a été extraite pour la première fois des graines de cacao en 1878 [18].



Fig 1.7. Le cacaoyer (*Theobroma cacao*) et ses graines dont contient 1-3% de la théobromine [19].

Le cacaoyer (*Theobroma cacao*) est un arbre de 5m de haut environ, portant des cabosses (dont l'intérieur ressemble à des épis de maïs) qui regroupent 25 à 60 graines aplaties (appelées fèves de cacao).

La théobromine est donc présente dans les graines du cacaoyer (1-3 %), dans les feuilles du maté (0,45-0,9 %), dans le guarana (0,02 à 0,06).



Fig 1.8. Guarana Plante où la théobromine est présente en quantité minime, avec environ 5 mg pour 100 graines [20].



Fig 1.9. La yerbamate, parfois appelée « thé du Paraguay », « thé des Jésuites » ou « thé du Brésil » [21].

Tableau I.1 contenu en théobromine en mg pour 1 g de produits [22].

Source	Contenu en théobromine en mg pour 1 g de produit
Poudre de cacao	5,3–26
Paillis fait avec l'enveloppe extérieure de la cabosse de cacaoyer	14–30
Fève de cacao	11–43
Chocolat noir	4,5–16
Chocolat blanc	0,009
Chocolat au lait	1,5–2,2
Chocolat à boire	0,5

I.6.2. Effets thérapeutiques et effet indésirables :

En médecine, la théobromine est utilisée comme diurétique, vasodilatateur et cardiostimulant. La théobromine est aussi connue pour induire des mutations génétiques sur les eucaryotes primitifs et sur les bactéries [23].

La théobromine est un facteur aggravant des reflux acides gastro-œsophagiens, car elle relâche les muscles du sphincter gastro-œsophagien, permettant aux acides gastriques d'accéder à l'œsophage [24].

I.6.3. Propriétés physico-chimiques de la théobromine:

- **Formule brute:** $C_7H_8N_4O_2$.
- **Nom chimique:** 3,7-dihydro-3,7-diméthyl-1H-purine-2,6-dione.
- **Masse molaire :** 180,164 g/mol.
- **PKa:** 7.89 à 18 °C.
- **Température de sublimation:** 290°C
- **Température de fusion:** 345 à 350 °C

- **Aspect:** poudre ou flocons blancs.

I.6.4. Solubilité de la théobromine:

Elle est peu soluble dans l'eau à pH neutre et dans les solvants organiques.

Par contre, elle est bien soluble dans l'eau :

- ✓ En milieu acide (car on peut fixer un proton sur le doublet d'un azote) ;
- ✓ En milieu basique (car on peut alors dé-protonner l'amine entre les deux cétones qui a un pKa d'environ 10).

I. 7. Extraction de la Théobromine :

I.7.1. Principe de l'extraction solide/liquide :

Le champ d'application de l'extraction solide-liquide étant très vaste, le grand nombre de vocables employés pour définir les opérations et les produits circulants impose la définition de quelques termes couramment utilisés.

Le liquide d'extraction, appelé **solvant**, dissout un (ou plusieurs) composant cristallisé ou liquide, dénommé **soluté**, pour donner une **solution** ou **extrait** (solvant + soluté) et laisse un solide *épuisé*, appelé **résidu**, **inerte** ou **insoluble**, contenant très peu ou pas de soluté. L'extraction solide-liquide est donc, une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, la matière à extraire, et une phase liquide, le solvant d'extraction, les constituants recherchés pouvant être soit le soluté, soit le résidu [25].

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes énumérées ci-après.

- La **lixiviation** ou **lessivage**, traduit en anglais par *leaching*. Le solide, finement divisé, est mis en contact avec un solvant, chaud ou froid, qui solubilise le soluté.
- La **percolation** consiste à laisser couler un solvant généralement chaud sur un lit de solides finement divisés afin de dissoudre les composants solubles qui y sont contenus. La préparation du café relève de cette opération.
- La **décoction** est l'opération dans laquelle le solide est mis à bouillir dans un liquide en vue d'extraire les parties solubles.

- L'**infusion** est la mise en suspension d'un solide dans un liquide chaud (proche de l'ébullition) ou l'arrosage du solide par ce liquide, afin de dissoudre les constituants utiles, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération [18].
- La **macération** est la mise en contact plus ou moins prolongé à froid d'un solide dans un solvant en vue d'extraire les parties solubles.
- La **digestion** est une macération à chaud. Cette opération et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie.
- L'**élution** consiste à enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par simple contact avec un solvant. C'est l'opération complémentaire à la fixation dans les opérations d'échange d'ions. Elle est fréquemment employée dans les méthodes d'analyses (chromatographie).

Dans notre cas, il s'agit d'une lixiviation ou lessivage qui consiste à la mise en contact d'un solide finement divisé avec un solvant d'attaque froid ou chaud qui solubilise le soluté [26].

I.7.2. Protocole d'extraction de la Théobromine :

Il est basé sur la solubilité particulière de la théobromine, contrairement à un grand nombre de molécules d'origine végétale, la théobromine étant presque insoluble dans les solvants organiques, nous allons la solubiliser dans l'eau en milieu basique.

La solution obtenue sera alors débarrassée de la majorité des autres molécules par lavage au dichlorométhane, solvant dans lequel les autres alcaloïdes sont solubles, contrairement à la théobromine, qui restera en solution aqueuse basique.

I.8. Caractérisation de la théobromine extraite :

Trois méthodes ont été utilisées pour caractériser notre produits, il s'agit de :

Mesure du point de fusion, Spectroscopie infrarouge et Chromatographie sur couche mince (CCM).

I.8.1. Caractérisation par mesure de la température de fusion :

La mesure de la température de fusion peut constituer un moyen de caractérisation d'un solide à titre indicatif mais ne pourra pas être suffisante. Nous avons utilisé un fusiomètre qui permet

l'augmentation graduellement de la température, jusqu'à l'apparition du liquide. A l'aide d'un voyant on lit la température correspondante.

I.8.2. Caractérisation par spectroscopie Infrarouge :

- Le principe de la spectroscopie infrarouge est basé sur la mesure de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Le rayonnement infrarouge dispense suffisamment d'énergie pour stimuler les vibrations moléculaires à des niveaux d'énergie supérieurs [27].
- La spectrométrie infrarouge s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule en mettant en évidence la présence de liaisons entre les atomes (fonctions et groupements). La majorité des applications se situe entre 2,5 et 15 μm soit en nombre d'ondes de 4000 cm^{-1} à 670 cm^{-1} .
- Plusieurs modes de vibrations sont possibles pour un groupe d'atomes donné. A chacun correspond une fréquence caractéristique. Ces modes fondamentaux sont responsables des principales bandes d'absorption. L'absorption du rayonnement IR par les composés organiques correspond à deux types principaux de vibrations [28] :
 - vibration de valence ou d'élongation.
 - vibration de déformation angulaire.

I.8.3. Caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM) :

I.8.3.1. Définition:

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant [29].

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- **la cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- **la phase stationnaire** : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique. (Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose).
- **l'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- **l'éluant** : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon [30].

I.8.3.2. Principe de la technique :

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.

Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques (forces de Vander waals, liaison hydrogène..) retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption.

Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

I.8.3.3. Applications de la CCM :

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

I.8.4. Spectrophotométrie UV-Visible :

I.8.4.1. Définition et principe de la spectroscopie UV-Visible :

La Spectrophotométrie UV-Visible est une technique de caractérisation optique non destructive qui nous renseigne sur les propriétés optiques de l'échantillon à analyser comme la transmission et l'absorption de la lumière, elle permet d'étudier quantitativement et qualitativement les interactions entre la lumière et la matière [31].

Le principe de cette technique repose sur l'interaction de la lumière émise avec l'échantillon à analyser. Une partie du faisceau incident sera absorbée ou transmis par l'échantillon. Lorsqu'une substance absorbe de la lumière dans le domaine de l'ultraviolet et du visible, l'énergie absorbée provoque des perturbations dans la structure électronique des atomes, ions ou molécules. Un ou plusieurs électrons absorbent cette énergie et peuvent sauter d'un niveau de basse énergie à un niveau de plus haute énergie. Ces transitions électroniques se font dans le proche UV visible (200 - 400 nm) au visible (400- 800 nm).

Lorsqu'une radiation (lumière) monochromatique (une seule longueur d'onde) traverse une substance avec une intensité lumineuse I_0 , elle en sort avec une intensité I .

On définit l'absorbance comme étant $A = \log(I_0/I)$. Lorsqu'une substance colorée absorbe pour une certaine longueur d'onde, l'absorbance sera donc maximale. Le spectrophotomètre effectue cette mesure d'absorbance pour différentes longueurs d'onde.

Selon la loi de **Béer - Lambert**, L'absorbance A (sans unité) de la solution est proportionnelle à la longueur l de la solution traversée par la lumière et à la concentration molaire c de cette solution :

$$A = \epsilon \times l \times c. \quad [31]$$

Le coefficient de proportionnalité ϵ (appelé coefficient d'extinction molaire) dépend de la nature de la solution et de la longueur d'ondes de la lumière. La loi de Beer-Lambert n'est cependant valable que sous certaines conditions :

- La lumière doit être monochromatique ;
- La concentration des solutions doit être faible (de l'ordre de 10^{-4} mol /L) ;
- Les solutions doivent être homogènes ;
- Le soluté ne doit pas réagir sous l'action de la lumière incidente.

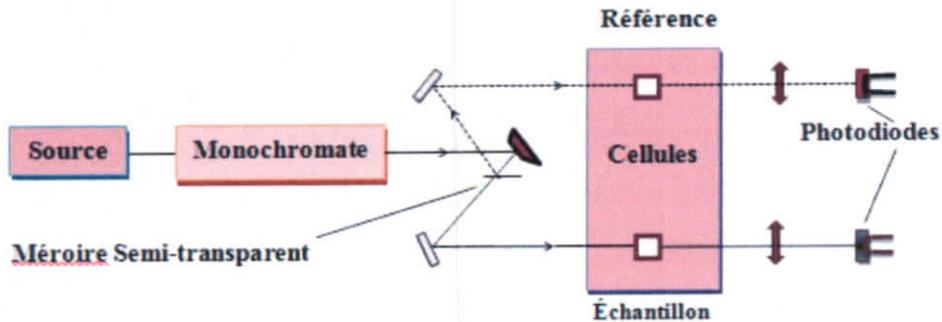


Fig I.10. Schéma générale de spectrophotomètre UV-visible doubles faisceaux.

Afin de ne prendre compte que l'absorption de la substance colorée étudiée, on retranche de la valeur mesurée, l'absorbance des autres substances (le solvant + la cuve). Cette étape s'appelle : faire le blanc.

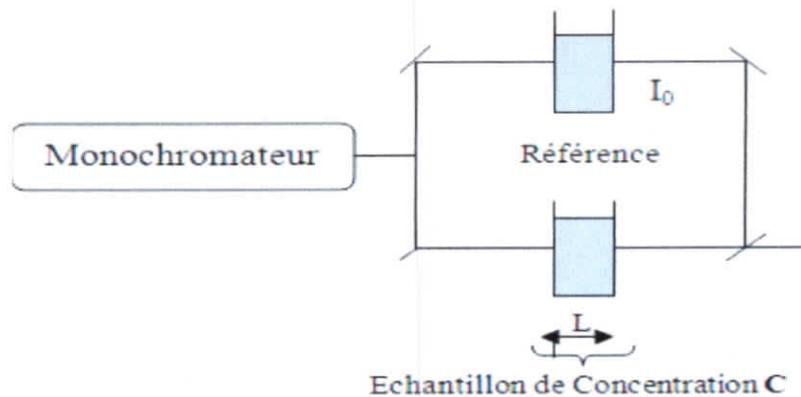


Fig I.11. Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire.

Références Bibliographiques :

- [1] Čáková, V. (2013). Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales: identification des constituants d'*Aerides rosea* et d'*Acamperigida*: techniques analytiques et préparatives appliquées à *Vanda coerulea* et *Vanda teres* (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- [1] D.-J. Cram, G.-S. Hammond, *Chimie organique*, trad. par P. L'Écuyer, Paris, Gauthier-Villars, 1963, p. 568.
- [2] Badiaga, M. (2011). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- [3] Bravin, F. (2008). ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DU TRANSPORT DE COMPOSÉS EXOGÈNES GRÂCE À L'ENRICHISSEMENT ISOTOPIQUE UNIFORME AU ¹³C (Doctoral dissertation, Ecole Centrale Paris).
- [4] Costentin, J., & Delaveau, P. (2010). *Café, thé, chocolat: les bienfaits pour le cerveau et pour le corps*. Odile Jacob.
- [5] El Alami, A., & Chait, A. (2016). Etude ethnobotanique sur les plantes médicinales spontanées poussant dans le versant nord de l'Atlas d'Azilal (Maroc). *ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 4(2), 271-282.
- [6] Chollet, S., Papet, Y., Mura, P., & Brunet, B. (2010). Détermination des teneurs en atropine et scopolamine de différentes espèces sauvages et ornementales du genre *Datura*. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 22, No. 4, pp. 173-179). EDP Sciences.
- [7] ROSER, A., FERRARI, M. L., PERDICAKIS, M. C., DRAELANTS, M. I., BOOB, M. F., Pharmacie, N., ... & en pharmacie-Pharmacien, D. Les empoisonnements dans les romans de CL Grace.
- [8] A. Baerheim-Svendsen & R. Verpoorte, *Chromatography of Alkaloids*, 2 vol., Elsevier, Amsterdam, 1983-1984
- [9] Navi, P., & Heger, F. (2005). *Comportement thermo-hydrromécanique du bois: Applications technologiques et dans les structures*. PPUR presses polytechniques.

- [10] **Baudrimont, A. (1846).** Traité de chimie générale et expérimentale: avec les applications aux arts, à la médecine et à la pharmacie (Vol. 2). Chez JB Bailliere.
- [11] **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques.
- [12] **Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- [13] : **Lehmann, H. (2013).** Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement, contrôles (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- [14] **Baillaud, L. (2007).** La végétalité: un réseau de déterminismes reliant structure, biologie et milieu de vie dans le deuxième royaume de la nature?. *Acta Botanica Gallica*, 154(2), 153-201.
- [15] : **Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007).** Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2), 217-225.
- [16] **Lemordant, D. (1979).** Utilisations pharmaceutiques du cacao. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 26(3), 233-246.
- [17] **Vabre, R. (2013).** Fonctionnalisation directe de liaisons CH et couplages croisés pour la formation de liaisons CC et CN: synthèse de purines 6, 8, 9-trisubstituées (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
- [18] **Lemordant, D. (1992).** Thérapeutique, Toxicomanie et Plantes Américaines. *Cahiers d'outre-mer*, 45(179), 263-286.
- [19] **CHARRIER, A. (2007).** Contribution à l'étude de la domestication de la variété de cacaoyer *Nacional d'Équateur*: recherche de la variété native et de ses ancêtres sauvages (Doctoral dissertation, Université d'Evry).
- [20] **Cassuto, D. A. (2013).** Qu'est-ce qu'on mange?: L'alimentation des ados de A à Z. Odile Jacob.

- [21] Adoue, C., Orantin, M., & Boidin, C. (2015). Diálogos en guaraní, un manuscrit inédit des réductions jésuites du Paraguay (XVIIIe siècle). *Nuevo Mundo Mundos Nuevos. Nouveaux mondes mondes nouveaux-Novo Mundo Mundos Novos-New world New worlds*.
- [22] Benlekehal, H., Clotteau, M., Dornier, M., & Reynes, M. (2001). Un produit amazonien particulièrement riche en caféine: la graine de guaraná [Paullinia Cupana HBK var. sorbilis (Mart.) Ducke]. *Fruits*, 56(6), 423-435.
- [23] Mounjouenpou, P. (2008). Aspergillus noirs producteurs d'ochratoxine A dans le cacao. Biodiversité et incidence des traitements post-récolte au Cameroun.
- [24] Maiga, D. D., Seyni, H., Sidikou, A., & Azouma, A. (2011). Convulsive crisis in Tramadol and caffeine abusers: about 8 cases and review of the literature. *The Pan African medical journal*, 13, 24-24.
- [25] LEYBROS, J, FRÉMEAUX, P. Techniques de l'ingénieur, Extraction solide- liquideJ 2 780-3
- [26] Ebbesen, T., Vergassola, M., & Martin, J. L. (2010). *Imagerie de Contraste Ionique térahertz Physique statistique des plasmons polaritons de surface* (Doctoral dissertation, ECOLE POLYTECHNIQUE).
- [27] Bazin, D., & Daudon, M. (2015, September). Les pathologies microcristallines et les techniques de physicochimie: quelques avancées. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 73, No. 5, pp. 517-534).
- [28] KHECHAI, M. (2016). Etude expérimentale de l'équilibre liquide-liquide d'un système ternaire (eau+ acide propanoïque+ huile d'Eucalyptus) (Doctoral dissertation).
- [29] Bahorun, T. (1998, March). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists* (p. 83).
- [30] Merad, L. (2010). *Etude par Spectroscopie Raman et modélisation d'une résine composite RTM* (Doctoral dissertation, Université de Metz).
- [31] Di Benedetto, D. (2007). *Spectrophotométrie D'Absorption dans l'Ultraviolet et le Visible*. Ed. Techniques Ingénieur.



Chapitre II

Les Capteurs Chimiques

(Biocapteurs)

Chapitre II : Les Capteurs Chimiques (Biocapteurs)

II.1 : Généralités sur les capteurs chimiques/Biocapteurs :

L'évolution technologique ne cesse de trouver des solutions aux problèmes qui sont considérés auparavant comme complexe et difficile à résoudre.

Les capteurs chimiques ont constitué une large application dans différents domaines (biologie, biochimie, médecine, sécurité, agriculture et environnement..) ces derniers ont permis la détection d'une espèce chimique ou biologique ainsi que l'évaluation de sa quantité ou sa concentration.

Les instruments classiques d'analyse pour la détection de telles espèces sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre [1].

Les capteurs sont considérés comme une solution alternative particulièrement intéressante, aux techniques analytiques traditionnelles telle que la chromatographie ou la spectrométrie [2].

Dans ce chapitre nous présentons des généralités sur les capteurs chimiques ainsi que les différentes méthodes de transduction utilisées et la méthode d'immobilisation de la couche réceptrice. Nous présentons également en fin de chapitre les méthodes de caractérisation utilisés.

II.1.1. Définition d'un capteur chimique :

Un capteur chimique est un système qui transforme une information chimique, comme la concentration ou la composition d'un échantillon à analyser, en un signal exploitable.

Un capteur chimique en lui-même est composé de deux parties essentielles, la première concerne la réception. Il s'agit de la partie qui transforme l'information chimique en une forme de signal ou d'énergie mesurable. Cette réception peut être soit physique (ce sont typiquement les capteurs basés sur les mesures d'absorbances, de l'indice de réfraction, de la modification de masse,...) soit chimique (système où il y a une réaction chimique avec l'échantillon à analyser qui donne naissance à un signal) [3].

La deuxième partie, le transducteur représente le dispositif permettant de mettre en évidence la réaction assurée par le récepteur [4], en transformant la modification chimique en signal mesurable et corrélable à la concentration de la substance cible [5,6].



II.1.2. Principe et fonctionnement :

Le principe de base d'un capteur repose sur la reconnaissance de la grandeur de l'espèce à analyser.

Cette reconnaissance se produit au sein d'une couche que l'on appellera corps d'épreuve ou « couche sensible », et se traduit généralement par la modification d'une propriété physique de cette couche. Cette modification est détectée puis convertie en un signal électrique directement analysable, grâce au « transducteur ».

Enfin, le signal transmis est analysé et transformé en une information simple pour l'utilisateur (tension ou courant) (Figure II.1). Outre ces trois fonctions : *Reconnaissance*, *Transduction* et *Analyse*, nécessairement présentes dans tout capteur, une fonction d'amplification est utile pour accroître la sensibilité du capteur. Cette amplification peut être obtenue en amont du transducteur, par un mécanisme chimique ou biochimique (catalyse) ou bien en aval, grâce à un dispositif électronique [7].

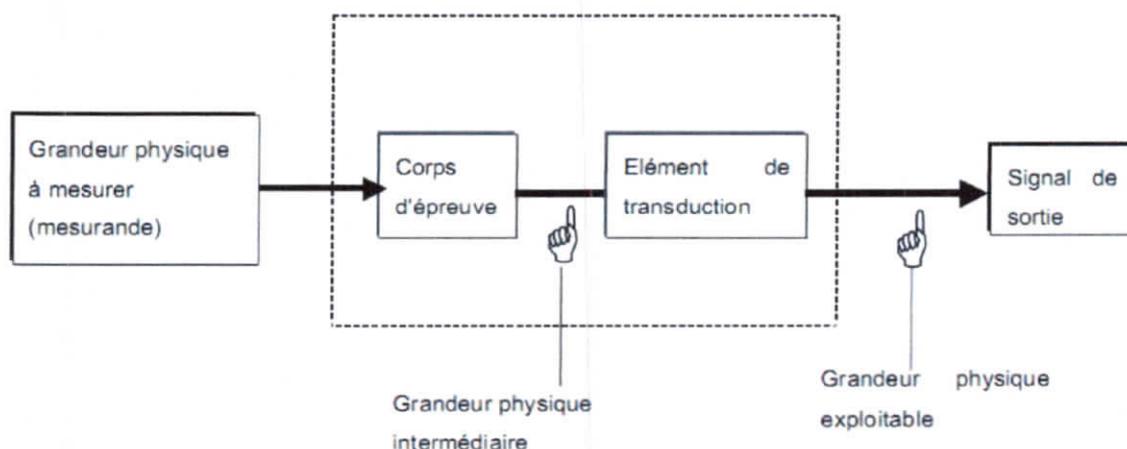


Figure II.1. Schéma représentatif du principe d'un capteur.

II.1.3 Constitution d'un capteur :

La majorité des capteurs sont composés de 3 parties chacune ayant un rôle bien défini [8] (Figure II.1).

Corps d'épreuve : C'est un élément qui réagit sélectivement aux variations de la grandeur à mesurer. Son rôle est de transformer cette grandeur en une autre grandeur physique dite mesurable.

Élément de transduction : C'est un élément lié au corps d'épreuve traduisant ses réactions en une grandeur (électrique) exploitable.

Système de conditionnement : Son rôle est d'amplifier et de faire un traitement sur le signal électrique.

II.2. Les différents types des capteurs chimiques :

Selon la nature du signal physico-chimique engendré par la reconnaissance moléculaire différents modes de transduction en signal électrique sont utilisés permettant de classer les capteurs chimiques en grandes familles : optique, électrochimique, massique, thermique.

II.2.1. Les capteurs électrochimiques :

On parle de capteur électrochimique lorsque ces capteurs permettent la détection en continu des espèces ioniques en milieu liquide, ils sont classés en quatre catégories suivant le mode de détection : potentiométrique, ampérométrique, conductimétrique et coulométrique [9].

Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus.

Toutefois, depuis les années 1980, les capteurs conductimétriques commencent à être à leur tour de plus en plus utilisés compte tenu de leur facilité d'élaboration et de simplicité du circuit de mesure [7]. Dans tous processus électrochimiques, on mesure un signal électrique généré entre les bornes de deux électrodes, par une réaction d'oxydo-réduction de l'espèce à détecter. Lors de ce transfert de charge, on assiste à une transformation chimique (l'oxydoréduction).

II.2.2. Les capteurs potentiométriques :

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence.

La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser [7].

Cette différence de potentiel est fonction de l'activité de l'ion présent dans l'électrolyte où le capteur est plongé.

Les conditions opératoires sont dites « potentiométrie à courant nul » si l'on n'impose pas de courant dans le circuit, dans le cas contraire, il s'agit de « potentiométrie à courant imposé » [8].

Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration (activité) de l'échantillon selon la loi de Nernst, dans le cas d'un capteur redox [11].

$$E_P = E_{Ox/Red}^{\circ} + \frac{RT}{nF} * \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}}$$

Où :

E_P : représente le potentiel du couple redox;

$E_{Ox/Red}^{\circ}$: le potentiel normal standard du couple redox;

R : la constante des gaz parfaits ($8.314JK^{-1}.mol^{-1}$);

a_{Ox}/a_{Red} : est le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état réduit;

T : la température absolue en Kelvin ;

F : constante de Faraday= $96500C.mol^{-1}$.

II.2.3. Les capteurs ampérométriques :

Les capteurs ampérométriques mesurent le courant issu de l'électrolyse d'une espèce électro active qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé.

Le courant est directement relié à la concentration dans la solution des espèces électro-actives ou à leur vitesse de production. Les réactions choisies sont souvent telles que les courants mesurés dépendent de la concentration des espèces à analyser, des propriétés des matériaux, de la géométrie des électrodes et des mécanismes de transport des espèces en solution (migration, convection, diffusion) [7,8].

Ces capteurs ont une bonne sensibilité et un temps de réponse assez rapide [12]. Le courant mesuré dépend de la propriété des matériaux de détection, de la composition et de la géométrie des électrodes, des concentrations des espèces électro actives [13].

II.2.4. Les capteurs conductimétriques :

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie. La conductimétrie permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions [10].

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 [9].

II.2.5. Capteur impédimétrique :

Les capteurs impédimétriques sont une combinaison entre les capteurs ampérométrique et potentiométrique, 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 [9].

II.2.6 Les capteurs optiques :

L'utilisation de transducteurs optiques est de plus en plus répandue notamment pour les milieux biologiques et environnementaux [12]. La détection est réalisée grâce à des changements des propriétés optiques (réflexion, absorption, ...). Le choix d'une méthode optique particulière dépend de la nature de l'application et de la sensibilité désirée.

Dans le cas de la fibre optique, la détection par ondes évanescentes via les fibres optique est de plus en plus utilisée. Les capteurs à fibres optiques, grâce à leur faible poids, leurs petites dimensions et leur insensibilité aux interférences électromagnétiques ainsi que la possibilité d'effectuer des mesures dans les endroits difficilement accessibles, ont rapidement pris une place importante dans le rang des capteurs chimiques.

Le principe de la détection par capteur à fibre optique se base sur des changements de la fréquence ou de l'intensité du rayonnement électromagnétique (par exemple le visible, l'infrarouge) pour détecter et identifier la présence de produits chimiques [9].

Une large gamme d'espèces chimiques peut être mesurée en utilisant ces capteurs à fibre optique (pH, pCO₂, pNH₄, glucose, sodium, cations des métaux...).

II.2.7. Les capteurs thermiques :

L'intérêt de la mise en œuvre des capteurs enthalpimétriques (thermiques) résulte du fait que la plupart des réactions s'accompagnent d'une émission de chaleur.

De nature très générale et donc de potentialité élevée, ces capteurs sont cependant relativement peu sensibles et nécessitent des montages différentiels très bien équilibrés afin de compenser toute variation de température parasite [14].

Le changement de température, ΔT , est déterminé un microcalorimètre et est relié aux variations d'enthalpie, ΔH , et la capacité de chaleur du réacteur, C_p par la relation suivante :

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{C_p}$$

Avec :

n : nombre de moles de substrat ayant réagi.

II.3. Les biocapteurs :

Le terme « biocapteurs » représente la fusion de deux des plus importantes technologies de ce siècle : l'électronique et les biotechnologies. Leur association permet des dosages rapides, sensibles et spécifiques [15]. Les premiers biocapteurs, développés au début des années 1960, sont des électrodes enzymatique permettant le dosage du glucose dans une solution biologique (Clark et Lyon, 1962 ; Updik et Hicks, 1967). Depuis, les biocapteurs ont connu un développement considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles, que ce soit dans les domaines médical, agro-alimentaire ou contrôle de l'environnement. Ils peuvent ainsi devenir des outils complémentaires et apporter des avantages, comme la mesure in situ et continue, par rapport aux techniques classiques d'analyses disponibles en laboratoire [16]. Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé « biorécepteur » et un « transducteur » représentant le mode de détection [17]. Même si les enzymes restent fréquemment employées, des nouveaux biorécepteurs sont aujourd'hui étudiés, comme l'ADN, les anticorps-antigènes, les cellules entières voire les organites.

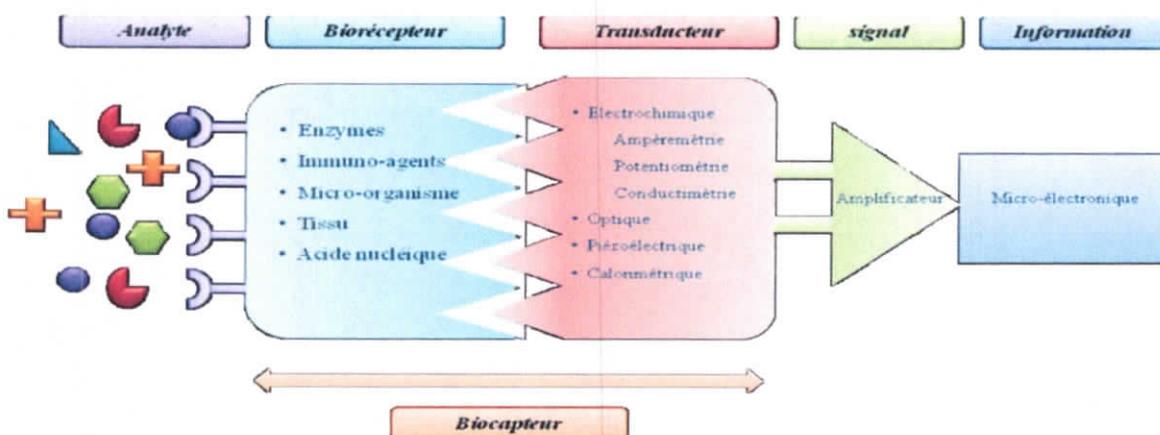


Fig II.2. Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

En ce qui concerne les transducteurs, des avancées majeures ont été faites grâce à la miniaturisation qui a notamment permis de développer des microélectrodes. Les fibres optiques ont, pour leur part, facilité la détection de signaux biologiques par absorbance ou fluorescence. Dans les nombreux travaux existants sur les biocapteurs, le choix du transducteur et du biorécepteur dépend de plusieurs facteurs.

A l'heure actuelle, une grande partie des études menées sur les biocapteurs tend à optimiser leurs caractéristiques pour répondre au mieux aux exigences de leur domaine d'application, notamment en travaillant sur la stabilité de la réponse, la sélectivité et la sensibilité des biocapteurs [17].

II.3.1. Paramètres et caractéristiques des biocapteurs :

Il existe un certain nombre de caractères communs à tous les capteurs lorsqu'ils sont utilisés dans un environnement donné.

a) Précision : La précision reflète l'écart entre le paramètre mesuré et la valeur délivrée. Elle est exprimée en pourcentage est l'incertitude absolue obtenue sur la grandeur électrique. Une bonne précision finale dépend d'une bonne corrélation entre une caractéristique d'une grandeur physique pouvant être mesurée et le phénomène à mesurer [18].

b) Sensibilité: Correspond à réponse du signale de sortie et sa sensibilité si une variation du de la grandeur à mesurer est manipulée.

c) Sélectivité: représentant la capacité du capteur à pouvoir détecter un ion bien déterminé parmi d'autres espèces contenue dans le milieu liquide [19]. Elle dépend de la partie sensible du capteur [20].

d) Linéarité: Un capteur est dit linéaire s'il présente la même sensibilité sur toute l'étendue de sa plage d'emploi. [10].

e) Réversibilité: Elle définit la capacité du matériau à revenir à son état initial lorsqu'on supprime l'excitation [21].

f) Temps de réponse: Il exprime le temps nécessaire que met la valeur de sortie du capteur pour se stabiliser lorsque les conditions de mesure varient brutalement d'un état à un autre. Le temps de réponse est pris entre 10% et 90% de la valeur stabilisée [21].

g) Fiabilité: La fiabilité est définie comme la capacité d'un capteur fonctionnant correctement, c'est-à-dire, à fournir des données avec une précision annoncée [10].

h) Autonomies: c'est-à-dire sa durée maximale de fonctionnement continu sans intervention humaine et sa capacité d'auto entretien [20].

Un capteur doit être rapide, il doit donner une réponse en temps réel, chaque essai doit être reproductible et facile à calibrer, il doit être robuste et résiste aux changements de température, pH, force ionique. De plus son utilisation doit être simple, requérant un minimum de technicité [10].

II.4. Méthodes de caractérisation :

Afin de caractériser nos échantillons et par conséquent étudier leur comportement à l'interface capteur-solution, nous avons utilisé les méthodes électrochimiques à savoir :

- La spectroscopie d'impédance ;
- La voltamétrie à ondes carrées ;

Ces deux techniques nous ont été très utiles pour mieux comprendre les éventuels phénomènes et déplacements chimiques qui se manifestent sur la surface active et l'électrolyte de nos dispositifs.

II.4.1. Méthodes de caractérisation électrochimiques :

En électrochimie on s'intéresse souvent aux processus et aux facteurs qui influencent le transport de charges à travers l'interface entre phases distinctes chimiquement (électrodes et électrolytes). Le plus souvent l'une des deux phases de part et d'autre de l'interface étudiée est un électrolyte dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions. La deuxième phase est une électrode, c'est à dire une phase dans laquelle le transport des charges a lieu par le mouvement d'électrons.

De nos jours la spectroscopie d'impédance électrochimique s'est imposée comme outil analytique puissant permettant de caractériser les propriétés électriques de nombreux systèmes. D'autre part, les études théoriques de l'impédance d'électrodes modifiées permettent de comprendre les processus et les transformations chimiques associées à ces supports [22].

II.4.1.1. Comportement d'un métal seul :

Un métal peut être considéré comme un composé globalement neutre formé d'ions positif s'occupant les positions du réseau cristallin et d'électrons mobiles. Malgré cette mobilité, les électrons ne peuvent s'éloigner à une trop grande distance du cristal car les noyaux positifs

exercer une force d'attraction. Toutefois, en l'absence de milieu extérieur, la surface d'un matériau métallique peut être considérée comme la superposition de deux couches minces, l'une de charge positive située sous la surface du solide et l'autre, de charge négative, adjacente à la surface. Cette zone de séparation des charges constitue la double couche électrique. [23]

II.4.1.2. Interface électrode/électrolyte :

Lorsqu'une électrode est en contact avec un électrolyte, on observe une séparation de charges. La charge accumulée d'un côté de l'interface est contre balancée par celle accumulée de l'autre côté:

$$q_{Sol} = -q_{el}$$

q : représentant la charge par unité de surface (en Coulombs. cm²).

La charge portée par l'électrode elle-même (q_{sol}) est constituée, soit par un excès d'électrons (charge négative), soit au contraire par un déficit d'électrons (charge positive), selon le signe de la ddp (différence de potentiel) ($\Delta \Phi$). La charge compensatrice du côté de la solution électrolytique est due, soit à un excédent de cations sur les anions, pour $\Delta \Phi < 0$ (cas où l'électrode est chargée négativement), soit à un excédent d'anions sur les cations, pour $\Delta \Phi > 0$ (cas où l'électrode est chargée positivement) [23].

La distribution des ions est complexe du fait d'une différence de leurs comportements selon leur nature et de la présence des molécules polaires de solvant.

La structure admise à l'heure actuelle pour cette couche ionique chargée est décrite, succinctement, de la façon suivante :

En l'absence d'interactions spécifiques fortes avec la surface d'électrode (adsorption spécifique), les ions excédentaires (cations ou anions) n'ont la possibilité de s'approcher de la surface de l'électrode que jusqu'à une distance de l'ordre de quelques Angströms, leurs centres venant ainsi se placer sur une surface parallèle à celle de l'électrode, que l'on appelle (dans le cas le plus fréquent des électrodes planes) le plan de Helmholtz (PH). La couche de Helmholtz (ou couche compacte), comprise entre la surface de l'électrode et ce plan, contient donc seulement des molécules de solvant orientées par le champ électrique, correspondant au diélectrique d'un condensateur. Si tous les ions excédentaires restaient localisés dans ce plan

de Helmholtz, on aurait l'équivalent d'un condensateur à plaques parallèles caractérisé par la capacité (par unité de surface).

$$C = \frac{q_{el}}{\Delta\Phi}$$

On sait que, dans ce cas, la variation du potentiel électrique Φ (entre Φ_{el} et Φ_{sol}), dans la couche comprise entre les deux plans limites, est fonction linéaire de la distance. Mais les phénomènes sont moins simples, il apparaît deux comportements des ions:

Ceux qui ne sont pas adsorbés (des cations généralement) sont maintenus à distance de l'électrode par leur coquille de solvation ;

Ceux qui subissent une adsorption spécifique (des anions) viennent au contraire au contact direct de la surface de l'électrode, sans interposition de molécules de solvant.

On est ainsi conduit à distinguer deux plans de Helmholtz (et deux couches distinctes correspondantes): un plan interne (PHI) et un plan externe (PHE), comme le montre le schéma de la figure (II.3). Il s'établit ainsi une couche de répartition des ions excédentaires (non-adsorbés), couche stationnaire par suite de l'équilibrage entre les «forces» de sens opposés, de rétrodiffusion et d'attraction électrostatique exercée par la surface de l'électrode. Cette couche est appelée couche diffuse de Gouy-Chapman.

L'ensemble couche de Helmholtz (couche compacte) + couche de Gouy-Chapman (couche diffuse) constitue la double couche électrochimique (selon le modèle théorique de Stern, 1924).

La répartition de potentiel qui s'établit dans cette région interfaciale, correspondante à la différence $\Delta\Phi$ entre les potentiels internes des deux phases, est représentée sur la figure (II.3). L'épaisseur de la double couche électrochimique est, dans ces conditions, de l'ordre d'une dizaine d'Angströms.



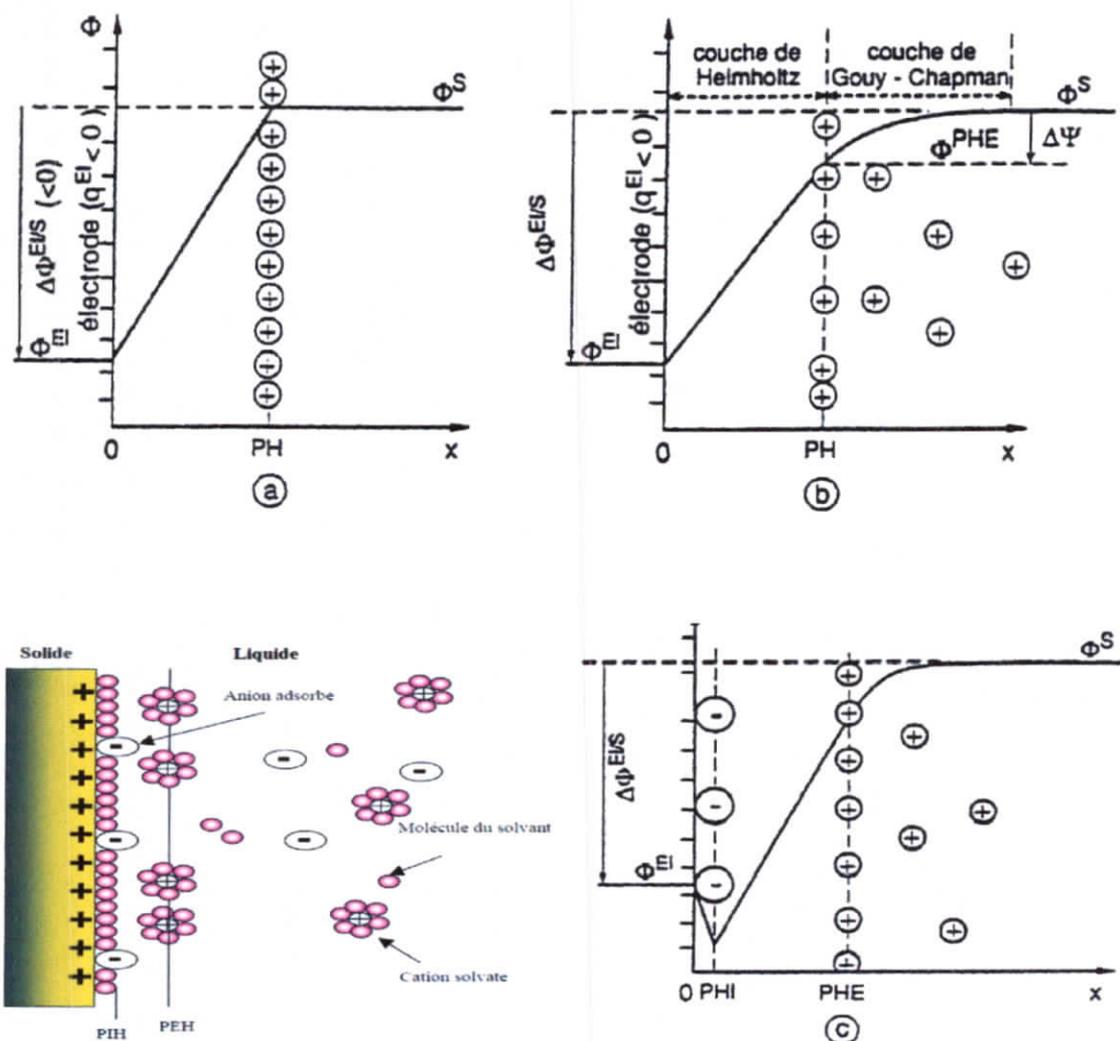


Figure II.3. La double couche électrochimique : distribution des charges, variation du potentiel électrique [24].

$\Delta\Phi$ en fonction de la distance (x) à la surface de l'électrode. (a) Modèle de HELMHOLTZ (cas $\Delta\Phi_{el/sol} < 0$) (b) Modèle de STERN, comprenant une couche compacte (couche de HELMHOLTZ) et une couche diffuse (couche de GOUY-CHAPMAN) (cas $\Delta\Phi_{el/sol} < 0$ et absence d'adsorption spécifique) (c) Même modèle, dans le cas d'une adsorption spécifique d'anions.

PH : plan de HELMHOLTZ, PHE : PH externe, PHI : PH interne.

II.4.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique conventionnelle ou SIE :

Dans le cadre de l'étude des interfaces électrode/électrolyte, différentes techniques électrochimiques sont couramment utilisées. Elles mettent toutes en jeu des mesures de potentiel et/ou de courant, et peuvent être classées en deux groupes.

Le premier regroupe les techniques dites stationnaires, comme la chronopotentiométrie, la chronoampérométrie, la voltampérométrie.

Ces techniques permettent de recueillir des informations liées à la thermodynamique du système étudié et quelquefois à sa cinétique. Néanmoins, elles sont sujettes à des limitations, notamment dans le cas de systèmes très résistants ou pour l'étude des mécanismes réactionnels. De plus, certaines d'entre elles entraînent la destruction de l'échantillon. Pour contourner ces limitations, il a été mis au point un certain nombre de techniques dites transitoires, basées sur l'utilisation des fonctions de transfert et dont la SIE fait partie.

La spectroscopie d'impédance électrochimique, ou SIE, est une technique utilisée depuis quelques décennies. L'intérêt et la quantité des informations qu'elle apporte dans l'étude des mécanismes réactionnels qui se déroulent à l'interface électrode/électrolyte ne sont plus à démontrer.

Cependant, la technique est limitée à la mesure de grandeurs globales (courant ou potentiel), moyennées sur l'aire totale de la surface active analysée. Les variations de ces grandeurs sont supposées représentatives des processus qui se déroulent à l'interface électrode/électrolyte,

II.4.2.1. Définition et principe :

La SIE repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du système électrochimique étudié. Ce système peut être considéré comme étant une « boîte noire » qui réagit en émettant un signal $y(t)$ quand il est soumis à une perturbation $x(t)$ (figure I.1). Les deux signaux $x(t)$ et $y(t)$ sont alors reliés par une fonction de transfert $H(\omega)$ telle que $Y(\omega) = H(\omega)X(\omega)$, $X(\omega)$ et $Y(\omega)$ étant respectivement les transformées de Fourier de $x(t)$ et $y(t)$. Avec ω est la pulsation.



Figure II.4. Schéma d'une fonction de transfert

Classiquement, la perturbation imposée au potentiel d'une électrode indicatrice est une perturbation sinusoïdale de faible amplitude. Le signal appliqué est donc de la forme :

$x(t) = A \sin(\omega t)$ et la réponse du système est $y(t) = B \sin(\omega t + \varphi)$ avec une fréquence f , une pulsation $\omega = 2\pi f$ et un déphasage φ .

En terme d'impédance, à l'instant t , le signal d'excitation est défini par la valeur du potentiel de l'électrode qui est exprimée en fonction de sa composante stationnaire E_0 et d'un terme sinusoïdal [25].

En pratique, la mesure de l'impédance consiste à surimposer, à un point de fonctionnement stationnaire (un système est en état stationnaire lorsqu'il est en équilibre thermodynamique), une perturbation sinusoïdale de potentiel électrique ΔE de faible amplitude et de pulsation

$\omega = 2\pi f$ (en rad.s⁻¹) [61]; le potentiel imposé à l'électrode est:

$$E(t) = E + \Delta E \text{ avec } \Delta E = |\Delta E| \sin(\omega t).$$

La réponse du système est un courant sinusoïdal ΔI de même pulsation

ω superposé au courant stationnaire I , tel que $I(t) = I + \Delta I$ avec : $\Delta I = |\Delta I| \sin(\omega t + \Phi)$

Φ correspond au déphasage du courant par rapport au potentiel [26].

L'impédance électrochimique se définit comme étant le nombre complexe $Z(\omega)$

résultant du rapport :

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)}$$

L'impédance peut être écrite sous deux formes :

$$Z(\omega) = |Z(\omega)| e^{j\Phi} \text{ ou } Z(\omega) = Z_r(\omega) + jZ_j(\omega) \text{ avec: } j^2 = -1$$

$|Z|$ étant le module de l'impédance, Φ le déphasage, Z_r la partie réelle et jZ_j la partie imaginaire.

Pour passer d'une forme à l'autre, il suffit d'utiliser les relations suivantes :

$$|Z|^2 = (Z_r)^2 + (Z_j)^2 \quad \Phi = \tan^{-1} \frac{Z_j}{Z_r} \text{ où : } Z_r = |Z| \cos \Phi \text{ et } Z_j = |Z| \sin \Phi$$

II.4.2.2. Variation du potentiel et mesure du courant :

Le courant total i correspond principalement à la somme de deux courants distincts:

Le courant faradique, i_f , et le courant capacitif, i_c .

$$i = i_f + i_c$$

Le courant faradique i_f résulte des réactions d'oxydoréduction des solutés considérés à l'interface électrode-solution, la valeur de ce courant est influencée par les vitesses de différents processus, en particulier :

- La vitesse du transfert de masse de l'espèce électro active au sein de la solution vers l'électrode et la vitesse du transfert de l'espèce produite par la réaction électrochimique vers le cœur de la solution.
- La vitesse de transfert des électrons à l'interface électrode-solution vers le soluté.
- La vitesse des réactions physicochimiques qui précèdent ou qui suivent le transfert d'électrons.

Le courant capacitif, quant à lui, est dû à la charge et à la décharge du condensateur représenté par l'interface entre la couche de surface de l'électrode et la solution adjacente.

La valeur de ce courant dépend de l'aire de la surface de l'électrode, de la vitesse du changement du potentiel en fonction du temps, et de la composition du milieu mais pas de la concentration du soluté étudié [27].

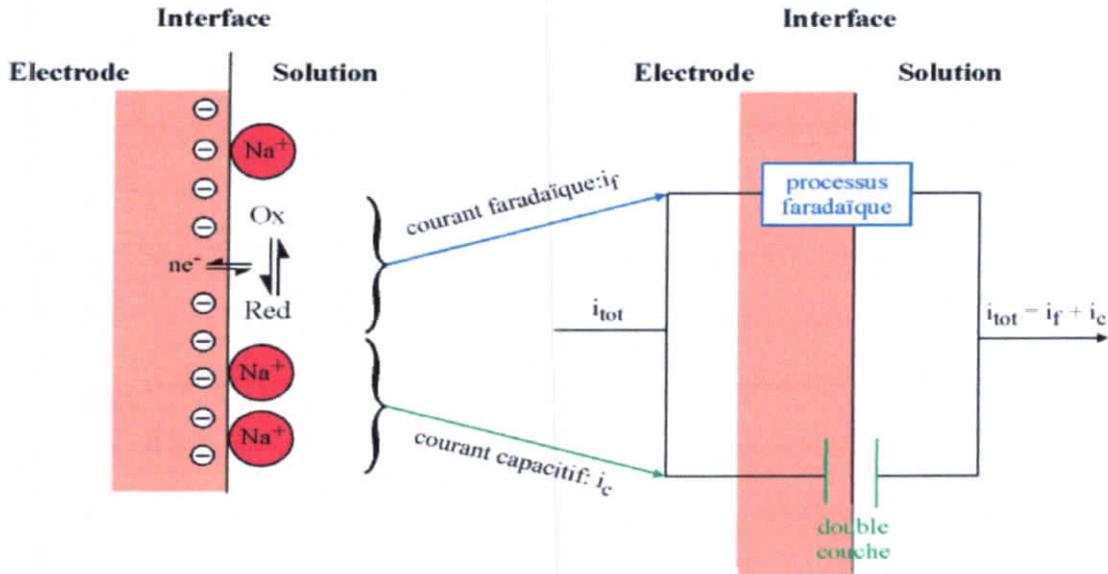


Figure II.5. Représentation des courants capacitif et courant faradique d'un métal dans une solution de NaCl et imposons à cette électrode un potentiel tel que sa charge soit négative.

II.4.2.3 Circuit électrique équivalent :

Les circuits équivalents sont traditionnellement utilisés pour modéliser les mesures d'impédance [1]. Un circuit équivalent est un circuit électrique qui a le même spectre d'impédance que les résultats expérimentaux. Les valeurs et l'arrangement des éléments du circuit sont fréquemment de bonnes approximations de vrais systèmes et les données peuvent souvent être adaptées pour donner des résultats d'exactitude raisonnable. Les changements de ces valeurs peuvent nous aider dans la compréhension de l'évolution du système.

II.4.2.3.1 Les éléments d'un circuit équivalent :

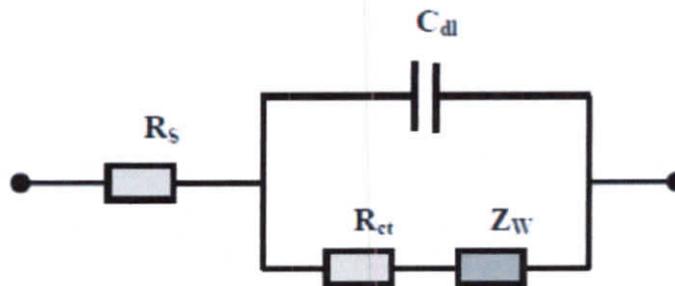


Figure II.6. Circuit équivalent de Randle.

Résistance de l'électrolyte:

La résistance de l'électrolyte (R_s) dépend généralement de la concentration d'ions dans la solution, du type d'ions, de la température et de la forme de la cellule électrochimique. Elle est proportionnelle à la résistivité de l'électrolyte, ρ . La résistance d'électrolyte est donnée par l'expression suivante :

$$R_s = \rho \frac{l}{A}$$

Avec :

- ρ : est la résistivité de la solution ;
- A : la surface de l'électrode de travail [14].

1. Résistance de transfert de charge :

La résistance de transfert de charge est la résistance liée au mécanisme de transfert de charge pour des réactions redox à l'électrode [3], elle est donnée par la relation suivante :

$$R_{tc} = \frac{RT}{nFi_0}$$

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'est-à-dire le potentiel auquel la vitesse de diffusion de l'espèce réduite est égal à la vitesse de diffusion de l'espèce oxydée) qui est reliée directement à la constante cinétique de transfert d'électron selon la relation suivante :

$$I_0 = nFAC_0k^0$$

A : la surface active de l'électrode ;

C_0 : la concentration du couple redox en solution.

K^0 : Constante cinétique de transfert d'électron.

2. Capacité de la double couche :

La capacité de la double couche résulte d'une double couche électrique qui se forme à l'interface entre l'électrode et l'électrolyte [3]. La valeur de cette capacité dépend de plusieurs variables comprenant la tension appliquée à l'électrode, la température, la concentration ionique, les types d'ions, les couches d'oxyde, la rugosité de l'électrode, l'adsorption d'impureté. L'expression de la capacité de la double couche est donnée par :

$$C_{dl} = \left(\frac{\partial Q}{\partial V} \right)_{T,P,\mu}$$

Avec

- ∂Q : la variation de charge stockée dans une couche ;
- ∂V : la variation de potentiel à travers la double couche ;
- T : la température ;
- P : la pression ;
- μ : le potentiel chimique de l' espèce ionique.

Selon le modèle d'Helmholtz, la double couche est équivalente à un condensateur plat. Lacapacité de la double couche est donc donnée par l'expression suivante :

$$C_{dl} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d}$$

Avec,

- ✚ ϵ_0 : le constant diélectrique du vide,
- ✚ ϵ_r : le constant diélectrique relatif de la double couche,
- ✚ A : la surface de l'électrode de travail et
- ✚ d: l'épaisseur de la double couche.

3. Impédance de Warburg :

L'impédance de Warburg est l'impédance résultant de la diffusion d'une espèce à l'électrode. C'est le premier élément électrochimique, qui a été présenté dans la description de l'impédance de la diffusion semi-infinie. Cette impédance dépend de la fréquence de la perturbation, du potentiel appliqué et de la concentration des espèces qui diffusent [4].

$$Z_w = \frac{\sigma}{\omega^2} (1 - j)$$

Avec σ le coefficient de Warburg
 $\omega = 2\pi f$: Pulsation et f : la fréquence

II.4.2.3.2. Représentation graphique de l'impédance :

Les données d'impédance sont typiquement représentées suivant deux types de représentations: le diagramme de Nyquist et le diagramme de Bode.

a) Diagramme de Nyquist :

Le diagramme de Nyquist, est une représentation graphique dans un plan complexe; l'axe des abscisses d'un système de coordonnées cartésiennes correspond à la partie réelle de l'impédance $Z_r(\omega)$, alors que l'axe des ordonnées correspondent à sa partie imaginaire $Z_{im}(\omega)$.

Les spectres d'impédance obtenus pour n'importe quelle interface, peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent. Les paramètres du modèle peuvent être obtenus en ajustant la courbe expérimentale avec la courbe théorique [7].

Habituellement, les diagrammes d'impédance électrochimique peuvent être tracés en coordonnées cartésiennes dans le plan complexe de Nyquist en plaçant les valeurs la partie réelle de l'impédance $Z_r(\omega)$ en abscisse alors que l'axe des ordonnées correspond à sa partie imaginaire $Z_{im}(\omega)$ [11]. Comme illustré dans la figure (II.7), le diagramme de Nyquist est un demi-cercle de diamètre (R_{tc}) dont les extrémités sur l'axe réel sont les points d'abscisse R_{set} et $R_s + R_{ct}$.

II.4.3 Voltamétrie à signaux carrés de potentiel (Square Wave Voltammetry, SWV):

La voltamétrie à onde carrée est basée sur la combinaison d'une modulation d'onde carrée d'amplitude $\Delta E = 50$ mV et de période $1/f$ (typiquement la fréquence $f = 50$ à 200 Hz) avec une rampe en escalier (figure II.8). Le signal mesuré est la différence Δi entre les courants mesurés, à la fin de chaque pulse montant et descendant de l'onde carrée, (figure II.9). Le pas

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

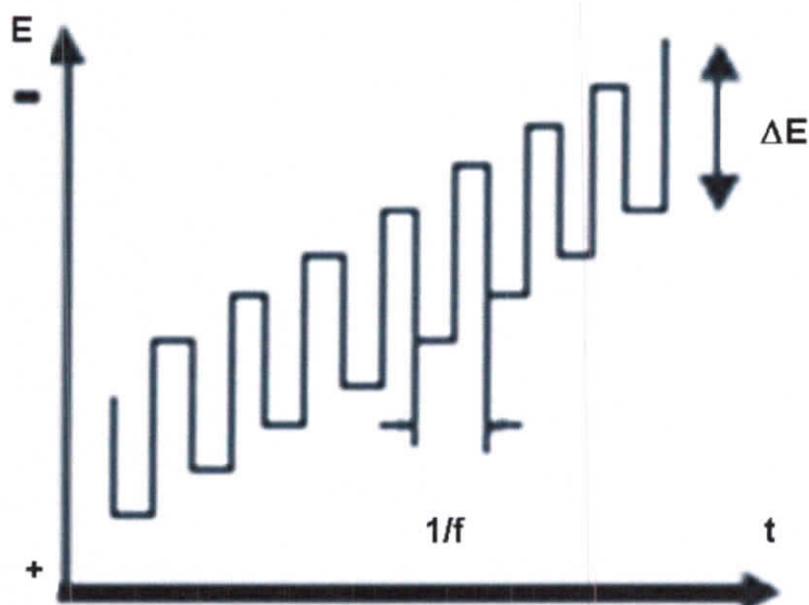


Figure II.7. Allure de la tension imposée en escalier en fonction de temps.

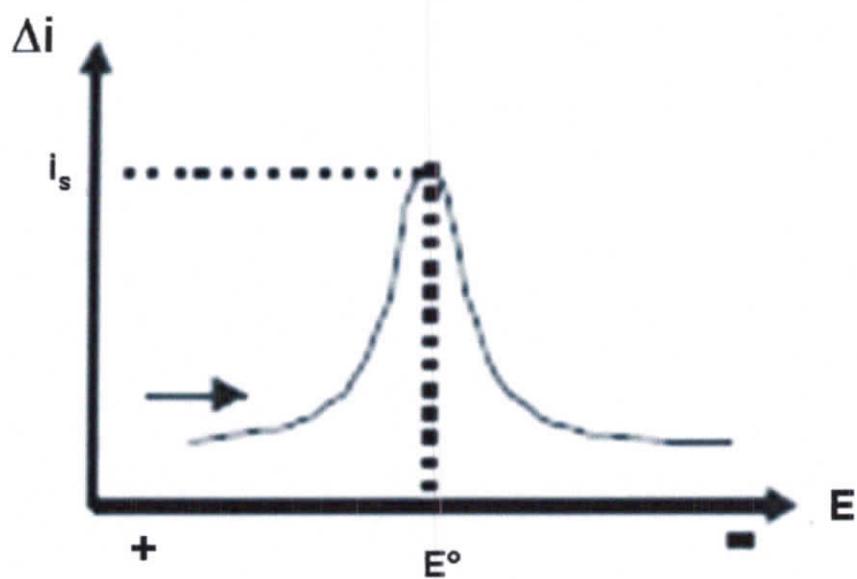


Figure II.8. Voltammogramme résultant de la voltamétrie à onde carrée.

Références Bibliographiques :

- [1] **Nicole Jaffrezic-Renault, Claude Martelet, Paul Clechet** "Capteurs chimiques et biochimiques", Techniques de l'Ingénieur, Doc. R 420; P 360
- [2] **Mai, A. T. (2004)**. Développement de biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection de polluants organiques en phase aqueuse (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- [3] **A.Hulanicki SG, F.Ingman**, « Chemical Sensors Definitions and classification», PureAndApplChem 1991.
- [4] **Tranminh**, « Les biocapteurs, principes, construction et applications».
- [5] **Saloua Helali** « conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impedimetriques » thèse de doctorat, Ecole centrale de Lyon, 2005.
- [6] **George. Ash et collaborateurs**, "les capteurs en instrumentation industrielle", BORDAS, Paris 1987.
- [7] **Ludivine FADEL** « contribution à l'utilisation de microcapteurs chimiques à base de micropoutres résonantes pour la détection d'espèces chimiques en milieu gazeux » thèse de doctorat de Université BordeauxI, 2007.
- [8] **S.Ghanem, A.Telia and C.Boukaous**, „" Humidity sensing based on sol-gel grown Zinc Oxide Thin films""", International Conference Nanotech MEET Tunisia 2014 (24-26) April, 2014 Hammamet Tunisia.
- [9] **C.Gabrielli** « Capteurs chimiques et biochimiques » Technique de l'ingénieur R-420
- [10] **Bouharouat Ali** « Modification de la sensibilité d'un QCM (Quartz Cristal Microbalance) par le dépôt dessus de films minces élaborés par plasma à partir de vapeurs de TEOS » thèse de Magister, Université Mentouri Constantine, 2009.
- [11] **Hafaiedh Imen** «Etudes physico-chimiques de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales» thèse de doctorat, Université Claude Bernard, LyonI, 2009.
- [12] **B. Torbiero**, " développement de microcapteurs électrochimiques pour l'analyse en phase liquide", thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 2006.
- [13] **I. Humenyuk**, " Développements des microcapteurs chimiques chemfets pour

l'analyse de l'eau", thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Toulouse, 2005.

[14] **H. Mohamed Walid** «Elaboration de biocapteurs basés sur différentes méthodes d'immobilisation de la couche de reconnaissance et différentes techniques de transduction» thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon1, 2009.

[15] **Silvia Fabiano**, immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : Le pedt, N° d'ordre : 54-2002, p5.

[16] **Christophe vedrine**, exploitation de signaux biologiques pour la réalisation de capteur environnementaux, N°d'ordre : 294CD, 2003, p5.

[17] **Céline Chouteau**, Développement d'un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales, N° d'ordre -: 04-ISAL-066, 2004.

[18] **Valentin Nicolas**, "Construction d'un capteur logiciel pour le contrôle automatique du procédé de coagulation en traitement d'eau potable", Thèse de doctorat l'UTC, 2000.

[19] **boukaous chahra** «Etude des potentialités des films de SiNx pour le développement de capteurs de type ISFET», Mémoire de Magister, Université Mentouri-Constantine,2006.

[20] **Lucile Barthet**, " Contribution a l'évaluation de l'impact sur les écosystèmes de la valorisation de résidus de procédés thermiques en BTP", thèse de doctorat, L'institut national des sciences appliquées de Lyon, 2003.

[21] **M Frédéric Parret**, " Méthode d'analyse sélective et quantitative d'un mélange gazeux à partir d'un microcapteur à oxyde métallique nanoparticulaire", thèse de doctorat, L'institut national polytechniques de Toulouse, 2006

[22] **Saloua Helali** « conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impedimétriques » thèse de doctorat, Ecole centrale de Lyon, 2005.

[23] M. F. Ashby, D. Jones. Matériaux, Propriétés et Applications, Dunod, Paris, (1998), 181.

[24] **Valette, G., & Hamelin, A. (1973)**. Structure et propriétés de la couche double électrochimique à l'interphase argent/solutions aqueuses de fluorure de sodium. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 45(2), 301-319.

[25] **Ludivine FADEL** « contribution à l'utilisation de microcapteurs chimiques à base de micropoutres résonantes pour la détection d'espèces chimiques en milieu gazeux » thèse de doctorat de Université BordeauxI, 2007.

[26] **G.Quarin** , « techniques voltampérométriques de balayage linéaire en tension », Notes de cours, université libre de Bruxelles.

[27] **S.Caillère, S.Henin, M.Rautureau**. Les argiles, édition septima, Paris1971.



Chapitre III

Partie Expérimentale

Chapitre III : Partie Expérimentale

III.1 Introduction :

Ce chapitre regroupe toute la partie expérimentale que nous avons réalisé ainsi que les résultats et leurs interprétations à savoir :

1. Extraction et caractérisation de la théobromine qui sera mobilisée sur un biocapteur comme partie sensible;
2. Etude cinétique de la théobromine avec l'urée ;
3. Dépôt de la théobromine sur l'électrode de travail (électrode en or fourni par le laboratoire) ;
4. La méthode de caractérisation électrochimique afin d'évaluer la sensibilité de notre électrode vis-à-vis des analytes considérés (urée, créatine) qui est :
 - Voltamétrie à ondes carrées.
5. Interprétations des résultats.

III.2 Extraction de la théobromine :

III.2.1 Protocole d'Extraction

- Nous avons pesé 40 g de cacao en poudre dans un bécher de 1 litre, et nous avons ajouté 75 mL de méthanol à l'aide d'une éprouvette de 100 mL en mélangeant avec une spatule.



Fig III.1. Pesées du cacao et d'hydroxyde de magnésium.

- Dans un autre bécher de 150 mL, nous avons pesé 4 g d'hydroxyde de magnésium, et nous avons ajouté 40 mL d'eau distillée en mélangeant avec une spatule.
- Les deux produits des étapes précédentes (1) & (2) ont été mélangés et mis sur une plaque chauffante (à la température à 100° C en mélangeant de temps à autres avec une spatule jusqu'à l'obtention d'un solide complètement sec. Cette étape prendra au minimum 3 heures (dans cette étape le méthanol et l'eau seront évaporés totalement).



Fig III.2. Evaporation du méthanol et l'eau.

- Le mélange complètement sec a été mis dans un bécher de 1 L pour se refroidir. Une préparation de 150 mL de dichlorométhane (DCM) dans un autre bécher de 1 L.
- Nous avons versé le solide sec dans le bécher contenant le dichlorométhane et nous avons assuré une agitation magnétique à froid pendant trois heures.





Fig III.3. Agitation après ajout du DCM avec un agitateur magnétique pendant trois heures.

- Trois heures plus tard, le mélange a été filtré sur un système de filtration Büchner, et lavé avec 25 mL de dichlorométhane. Une spatule du sulfate de magnésium anhydre a été ajoutée au filtrat récupéré pour séchage.

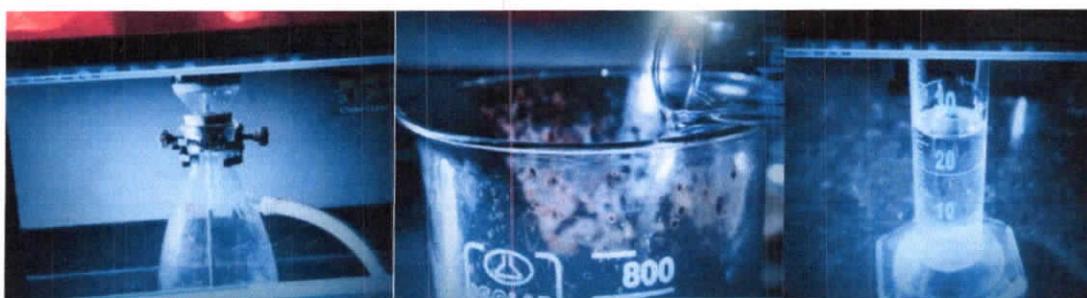


Fig III.4 Filtration sur Büchner et lavage avec 25 ml du DCM.

- Filtration du jus récupéré sur un Système de filtration Büchner pour enlever les sulfates de magnésium anhydre. On constate que le jus récupéré contient deux phases distinctes.
- Une évaporation du DCM à 50 C° a été réalisé, jusqu'à l'évaporation complète qui se caractérise par l'obtention d'une seule phase (l'évaporation a été réalisée sous haute car les vapeurs du DCM sont très toxique par inhalation).



Fig III.5. Evaporation du DCM.

- Après refroidissement, nous avons ajouté 35 ml de d'éthyle éther, pour ^{recristalliser} complexer la théobromine et nous avons filtré le mélange sur un Système de filtration Büchner. **La théobromine constitue le rétentat du filtre.** Nous avons pu récupérer 0.440g.

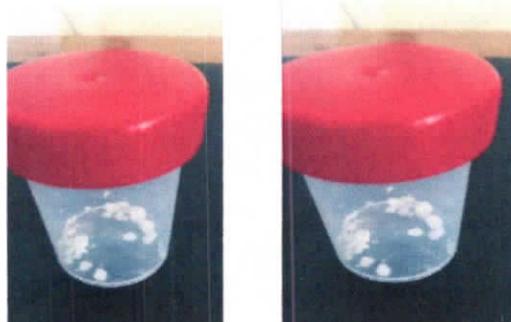
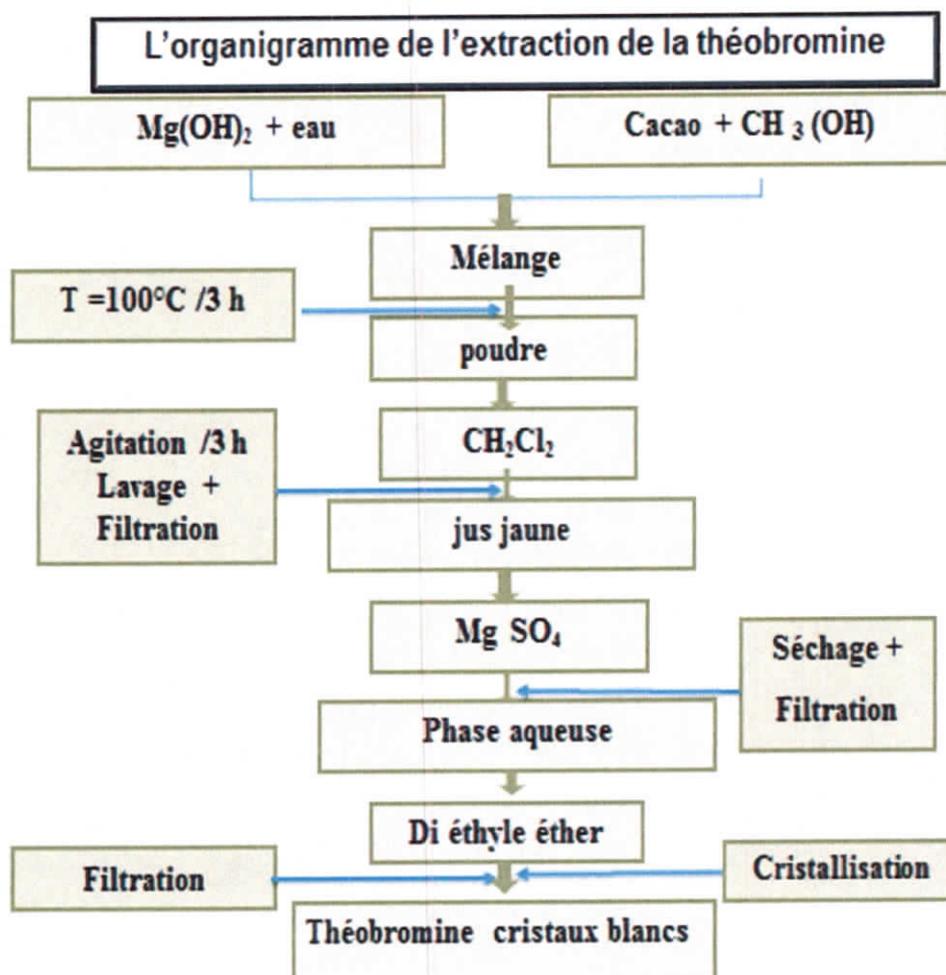


Fig. III.6. Théobromine Extraite à partir du Cacao qui constitue le rétentat du filtre.

Les étapes d'extraction peuvent être résumées dans l'organigramme suivant :



III.2.2 Caractérisation de la théobromine extraite :

La théobromine extraite obtenue est sous forme de cristaux blancs. Elle peut être identifiée par :

- Par chromatographie sur couche mince (CCM) .
- Par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-MS) ;
- Par spectroscopie infrarouge, UV ou RMN.

Selon les moyens disponibles à notre niveaux ; les techniques suivantes ont été utilisées pour l'identification de la théobromine extraite à savoir :

- ✓ La mesure du point de fusion.
- ✓ La spectroscopie infrarouge.
- ✓ Chromatographie sur couche mince.

III.2.2.1 Mesure du point de fusion

L'appareil fusiomètre utilisé nous a permis de lire une température de fusion du produit en question qui est de 345 C° . Théoriquement cette température varie de 345 à 350 C° pour la théobromine pure.



Fig III.7. Fusiomètre utilisé pour la mesure de la température de fusion de la théobromine extraite.

III.2.2.2 Spectroscopie infrarouge :

La spectroscopie infrarouge a été réalisée sur un appareil permettant la mesure de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Fig III.8- A et B

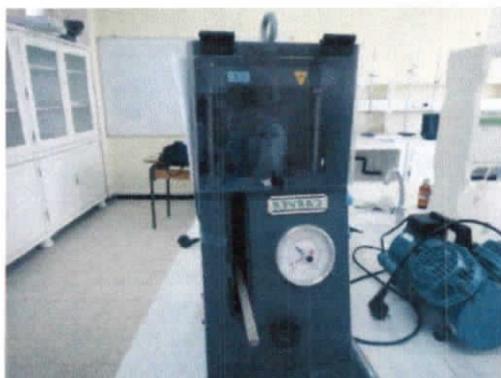


Fig III.8. A. la pastilleuse.

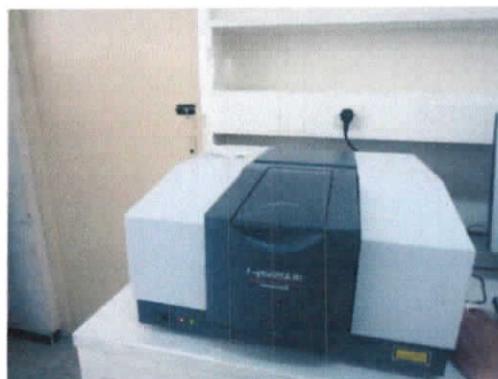


Fig III.8 B. Appareil IR

Le spectre IR de la théobromine extraite montre clairement les fonctions des groupements qui constitue le produit en question et qui sont tous présentes sur le spectre, à savoir :

- Elongation C-N , vibration d'élongation à $\nu = 1200 \text{ cm}^{-1}$ environ
- Elongation N-H à $\nu = 3300 \text{ cm}^{-1}$ environ
- Elongation =C-H à $\nu = 3000 \text{ à } 3100 \text{ cm}^{-1}$ environ
- Elongation C-H de méthyle à $\nu = 2800 \text{ à } 3000 \text{ cm}^{-1}$ environ
- Elongation du groupement C=O à $\nu = 1700 \text{ cm}^{-1}$ environ
- Elongation du groupement O=C-NH à $\nu = 1650 \text{ cm}^{-1}$ environ
- Elongation du groupement C-N du cycle, élongation à $\nu = \text{ cm}^{-1}$ environ

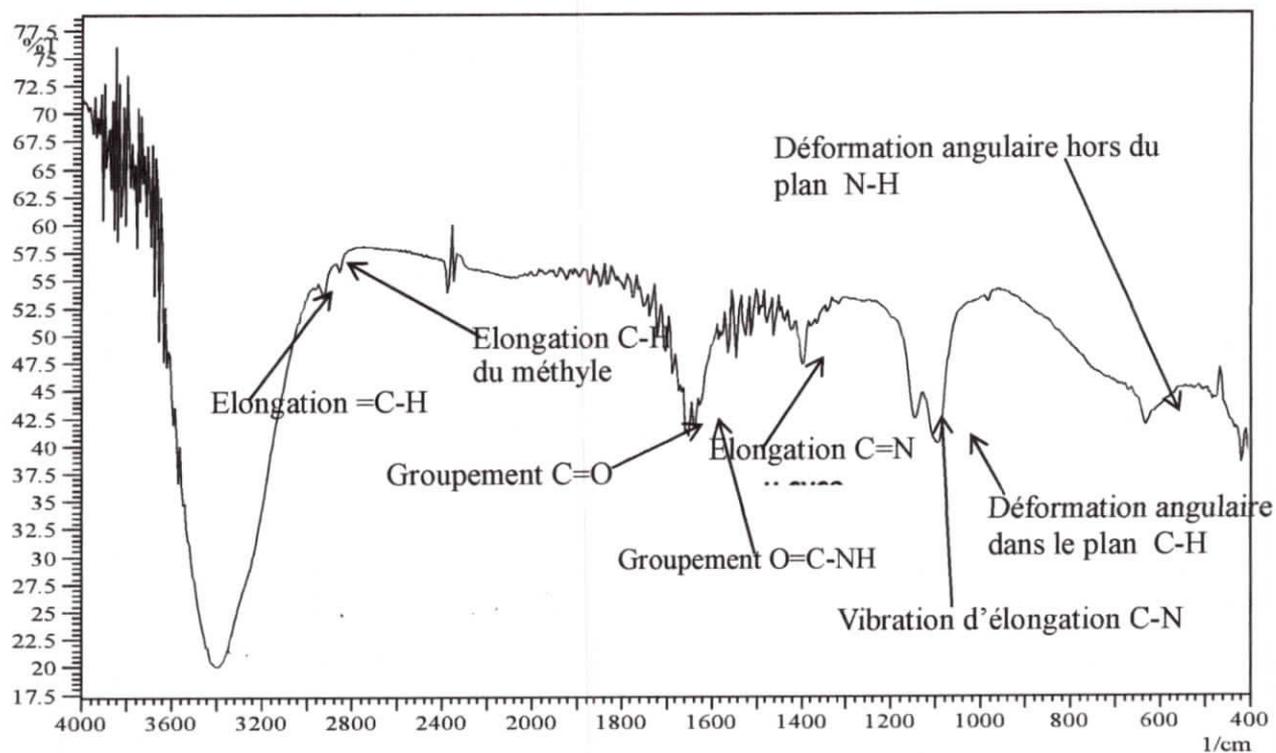


Fig III.9. Spectre Infrarouge de la théobromine extraite.

On remarque, d'après les bandes IR que la théobromine extraite présente toutes les fonctions. Ceci confirme que qualitativement, le produit extrait contient de la théobromine.

Afin de confirmer sa pureté, une autre caractérisation est indispensable. Nous avons par conséquent, utilisé la technique du chromatographie sur couche mince. On note l'utilisation de la théobromine commerciale comme référence (Fig III.10).



Fig III.10. Théobromine commerciale 99% pure.

III.2.2.3 Chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption :

- la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une feuille semi-rigide d'aluminium.
- Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant [1].

Lors de notre caractérisation, nous avons utilisé une goutte de chaque produit à tester à savoir :

- ✓ La caféine car elle fait partie des alcaloïdes purine xanthine au même titre que la théobromine, caractérisé par la lettre C Fig III.11.

- ✓ La théobromine commerciale, caractérisée par la lettre T.
- ✓ La théobromine extraite lors de notre première extraction, caractérisée par la lettre E1,
- ✓ La théobromine extraite lors de notre dernière extraction, caractérisée par la lettre E2.

Nous constatons après cette analyse de caractérisation que nos échantillons possèdent :

- ✓ Une seule substance car une seule tache caractérise chaque échantillon ;
- ✓ Les échantillons E1 et E2 ont des taches alignées ;
- ✓ La théobromine 99% pure commerciale, possède une tache légèrement déplacée par rapport aux taches des produits extraits

Selon cette analyse (CCM), nous constatons que la théobromine extraite et celle commerciale n'ont pas le même rayon frontale, ce qui confirme la non pureté de la théobromine extraite.

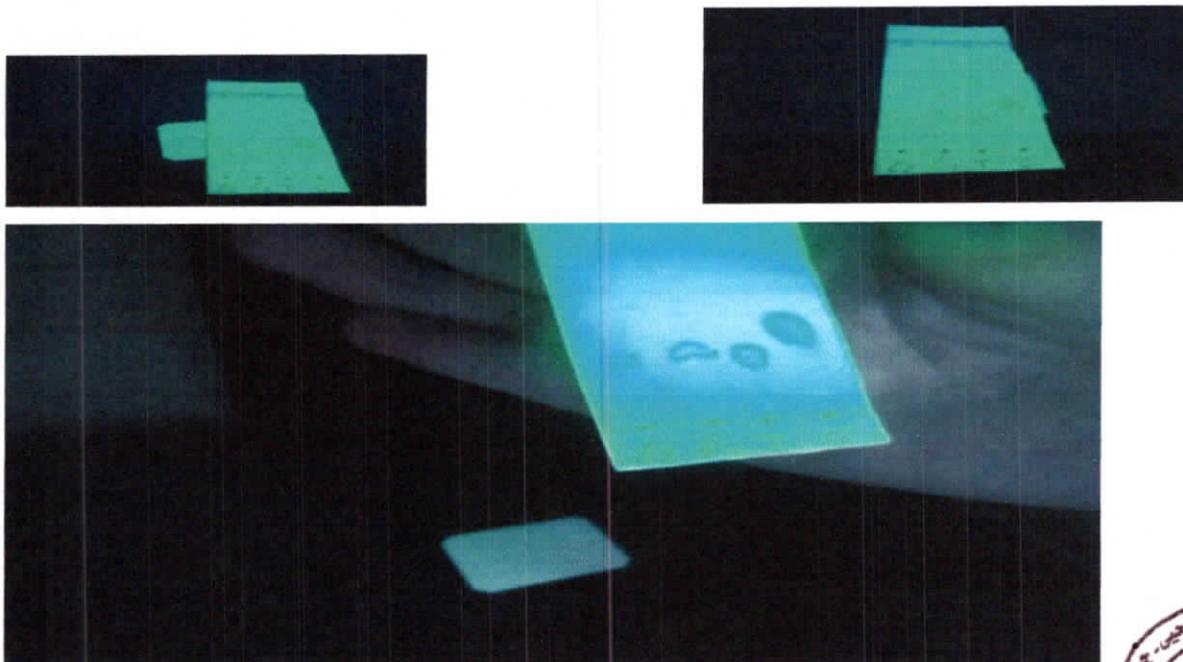


Fig III.11. Caractérisation de la théobromine par la méthode CCM.



III.3 Etude cinétique de la réaction théobromine /urée :

III.3.1 Introduction :

Avant de tester la théobromine sur un biocapteur, nous avons jugé utile d'étudier la cinétique de cette dernière avec l'urée.

Nous avons utilisé 0,01g de la théobromine dans 100 mL de la solution tampon, spécialement utilisé dans les biocapteurs (phosphate buffer à pH 6,8) dans laquelle nous avons ajouté 0,05 g d'urée et nous avons lu l'absorbance à intervalle du temps. La concentration d'urée utilisée a été choisie en se basant sur **la norme d'urée dans le corps humain qui est de :**

- ✓ **chez l'homme : 3 à 8,33 mmol/L, soit 0,18 à 0,50 g/L ;**
- ✓ **chez la femme : 2,5 à 8,33 mmol/L, soit 0,15 à 0,50 g/L.**

A l'aide d'une courbe d'étalonnage on déduit la concentration d'urée dans la solution tampon en fonction du temps.

- Le pH 6,8 a été choisi conformément au protocole du dosage d'urée [2] qui exige un pH de 6,7 d'où nous avons préparé la solution tampon phosphate d'un **pH 6,8**, car le pH 6.7 n'existe pas sur le protocole du tampon phosphate.
- Nous avons pris pour la courbe d'étalonnage les différentes concentrations d'urée varient entre 0.2 g/L à 1 g /L.

III.3.2 Solution Tampon phosphate :

La solution tampon phosphate a été choisie car cette solution donne une bonne stabilité lors de son utilisation sur biocapteur. A cet effet, nous avons jugé utile d'utiliser la même solution pour la cinétique, les analyses de la voltamétrie à ondes carrées (SWV) sur le biocapteur ultérieurement développé.

III.3.2.1 Préparation de la solution tampon phosphate (phosphate Buffer pH 5.8 – 8.0 à 25° C).

Le protocole guide des solutions tampons phosphates, montre les quantités nécessaires pour obtenir différents pH à savoir [4]:

Pour obtenir 100 ml 0.1 M de la solution tampon phosphate, nous avons mélangé sodium phosphate dibasique déshydraté $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et sodium phosphate monobasique monohydraté $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ comme présenter ci-dessous et nous avons dilué à 100 mL avec de l'eau distillée [4] :

Solution A : sodium phosphate dibasique di hydraté $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M ;

M= 178.05g /mole.

Solution B : sodium phosphate monobasique monohydrate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M;

M= 138.01 g/mole.

La préparation de 100 mL de la Solution tampon à un pH = 6.8, nécessite 25.4 mL de la solution A et 25.5 mL de la solution B et diluer le mélange avec de l'eau distillée à 100 mL. Pour cela nous avons préparé 30 mL de chaque solution. [4]

Enfin, la solution 0.1 M de la solution tampon phosphate à pH 6.8 est obtenue par le mélange de 24.5 ml de la solution A et de 25.5 ml de la solution B, le mélange dilué à 100 ml [4].

III.3.3 Préparation de la solution urée pour la courbe d'étalonnage.

Afin d'étudier l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration d'urée, nous avons tracé la courbe d'étalonnage. Pour cela, nous avons préparé 10 mL d'une solution d'urée à des concentrations différentes. Ces concentrations varient de 0.2 g/L à 1 g/L. Les quantités d'urée solide à dissoudre dans 10 mL d'eau distillée pour différentes concentrations sont montrées dans le tableau suivant :

Tableau III.1. Préparation de la solution d'urée pour tracer la courbe d'étalonnage.

Quantité d'urée solide (g/L) à dissoudre dans 10 mL d'eau distillée	Concentration d'urée obtenue en g/L
0.01	1
0.008	0.8
0.007	0.7
0.006	0.6
0.005	0.5
0.004	0.4
0.003	0.3
0.002	0.2

III.3.4 L'étude cinétique de la réaction urée théobromine :

III.3.4.1 La réaction d'urée avec la théobromine.

L'étude de la réaction de l'urée avec la théobromine a été réalisée en régime statique dans un bécher contenant une solution d'urée de l'ordre de 0.00825 M soit 0.5 g/L et 1 g/L de la théobromine.

Les différents échantillons prélevés ont été analysés par spectrométrie d'absorption UV-Visible à la longueur d'onde 590 nm à 37° C dans une cuve de 1cm d'épaisseur.

L'évolution de la concentration au cours de l'analyse a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (Tableau III.4)

La quantité d'urée retenue par unité de masse de la théobromine au moment t, qt (mg / g) et l'efficacité d'élimination d'urée, R ont été calculées comme suit [5].

$$qt = \frac{(C_0 - Ct)}{M} v \dots \dots \dots \text{Eq.III.1.}$$

$$R = \frac{(C_0 - Ct)}{C_0} 100 \dots \dots \dots \text{Eq.III.2.}$$

Où C_0 est la concentration initiale d'urée (mg / L), C_t la concentration d'urée à l'instant t, V le volume de la solution.

Nous avons mesuré l'absorbance après l'ajout des réactifs d'urées selon le protocole de dosage [2]. Cette mesure d'absorbance a été réalisée sur des intervalles du temps variant de 5 min à 60 min.



Fig III.12. Réaction de 0.05g d'urée et 0.1 g de la théobromine.

III.3.4.2 Dosage de l'urée par la méthode de Berthelot modifiée :

Il est à noter que les réactifs d'urée ont été récupérés de chez M. BAKIOUA laboratoire d'analyse, le principe de ce protocole est basé sur le dosage d'urée en cinétique selon la réaction suivante :



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagisse en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée [2].

Deux réactifs A et B standards ont été récupérés de laboratoire d'analyse, les colorations des différents échantillons sont constituées comme suit :

Pour le Blanc : 1 mL du réactif (A) mélanger, incuber 5 min à 37° C puis ajouter 5 mL du réactif (B) mélanger et incuber 5 min à 37° C [2].

Pour l'étalon :

On prend 10 µL de chaque concentration de l'échantillon étalon, on ajoute 1 mL du réactif (A) on mélange et on le met dans un bain à 37° C pour incubation pendant 5 min, puis on ajoute 5 mL du réactif (B) on mélange et on le met dans un bain à 37° C pour incubation pendant 5 min et on lit l'absorbance. Les mêmes étapes ont été refaites pour toutes les concentrations de l'étalon [2].

Pour la cinétique :

A chaque intervalle du temps, on prend 10 µL de la solution (théobromine +urée), on ajoute 1 mL du réactif (A) on mélange et on le met dans un bain à 37° C pour incubation pendant 5 min, puis on ajoute 5 mL du réactif (B) on mélange et on le met dans un bain à 37° C pour incubation pendant 5 min et on lit l'absorbance. Les mêmes étapes ont été refaites pour toutes les intervalles du temps [2].

Les colorations des étalons ainsi que l'échantillon à différents intervalles de temps en fonction d'ajout des réactifs A et B et selon le protocole [2] sont présentés dans les figures ci-après:

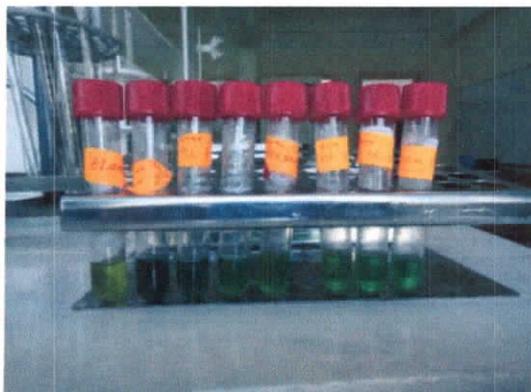


Fig III.13 Coloration des échantillons étalons.



Fig III.14. Coloration des échantillons de la cinétique à intervalles du temps.

III.3.5 Lecture de l'absorbance des différents échantillons sur Spectrophotométrie UV-Visible, longueur d'onde 590 nm [2] :

III.3.5.1 Courbe d'étalonnage :

Tableau III.2. Absorbance en fonction de la concentration de la courbe d'étalonnage.

Concentration (g/L)	0.2	0.4	0.5	0.55	0.6	0.8	1
Absorbance	0.42	0.49	0.56	0.57	0.62	0.72	0.81

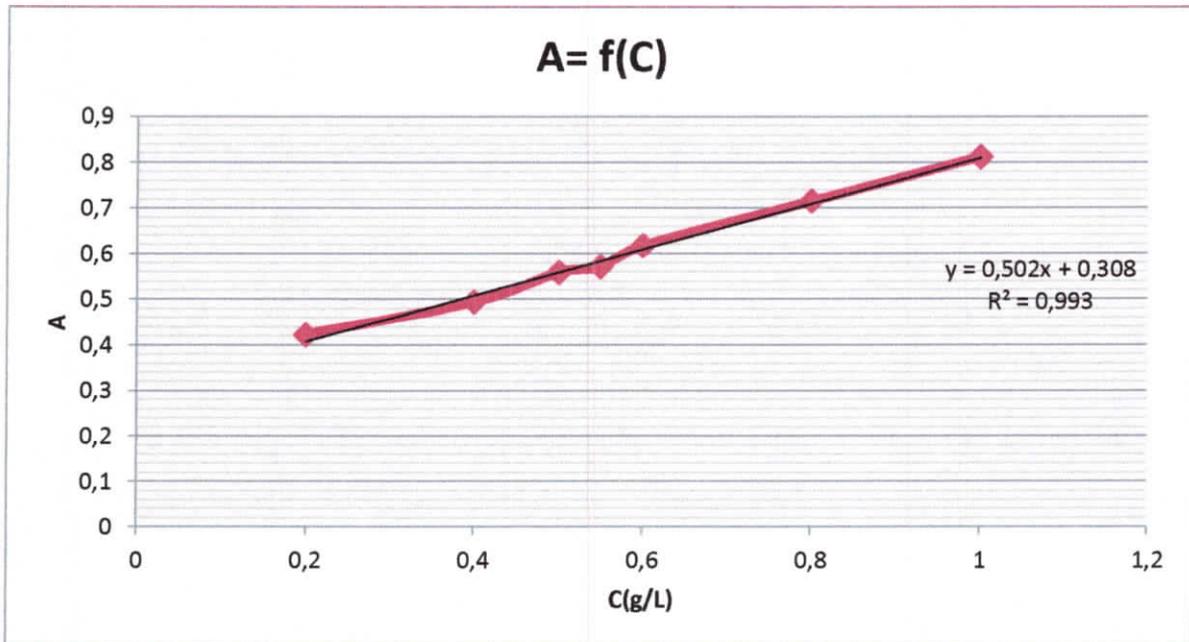


Fig III.15. Courbe d'étalonnage absorbance en fonction de la concentration.

III.3.5.2 Résultats de la cinétique théobromine/urée

Tableau III.3 Absorbance en fonction du temps.

Temps (min)	5	10	15	20	25	30	40	50	60
Absorbance	0.4916	0.463	0.445	0.4373	0.434	0.433	0.4326	0.4324	0.434

A partir de l'absorbance nous avons déduit la concentration en fonction du temps en utilisant la courbe d'étalonnage, les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Si on s'intéresse à la quantité d'urée captée par la théobromine exprimée en %, le calcul sera réalisé comme suit:

Soit C_0 la concentration initiale d'urée qui est de 0.00855M, soit 0,5 g/L et (C_t) la concentration résiduelle d'urée à différents intervalles du temps (calculer à partir de l'absorbance en utilisant la courbe d'étalonnage), le pourcentage de rétention d'urée par la théobromine sera donc:

$$R\% = \frac{C_0 - C_t}{C_0}$$

Tableau III.4. Tableau récapitulatif de la cinétique (Urée/Théobromine).

Temps (min)	5	10	15	20	25	30	40	50	60
L'absorbance	0,4916	0,463	0,445	0,4373	0,434	0,433	0,4326	0,4324	0,434
Concentration (g/l)	0,34072	0,28205	0,24513	0,22933	0,22256	0,22051	0,21969	0,21928	0,22256
Taux %	31,8564	43,5897	50,9744	54,1333	55,4872	55,8974	56,0615	56,1436	55,4872

om

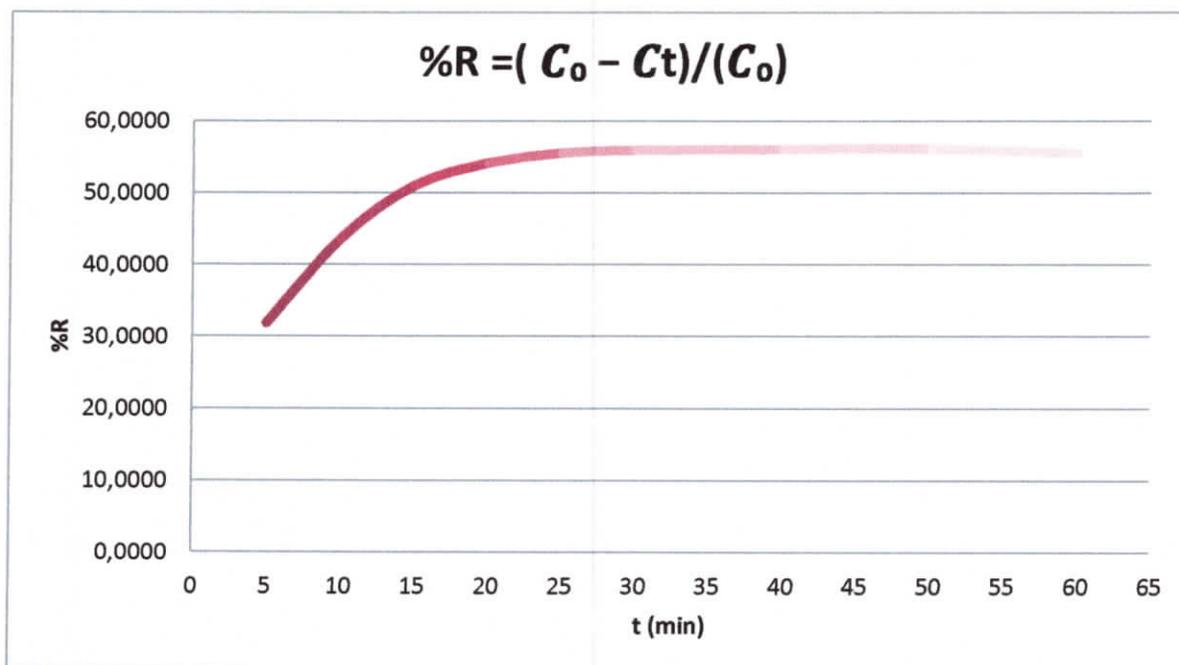


Fig III.16. Pourcentage en concentration d'urée réagit sur théobromine en fonction du temps.

La courbe obtenue (Figure III.16) représentant la cinétique de la réaction, a la forme typique d'une courbe de saturation caractérisée par une forte rétention des premières minutes (15 minutes).

Après 20 minutes, l'équilibre est atteint et l'urée est éliminée à 56%. Cette élimination nous motive à pousser notre étude et tester l'effet de la théobromine comme partie sensible d'un biocapteur biologique.

La réaction urée / Théobromine peut être développée comme suit:



Le mécanisme de la réaction peut être expliqué comme suit :

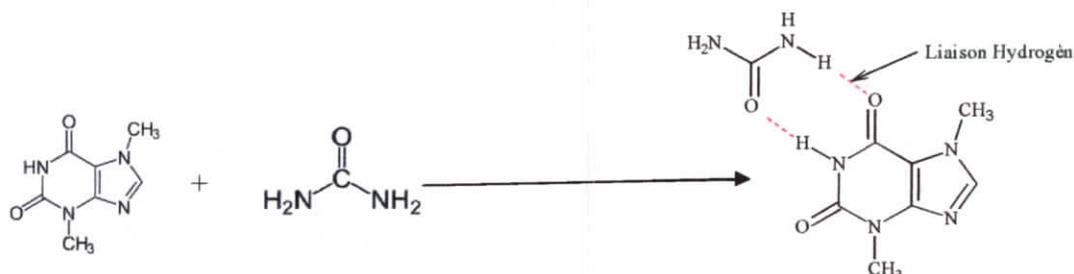


Fig III.17. Réaction urée théobromine.

Afin d'illustrer cette réaction, nous avons réalisé une spectroscopie infrarouge après la réaction de la théobromine avec l'urée dont le spectre est le suivant :

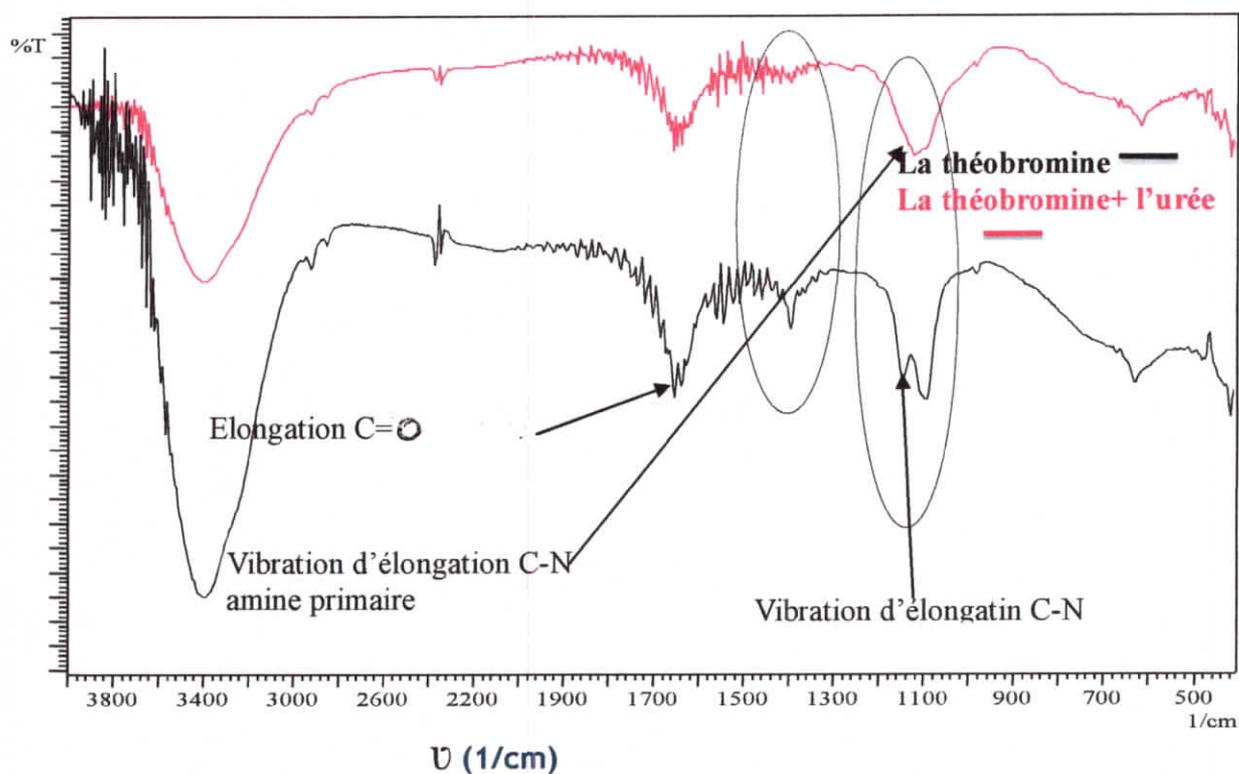


Fig III.18. Spectre Infrarouge de la théobromine et de la théobromine après réaction avec l'urée.

III.4 Fonctionnalisation des électrodes (Théobromine comme partie sensible d'un biocapteur biologique).

III.4.1. Nettoyage des électrodes :

Dans notre travail, nous avons utilisé des électrodes en or qui ont servis comme transducteurs, avant leur utilisation une méthode de nettoyage est utilisée qui sera composée de deux étapes distinctes à savoir :

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 ultra pure puis à l'éthanol et séchées sous un flux d'azote. [6].

III.4.2. Préparation de la membrane et conception du capteur :

Pour la préparation des membranes nous avons utilisés :

- Le polychlorure de vinyle (PVC) comme matrice, soit 33mg ;
- Le Dioctylphtalate (DOP), il est utilisé comme additif en tant que plastifiant.
- Le Tetrahydrofuran THF est un composé organique hétérocyclique utilisé comme solvant, c'est l'un des éthers les plus polaires.
- La théobromine extraite du cacao qui servira comme partie sensible de notre biocapteur.

Pour réaliser ce travail nous avons caractérisé notre électrode par les méthodes suivantes :

1. **Electrode avec théobromine extraite et PVC comme couche réceptrice :** La théobromine et le PVC ont été solubilisés dans THF et mélangés avec DOP ;
2. **Electrode avec PVC comme couche réceptrice :** Le PVC est solubilisé dans le THF et mélangé avec DOP.
3. **Electrode avec théobromine commerciale comme couche réceptrice sans PVC :** La théobromine a été solubilisée dans le THF et mélangée avec le DOP.
4. **Electrode avec théobromine extraite comme couche réceptrice sans PVC :** La théobromine a été solubilisée dans le THF et mélangée avec le DOP.

La méthode de préparation consiste à mélanger les quantités des produits en assurant une parfaite agitation magnétique, ces quantités ont été choisies en se basant sur des valeurs optimisées par S.Zougar. [8]

1. 33 mg du PVC
2. 69 mg du DOP
3. 36 mg de la théobromine
4. 750 μL du THF,

III.4.3 Dépôt d'une quantité du mélange sur l'électrode en or, méthode avec spin-coating :

Une goutte de 15 μL de chaque suspension est déposée sur la surface de l'électrode d'or par la méthode de spin-coating [9]. La surface est ensuite séchée à l'air libre pendant une journée.

La technique du revêtement par centrifugation (spin coating) le dépôt d'une couche mince sur un substrat s'effectue en deux étapes :

1. La première consiste à déposer la solution sur le substrat (un excès de liquide est distribué sur la surface).
2. Dans la deuxième étape, le fluide est étalé sur la surface du substrat par centrifugation à petite vitesse durant un temps T_1 où l'excès du liquide s'écoule vers l'extérieur. Ensuite la vitesse de rotation est augmentée et maintenue pendant un certain temps T_2 permettant l'évaporation des solvants les plus volatils qui accentue la diminution de l'épaisseur du film déposé jusqu'à atteindre une épaisseur désirée de la couche (Figure III.16).

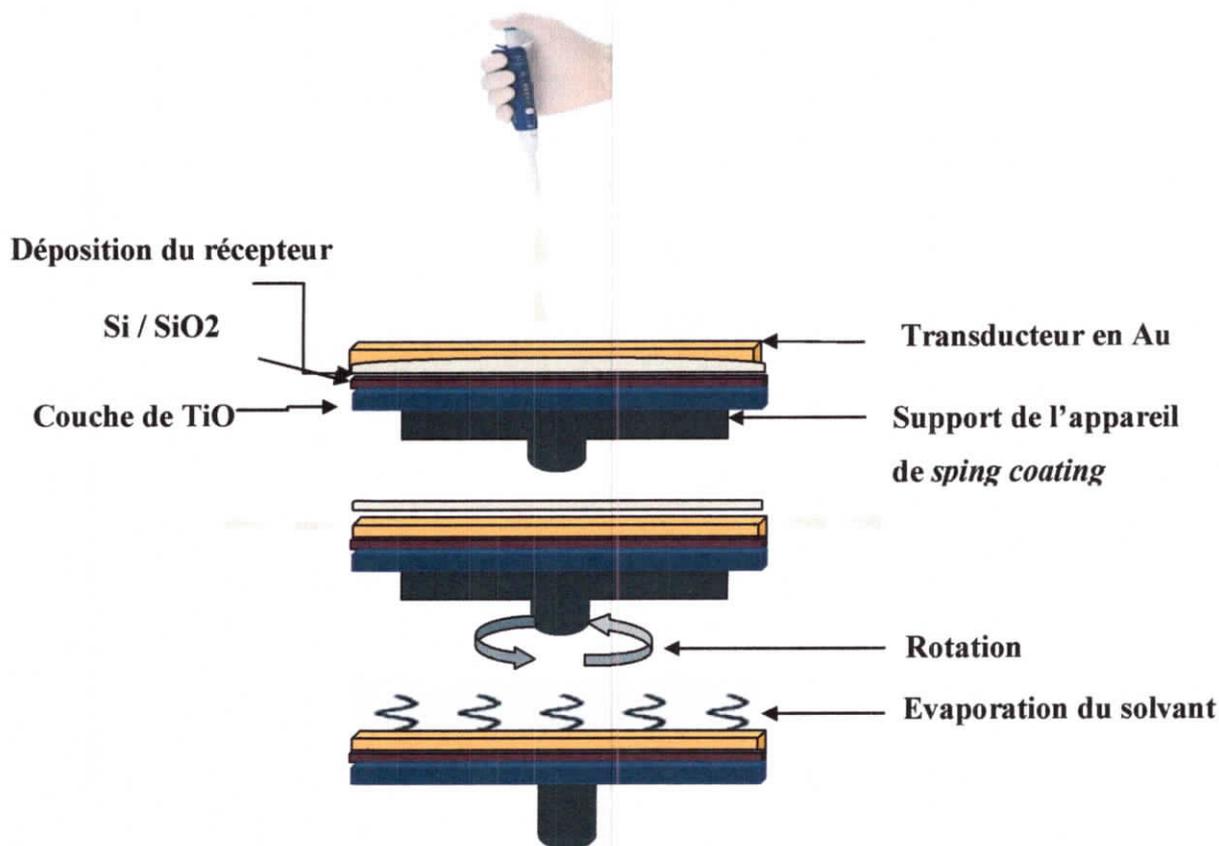


Fig III.19. Déposition de la membrane contient la théobromine sur l'électrode d'or par spin coating.

III.4.4 Caractérisation électrochimiques :

Les électrodes ont été caractérisées par la spectroscopie d'impédance et la voltamétrie à ondes carrées, afin d'évaluer la sensibilité de notre capteur vis-à-vis des analytes (Urée, acide urique, créatine).

III.4.4.1 Cellule électrochimique :

La caractérisation de nos électrodes par les méthodes d'impédance et de voltamétrie à ondes carrées a été réalisée dans une cellule électrochimique en verre (figure III.18), de volume 5 ml, à trois électrodes : une électrode de travail (WE), une électrode de référence (RE) et une contre-électrode à savoir :

- L'électrode de travail (WE) en or joue le rôle de transducteur sur laquelle s'effectue la réaction à étudier ;
- une électrode de référence (RE) au calomel saturée qui possède un potentiel constant quel que soit la valeur du courant qui la traverse, ce qui permet d'imposer une différence de potentiel définie entre cette électrode et l'électrode de travail ;

- une électrode auxiliaire(CE) (encore appelée contre-électrode) en platine, elle possède une résistance interne plus faible que celle de l'électrode de travail et assure donc le passage de plus grande partie du courant d'oxydation ou de réduction dans le circuit de mesure. Cette électrode a une large surface par rapport à l'électrode de travail. De ce fait le courant qui traverse l'électrode de travail et la chute ohmique qui lui correspond sont réduits au minimum. La différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est donc connue avec une meilleure précision.
- Un agitateur magnétique de petite dimension permet d'homogénéiser la solution.

La géométrie de cette cellule permet une disposition bien déterminée des trois électrodes.

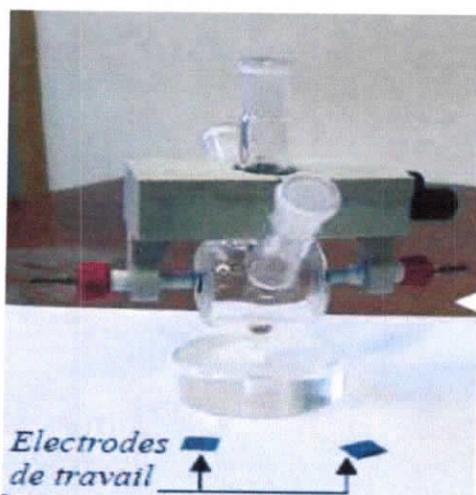


Fig III.20. La cellule électrochimique.

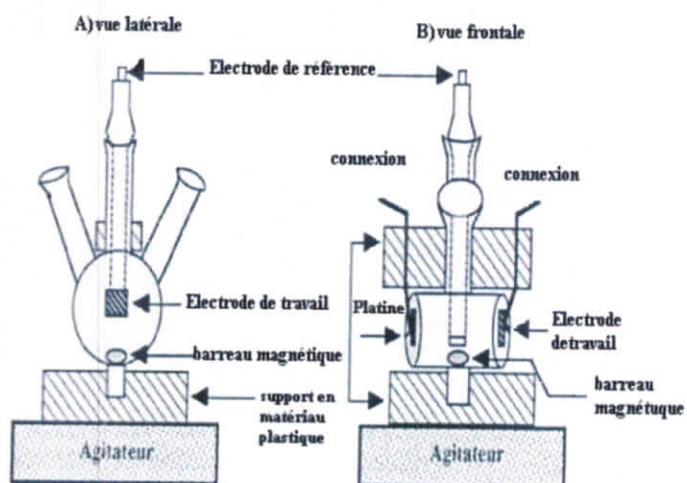


Fig III.20. Vue latérale et frontale de la Cellule Electrochimique.

III.4.4.2 Montage expérimental des caractérisations électrochimiques :

Toutes les mesures électrochimiques, ont été réalisées avec un analyseur d'impédance potentiostat-galvanostat Voltalab 40 de type Radio-Meter PGZ 301, piloté par le logiciel VoltaMaster 4.

La cellule électrochimique est placée dans une cage de Faraday afin de minimiser l'interférence des ondes électromagnétique (figure III.19).

Pour les mesures d'impédance, cet appareil sert à la fois à générer le signal sinusoïdal avec l'amplitude et la fréquence désirées et à extraire les parties réelles et imaginaires de l'impédance du système étudié.

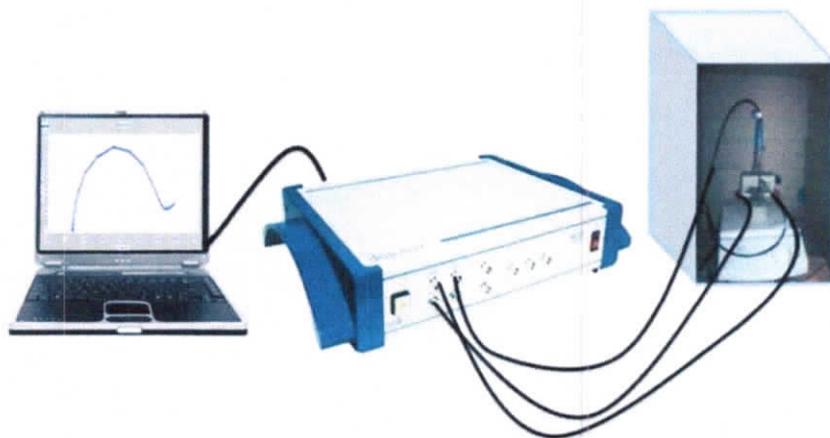


Fig III.21. Dispositif de mesure électrochimique.

III.5 Sensibilité du capteur Au/membrane déposée vis-à-vis de l'urée en utilisant la technique de voltamétrie à ondes carrées SWV :

III.5.1 Cas de la membrane composée de (Théobromine extraite+ PVC+DOP solubilisés dans THF) :

III.5.1.1 Courbes obtenues par la technique du voltamétrie à ondes carrées (SWV) :

Les mesures voltamétriques à ondes carrées ont été effectuées sur une marge du potentiel variant de -2000 mV à +2000 mV. La figure III.22 montre l'évolution de la densité du courant en fonction du potentiel pour le biocapteur à base de la théobromine extraite et du PVC comme partie sensible, le biocapteur a été émergé dans une solution tampon phosphate et des concentrations d'urée variant de 10^{-10} ppm jusqu'à 10^{-5} ppm ont été ajoutées au fur et à mesure de la stabilité du système (impédance).

On remarque que les courbes à différentes concentrations ont le même optimum correspondant à un potentiel de $E = -0.14$ mV et que l'intensité du courant augmente avec la concentration d'urée. Ceci est bien illustré dans la courbe de calibration de la membrane (Figure III.23). Cette courbe montre une réponse linéaire entre 10^{-11} et 10^{-7} ppm et une limite de détection de l'ordre de 10^{-8} ppm.

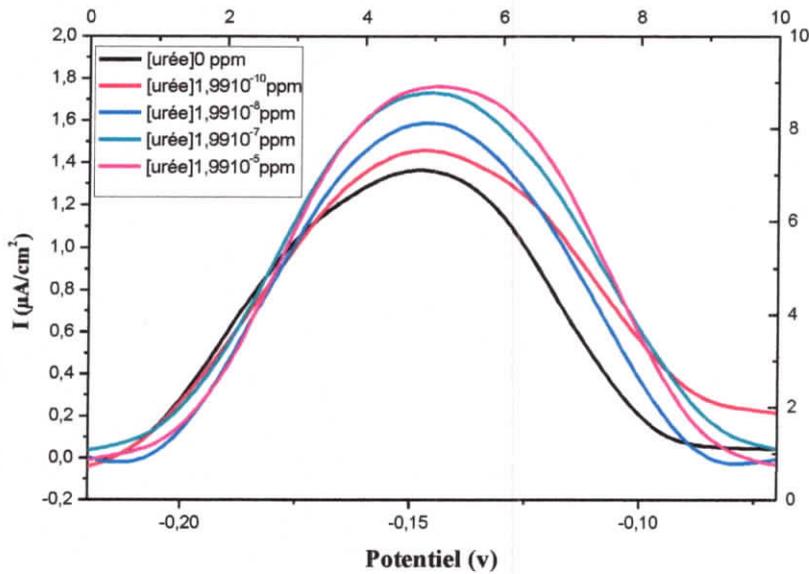


Fig III.22. Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composé de la théobromine extraite avec pvc suite à l'injection des concentrations croissantes d'urée.

III.5.1.2 Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite avec PVC :

Tableau III.5. Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite avec PVC.

Concentration (ppm)	$1.99 \cdot 10^{-11}$	$1.99 \cdot 10^{-10}$	$1.99 \cdot 10^{-8}$	$1.99 \cdot 10^{-7}$	$1.99 \cdot 10^{-5}$
LOG(C)	-10.7	-9.7	-7.7	-6.7	-4.7
I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	1.3701	1.4625	1.5840	1.7322	1.7649
ΔI ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	0	0.0924	0.2139	0.3621	0.3948
V (Volt)	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14

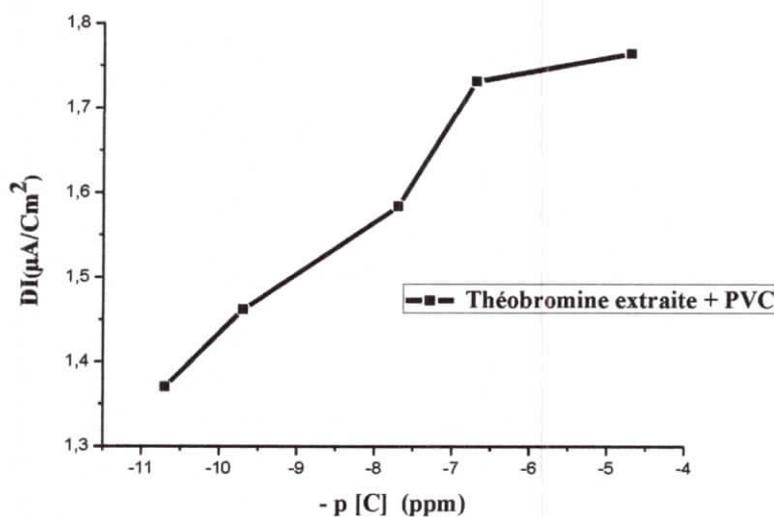


Fig III.23. Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite avec PVC.

III.5.2 Cas de la membrane composée de (Théobromine commerciale sans PVC+DOP solubilisés dans THF) :

III.5.2.1 Courbes obtenues par la technique du voltamétrie à ondes carrées (SWV) :

Les mêmes conditions ont été utilisées que celle de la membrane précédente, seulement dans ce cas nous avons éliminé le PVC et nous avons utilisé la théobromine commerciale d'une pureté de plus de 99%. La figure III.24 montre l'évolution de la densité du courant en fonction du potentiel après l'ajout des concentrations d'urée variant de 10^{-11} à 10^{-5} ppm. On remarque que les courbes à différentes concentrations ont gardé le même optimum correspondant à un potentiel de $E = -0.14$ mV et que l'intensité du courant augmente avec la concentration d'urée. Néanmoins l'intensité du courant dans cette membrane est plus importante (varie du $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) en fonction de la concentration d'urée.

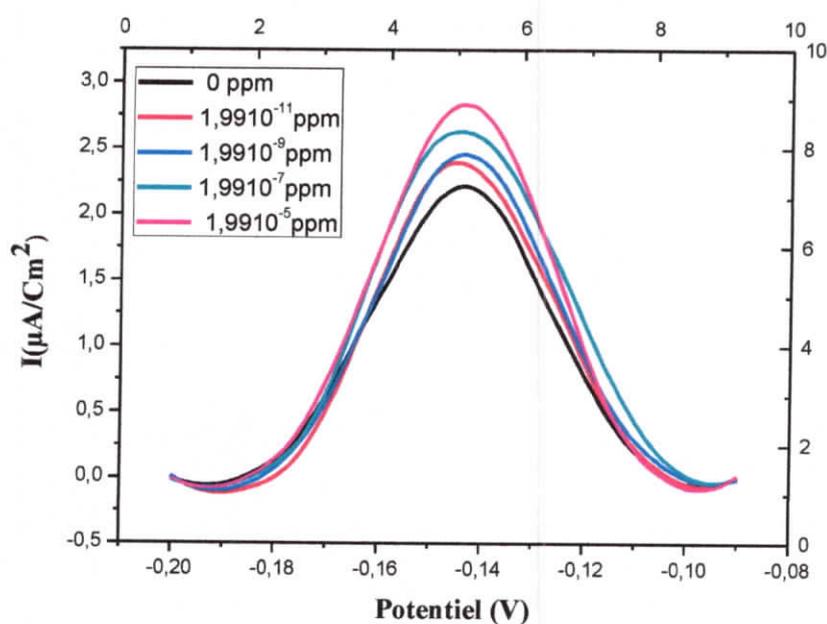


Fig III.24. Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composé de la théobromine commerciale sans pvc suite à l'injection des concentrations croissantes d'urée.

III.5.2.2 Courbe de calibration correspondante de la théobromine commerciale sans PVC :

Tableau III.6. Courbe de calibration correspondante de la théobromine commerciale sans PVC :

Concentration (ppm)	0 ppm	$1.99 \cdot 10^{-11}$	$1.99 \cdot 10^{-9}$	$1.99 \cdot 10^{-7}$	$1.99 \cdot 10^{-5}$
LOG(C)		-10.7	-8.7	-6.7	-4.7
I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	1.3647	1.5131	1.5974	1.7449	1.9372
ΔI ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)		0	0.0843	0.2318	0.4241
V (Volt)	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14

La courbe de calibration (III.25) montre une linéarité et une pente plus importante entre 10^{-10} à 10^{-4} ppm et la limite de détection 10^{-7} ppm.

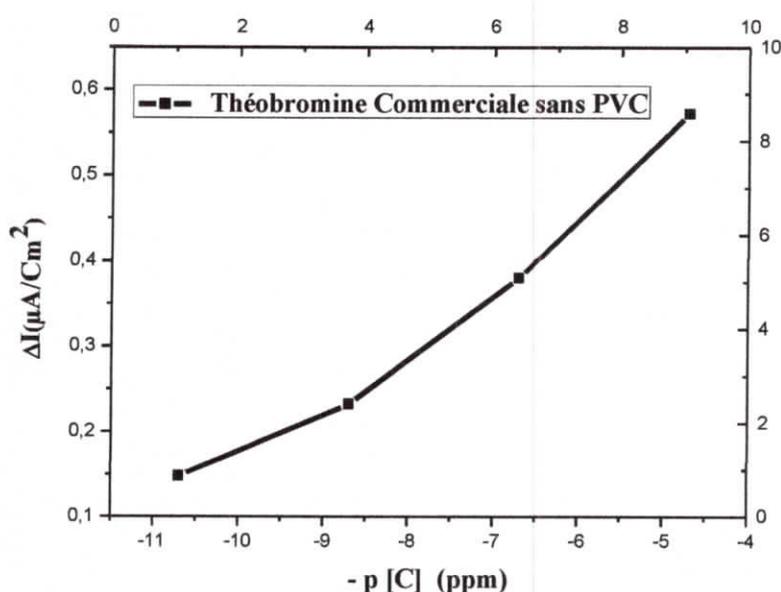


Fig III.25. Courbe de calibration correspondante de la théobromine commerciale sans PVC.

III.5.3 Cas de la membrane composée de (Théobromine extraite sans PVC+DOP solubilisés dans THF) :

Avec les mêmes conditions de travail et les mêmes produits que ceux utilisés pour la courbe III.22, (théobromine extraite avec PVC), uniquement nous avons éliminé le PVC, nous remarquons que l'intensité du courant est plus importante, l'effet de la concentration en urée est plus importante dans l'électrode sans PVC qu'avec celle avec PVC.

L'optimum qui correspond à un potentiel de $E = -0.14$ mV restera le même. Ceci est bien illustré dans la courbe de calibration (Fig III.27) où le domaine de linéarité varie de 10^{-11} à 10^{-4} ppm avec une limite de détection de 10^{-8} ppm.

III.5.3.1 Courbes obtenues par la technique du voltamétrie à ondes carrées (SWV) :

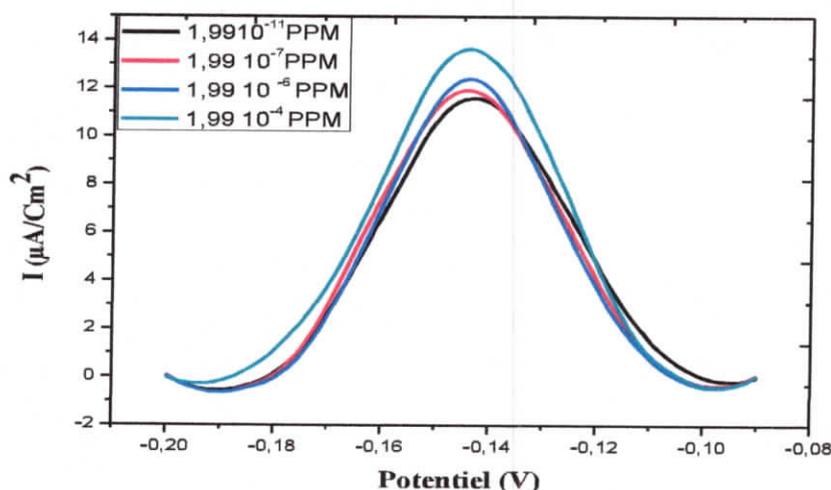


Fig III.26. Voltammogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composée de la théobromine extraite sans pvc suite à l'injection des concentrations croissantes d'urée.

III.5.3.2 Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite sans PVC :

Tableau III.7. Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite sans PVC :

Concentration (ppm)	$1.99 \cdot 10^{-11}$	$1.99 \cdot 10^{-9}$	$1.99 \cdot 10^{-7}$	$1.99 \cdot 10^{-6}$	$1.99 \cdot 10^{-5}$
LOG(C)	-10.7	-8.7	-6.7	-5.7	-4.7
I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	12.16	12.33	12.62	12.84	12.97
ΔI ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	0	0.17	0.46	0.68	0.81
V (Volt)	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14

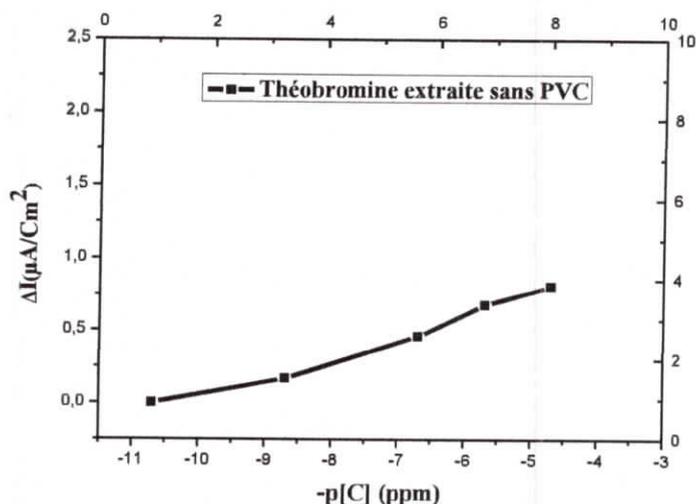


Fig III.27. Courbe de calibration correspondante de la théobromine extraite sans PVC.

III.5.4 Les courbes de calibration superposées :

Afin d'étudier la sensibilité de différentes membranes par rapport à l'urée et à différentes concentrations, nous avons procédé à une superposition des courbes de calibrations relatives à la voltamétrie à ondes carrées (SWV) des trois membranes (Fig III.26).

La comparaison de pentes relatives aux trois courbes nous montre clairement qu'une bonne sensibilité vis-à-vis de l'urée de la membrane préparée à partir de la théobromine extraite est meilleure par rapport aux autres membranes.

Aussi, et pour cette même membrane, la présence du PVC a diminué le transfert électronique à travers l'électrode et par la même l'activité de la membrane. Cette diminution a engendré un domaine d'intensité faible à différentes concentrations d'urée (Fig III.28) par rapport à la même membrane sans PVC.

La comparaison de la sensibilité vis-à-vis de l'analyte testé (urée) entre la théobromine extraite et celle commerciale, montre aussi que la membrane à base de la théobromine extraite est plus sensible à l'urée comparativement à celle commerciale. La théobromine commerciale est à 99% pure.

Cette différence de sensibilité confirme la présence d'autres métabolites mélangés avec la théobromine extraite à partir du cacao qui ont réagi avec l'urée et donc augmentés la sensibilité de la membrane relative à la théobromine extraite. Ces métabolites peuvent être des polyphénols par exemple.

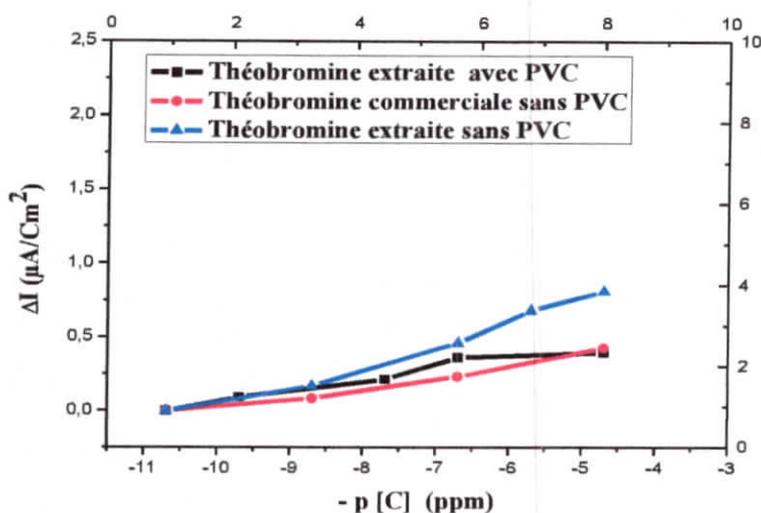


Fig III.28. Les courbes de calibration superposées correspondants aux trois membranes.

III.6 Test de la membrane composée de la (Théobromine extraite sans PVC+DOP solubilisés dans THF) sur un mélange d'analyte (urée et créatine):

Nous avons testé un mélange d'analytes composé d'urée et de la créatine sur l'électrode. Nous constatons la parution de deux pics (Fig III.29 et Fig III.30), l'un des pics correspond à l'urée et l'autre pic correspond probablement à la créatine.

Nous avons essayé de calculer l'air des pics et les comparés aux concentrations initiales. Les résultats sont les suivants :

Le premier pic donne un air de 1.1510^{-3} / unité de surface

Le deuxième pic donne un air de 2.710^{-3} / unité de surface.

L'air du pic d'urée utilisé seul est de 0.54 / unité de surface qui correspond à une concentration de 1.9910^{-4} ppm.

Si on considère que le premier pic correspond à l'urée, son air est de 1.1510^{-3} unité de surface, ce qui donne une concentration de $4.57 \cdot 10^{-7}$. Cette concentration est largement différente à celle utilisée réellement qui est de 10^{-4} ppm, avec une différence de : 9.8510^{-5} .

L'air du deuxième pic est de 2.710^{-3} , elle est presque le double par rapport à ce d'urée. On peut donc conclure que la membrane présente une sélectivité envers la créatine qu'avec l'urée quand ils sont mélangés.

Il est à signaler que les solutions tampon de la créatine et d'acide urique ont été récupérées par le laboratoire de M. BOUROUIED.

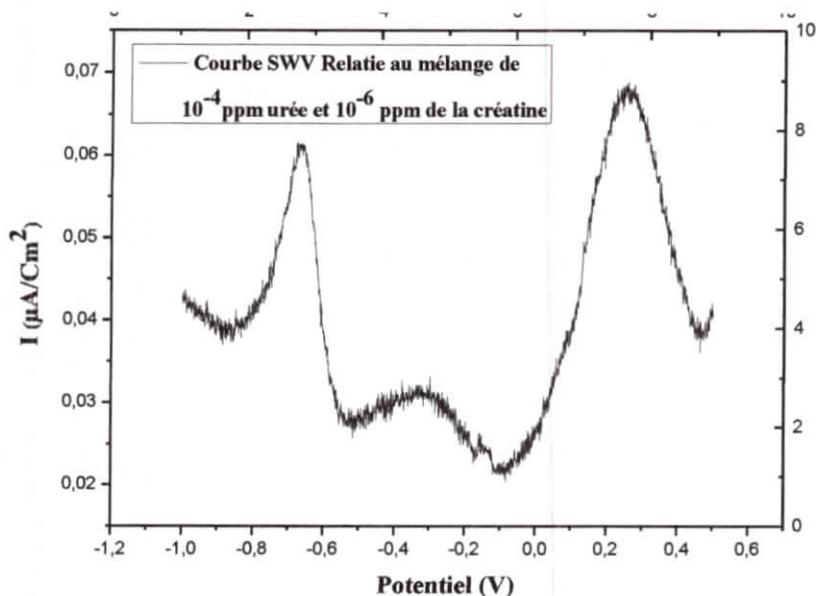


Fig III.29. Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composé de la théobromine extraite sans pvc suite à l'injection d'un mélange d'urée et de la créatine 10^{-4} et 10^{-6} respectivement.

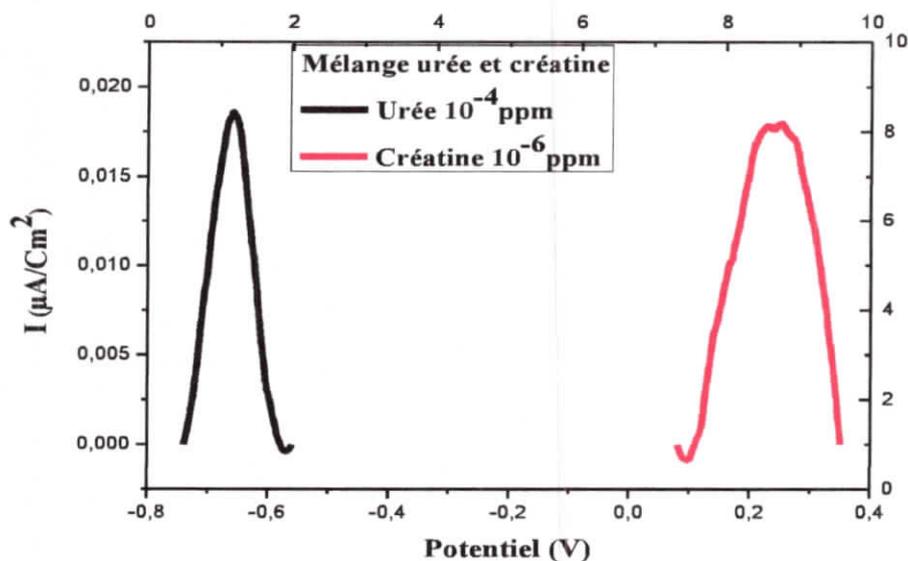


Fig III.30. Pics séparés relatifs au Voltamogramme obtenu par mesure de SWV de l'électrode composé de la théobromine extraite sans pvc suite à l'injection d'un mélange d'urée et de la créatine 10^{-4} et 10^{-6} respectivement.

Références Bibliographiques :

- [1]. **KHECHAI, M. (2016).** Etude expérimentale de l'équilibre liquide-liquide d'un système ternaire (eau+ acide propanoïque+ huile d'Eucalyptus) (Doctoral dissertation).
- [2]. **Balleter, W.G , Bushaman, C.S., Tidwell, P.W.,** Anal. Chim. Acta, 33,59 Berthelot, M.P.E., Report Chim. Appl; 284(1859)Mac Key, E.M., Racheyll, J. Clin. Invest, J.Clin.Invest.4,295(1927)
- [3]. **Tondeur, J. J., Dombert, A., & Gierst, L. (1962).** Le comportement polarographique de l'ion chromate: I. Éluclidation du mécanisme réactionnel et étude de l'influence de l'électrolyte-support. *Journal of Electroanalytical Chemistry (1959)*, 3(4), 225-262.
- [4] : **Protocols & Applications guides, promega, page 15-4**
- [5]. **Z; Zhou, F; Liu, Yong Huang, Z; Wang, G; Li;** International Journal of Biological Macromolecules; 77 (2015) 336–343., 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.
- [6]. **C. Dernane , A. Zazoua , I. Kazane , N. Jaffrezic-Renault ;** Materials Science and Engineering; 33 (2013) 3638–3643].
- [7]. **H.Benelmadjat,** “ Elaboration et caractérisation de matériaux cristallins ou amorphes purs et dopés, thèse de doctorat, université Mentouri Constantine (2011).
- [8]. **S.Zougar, K.Morakchi, A .Zazoua, S.Saad, R,Kherrat, N.Jaffrezic-Renault,**
«Characterization of ammoniumion-Sensitive membranes in solution With electrochemical impedance spectroscopy»,Materials Scienc and Engineering C28, 1020-1023, 2008..
- [9]. **Bornside, D. E., Macosko, C. W., & Scriven, L. E. (1987).** On the modeling of spin coating. *Journal of imaging technology*, 13(4), 122-130.



Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives :

Cette étude menée sur l'extraction et l'utilisation des alcaloïdes comme partie sensible d'un biocapteur pour la détection d'urée a permis d'éclaircir l'affinité de ce dernier par rapport aux différents biocapteurs utilisés.

Les voltamogrammes obtenus ainsi que les courbes de calibrations, nous ont montrés clairement qu'une bonne sensibilité vis-à-vis de l'urée de la membrane préparée à base de la théobromine extraite est meilleure par rapport aux autres membranes.

Aussi, et pour cette même membrane, la présence du PVC a diminué le transfert électronique à travers l'électrode et par la même l'activité de la membrane. Cette diminution se manifeste par un domaine d'intensité faible à différentes concentrations d'urée par rapport à la même membrane sans PVC.

La comparaison de la sensibilité vis-à-vis de l'analyte testé (urée) entre la théobromine extraite et celle commerciale, montre aussi que la membrane à base de la théobromine extraite est plus sensible comparativement à celle commerciale. La théobromine commerciale est à 99% pure.

Cette différence de sensibilité confirme la présence d'autres métabolites mélangés avec la théobromine extraite à partir du cacao. Ces métabolites ont réagi avec l'urée qui engendre une augmentation de la sensibilité de la membrane relative à la théobromine extraite.

Ces métabolites peuvent être des polyphénols par exemple qui sont présents dans le cacao.

Enfin, nous avons mélangé deux analytes ensemble (urée et créatine) et la technique de voltamétrie à ondes carrées nous montre clairement la présence de deux pics.

Nous avons essayé de calculer l'aire des pics et les comparés aux concentrations initiales. Les résultats sont les suivants :

Le premier pic donne un aire de 1.1510^{-3} / unité de surface

Le deuxième pic donne un aire de 2.710^{-3} / unité de surface.

Si on considère que le premier pic correspond à l'urée, son aire est de 1.1510^{-3} unité de surface, ce qui donne une concentration de $4.57 \cdot 10^{-7}$. **Cette concentration est largement différente à celle utilisée réellement qui est de 10^{-4} ppm, avec une différence de : 9.8510^{-5} .**

L'air du deuxième pic est de 2.710^{-3} , elle est presque le double par rapport à ce d'urée. On peut donc conclure que la membrane présente une sélectivité envers la créatine qu'avec l'urée quand ils sont mélangés.

A la lumière de ce qui a été réalisé, il serait intéressant :

- de poursuivre cette étude en procédant à d'autres méthodes d'extractions permettant d'extraire des alcaloïdes pure et d'utiliser d'autre technique de caractérisations.
- De comparer les résultats obtenus avec ceux réalisés dans l'un des laboratoires de notre région.
- Procéder à un essai sur un échantillon réel.
- Les résultats que nous avons obtenus peuvent être servis comme base ou guide pour de nouvelles études.

