

2m11-2875.6

Université de Montréal

**La détection de la dopamine par l'intermédiaire d'électrodes de carbone
modifiées par des polyacrylamides**

Par
Marjaneh Sarir
Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En chimie

Octobre, 2000

©Marjaneh Sarir, 2000



QD

3

U54

2001

N, 028

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**La détection de la dopamine par l'intermédiaire d'électrodes de carbone
modifiées par des polyacrylamides**

Présenté par :

Marjaneh Sarir

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Professeur Jacques Prud'homme	Président-rapporteur
Professeur Donal Leech	directeur de recherche
Professeure Antonella Badia	membre du jury

Mémoire accepté le.....

SOMMAIRE

Pourquoi la dopamine est-elle importante dans notre corps ? La dopamine tout comme plusieurs autres neurotransmetteurs (l'épinephrine et la norépinephrine par exemple), circule dans le système nerveux central. En fait, les neurotransmetteurs sont les intermédiaires permettant aux neurones de transmettre l'influx nerveux. La dopamine joue un rôle très important pour le contrôle des mouvements. Le manque de dopamine est responsable de la maladie de **Parkinson**. En remplaçant la dopamine par une drogue dopaminérgique, on peut éliminer les symptômes reliés à la maladie de **Parkinson**.

La détermination quantitative de cette substance a toujours été un défi à relever pour les spécialistes en neurosciences. Afin de déterminer la quantité de **dopamine** dans le système nerveux central, on peut utiliser les méthodes électrochimiques. La dopamine est électroactive, donc elle peut être oxydée à la surface d'une électrode et en mesurant le courant d'oxydation, on peut la quantifier. Dans la première section de ce mémoire, on étudie l'utilisation de plusieurs méthodes voltampérométriques pour la détection électrochimique de la dopamine.

Dans la deuxième étape du projet, on tente d'utiliser un polymère (polyacrylamide) afin de modifier l'électrode et donc, améliorer la limite de détection de la dopamine. L'introduction de monomères anioniques dans la chaîne de ce polymère permet d'accumuler la dopamine à la surface de l'électrode. En effet, la dopamine se présente sous une forme cationique aux pH physiologiques. Une interférence majeure au niveau de la détection

électrochimique de la dopamine *in-vivo* est l'acide ascorbique. Quand on utilise des polymères chargés négativement, il y a répulsion entre l'acide ascorbique (également chargée négativement) et le polymère. Donc une discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique devient possible.

La modification des électrodes a été effectuée en utilisant des polyacrylamides préparés par deux méthodes différentes: polymérisation chimique et l'électropolymérisation. Deux sortes de comonomères anioniques ont été considérées: l'acide acrylique et l'acide 2-acrylamidoglycolique. Dans chacun des cas la limite de détection pour la dopamine a été calculée. La plus basse limite de détection est de l'ordre de 1×10^{-7} M en dopamine.

L'élaboration d'un médiateur afin d'améliorer la limite de détection n'a pas été un succès. Deux médiateurs différents à base d'osmium ont été utilisés. L'électrode modifiée avec ces médiateurs donne une limite de détection qui est de l'ordre de 1×10^{-5} M, ce qui n'est pas avantageux par rapport au **polyacrylamide**. Le but était de trouver des électrodes capables de détecter des concentrations aussi basses qu'un nM afin de réaliser l'essai **récepteur – ligand**. On effectue une mesure dans une solution de dopamine avec une concentration précise. On ajoute un récepteur de dopamine à cette solution. À cause de l'affinité entre la dopamine et le récepteur, une liaison se présente entre ces deux molécules. Comme résultat, la quantité de dopamine libre dans la solution (sous forme cationique) diminue. Donc, la réponse électrochimique va diminuer aussi en fonction de cette concentration. Si on ajoute un agoniste ou un antagoniste ayant une affinité plus grande que la dopamine pour le même récepteur, la dopamine ainsi libérée dans la solution aura pour effet de

donner une réponse électrochimique proportionnelle à l'activité de l'agoniste ou de l'antagoniste.

La discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique a été essayée en utilisant chaque monomère et chaque méthode. Comme résultat, le monomère acide 2-acrylamidoglycolique avec la méthode polymère chimique donne la meilleure discrimination par rapport à l'électrode non-modifiée. Ces résultats ont été comparés aux résultats obtenus en utilisant le **Nafion**, un polymère couramment utilisé par les chercheurs en neurosciences, comme modificateur de l'électrode. Cette comparaison montre que le Nafion reste toujours le meilleur polymère afin de discriminer entre la dopamine et l'acide ascorbique.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
REMERCIEMENTS.....	XVI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. LES BIOCAPTEURS.....	1
1.2. LA DOPAMINE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	2
1.3. PROPOSITION.....	8
2. PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	9
2.1. APPAREILS ET MATÉRIAUX.....	9
2.1.1. Électrodes	9
2.1.1.1. Macroélectrode de carbone.....	12
2.1.1.2. Fibre de carbone.....	12
2.1.2. Nature des polymères anioniques utilisés	13
2.1.2.1. Polyacrylamide contenant des motifs d'acide acrylique (ACA).....	13

2.1.2.2. Polyacrylamide contenant des motifs d'acide 2-acryl amidoglycolique (AGA).....	14
2.1.2.3. Nafion.....	15
2.1.3. Synthèse des polyacrylamides comportant des motifs ACA ou AGA.....	16
2.1.3.1. Synthèse par voie chimique.....	17
2.1.3.2. Électropolymérisation.....	17
2.1.4. Modification des électrodes.....	18
2.2. MÉTHODOLOGIE D'ANALYSE.....	19
2.2.1. Effet de l'épaisseur de la couche de polymère.....	19
2.2.2. Détermination de la limite de détection.....	20
2.2.3. La Discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique.....	21
2.2.4. Synthèse du médiateur.....	22
2.2.5. La modification de l'électrode de carbone vitreux avec le couple médiateur/nafion.....	22
2.2.6. Précision, intervalle de confiance et domaine de linearité.....	23
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	25
3.1. PRÉAMBULE SUR LA VOLTAMPÉROMÉTRIE CYCLIQUE ET À ONDES CARRÉES.....	25
3.2. LA VOLTAMPÉROMÉTRIE CYCLIQUE DE LA DOPAMINE.....	32
3.3. EFFET DU PH.....	34

3.4. ÉLECTRODES NON MODIFIÉES.....	38
3.4.1. Électrode de carbone vitreux.....	38
3.4.2. Électrode de fibre de carbone.....	42
3.5. ÉLECTRODES MODIFIÉES.....	44
3.5.1. Électrodes modifiées avec le nafion.....	44
3.5.2. Électrodes modifiées avec du polyacrylamide obtenu par polymérisation chimique.....	46
3.5.2.1. Polymère chimique contenant des motifs ACA.....	48
3.5.2.2. Polymère chimique contenant des motifs AGA.....	51
3.5.3. Électrodes modifiées avec du polyacrylamide obtenu par électropolymérisation.....	55
3.5.3.1. Électropolymérisation en présence d'acide acrylique.....	57
3.5.3.2. Électropolymérisation en présence d'acide 2-acrylamidoglycolique.....	60
3.6. LA DISCRIMINATION ENTRE DOPAMINE ET L'ACIDE ASCORBIQUE.....	64
3.6.1. Électrode de carbone vitreux non-modifiée.....	65
3.6.2. Électrode de carbone vitreux modifiée avec du nafion.....	68
3.6.3. Électrode de carbone vitreux modifiée avec un polyacryalmide comportant des motifs ACA.....	69

3.6.3.1. Polymère obtenu par voie chimique.....	69
3.6.3.2. L'électropolymérisation.....	69
3.6.4. Électrode de carbone vitreux modifiée avec un polyacrylamide comportant des motifs AGA.....	70
3.6.4.1. Polymère obtenu par voie chimique.....	70
3.6.4.2. L'électropolymérisation.....	71
3.7. LES MEDIEATEURS.....	72
3.7.1. Les propriétés requises pour les médiateurs.....	72
3.7.2. Les médiateurs à base d'osmium.....	73
3.7.3. L'effet d'un médiateur sur la réponse de la dopamine	73
3.7.4. Complexe [Os(dmbpy) ₂ (4-VP) Cl]PF ₆	74
3.7.5. Complexe [Os(bpy) ₂ (PVP) ₁₀ Cl]Cl / nafion.....	76
4. CONCLUSION.....	79
BIBLIOGRAPHIE.....	82

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Différentes combinaisons d'éléments de reconnaissance et de transducteurs pouvant former différents capteurs.....2
- Tableau 2.** Les limites de détections pour deux types d'électrodes de carbone non-modifiées telles que déterminées par deux méthodes différentes(VC et SQWV).....41
- Tableau 3.** Les limites de détection obtenues pour deux électrodes de carbone modifiées avec du polyacrylamide comportant des motifs ACA établies par deux méthodes différentes (VC et SQWV).....50
- Tableau 4.** Les limites de détection obtenues pour deux électrodes de carbone modifiées avec du polyacrylamide comportant des motifs AGA et établies par deux méthodes différentes (VC et SQWV).....54
- Tableau 5.** Limites de détection obtenues pour des électrodes de carbone vitreux modifiées avec du polyacrylamide comportant 20 % de motifs ACA.....59
- Tableau 6.** Limites de détection obtenues pour des électrodes de carbone vitreux modifiées avec du polyacrylamide comportant 10% des motifs AGA.....62
- Tableau 7.** La discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique par les divers types d'électrodes préparées dans ce travail.....68

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma d'un capteur.....	1
Figure 2. Schéma d'un récepteur.....	5
Figure 3. Le cheminement de l'oxydation de la dopamine en montrant la série des molécules qui sont impliquées dans cette réaction.....	7
Figure 4. . Montage du potentiostat contrôlé par l'ordinateur	9
Figure 5. Le schéma d'une électrode de fibre de carbone	10
Figure 6. La structure chimique du polyacrylamide réticulé contenant des motifs d'acide acrylique (ACA).....	14
Figure 7. La structure chimique du polyacrylamide contenant des motifs d'acide 2-acrylamidoglycolique (AGA).....	15
Figure 8. La structure chimique du nafion	16
Figure 9. Forme de l'onde utilisée en voltampérométrie cyclique	25
Figure 10. Voltampérogramme pour une espèce électroactive réversible en solution ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} = 1 \text{ mM}$, $\text{KCl } 0.1 \text{ M}$, $v=100 \text{ mV/s}$).....	28
Figure 11. Schéma d'application du potentiel	31
Figure 12. Réponse typique pour une voltampérogramme à onde carrée	31
Figure 13. Le balayage consécutifs à 4 cycles d'une solution de dopamine à pH 7.4 (électrode de carbone vitreux, $v= 100 \text{ mV/s}$, $[\text{Dop}] = 1 \text{ mM}$).....	33
Figure 14. La variation du courant d'oxydation en fonction du pH (électrode de carbone vitreux, $[\text{Dop}] = 1 \text{ mM}$, $v = 100 \text{ mV/s}$).....	35
Figure 15. La variation du potentiel d'oxydation en fonction du pH (électrode de carbone vitreux, $[\text{Dop}] = 1 \text{ mM}$, $v = 100 \text{ mV/s}$).....	35

Figure 16. Voltampérogrammes de la dopamine enregistrés à des pH différents situés entre 2 et 8.8 (électrode de carbone vitreux, [Dop]= 1 mM, $v= 100$ mV/s).....	37
Figure 17. Courbe d'étalonnage (Carbone vitreux activé, VC, $v=100$ mV/s).....	39
Figure 18. Courbe d'étalonnage (Carbone vitreux activé, SQWV, $v=100$ mV/s).....	39
Figure 19. Courbe d'étalonnage(Fibre de carbone, VC, $v=100$ mV/s).....	43
Figure 20. Courbe d'étalonnage (Fibre de carbone, SQWV, $v=100$ mV/s).....	43
Figure 21. Courbe d'étalonnage établie avec une électrode modifiée avec du nafion 2.5 % dans l'éthanol (carbone vitreux, VC, $v=100$ mV/s).....	46
Figure 22. La comparaison entre des électrodes modifiées avec un polyacrylamide contenant des motifs ACA, un polyacrylamide contenant des motifs AGA et une électrode non modifiée (solution 0.1 mM en dopamine, vitesse de balayage de 100 mV/s et pH=7.4). Les polymères ont été préparés par polymérisation chimique.....	47
Figure 23. La variation du courant en fonction du pourcentage d'ACA, épaisseur =0.2 mm, [Dop] = 1 mM).....	49
Figure 24. La variation du courant en fonction de l'épaisseur du polymère (% ACA = 10 %, [Dop] = 1 mM).....	49
Figure 25. La variation du courant en fonction du pourcentage d'AGA (épaisseur = 0.2 mm, [Dop]= 1 mM).....	52
Figure 26. La variation du courant en fonction de l'épaisseur du polymère (% AGA= 5%, [Dop]= 1 mM).....	53

Figure 27. La variation du courant en fonction du pourcentage d'ACA dans la solution d'électropolymérisation (20 segments, [Dop]= 1 mM, ν = 100 mV/s).....	58
Figure 28. La variation du courant en fonction de l'épaisseur de la couche définie en nombre de segments d'électropolymérisation (% ACA= 20 %, [Dop]= 1 mM, ν = 100 mV/s).....	59
Figure 29. La variation du courant en fonction du pourcentage d'AGA dans la solution d'électropolymérisation (20 segments, [Dop]= 1 mM).....	61
Figure 30. La variation du courant en fonction de l'épaisseur de la couche définie en nombre de segments d'électropolymérisation (%AGA= 10 %, [Dop]= 1 mM).....	62
Figure 31. Comparaison des voltampérogrammes de la dopamine et de l'acide ascorbique (électrode non modifiée, [Dop]= 0.1 mM , [AA]= 1 mM, pH= 7.4, ν = 100 mV/s	65
Figure 32. Les balayages consécutifs d'une solution de dopamine 1 mM avec une électrode modifiée avec un polyacrylamide contenant des motifs ACA (pH= 7.4, ν = 100 mV/s)....	66
Figure 33. Voltampérogrammes de la dopamine en présence et en absence du médiateur [Os(dmbpy) ₂ (4-VP)Cl] PF ₆ et voltampérogramme de ce dernier en absence de dopamine (pH = 7.4, ν = 5 mV/s, électrode de carbone vitreux).....	75
Figure 34. Voltampérogrammes de la dopamine en présence et en absence du médiateur [Os(bpy) ₂ (PVP) ₁₀ Cl]Cl et voltampérogramme de ce dernier en absence de dopamine (pH = 7.4, ν = 5 mV/s, électrode de carbone vitreux).....	77
Figure 35. Courbe d'étalonnage obtenue pour l'électrode modifiée avec le couple polymère rédox/nafion.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- A ampère
- AA acrylamide
- ACA acide acrylique
- AGA acide 2-acrylamidoglycolique
- AMP persulphate d'ammonium
- BIS N,N'-méthylènebisacrylamide
- bpy bipyridine
- PVP poly4-vinylpyridine
- C électrode auxiliaire
- Dop dopamine
- e charge de l'électron ($1,60219 \times 10^{-19}$ C)
- F constante de Faraday (96485,3 C/mol)
- I courant (Ampères)
- M médiateur
- Pt platine
- R électrode de référence
- R constante des gaz parfaits (8,3144 J/mol K)
- TEMED N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine
- v vitesse de balayage(V/s)
- V volt
- VC voltampérométrie cyclique
- W électrode de travail

- QH *o*-dopaminequinone-H⁺
- Q *o*-dopaminequinone
- OSQ *o*-dopaminesemiquinone
- L leukodopaminechrome
- T 6-hydroxydopamine
- PQ *p*-topaminequinone
- PSQ *p*-topaminesemiquinone
- DC dopaminechrome

REMERCIEMENT

Mon tout premier merci va à mon père pour m'avoir encouragée durant mes études et donner la curiosité de découvrir la science . Merci à ma mère pour son soutien précieux et sa patience.

Merci du fond de mon cœur à Hamid mon conjoint pour son écoute, sa volonté à m'aider et son encouragement.

J'aimerais bien remercier le professeur Donal Leech pour m'avoir acceptée dans son groupe de recherche, son enthousiasme pour le projet et surtout sa disponibilité.

Je voudrais également remercier tout le groupe : Éric Villiard, Pascal Pérusse et Francis Daigle.

1. INTRODUCTION

1.1. Les biocapteurs

Le domaine de la chimie analytique ne cesse d'innover. C'est une science qui entretient une étroite collaboration avec plusieurs autres disciplines comme la médecine, la biologie, la biochimie... Elle se doit donc de suivre de près l'évolution dans ces disciplines. Ceci impose aux chercheurs la mise en place de nouveaux dispositifs de plus en plus ingénieux face aux défis qui, eux aussi, sont de plus en plus complexes.

Dans le domaine de la biotechnologie, les capteurs (figure 1) font partie des découvertes qui ont connu un rythme de progression exceptionnelle. Cette évolution correspond en fait au besoin de dispositifs de mesure permettant de suivre en continu des processus biologiques.

Grâce à la combinaison d'un élément biologique capable d'une reconnaissance sélective et d'un transducteur, le capteur réalise la détection et le dosage direct d'un composé chimique ou biologique dans un milieu complexe [1].

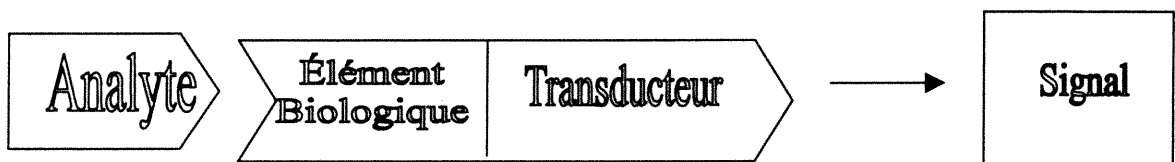


Figure 1. Schéma d'un capteur

Le concept de biocapteur a été introduit par Clark Jr. et al. [2] en 1962. Ils ont montré que des enzymes pourraient être immobilisées sur une électrode sensible à l'oxygène, afin de construire une électrode enzymatique. Cette électrode modifiée permet d'observer les réactions enzymatiques. Donc, le but

ultime dans le développement d'un capteur est d'avoir un signal qui est proportionnel à la concentration d'un élément ou d'un groupe de molécules ayant des propriétés similaires.

Beaucoup d'éléments de reconnaissance et de transducteurs peuvent être combinés (tableau 1), ce qui donne une grande gamme de capteurs aux propriétés différentes.

Tableau 1. Différentes combinaisons d'éléments de reconnaissance et de transducteurs pouvant former différents capteurs.

<u>Analytes</u>	<u>élément de reconnaissances</u>	<u>transducteur</u>
Anticorps	Polymères	Thermique
Antigènes	Cellules	Piézo électrique
Ligands	Protéines	Fluorescence
Médicaments	Molécules hôtes	Absorbance
Substrats	Enzymes	Ampérométrie
Ions	Récepteurs	Potentiométrie

Ce travail concerne l'introduction d'un capteur qui sera capable de mesurer la concentration de la dopamine dans la solution. Par l'intermédiaire des électrodes modifiées, nous visons à améliorer la limite de détection de la dopamine.

1.2. La dopamine dans le système nerveux central

La formation de dopamine intervient dans la synthèse de la cathécholamine. Trois enzymes sont impliquées dans cette synthèse : la

tyrosine-béata-hydroxylase (TH), la dopa-décarboxylase (DDC) et la dopamine-béatahydroxylase (DBH). Leurs activités sont influencées par un nombre de facteurs incluant le stress. Le catabolisme de la dopamine produit l'acide dihydroxyphénylacétique comme métabolite majeur et une quantité moindre d'acide homovanillique [3]. Dans le cas de la maladie de Parkinson, il y a des changements dégénératifs au Substantia Nigra (région du cerveau) et une destruction partielle des neurones produisant la dopamine, qui donne comme résultat une réduction de l'acide homovanillique.

Cette maladie dégénérative du cerveau affecte une personne sur 12 500 parmi les gens âgées de moins de 50 ans, et une personne sur 45 parmi les gens âgées de 70 ans et plus. Au tout début il y a une sensation de fatigue et au fur et à mesure que les cellules du cerveau continuent de mourir les autres symptômes apparaissent: un tremblement musculaire rythmique au niveau des membres et de la tête et une inhabilité à initier tout mouvement.

Il y a deux formes principales de la maladie de Parkinson. D'abord la Parkinson classique qui apparaît avant l'âge de 60 ans et se développe lentement, et ensuite la Parkinson tardive qui commence après l'âge de 70 ans et se développe plus rapidement. La maladie est déclenchée par un manque des cellules du cerveau qui produisent la dopamine et la norépinephrine. Ces cellules sont situées à des endroits précis du cerveau soit la Substantia Nigra et le Locus Ceruleus. Nous sommes tous nés avec un excédent de ce genre de cellules que nous perdons graduellement tout au long de notre vie. Une fois que 70 à 80 pour cent de ces cellules sont perdues les symptômes de Parkinson commencent à apparaître.

La raison pour laquelle les cellules du cerveau meurent plus rapidement chez certaines personnes que chez d'autres n'est pas claire. Une hypothèse est

peut-être que certains individus sont nés avec une quantité moins élevée de ces cellules. Une autre hypothèse suggère qu'il y a un facteur externe ou environnemental particulier qui cause une chute soudaine du nombre des cellules produisant la dopamine.

C'est à la fin des années cinquante que les scientifiques ont identifié la déficience de la dopamine chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Les efforts pour administrer la dopamine directement aux patients ont été infructueux parce que le corps métabolise ses liens chimiques avant qu'elle arrive au cerveau [4].

Les chercheurs ont donc concentré leur attention sur le précurseur naturel de la dopamine (L-dopa) qui est converti en dopamine par l'intermédiaire de l'enzyme DDC. L'administration de doses massives de L-dopa est nécessaire parce qu'une proportion assez importante de dopamine est toujours métabolisée avant qu'elle arrive au cerveau. Pour cette raison deux drogues ont été développées qui inhibent l'enzyme DDC. En les administrant avec le L-dopa, on augmente la proportion de L-dopa arrivant au cerveau de 10 % à 50 %.

La découverte de molécules capable d'imiter la dopamine pourrait améliorer le traitement de cette maladie. Afin d'évaluer la capacité de ces molécules à imiter la fonction biologique de la dopamine, il faut examiner si elles se lient aux mêmes sites biologiques (les récepteurs) que la dopamine.

Les récepteurs biologiques sont des protéines qui interagissent avec les signaux physiologiques extracellulaires et les convertissent en effets intracellulaires [5]. Comme le montre la figure 2, ces récepteurs sont des

convertisseurs de signaux qui contiennent trois parties fonctionnelles [6]: un receveur de signal , un transmetteur et un effecteur (ou codeur).

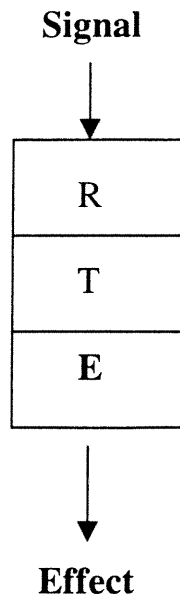


Figure 2. Schéma d'un récepteur

Il existe deux modes de réception appelés agoniste et antagoniste. Tous les neurotransmetteurs sont des agonistes, en d'autres mots, des molécules qui envoient un signal à la cellule après s'être liées à leur récepteur. Les antagonistes sont des molécules qui se lient au même récepteur, mais avec une seule conséquence qui est de prévenir les agonistes de déployer leur effet.

Les récepteurs de la dopamine sont couplés avec la protéine G. Ces récepteurs consistent en une seule chaîne de polypeptide qui inclut un noyau hydrophobe de sept hélices α transmembranaires, un segment terminal amino extracellulaire et un segment terminal cytoplasmique C [7].

Dans le cerveau, les fonctions principales qui sont déclenchées par l'intermédiaire de la dopamine sont le contrôle des mouvements et certains

aspects du comportement comme la motivation, la fonction cognitive, et les émotions.

Un ligand se lie à un récepteur à travers une série d'interactions dans la chaîne latérale d'acides aminés. Parmi ces interactions on trouve des ponts hydrogène, des interactions hydrophobes, des interactions de van der Waals et des interactions électrostatiques. Dans le cas des récepteurs de la dopamine, tous les ligands sont cationiques. Il y a donc des interactions électrostatiques entre ces ligands et la chaîne latérale de la dopamine qui est négativement chargée [8]. De fait, des résidus d'acide aspartique et des résidus de serine sont présents dans tous les récepteurs de dopamine. Ces derniers pourraient donc impliquer des interactions électrostatiques (acide aspartique) et des ponts hydrogène (serine) avec le groupement catéchol des molécules de dopamine [9].

L'oxydation de la dopamine produit l'o-dopaminequinone qui pourrait poursuivre deux cheminements différents selon le pH du milieu (figure 3) [10]. Le chemin de cyclisation de l'o-dopaminequinone, qui se poursuit pour tous le domaine de pH, est le seul chemin significatif à $\text{pH} > 6$. Le chemin de hydroxylation de l'o-dopaminequinone est le chemin favori à $\text{pH} < 6$.

1.3. Proposition

Nous nous proposons de mesurer la limite de détection électrochimique de la dopamine *in vitro* par l'intermédiaire d'électrodes non-modifiées et modifiées.

L'étude des électrodes modifiées portera sur la synthèse de polyacrylamides contenant des monomères chargés tels que l'acide acrylique et l'acide 2-acryl amidoglycolique et la modification des électrodes avec ces polymères. Ces polymères comportant des motifs chargés négativement devraient accumuler la dopamine à la surface de l'électrode et repousser les analytes chargés négativement hors de cette surface. Nous allons d'abord optimiser la quantité des monomères acides présente dans le polymère et ensuite l'épaisseur du polymère. Dans le cas de chaque monomère optimisé, on déterminera la limite de détection de la dopamine.

Dans la seconde étape de ce projet on utilisera l'électropolymérisation afin de former le polymère sur la surface de l'électrode, ce qui donne une épaisseur polymérique beaucoup plus mince. On va utiliser les médiateurs inorganiques afin de construire une électrode de deuxième génération. Ce type d'électrode utilise des médiateurs afin de catalyser le transfert de charge entre l'électrode et la molécule électroactive. Les médiateurs sont des complexes métalliques, des colorants organiques ou des quinones.

Les électrodes modifiées seront utilisées afin de différencier la molécule de dopamine de la molécule d'acide ascorbique, qui se trouve avec une concentration de 10 à 50 fois plus élevée que la dopamine dans le système nerveux central.

2. Partie expérimentale

2.1 Appareils et matériaux

Deux types de montage ont été effectués pour réaliser les expériences de voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à onde carrée :

1- Le bipotentiostat AFCBP1 (PINE, Grove City, PA) relié à une table traçante de Bioanalytical Systems (BAS, W. Lafayette, IN).

2. Le potentiostat BAS 100B (BAS) contrôlé par l'ordinateur (486, 66MHz) avec le logiciel BAS 100 W version 2.0, dont l'ensemble est décrit sur la figure 4.

Les cellules électrochimiques sont des cellules de verres (BAS) de 20 ml pour toutes les expériences à la température de la pièce.

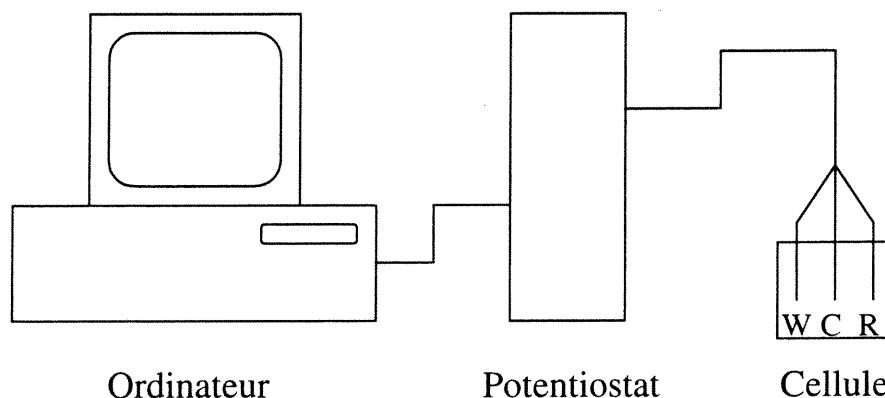


Figure 4. Montage du potentiostat contrôlé par l'ordinateur

2.1.1 Électrodes

Trois électrodes ont été utilisées simultanément dans une cellule électrochimique afin de réaliser les expériences de voltampérométrie cyclique

et de voltampérométrie à onde carrée. Comme électrode de travail une électrode de carbone vitreux de 3 mm de diamètre ou une électrode de fibre de carbone (figure 5) avec un diamètre variant de 3 à 5 μm a été utilisée. Les électrodes de carbone vitreux étaient achetées chez BAS. Les électrodes de fibre de carbone ont été construites au laboratoire en utilisant des fibres de carbone provenant de Shanghai Synthetic Fiber Research Institute (Chine). En insérant une seule fibre de carbone dans un tube de verre de diamètre de 2 à 3 mm, et ensuite en utilisant la colle de Spurr low-viscosity, Polysciences (Farmingdale, N.Y.) afin d'immobiliser la fibre au bout du tube, et finalement en complétant le contact en arrière avec du mercure et un fil de cuivre, on peut assez facilement construire une électrode de fibre de carbone. Le seul inconvénient pour la fabrication de cette électrode c'est que la manipulation de la fibre de carbone est difficile et il faut être sûr d'insérer une seule fibre dans un tube de verre.

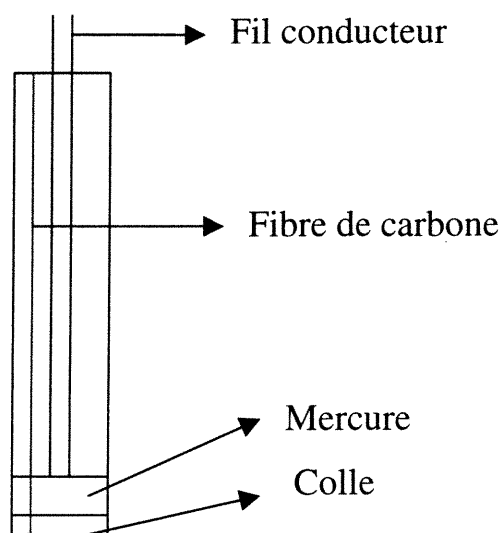


Figure 5. Le schéma d'une électrode de fibre de carbone

Un fil de platine était immobilisé à la pointe d'un tube de verre afin de construire une électrode auxiliaire (une contre-électrode). Le fil a été acheté chez Aldrich (Milwaukee, WI). Finalement la troisième électrode du système est l'électrode de référence, une électrode de Ag/AgCl 3M KCl provenant de BAS. L'aire de l'électrode de fibre de carbone a été déterminée en utilisant la formule suivante:

$$I = 4nrDCF \quad (1)$$

où I est le courant en ampère, n est le nombre d'électrons échangés, D est le coefficient de diffusion des molécules en cm^2/s , r est la rayon hydrodynamique de l'électrode en cm, C est la concentration dans la solution en mol/cm^3 et F est la constante de Faraday.

On effectue des balayages dans une solution de $[\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6]$ d'une concentration de 1 mM. En sachant la valeur de courant, le coefficient de diffusion, le nombre d'électron échangé, la concentration d'espèce et la constante de Faraday, on peut déterminer la rayon hydrodynamique de l'électrode et éventuellement l'aire de l'électrode.

Les expériences ont pour but d'étudier deux électrodes différentes (carbone vitreux et fibre de carbone) dans deux conditions, non-modifiées et modifiées avec deux sortes de polymères différents, le polyacrylamide et le nafion. L'étude porte sur l'amélioration de la détection de la dopamine par les électrodes modifiées en comparant avec les électrodes non-modifiées.

Les électrodes de carbone sont toutes une hybride de sp^2 . La surface des électrodes est très active, et donc pourrait être facilement empoisonnée. Mais, il y a un avantage pour les électrodes de carbone qui semblent très utiles en

2.1.2. Nature des polymères anioniques utilisés

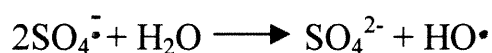
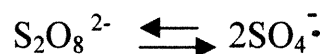
Par définition, nous pouvons synthétiser un polymère à partir d'un monomère ou un copolymère à partir de deux ou plusieurs monomères. Ce projet a comme but ultime la synthèse de copolymères à base de polyacrylamide et ensuite d'exploiter ces copolymères pour modifier la surface de l'électrode. Nous allons nous concentrer sur deux types de polymères:

- A) Des polyacrylamides contenant des motifs d'acide acrylique ou d'acide 2-acrylamidoglycolique.
- B) Le nafion, un polymère d'échange cationique.

Maintenant, passons aux descriptions plus détaillées de chaque catégorie.

2.1.2.1. Polyacrylamide contenant des motifs d'acide acrylique (ACA)

Plusieurs composés sont utilisés pour synthétiser ce polymère. Le monomère principal est l'acrylamide . Le N, N'-méthylène-bisacrylamide joue un rôle d'agent de réticulation alors que l'acide acrylique a été utilisé comme monomère anionique. La N,N,N',N'-tetraméthylethylènediamine (TEMED) a servi de catalyseur et le persulphate d'ammonium a été utilisé comme amorceur de polymérisation radicalaire. Voici comment la réaction radicalaire s'amorce:



(C'est $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ou HO^{\cdot} qui amorce la polymérisation)

D'après la quantité de monomère acide acrylique utilisée le nombre de charges négatives dans le polymère sera différent. La figure 6 décrit la structure du polymère correspondant.

comparant avec les autres électrodes: la modification de l'électrode est facilement faisable. Il y a différentes catégories de carbone: carbone vitreux, fibre de carbone, graphite et pâte de carbone.

2.1.1.1. Macroélectrode de carbone

Toutes les électrodes de carbone ayant un diamètre plus grand que 100 μm entrent dans la catégorie des macroélectrodes.

Dans cette étude nous allons nous concentrer sur les électrodes de carbone vitreux et de fibre de carbone.

2.1.1.2. Fibre de carbone

On appelle électrode de fibre de carbone celle dont le diamètre est de 1 à 100 μm [13]. À cause de la petite taille de l'électrode, le nombre de molécules arrivant à la surface pour être oxydées ou réduites en un temps donné est bas et donc le courant sera petit. En ayant un courant qui est faible, la chute ohmique (IR) aura une quantité négligeable. Cette qualité permet l'utilisation des fibres de carbone dans les solutions non-aqueuses et même dans les membranes de polymères.

La capacité électrique de la double couche d'une fibre de carbone est très petite. Cette petite capacité permet au potentiel de l'électrode de varier aux vitesses de balayage aussi haute que 500 kV/s. Donc, l'étude des espèces chimiques avec une courte durée de vie devient possible. D'autre part le transport de masse est plus grand, à cause de la diffusion radiale et perpendiculaire à la surface de l'électrode, ce qui donne un rapport signal sur bruit plus élevé.

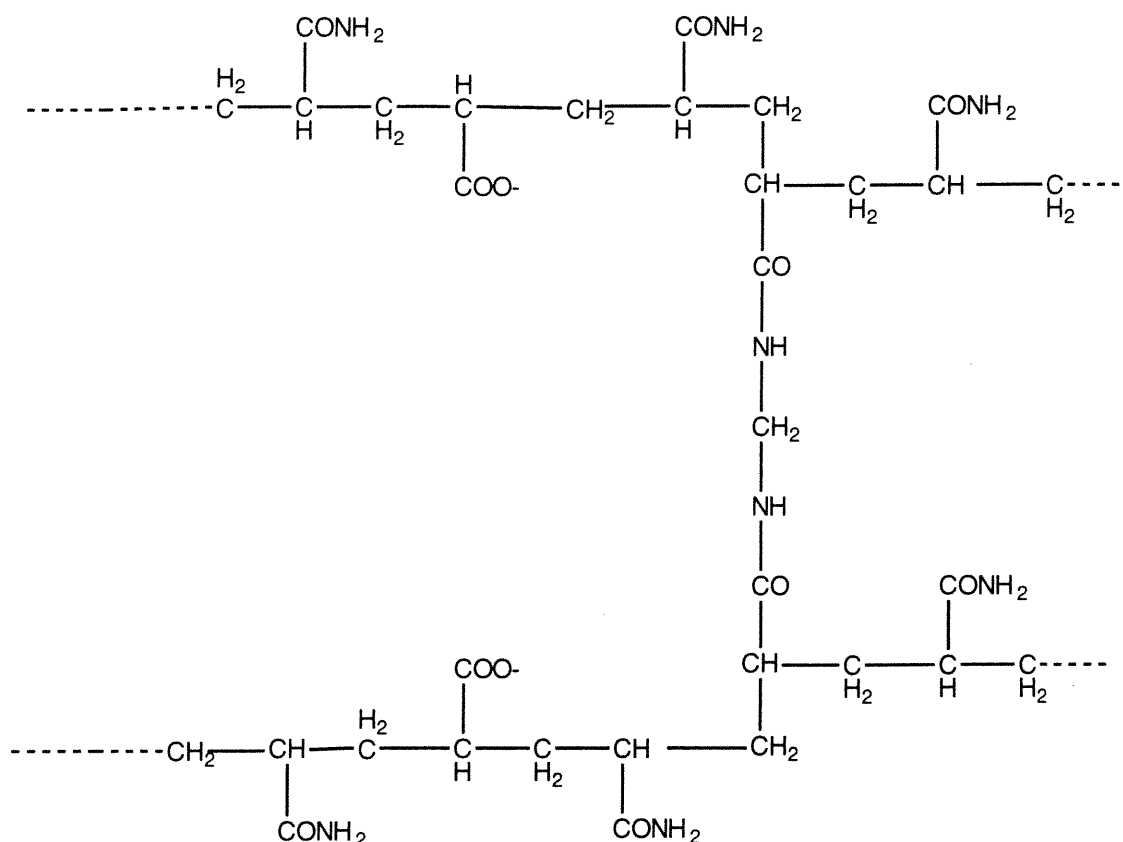


Figure 6. La structure chimique du polyacrylamide réticulé contenant des motifs d'acide acrylique (ACA)

2.1.2.2. Polyacrylamide contenant des motifs d'acide 2-acrylamidoglycolique (AGA)

L'acide 2-acrylamidoglycolique a une masse molaire (163.1 g/mol) deux fois plus grande que celle (71.1 g/mol) de l'acide acrylique, ce qui crée une difficulté pour la synthèse de polymères avec des pourcentages plus élevés que 5 %. La préparation des solutions concentrées était aussi un problème à surmonter. La structure du polymère concerné est décrite sur la figure 7.

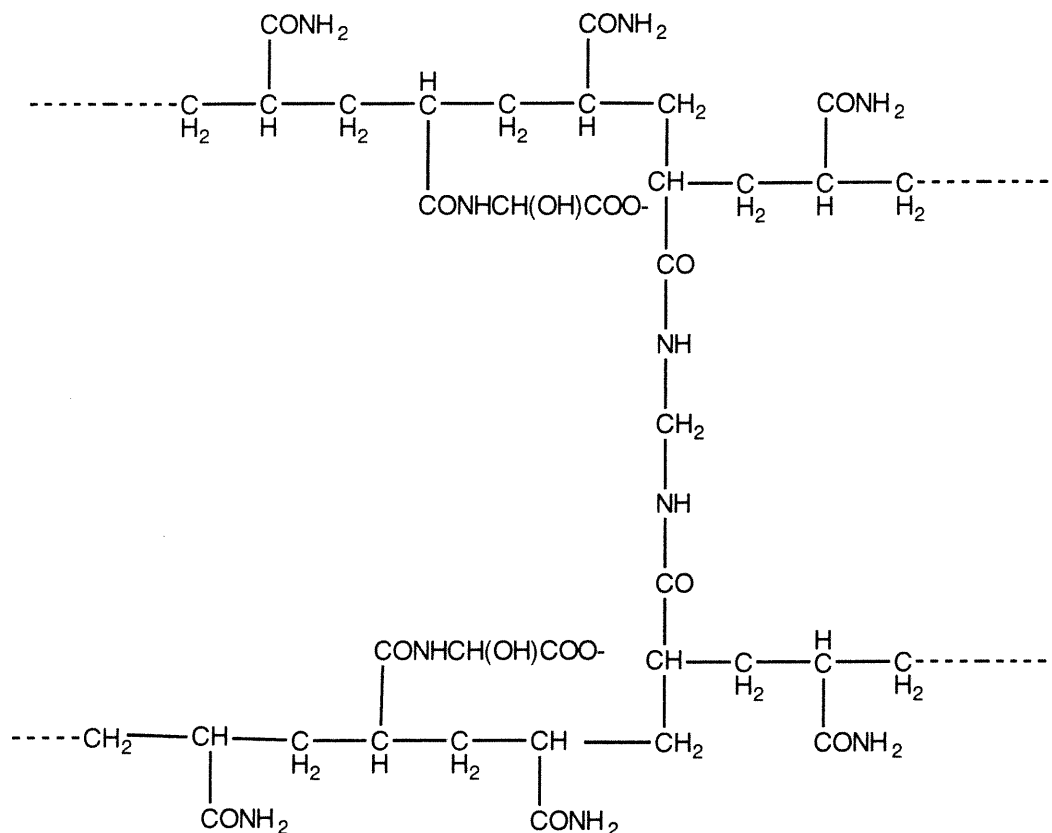


Figure 7. La structure chimique du polyacrylamide contenant des motifs d'acide 2-acrylamidoglycolique (AGA)

2.1.2.3. Nafion[14]

Le nafion est un polymère qui contient des motifs chargés négativement. Le point important c'est que le nombre de charges négatives est constant tandis qu'on pouvait très facilement changer le nombre des charges négatives présentes dans les polyacrylamides. En fait, le nafion est reconnu

depuis plusieurs années comme un polymère pouvant s'associer à des molécules de dopamine [15]. Lorsque présent à la surface des électrodes de carbon, il donne un signal beaucoup plus grand que celui obtenu avec l'électrode non-modifiée [16]. Sa structure est décrite sur la figure 8.

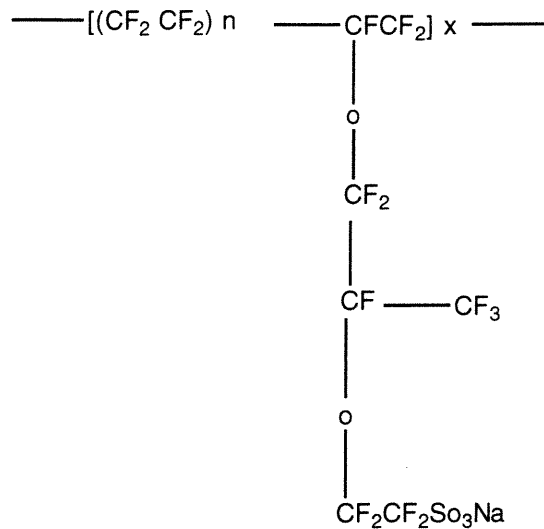


Figure 8. La structure chimique du nafion

2.1.3. Synthèse des polyacrylamides comportant des motifs ACA ou AGA

Dans le cas des polymérisations par voie chimique, le mélange concerné fût préparé entre deux verres de montres superposés. Afin d'avoir différentes épaisseurs, la distance séparant les deux verres de montre a été variée. Dans le cas de l'électropolymérisation, ce mélange dans les même proportions mais sans initiateur a été élaboré. Donc, dans ce cas là, c'est le balayage de potentiel appliqué qui initie la réaction radicalaire.

2.1.3.1. Synthèse par voie chimique

L'optimisation du mélange a été effectuée en utilisant des pourcentages différents de chaque monomère anionique. Dans le cas de chaque mélange, des volumes de 121 μL (0.68 mmol) de l'acrylamide, 312 μL (0.05 mmol) de N,N'-méthylènebisacrylamide, 8 μL de N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine et 300 μL d'une solution de persulfate d'ammonium (0.02 M) ont été utilisés afin de former le polymère.

D'abord dans le cas de l'acide acrylique (ACA, fournisseur : A&C), un liquide à 99 % de pureté a été utilisé. Afin d'avoir les différents pourcentages de monomère anionique, il fallait directement soustraire la quantité de monomère anionique de la quantité de monomère principal. Les pourcentages entre 0 et 20 % (en poids) ont été essayés. En augmentant encore le pourcentage, le polymère ne se formait plus.

Ensuite, en ce qui concerne l'acide 2-acrylamidoglycolique (AGA, fournisseur : Sigma), une solution 5 M dans un tampon de pH 7.4 a été préparée. Les pourcentages entre 0 et 5 % (en poids) ont été essayés parce que les polymères ne se formaient plus à partir de ce pourcentage. Il faut mentionner que les copolymères n'ont pas été caractérisés. Donc la teneur en ACA et AGA pourrait être bien différente de celle dans le mélange réactionnel.

2.1.3.2. Électropolymérisation

Dans cette manipulation, tout simplement on procédait à une expérience de voltampérométrie cyclique en effectuant plusieurs cycles sur une fenêtre de potentiel assez large (entre 0 et -2000 mV) à une vitesse de balayage de 100 mV/s. Le dégazage des solutions était effectué par barbotage d'azote (5 min.), afin d'enlever l'oxygène. Une traitement préalable (polissage)

de l'électrode à modifier était nécessaire afin de bien préparer la surface. L'électrode à modifier était ensuite immergée dans la solution.

Dans le cas de chaque mélange, des volumes de 363 μL (2.04 mmol) de acrylamide, 936 μL (0.15 mmol) de N,N'-methylènebisacrylamide et 30 μL de N,N,N',N'-tetramethylethylènediamine ont été utilisés. Cette fois-ci c'était la réduction électrochimique de l'acrylamide qui initiait la polymérisation. Donc, il n'y avait pas besoin d'ajouter d'amorceur persulfate d'ammonium afin d'initier la réaction.

Dans le cas de l'acide acrylique, des pourcentages entre 0 et 35 % (en poids) ont été essayés. Dans le cas de l'acide 2-acrylamidoglycolique, la concentration utilisée était 5 M, mais des pourcentages entre 0 et 20 % (en poids) ont été essayés. Après avoir optimiser au niveau du pourcentage, il fallait optimiser au niveau de l'épaisseur, à travers le nombre de cycles balayés pendant l'électropolymérisation. Donc, des nombres de cycles entre 0 et 25 ont été essayés.

2.1.4. Modification des électrodes

Les électrodes modifiées étaient toujours préparées selon la même procédure. Après la formation chimique du gel de polyacrylamide un cercle plus grand que la surface de l'électrode a été découpé et déposé sur cette surface. Afin d'immobiliser le gel sur la surface de l'électrode une membrane de dialyse avec un seuil de masse moléculaire (MWCO) de 50,000 et un «o-ring» ont été utilisés.

Dans le cas de l'électropolymérisation, la couche du polymère se dissout facilement dans le milieu aqueux. On ne peut donc pas effectuer les analyses sans l'utilisation d'une membrane.

2.2. Méthodologie d'analyse

Les expériences ont été effectuées à la température de la pièce. Toutes les expériences ont été réalisées à un pH de 7.4 avec une solution tampon phosphate (0.05 mol /L), ce qui correspond aux conditions physiologiques. Une seule manipulation a été effectuée en variant le pH. Afin d'obtenir des pH différents, deux solutions de Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 à une concentration de 0.05 M ont été utilisées.

Les méthodes expérimentales décrites dans ce qui suit ont été utilisées pour obtenir les résultats présentés dans le chapitre suivant. Des acronymes des produits sont utilisés (v. liste des abréviations) dans le but d'alléger la présentation.

2.2.1. Effet de l'épaisseur de la couche du polymère

Afin de réaliser cette partie de l'expérience, deux verres de montre ont été utilisés. Des couches d'épaisseurs différentes étaient produites en changeant la distance entre les deux verres de montres. Cette distance a été ajustées par des morceaux de colle qui créaient des espaces bien définis.

Après optimisation de la composition des différents polymères, des épaisseurs entre 0 et 2 mm ont été examinées. Pour chaque électrode de carbone vitreux, les valeurs moyennes du courant ont été déterminées à partir de trois mesures distinctes pour un même polymère.

Comme on a obtenu des courants plus élevés pour des couches très minces (0.2 mm), on a procédé aux expériences d'électropolymérisation dans le but d'avoir des couches encore plus minces et donc de meilleurs courants.

2.2.2. Détermination de la limite de détection

La limite de détection (L.D.) pour une procédure analytique se définit comme étant la plus petite concentration ou quantité d'analyte pouvant être détecté avec une bonne certitude à un niveau de confiance donné.

Elle est représentée par la relation suivante :[11]

$$L.D. = \frac{3s_b}{S} \quad (2)$$

où S est la sensibilité de la méthode d'analyse et s_b est l'écart-type sur le signal de blanc (le signal de blanc est le bruit de fond).

Afin de calculer la limite de détection, d'abord des solutions de dopamine ayant des concentrations entre 1×10^{-6} et 1×10^{-3} M ont été préparées. Ensuite, la courbe d'étalonnage a été tracée pour chaque série d'expériences. En tenant compte de la sensibilité (la pente de la courbe d'étalonnage), la limite de détection a été calculée dans le cas de chaque expérience d'après l'équation (2). L'écart-type sur le signal de fond S_b a été évalué en calculant l'écart-type de 30 balayages dans la même solution tampon. Pour trouver le courant de chaque balayage, la mesure du courant au pic du potentiel d'oxydation de la dopamine a été effectuée.

Dans le cas des électrodes modifiées, pour chaque concentration une nouvelle couche de polymère a été utilisée. La raison en est que le produit de l'oxydation de la dopamine bloque l'accès des autres molécules de dopamine à la surface de l'électrode. Donc, l'utilisation d'une nouvelle couche pour chaque concentration semblait nécessaire.

Dans le cas des électrodes modifiées, une durée de 10 minutes est allouée pour chaque solution afin d'accumuler la dopamine.

2.2.3. La discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique

Cette manipulation a été réalisée dans le cas des électrodes non-modifiées et modifiées. La concentration de l'acide ascorbique était choisie comme 10 fois plus élevée que la concentration de la dopamine.

D'abord les solutions mères de dopamine 1 mM dans le tampon phosphate et d'acide ascorbique 10 mM dans le même tampon ont été préparées. Ensuite, on a effectué un balayage (voltampérométrie cyclique) dans 10 ml de tampon avant et après avoir ajouter 1 ml de la solution mère de l'acide ascorbique et 1 ml de la solution mère de la dopamine. On a effectué exactement la même expérience dans le sens inverse. Dans chaque cas, on a mesuré le rapport entre le courant relié au mélange de dopamine et d'acide ascorbique et le courant de l'acide ascorbique seul.

Pour les électrodes modifiées, les couches de polymères optimisées ont été choisies afin de réaliser l'expérience. Les couches de polyacrylamide contenant des monomères anioniques ont été comparées avec le nafion.

2.2.4. Synthèse du médiateur

Le procédure de la synthèse a été suivie d'après la littérature [17]. Donc, 35 mg de complexe de $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ a réagit avec 57 mg de poly 4-vinyl pyridine en reflux dans 50 ml d'un mélange de éthanol/ eau (50:50) sans lumière pendant 7 jours.

Le métallopymère a été traité au rotavapeur afin d'enlever le solvant. Le polymère redox a été dissout dans 10 ml de méthanol. Ensuite, après avoir ajouté goutte par goutte du diéthyether, un précipité a été formé. Le précipité a été séparé du liquide par filtration sous vide. Le rendement de la réaction était de 70 %.



(3)

2.2.5. La modification de l'électrode de carbone vitreux avec le couple médiateur/nafion

La procédure de modification de l'électrode a été effectuée comme suit. L'électrode de carbone vitreux a été polie par des suspensions d'alumine de 0.3 μm et ensuite de 0.05 μm . Les traces d'alumine ont été enlevées de la surface de l'électrode par une sonification dans l'eau déionisée.

L'électrode a été modifiée par 3 μl d'une solution de 2 mg/ml de $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{PVP})_{10}\text{Cl}] \text{ Cl}$ dans l'éthanol et a été séchée à l'air pendant 30 min. L'électrode a été encore modifiée par 2 μl d'une solution de 0.5 % de nafion dans l'éthanol et séchée à l'air pendant une autre période de 30 min. La

détermination de la limite de détection a été effectuée comme dans la section 2.2.2, sauf que la méthode d'ajout dosé a été exploitée pour avoir des concentrations différentes. Il faut mentionner qu'aucune membrane a été utilisée pour retenir le couple médiateur/naïon à la surface des électrodes.

2.2.6. Précision, intervalle de confiance et domaine de linearité

La précision absolue d'une analyse représente une évaluation de la dispersion des résultats d'analyses due aux erreurs aléatoires. Dans ce mémoire, la précision sera évaluée et un intervalle de confiance à un niveau de probabilité de 95% sera utilisé. La précision absolue se calcule comme suit:

$$P = \left(\frac{S_x}{\sqrt{n-1}} \right) \quad (4)$$

où S_x est l'écart-type sur une mesure, n est le nombre de mesures et x est chaque mesure.

Alors que l'intervalle de confiance (IC) est:

$$IC = \bar{X} \pm t \left(\frac{S_x}{\sqrt{n-1}} \right) \quad (5)$$

où \bar{X} est la valeur moyenne sur une mesure, t est le facteur de la distribution de student, S_x est l'écart-type sur une mesure, n est le nombre d'échantillons ou de mesures et x est chaque mesure.

Le domaine de linéarité (D.L.) constitue le domaine sur lequel le signal analytique varie de façon linéaire en fonction de la concentration. Il est représenté par la relation suivante :[12]

$$D.L. = \log_{10} \frac{Q_m}{L.D.} \quad (6)$$

où Q_m est la quantité maximale pour laquelle la relation entre l'intensité du signal et la quantité est linéaire. Généralement, on exprime le domaine de linéarité en nombre de décades ou en ordres de grandeur.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Préambule sur la voltampérométrie cyclique et à ondes carrées

La voltampérométrie cyclique (VC) est une technique électrochimique principalement basée sur la mesure du courant en fonction du potentiel appliqué à une cellule. En ce sens, cette technique nous permet de suivre le comportement électroactif d'une espèce en solution (couple redox).

En voltampérométrie cyclique, on procède par le balayage du potentiel sur une fenêtre choisie. Le signal résultant donne la mesure du courant du pic selon qu'il s'agit d'oxydation ou de réduction.

Ce signal provient de l'excitation par l'application d'une onde triangulaire qui parcourt l'intervalle du potentiel considéré de l'électrode. Ce qui correspond au balayage négatif du potentiel ou réduction. Après avoir atteint la valeur minimale négative, l'excitation change de direction de potentiel et balaie positivement (voir la figure 9).

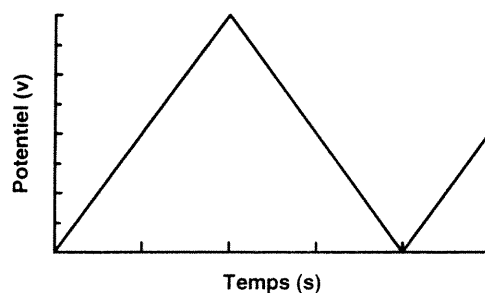


Figure 9. Forme de l'onde utilisée en voltampérométrie cyclique

Chaque balayage complet effectué constitue un cycle. Selon la molécule choisie, la direction pourrait se faire dans le sens inverse, ce qui se produit

dans notre cas, parce que d'abord la molécule de dopamine s'oxyde et en balayant le potentiel dans le sens inverse la molécule oxydée se réduit.

Le courant faradique est dû à un transfert d'électrons entre une électrode et une espèce électroactive dans la solution. Ce courant résulte du changement de degré d'oxydation d'une espèce électroactive. Ces réactions sont régies par la loi de " *Faraday* " qui exprime que la quantité de produits formés électrochimiquement par un courant est proportionnelle à la charge passée dans l'électrolyte [19].

$$N = \frac{Q}{nF} \quad (7)$$

où Q est la charge passée dans la solution (coulombs) , n est le nombre d'électrons échangés lors de la réaction redox , F est la constante de Faraday (96485.3 C/mol), et N est le nombre de moles oxydées ou réduites.

L'autre composante du courant à l'électrode est le courant de charge. Le courant de charge est le résultat d'un changement de structure à l'interface de l'électrode avec la solution, avec le changement de potentiel. L'interface se comporte comme un condensateur, en appliquant un potentiel à une surface, on se trouve à accumuler des charges à sa surface afin de créer une double couche. Donc, l'accumulation de la charge engendre un courant [20].

Si la voltampérométrie cyclique est avant tout une technique d'analyse qualitative dans la mesure où elle permet d'observer le comportement redox des complexes ou de faire l'étude des réactions de transfert d'électrons, il reste

vrai que cette technique convient aussi pour une analyse quantitative. En effet, elle nous permet d'évaluer certains paramètres importants comme le pic de courant anodique et cathodique (I_{pa} et I_{pc}), ainsi que le potentiel maximal de réduction et d'oxydation (E_{pa} et E_{pc}).

Pour un système réversible, le courant de pic est relié à d'autres paramètres caractérisant tant l'électrode de travail que l'analyte par l'équation de " *Randles-Sevcik* "[18].

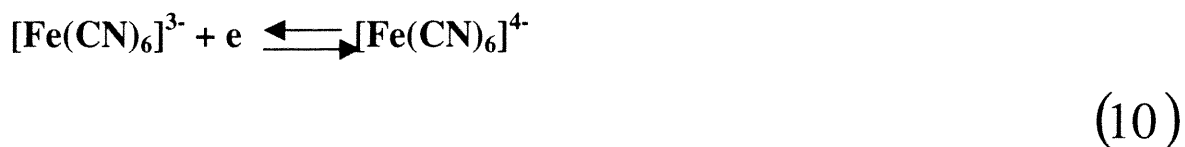
$$I_p = 0.443 nFA \left(\frac{DnF \nu}{RT} \right)^{1/2} C_0 \quad (8)$$

où I_p est la hauteur du pic (A) , A l'aire de l'électrode (cm^2) , D la constante de diffusion de l'espèce électroactive(cm^2/s) , ν la vitesse de balayage (V/s) , R la constante des gaz parfaits ($8.314 J mole^{-1} K^{-1}$) , T la température (K) , C_0 la concentration de l'espèce électroactive ($mol cm^{-3}$)

En regroupant les constantes à 25 °C, l'équation prend cette forme simplifiée:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2} C \nu^{1/2} \quad (9)$$

La figure 10 illustre un voltampérogramme typique, soit celui de l'anion ferrocyanure dont la réaction d'oxydoréduction est la suivante:



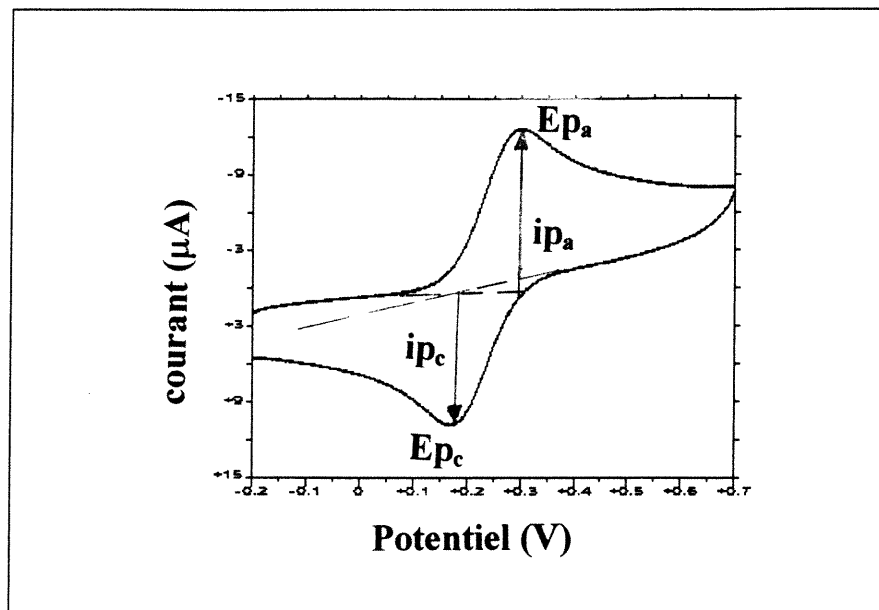


Figure 10. Voltampérogramme pour une espèce électroactive réversible en solution ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} = 1 \text{ mM}$, $\text{KCl } 0.1 \text{ M}$, $v=100 \text{ mV/s}$)

La cellule électrochimique forme un milieu dans lequel il se passe un mouvement des espèces électroactives dans l'interface électrode-solution. Une fois dissous, les ions doivent être transportés à la surface de l'électrode. Ce mouvement d'analyte est défini par le terme **transfert de masse**. Il existe trois sortes de mécanisme de transfert de masse.

- Le mouvement hydrodynamique (convection), soit le déplacement de l'analyte sous l'effet d'une source physique comme l'agitation ou la rotation d'électrode.

- La diffusion, soit le transfert de masse associé à un gradient de concentration. Ce mode de transfert assure le déplacement de masse d'une région de concentration élevée vers une région de faible concentration. D'un point de vue physico-chimique, ce processus augmente l'entropie du système et les molécules s'orientent toutes dans une même direction [21].
- La migration, soit le mouvement des ions provoqué par un champ électrique. Elle est basée sur le principe électrostatique suivant lequel il se produit une attraction entre les particules de charges différentes.

Donc, chacun de ces phénomènes donne lieu à un changement de la concentration de l'espèce à l'interface, et peut affecter le courant observé. Seul, le courant de diffusion est désirable. Donc, pour éliminer le courant de convection la cellule sera laissée au repos. On élimine le courant de migration en ajoutant un électrolyte de support dont la concentration est 10 à 100 fois plus grande que la concentration de l'analyte. L'électrolyte de support ne peut pas être réduit ou oxydé dans la fenêtre de potentiel choisie. Il transporte presque toute la charge en solution, ce qui élimine la migration. En éliminant les courants de migration et de convection, on peut observer seulement le courant de diffusion [22].

La voltampérométrie à onde carrée sera également exploitée dans ce travail. Cette méthode électrochimique a été inventée par Barker en 1952 [23]. Comme pour la voltampérométrie cyclique, il y a toujours une fenêtre de potentiel à balayer et donc un courant à mesurer. Mais ce qui rend cette technique plus intéressante, c'est qu'on peut avoir une bonne différenciation

entre le courant faradaique et le courant de charge. Ceci donne comme résultat une bonne limite de détection (L.D.= 10 nM) en comparaison avec la voltampérométrie cyclique.

Si on examine l'onde de potentiel de plus près (figure 11), on voit qu'il s'agit d'une onde carrée superposée à une onde en escalier. Deux échantillonnages distincts du courant sont effectués (I_1 et I_2). L'un correspond à la fin de l'impulsion de haute amplitude (point 1) et l'autre à la fin de l'impulsion de basse amplitude (point 2). Le signal mesuré est la différence entre ces deux courants, soit $\Delta I = I_1 - I_2$.

Dans la figure 12 qui décrit le voltamperogramme correspondant, au lieu de voir une courbe sigmoïdale il y a un seul pic. La raison c'est que c'est une mesure différentielle. Donc, le résultat se manifeste en forme d'un seul pic.

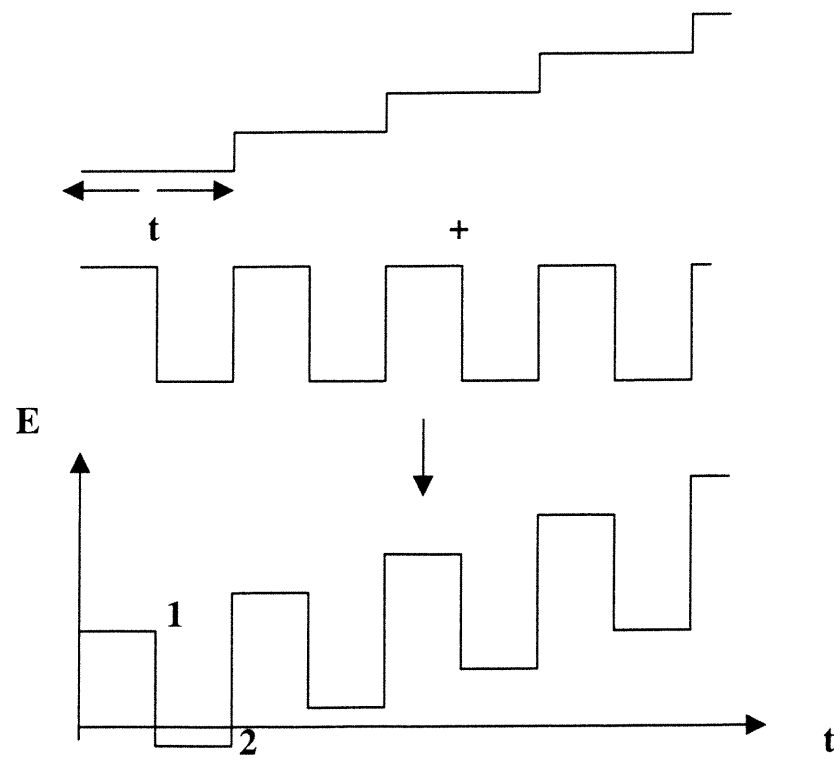


Figure 11. Schéma d'application du potentiel

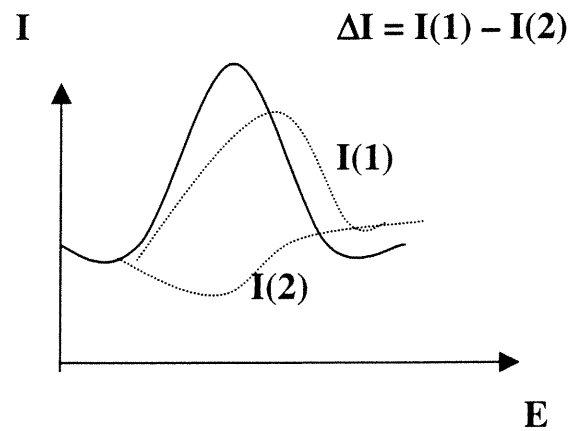
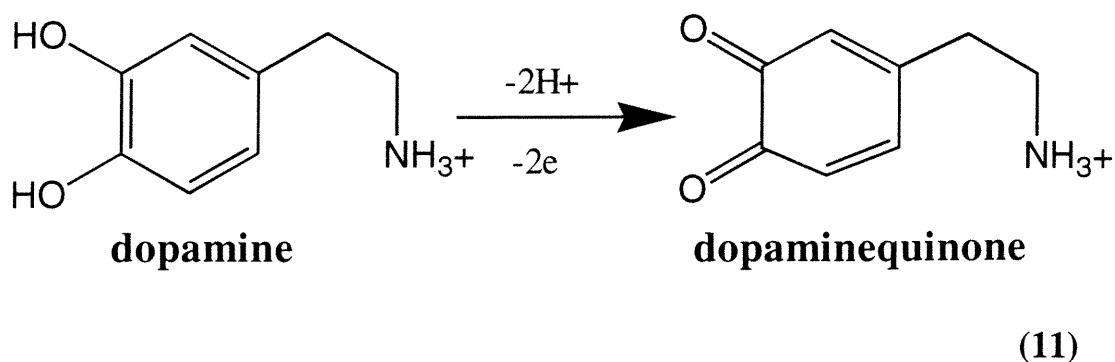


Figure 12. Réponse typique pour une voltampérogramme à onde carrée

3.2. La voltampérométrie cyclique de la dopamine

La réaction de l'oxydation de la dopamine se passe comme suit:



Si on regarde le cyclovoltampérogramme de la figure 13, on peut constater que les pics dus à l'oxydation et à la réduction sur une électrode de carbone vitreux ne sont pas identiques. Le courant du pic de l'oxydation est beaucoup plus grand que celui de la réduction. Cette différence est due au fait qu'une bonne partie du produit de l'oxydation de la dopamine est transformé en mélanine à pH de 7.4 et donc n'est plus convertible au produit de départ [10][25].

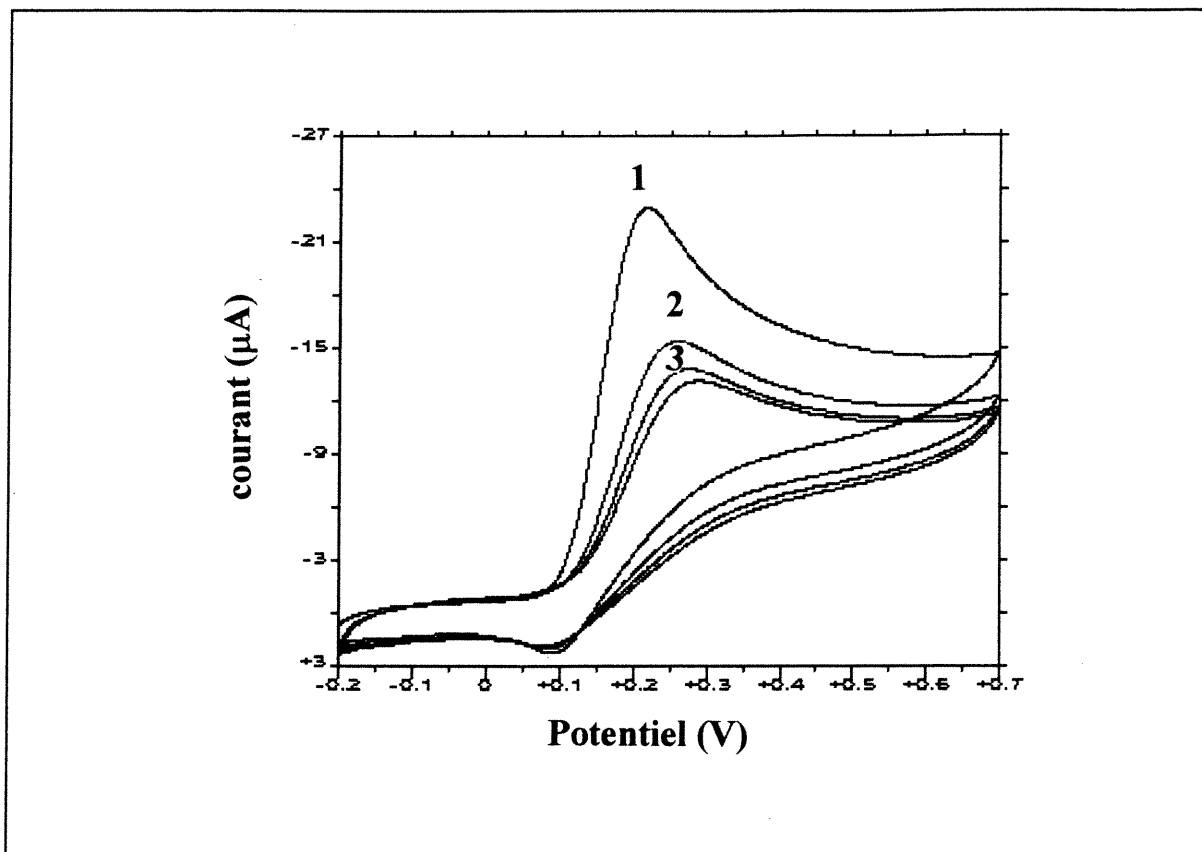


Figure 13. Le balayage consécutifs à 4 cycles d'une solution de dopamine à pH 7.4 (électrode de carbone vitreux, $v = 100$ mV/s, [Dop]= 1 mM)

En augmentant la vitesse de balayage, il y a des changements de courants d'oxydation et de réduction à cause du temps disponible pour laisser la réaction de cyclisation se poursuivre. À basse vitesse de balayage, le pic de réduction disparaît et donc seul le pic d'oxydation est favorisé. À haute vitesse de balayage le chemin de cyclisation est défavorisé. Ceci montre le rapport entre la vitesse de balayage et le temps disponible pour laisser la réaction se poursuivre [10,25].

D'après l'équation de Nernst pour la réaction de l'oxydation de la dopamine, les potentiels d'oxydo-réduction dépendent du pH du milieu.

$$E = E^{0'} - \frac{RT}{2F} \ln \frac{[Dop.]}{[Dopaq.][H^+]^2} \quad (12)$$

Si on considère la réaction de l'oxydation de dopamine, il y a deux électrons qui sont impliquées dans la réaction, donc la pente de l'équation de Nernst sera -59 mV par unité de pH [24].

Adams et al [10] ont aussi constaté que la cinétique de la réaction de cyclisation de la dopaquinone en mélanine est une fonction du pH.

Donc, c'est très important d'effectuer une étude de pH afin de voir l'effet du changement de pH sur les voltampérogrammes de la dopamine.

3.3. Effet du pH

L'étude a été effectuée pour divers pH (entre pH=2 et pH=8.8) et les valeurs moyennes de trois mesures du courant d'oxydation avec les écart-types correspondants sont montrés dans la figure 14. C'est au pH de 8.8 que ce courant est au maximum de sa valeur.

Sur la figure 15, on observe la variation du potentiel d'oxydation en fonction du pH. La pente qui a été calculée à partir de tous les points est égale à -65 mV donc un écart de 10 % en comparant avec la pente théorique de l'équation de Nernst qui a une valeur de -59 mV par unité de pH.

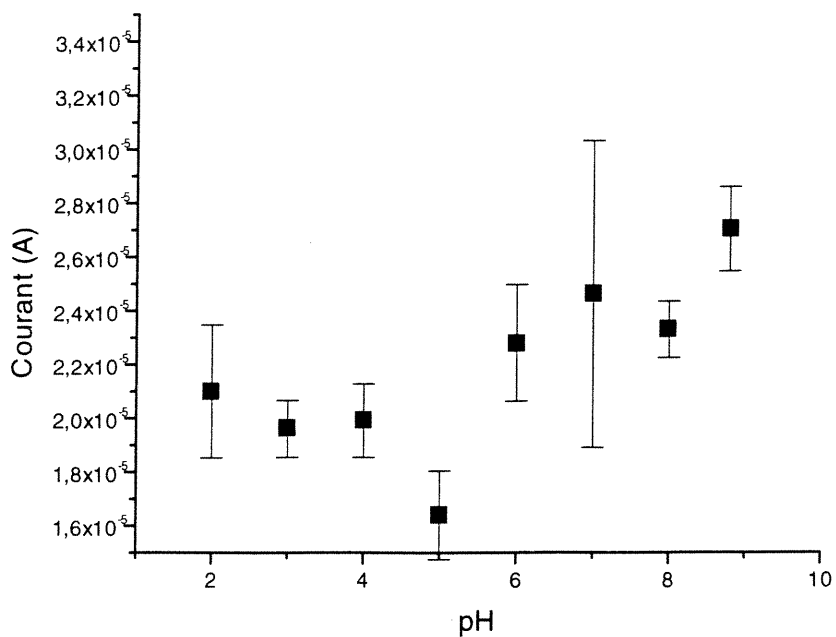


Figure. 14. La variation du courant d'oxydation en fonction du pH
(électrode de carbone vitreux, [Dop]=1 mM, $v=100$ mV/s)

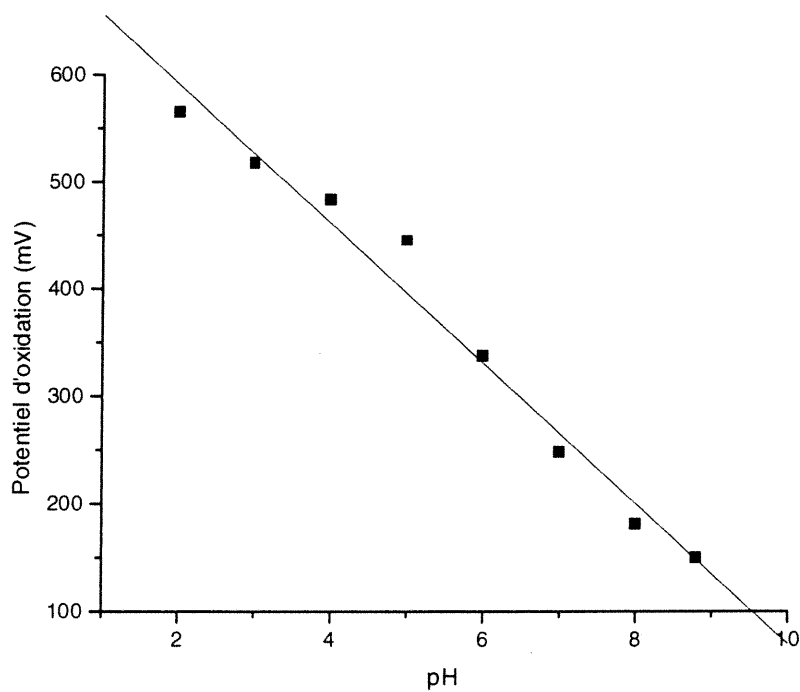


Figure. 15. La variation du potentiel d'oxydation en fonction du pH (électrode de carbone vitreux, [Dop]=1 mM, $v=100$ mV/s)

Sur la figure 16, une série de voltampérogrammes enregistrés à différents pH est montrée. Si nous étudions chacun des voltampérogrammes séparément, on peut constater qu'aux pH supérieurs à 6 le rapport entre le courant de l'oxydation sur celui de la réduction tend à augmenter. D'après la littérature [25] le chemin de cyclisation est le chemin favori à un pH plus élevé que 6. C'est pour cette raison que le courant de la réduction commence à diminuer et donc le rapport du courant de l'oxydation sur celui de la réduction augmente.

Aux pH inférieurs à 6, le potentiel d'oxydation et celui de la réduction tendent à s'éloigner tandis qu'aux pH supérieurs à 6 le potentiel d'oxydation et celui de la réduction commencent à se rapprocher. En effet, la réaction de l'oxydation de la dopamine est une réaction de type EC. Une réaction de type EC est défini par une réaction chimique qui suit une réaction électrochimique. Le cyclovoltampérogramme de la dopamine montre un pic de réduction plus petit que celui d'oxydation. Ce qui indique que le produit de l'oxydation est entré dans la réaction de cyclisation. Donc la différence entre ces potentiels d'oxydo-réduction est fonction de ce mécanisme [18,22].

Un but de ce projet est d'optimiser la limite de détection et en même temps d'être capable de détecter le niveau de la dopamine *in vivo*. Donc, le pH physiologique (7.4) a été choisi afin d'effectuer toutes les expériences. Ce dernier se situe dans la région entre pH= 7.0 et pH= 8.0 où le courant d'oxydation est voisin de sa valeur maximale observée à pH= 8.8.

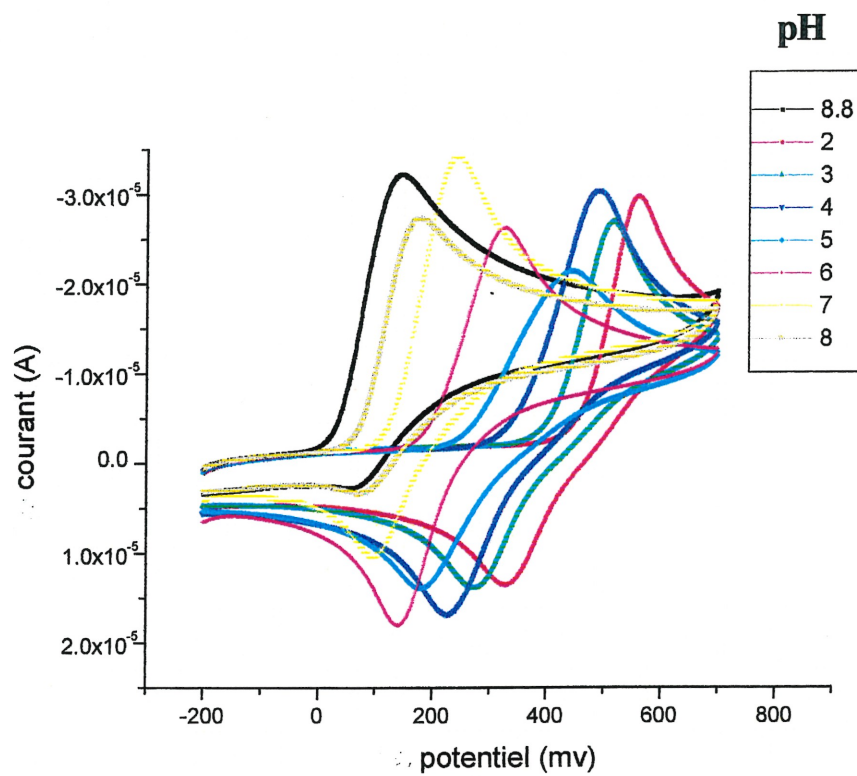


Figure 16. Voltampérogrammes de la dopamine enregistrés à des pH différents situés entre 2 et 8.8 (électrode de carbone vitreux, [Dop]= 1 mM, $v = 100$ mV/s)

3.4. Électrodes non modifiées

Dans cette section on compare la capacité de deux électrodes différentes pour la détection de la dopamine. Ces deux électrodes sont l'électrode carbone vitreux et fibre de carbone.

3.4.1. Électrode de carbone vitreux

Les méthodes de voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à onde carrée ont été utilisées afin de comparer les limite de détections dans le cas de chaque électrode. Rappelons qu'une électrode activée est une électrode qui a subi un traitement électrochimique dans une solution acide (il s'agit des groupements de carbone oxydés à la surface de l'électrode). Les courbes d'étalonnages pour la détection de la dopamine avec une électrode de carbone vitreux activée exploitant deux méthodes distinctes (voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à onde carrée) sont montrées sur les figures 17 et 18. En élaborant la méthode de voltampérométrie cyclique une limite de détection de $(6.5 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ M a été calculée (d'après l'équation 2, p.20) et dans le cas de la méthode de voltampérométrie à onde carrée (SQWV) une limite de détection de $(1.9 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M a été trouvée.

D'après les courbes d'étalonnages, les concentrations plus basses que ces limites de détections sont détectables dans une étude d'une seule série de concentrations. Mais l'écart-type du signal de fond est si élevé que la détection reproductible des concentrations plus basses que L.D. devient problématique.

Si on compare les deux méthodes, la méthode de voltampérométrie à onde carrée donne les meilleures limites de détection parce qu'on peut avoir une bonne discrimination entre le courant faradaique et le courant de charge.

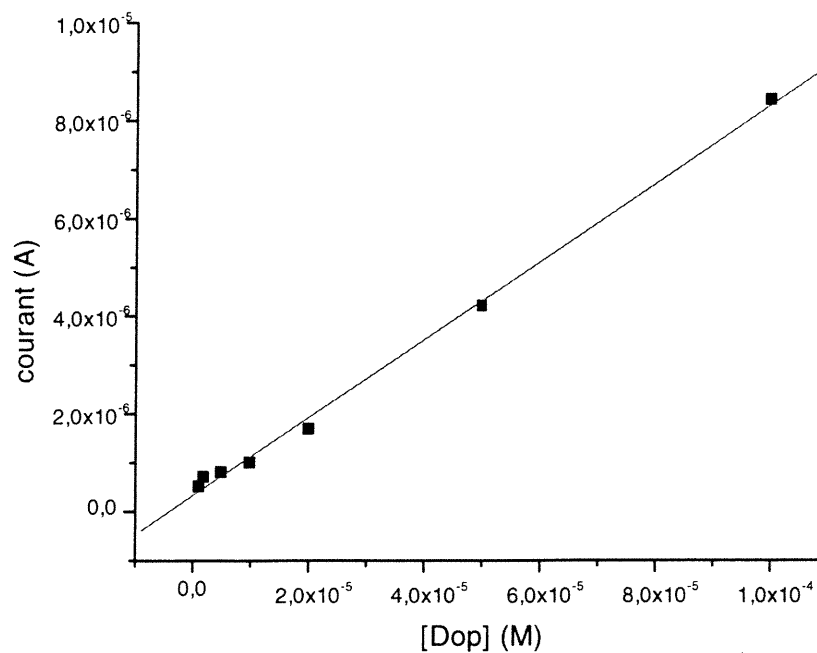


Figure 17. Courbe d'étalonnage (Carbone vitreux activé, VC, $v=100\text{mV/s}$)

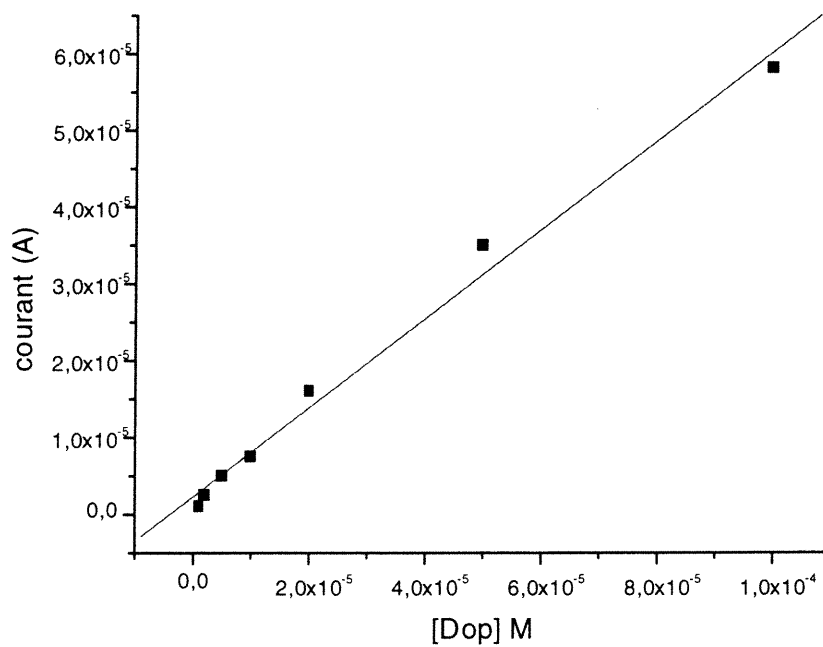


Figure 18. Courbe d'étalonnage (Carbone vitreux activé, SQWV, $v=100\text{mV/s}$)

Une électrode non-activée signifie tout simplement qu'un polissage de l'électrode a été effectué après chaque balayage, au lieu d'un traitement électrochimique.

Dans le cas de l'électrode de carbone vitreux non-activée une limite de détection de $(2.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M a été calculée. Tandis que comme ça a été mentionné plus tôt pour l'électrode de carbone vitreux activée la limite de détection de $(6.5 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ M a été mesurée.

L'électrode non-activée donne une limite de détection qui est au moins deux fois meilleure à celle de l'électrode activée, parce que le fait d'activer l'électrode donne une couche de carbone oxydée qui peut empêcher l'oxydation de la dopamine sur la surface de l'électrode et qui contribue à un signal de fond (courant capacitif) plus élevé. Pour cette raison, les électrodes de carbone vitreux non-activées ont été élaborées pour la modification des électrodes.

La prochaine étape consiste à comparer la limite de détection de l'électrode de carbone vitreux avec celle d'une même électrode modifiée seulement avec la membrane de dialyse en exploitant la méthode de voltampérométrie cyclique. La membrane est une couche de protéine qui a un seuil de masse moléculaire (MWCO) de 50,000. Donc, elle donne le droit de passage aux molécules ayant une masse moléculaire inférieure à cette valeur. La raison pour laquelle on utilise cette membrane c'est tout simplement de garder la couche de polymère sur la surface de l'électrode dans des expériences à venir exploitant des polymères comme modifiants. Il faut donc étudier l'effet de la présence de cette membrane sur la détection de la dopamine.

Pour l'électrode modifiée comportant une membrane, une limite de détection de $(1.6 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M a été calculée.

Si on considère la limite de détection pour l'électrode de carbone vitreux non-modifiée, dont $(2.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M, les deux valeurs sont comparables à cause des écart-types correspondants. Donc, la membrane concernée ne peut pas être considérée comme une barrière importante à l'accès de la dopamine à la surface de l'électrode. Alors, c'est un moyen de garder la couche de polymère sur la surface de l'électrode qui ne devrait pas affecter la réponse électrochimique. Les limites de détections sont présentées au tableau 2 pour deux types d'électrodes de carbone non-modifiées par deux méthodes différentes.

Tableau 2. Les limites de détections pour deux types d'électrodes de carbone non-modifiées telles que déterminées par deux méthodes différentes(VC et SQWV)

Électrode	L.D. VC	L.D. SQWV
Carbone vitreux Activée	$(6.5 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ M	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M
Fibre de carbone	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ M	$(5.3 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M
Carbone vitreux Non-activée	$(2.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M
Carbone vitreux modifiée (M)	$(1.6 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ M

(M): Membrane

3.4.2. Électrode de fibre de carbone

Une autre fois les méthodes de voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à onde carrée ont été élaborées afin de trouver les limites de détections. Les courbes d'étalonnage pour la détection de la dopamine à l'électrode de fibre de carbone par élaboration de deux méthodes de voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à onde carrée sont montrées dans les figures 19 et 20.

Une limite de détection de $(1.0 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ M a été calculée dans le cas de la méthode de voltampérométrie cyclique et une limite de détection de $(5.3 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M a été trouvée dans le cas de la méthode de voltampérométrie à onde carrée.

La différence de la limite de détection pour les deux sortes d'électrodes peut être due au fait que la dopamine est transportée à la surface par la diffusion radiale ainsi que perpendiculaire pour l'électrode de fibre de carbone.

Dans la littérature [26] concernant l'analyse *in vivo* de la dopamine, une limite de détection de 1×10^{-7} M a été mesurée pour une électrode de fibre de carbone. Avec une vitesse de 300 V/s une limite de détection de 2×10^{-7} M a été calculée pour une électrode de fibre de carbone [27].

Par conséquent on peut conclure que parmi les électrodes non-modifiées l'électrode de fibre de carbone en utilisant la méthode de voltampérométrie cyclique donne la plus basse limite de détection.

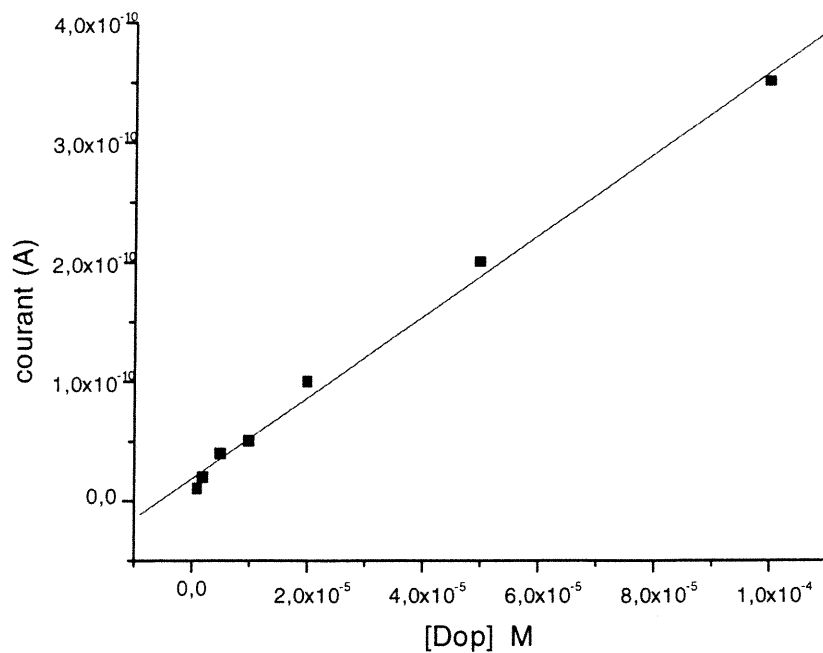


Figure 19. Courbe d'étalonnage(Fibre de carbone, VC, $v=100$ mV/s)

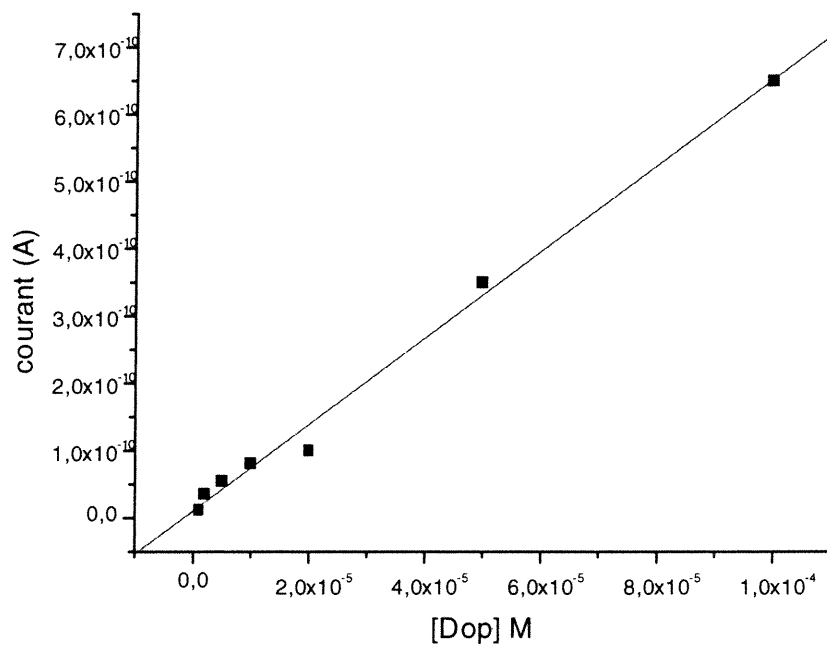


Figure 20. Courbe d'étalonnage (Fibre de carbone, SQWV, $v=100$ mV/s)

3.5. Électrodes modifiées

Dorénavant on va utiliser les électrodes modifiées. Le nafion était parmi les premiers polymères utilisés pour la détection de la dopamine [27,28]. Dans la littérature [29,30,31] le polyacrylamide a été préparé en présence de vinylferrocene en utilisant le mononucléotide de flavine comme initiateur et le peroxyde d'hydrogène comme amorceur.

En exploitant ces électrodes on espère accumuler la dopamine dans la couche de polymère contenant des motifs chargés et donc améliorer la détection de la dopamine. Le but de ce choix est d'avoir un polymère qui contient des charges négatives afin d'accumuler la dopamine, car cette dernière se trouve sous une forme cationique au pH physiologique.

Le deuxième but c'est de pouvoir faire la discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique qui se trouve avec une concentration 10-50 fois plus élevée que la dopamine et s'oxyde au même potentiel que la dopamine. Contrairement à la dopamine, l'acide ascorbique se trouve sous forme anionique au pH physiologique. Il y aura donc répulsion électrostatique dans ce cas.

3.5.1. Électrodes modifiées avec le nafion

Le nafion est un polymère échangeur d'ions qui est capable d'accumuler les molécules de dopamine à cause de ses charges négatives. Un autre mécanisme d'accumulation est à cause de son caractère hydrophobe. Une interaction se produit entre le noyau aromatique de dopamine et cette couche hydrophobe. Donc, il y a deux facteurs différents qui entrent en jeu.

Les deux électrodes de carbone vitreux et de fibre de carbone sont modifiées avec une solution de nafion (2.5 % dans l'éthanol) et ensuite laissées

pendant 30 minutes dans un dessiccateur. Le temps d'accumulation pour chaque concentration de la dopamine était de 10 minutes. La diamètre de la fibre de carbone variait entre 10 et 50 μm . L'électrode de carbone vitreux modifiée avec le nafion donne une limite de détection de $(2.0 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ M, tandis que dans le cas de la fibre de carbone la limite de détection calculée est de $(7.9 \pm 0.6) \times 10^{-6}$ M. La méthode de voltampérométrie cyclique a été utilisée dans les deux cas.

Si on compare ces résultats avec ceux de la littérature [32] une limite de détection de 1×10^{-7} M a été trouvée avec une électrode de fibre de carbone modifiée par une solution de nafion 2.5 % dans l'éthanol pour 10 minutes. L'aire géométrique de la surface de l'électrode était de 3×10^{-6} cm^2 . Dans un autre article [33], une limite de détection de 1×10^{-7} M a été trouvée pour une électrode de fibre de carbone modifiée avec une solution de nafion 5 % dans l'éthanol à des hautes vitesses de balayages (900 V/s). La limite de détection de 2×10^{-7} M [34] a été calculée avec une électrode de fibre de carbone modifiée avec le nafion à des haute vitesse de balayage (400 V/s). Le diamètre de la fibre de carbone était de 10 μm .

Cette différence au niveau de la limite de détection peut être due d'une part au pourcentage de la solution de nafion utilisée et d'autre part à la vitesse de balayage. Parce que dans toutes nos expériences une vitesse de balayage de 100 mV/s a été choisie.

La figure 21 montre la courbe d'étalonnage établie avec une électrode de carbone vitreux modifiée avec une solution de nafion 2.5 % dans l'éthanol à une vitesse de balayage de 100 mV/s. Comme on peut constater les données ne sont pas linéaires à haute concentration probablement à cause de la saturation du polymère avec de la dopamine à ces concentrations.

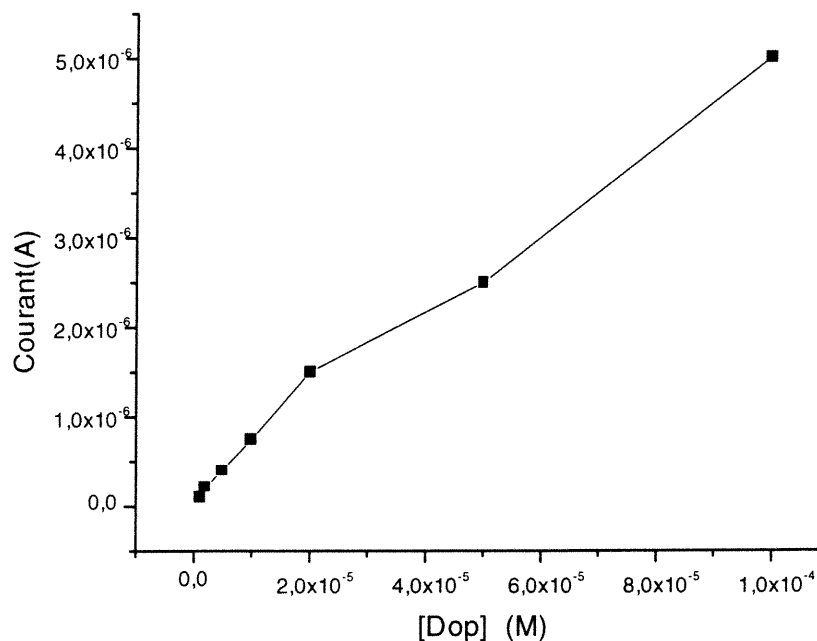


Figure 21. Courbe d'étalonnage établie avec une électrode modifiée avec du nafion 2.5 % dans l'éthanol (carbone vitreux, VC, $v=100$ mV/s)

3.5.2. Électrodes modifiées avec du polyacrylamide obtenu par polymérisation chimique

Dans cette étape, la modification des électrodes a été effectuée par des polyacrylamides contenant des monomères chargés, soit des motifs d'acide acrylique (ACA), soit des motifs d'acide 2-acrylamidoglycolique (AGA). Nous allons considérer deux sortes de polymères: des polymères formés chimiquement que l'on appellera polymères chimiques et des polymères

obtenus par électropolymérisation que l'on appellera polymères électrochimiques.

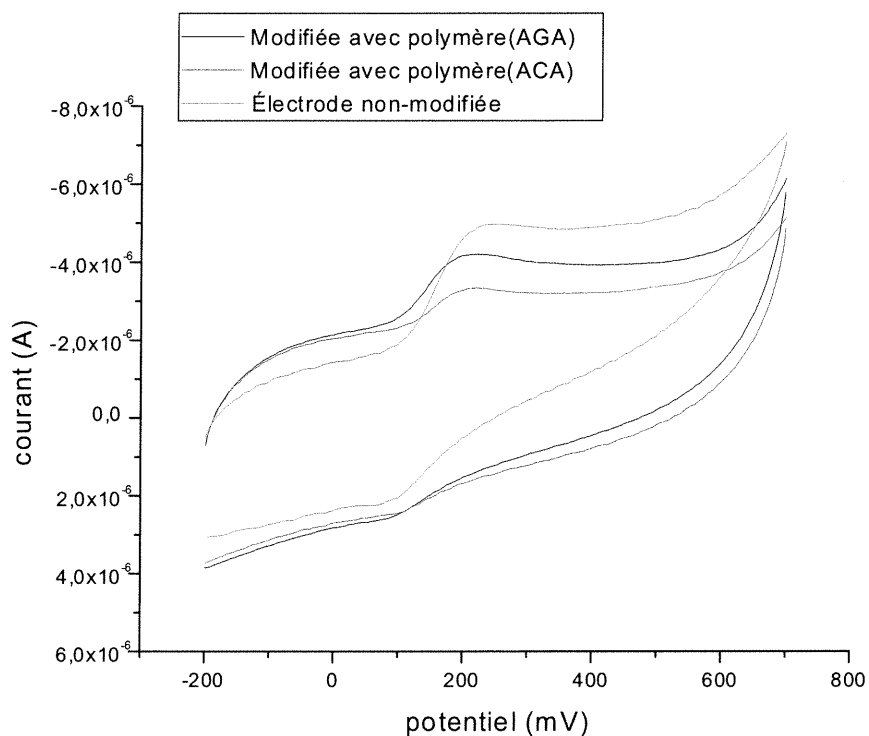


Figure 22. La comparaison entre des électrodes modifiées avec un polyacrylamide contenant des motifs ACA, un polyacrylamide contenant des motifs AGA et une électrode non modifiée. (solution 0.1 mM en dopamine, vitesse de balayage de 100 mV/s et pH=7.4) Les polymères ont été préparés par polymérisation chimique.

La figure 22 montre la comparaison entre l'électrode non-modifiée et la même électrode modifiée avec des polyacrylamides contenant chacun de ces motifs acides (ACA ou AGA). On peut observer que le courant dû à

l'électrode non-modifiée est plus considérable que les courants dû aux électrodes modifiées.

3.5.2.1. Polymère chimique contenant des motifs ACA

Deux études différentes sont effectuées afin d'optimiser la couche de polymère: d'abord une étude portant sur l'effet du pourcentage de monomère ACA dans le polymère et, ensuite une étude portant sur l'effet de l'épaisseur de la couche de polymère.

Dans la figure 23, qui montre la variation du courant en fonction du pourcentage de monomère, on peut observer que le courant maximum se trouve au voisinage de 10 % de ACA (le pourcentage est massique). Un point important c'est que cette valeur du courant est plus élevée que le courant correspondant au point zéro de pourcentage (le polyacrylamide qui ne contient pas de ACA). Il n'y a pas une grande différence de courant entre les pourcentages de 5 ,10 et 15 mais malgré cet effet la valeur moyenne du courant correspondant au pourcentage de 10 est la plus élevée.

La figure 24 montre la variation du courant en fonction de l'épaisseur de la couche. En dépit de la marge d'erreur relativement grande, on peut observer que l'épaisseur de 0.2 mm donne le courant le plus élevé, et que cette valeur du courant est plus élevée qu'avec l'épaisseur zéro (l'électrode modifiée avec membrane seulement). Ce résultat montre l'intérêt d'avoir une couche de polymère formée par électropolymérisation car, par l'intermédiaire de cette méthode on pourra avoir accès à des couches plus minces que 0.2 mm.

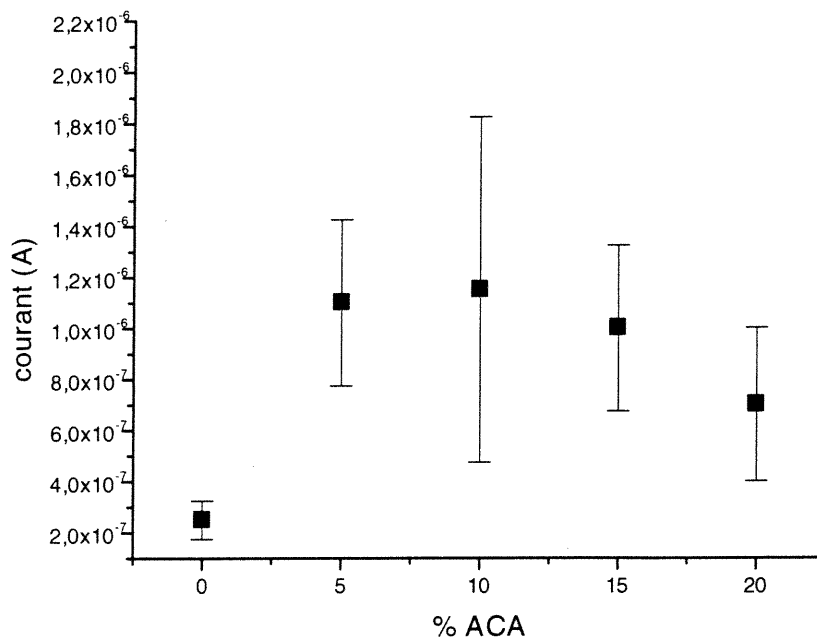


Figure 23. La variation du courant en fonction du pourcentage d'ACA
(épaisseur = 0.2 mm, [Dop]= 1 mM)

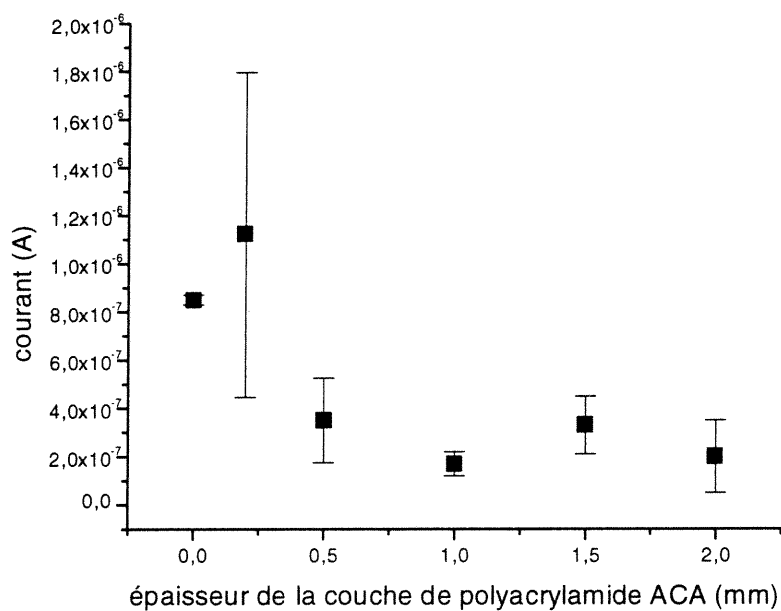


Figure 24. La variation du courant en fonction de l'épaisseur du polymère
(% ACA = 10 %, [Dop] = 1 mM)

Le tableau 3 montre les limites de détections déterminées pour une couche de polymère optimisée (10 % ACA, 0.2 mm). Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'électrodes de carbone vitreux et de fibres de carbone en exploitant la voltampérométrie cyclique et à onde carrée.

Tableau 3. Les limites de détection obtenues pour deux électrodes de carbone modifiées avec du polyacrylamide comportant des motifs ACA Etablies par deux méthodes différentes (VC et SQWV)

Électrode	L.D.	L.D.
	VC	SQWV
Carbone vitreux	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ M	$(3.6 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ M
Fibre de Carbone	$(6.6 \pm 0.6) \times 10^{-6}$ M	$(7.0 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ M

Si on analyse les données présentées au tableau 3, on peut observer que la méthode de voltampérométrie à onde carrée donne les limites de détection 10 fois meilleures que celle de la voltampérométrie cyclique.

Dans le cas du monomère ACA, l'électrode de carbone vitreux représente la meilleure électrode au niveau de la limite de détection. Ce qui est évident, c'est qu'on peut avoir les meilleures limites de détection en exploitant la méthode de voltampérométrie à onde carrée, parce qu'on peut avoir une bonne discrimination entre le courant faradique et le courant de charge.

Si on considère les résultats présentés au tableau 2, la limite de détection pour l'électrode de carbone vitreux non-modifiée et non-activée est de 2.7×10^{-5} M. Tandis que en regardant le tableau 3, on peut remarquer qu'une amélioration se présente pour la même électrode et la même méthode avec une

valeur de 3.4×10^{-6} M. Dans le cas de l'électrode modifiée avec membrane seulement, on peut remarquer une amélioration aussi. La limite de détection pour la même électrode modifiée comportant une membrane est de 1.6×10^{-5} M, ce qui montre quand même une légère amélioration par rapport à l'électrode non-modifiée. Mais dans le cas de voltampérométrie cyclique à l'électrode de fibre de carbone, on constate une détérioration. Donc, la méthode de voltampérométrie à onde carrée est avantageuse pour l'électrode de carbone vitreux.

3.5.2.2. Polymère chimique contenant des motifs AGA

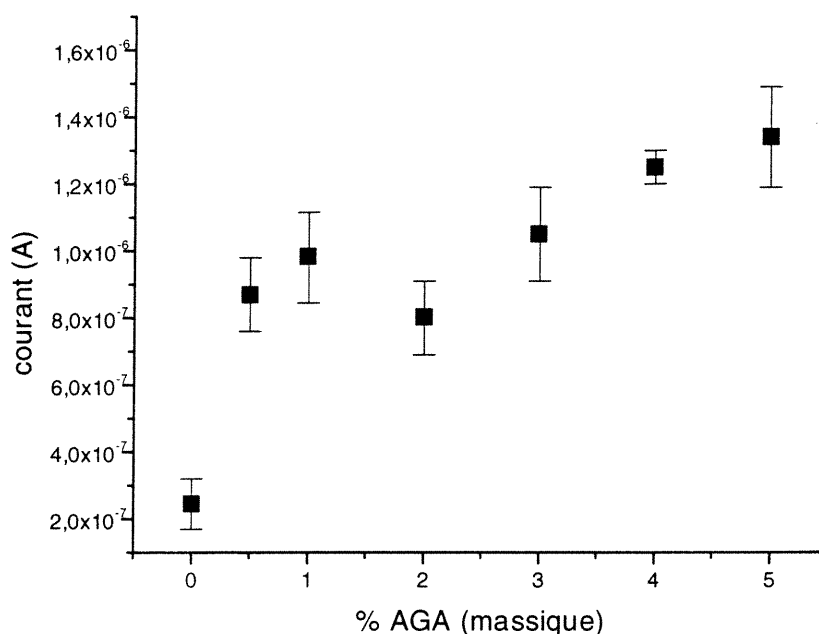
Sur la figure 22, on peut voir un voltampérogramme obtenu par une solution 0.1 mM en dopamine avec une électrode de carbone vitreux modifiée avec un polyacrylamide contenant des motifs AGA.

On constate que le comportement électrochimique du polyacrylamide contenant des motifs AGA ressemble au comportement électrochimique du polyacrylamide contenant des motifs ACA. Dans les deux cas, le pic de l'oxydation des électrodes modifiées est plus large que celui de l'électrode non-modifiée à cause de la diffusion des molécules de dopamine dans la couche de polyacrylamide.

Comme dans le cas précédent, nous avons examiné l'effet de la teneur en monomère AGA présent dans la couche de polymère et ensuite l'effet de l'épaisseur de cette couche.

Sur la figure 25, on peut observer la variation du courant en fonction du pourcentage de monomère AGA. Le courant maximum se trouve au voisinage de 5 % de AGA, la plus haute teneur examinée car le polymère chimique ne se formait pas à un pourcentage supérieur à 5% de monomère AGA.

Sur la figure 26, la variation du courant en fonction de l'épaisseur de la couche de polymère est montrée. L'épaisseur de 0.2 mm semble donner un courant plus grand que celui obtenu avec l'épaisseur 0 (l'épaisseur zéro signifie l'électrode modifiée avec la membrane seulement). Ce résultat est comparable à celui obtenu pour le monomère ACA (figure 23). Pour une épaisseur de 0.2 mm le courant est essentiellement le même dans les deux cas (1.1×10^{-6} A).



**Figure 25. La variation du courant en fonction du pourcentage d'AGA
(épaisseur = 0.2 mm, [Dop]= 1 mM)**

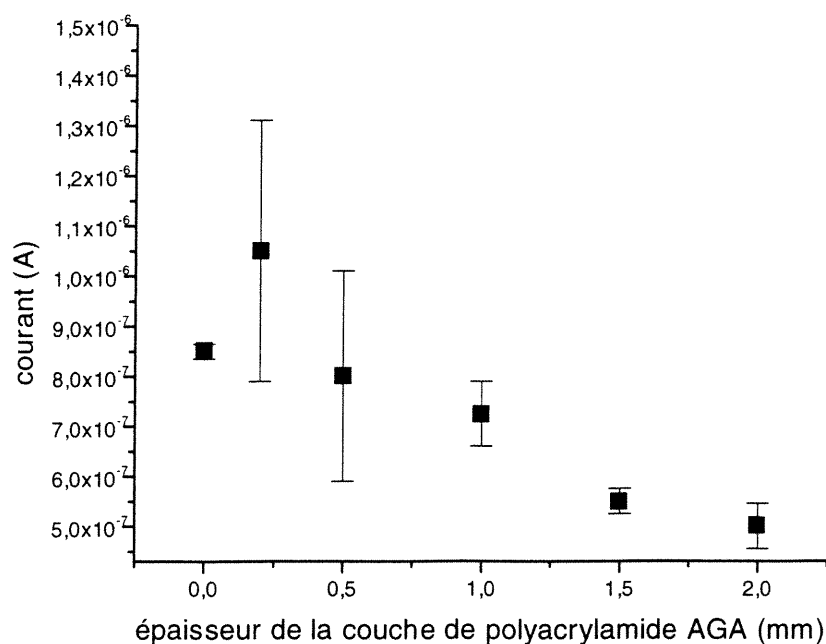


Figure 26. La variation du courant en fonction de l'épaisseur du polymère (% AGA= 5%, [Dop]= 1 mM)

Le tableau 4 montre les limites de détections déterminées pour une couche de polymère optimisée (5 % AGA, 0.2 mm). Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'électrodes de carbone vitreux et de fibres de carbone en exploitant la voltampérométrie cyclique et à onde carrée.

Tableau 4. Les limites de détection obtenues pour deux électrodes de carbone modifiées avec du polyacrylamide comportant des motifs AGA et établies par deux méthodes différentes (VC et SQWV)

Électrode	L.D.	L.D.
	VC	SQWV
Carbone vitreux	$(2.1 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ M}$	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{-7} \text{ M}$
Fibre de carbone	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^{-6} \text{ M}$	$(7.0 \pm 0.4) \times 10^{-7} \text{ M}$

Dans le cas du monomère AGA, les deux électrodes donnent les mêmes limites de détection. Tandis que dans le cas du monomère ACA la meilleure limite de détection a été obtenue pour l'électrode de carbone vitreux. Maintenant, si on compare les deux monomères, le monomère ACA représente une limite de détection qui est 2 fois meilleure que le monomère AGA.

La masse molaire du monomère AGA est de 163.1 g/mol, tandis que la masse molaire du monomère ACA est de 72.1 g/mol. C'est probablement ce qui explique la différence dans le nombre de charges négatives dans les deux polymères contenant ces monomères et par conséquent la différence au niveau de la limite de détection pour chaque polymère.

3.5.3. Électrodes modifiées avec du polyacrylamide obtenu par électropolymérisation

Le but de cet étude est d'avoir des couches de polymère les plus minces possible. Or, l'électropolymérisation nous permet de produire une couche de polymère ayant une épaisseur entre 0.05 et 0.1 mm.

Dans un premier temps nous avons examiné s'il était possible d'exploiter une telle couche très mince de polymère sans membrane protectrice. Pour répondre à cette question, on va faire appel à une série de mesures discriminatoires. D'abord on mesure le courant à l'électrode non modifiée dans une solution de ferrocyanure de potassium d'une concentration de 1 mM. Ensuite on effectue une électropolymérisation sur la même électrode mais sans membrane et on mesure le courant une autre fois dans la solution de ferrocyanure de potassium. On peut observer que le courant est diminué de moitié, ce qui indique que la surface de l'électrode est partiellement bloquée par la présence du polymère. Si on effectue des balayages consécutifs, on peut observer que le courant augmente graduellement jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur correspondant à celle de l'électrode non modifiée. Donc, la conclusion c'est que la couche de polyacrylamide se dissout facilement en milieu aqueux. Cette dissolution suggère que l'on a affaire à un polymère peu réticulé. Donc l'utilisation d'une membrane de dialyse est nécessaire.

La prochaine étape comprend l'utilisation de la même sonde électrochimique mais en présence de la membrane. La question est : est-ce que le polymère se dissout à travers la membrane? Le courant a été mesuré une autre fois sur une électrode non modifiée dans une solution de ferrocyanure de potassium. Ensuite, une couche de polymère a été formée sur la surface de l'électrode. La membrane a été déposée et le courant a été mesuré dans la

même solution. Le courant à l'électrode modifiée avec le polymère et la membrane était 10 fois moins élevé que celui obtenu avec l'électrode non modifiée. Donc, la présence du polymère et de la membrane empêche les molécules de ferrocyanure d'arriver à la surface de l'électrode.

Le deuxième balayage effectué avec l'électrode modifiée montre un courant plus élevé que le premier. Deux hypothèses sont possibles. Premièrement, les molécules de ferrocyanure se sont diffusées à travers la membrane et dans la couche du polymère. Deuxièmement, le polymère se dissout graduellement à travers la membrane et comme résultat la couche devient plus mince et le courant dû aux molécules de ferrocyanure augmente. Finalement, ce dernier plafonne pour atteindre la valeur du courant dû à l'électrode non modifiée. Dans les études qui suivent concernant la détection de la dopamine, le premier balayage a toujours été considéré.

3.5.3.1. Électropolymérisation en présence d'acide acrylique

Dans cette étude, l'optimisation de la couche de polymère a été effectuée. Donc, de nouveau la fraction massique en motifs ACA dans la couche de polymère et l'épaisseur de cette dernière ont été optimisées. D'abord l'effet de la réticulation produite par le bisacrylamide sur la réponse de la dopamine a été examiné. Nous avons observé que le meilleur courant était obtenu avec le même rapport volumique des réactifs AA et BIS (AA: 121 μ L, BIS: 312 μ L) que dans le cas du polymère chimique.

Sur la figure 27, on peut voir la variation du courant en fonction du pourcentage de monomère ACA présent dans le mélange. Comme pour la polymérisation chimique, on n'est pas certain du pourcentage de monomère présent dans la couche formée par l'électropolymérisation. Le pourcentage de 20 % dans la solution de l'électropolymérisation nous donne le meilleur courant, ce qui est plus élevé que le courant à 0 % de monomère (le point zéro indique qu'il s'agit d'un polymère formé sans monomère ACA).

Sur la figure 28, on peut observer la variation du courant en fonction du nombre de segments en électropolymérisation. L'épaisseur de la couche de polymère est représentée par le nombre de segments en voltampérométrie cyclique. Le courant maximum se trouve à 10 cycles (20 segments). Pour cette étape de la manipulation une seule série d'expériences a été effectuée.

La quantité du courant correspondant à la teneur optimale en ACA dans polymère chimique était voisine de 1.2×10^{-6} A (figure 23). Si on la compare avec celle correspondant au pourcentage d'optimum d'ACA en électropolymérisation, une valeur voisine de 1.5×10^{-5} A (figure 28), on peut déduire que le courant optimum dans le cas de l'électropolymérisation est 10 fois plus élevé que celui correspondant au polymère chimique.

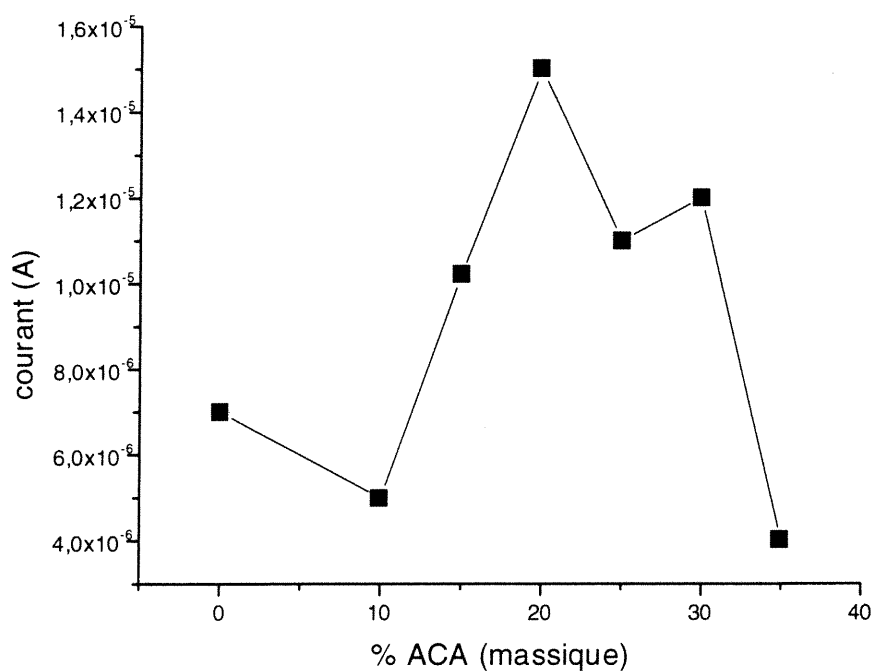


Figure 27. La variation du courant en fonction du pourcentage d'ACA
Dans la solution d'électropolymérisation
(20 segments, [Dop]= 1 mM, $v = 100$ mV/s)

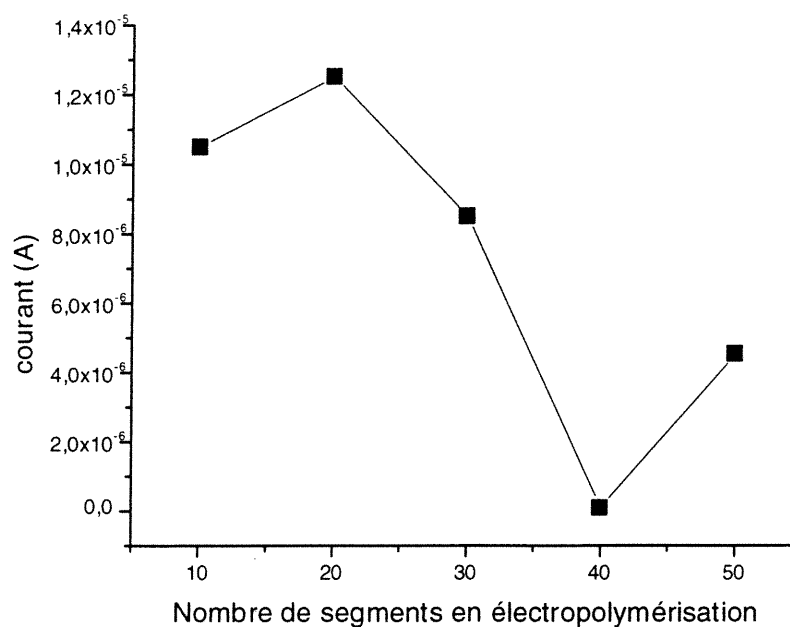


Figure 28. La variation du courant en fonction de l'épaisseur de la couche définie en nombre de segments d'électropolymérisation.

(% ACA= 20 %, [Dop]= 1 mM, v = 100 mV/s)

En exploitant cette couche optimisée (20 % ACA et 20 segments) on a déterminé la limite de détection. Les résultats sont résumés dans le tableau 5, où la comparaison avec un polymère chimique de même composition montre que les deux types d'électrodes ont des limites de détection semblables.

Tableau 5. Limites de détection obtenues pour des électrodes de carbone vitreux modifiées avec du polyacrylamide comportant 20 % de motifs ACA

Méthode de dosage	Polymère chimique SQWV	Électropolymérisation SQWV
Carbone vitreux	$(3.6 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ M	$(3.4 \pm 0.6) \times 10^{-7}$ M

En conclusion, dans le cas du monomère ACA, la meilleure limite de détection est obtenue par la méthode de voltampérométrie à onde carrée et l'utilisation d'un polymère chimique (10 % ACA, 0.2 mm). C'est vrai que l'électropolymérisation donne le même ordre de grandeur au niveau de la limite de détection, mais le fait d'avoir une seule série de données pour l'optimisation de l'électropolymérisation nous rend plus confiants aux résultats obtenus par l'utilisation d'un polymère obtenu par voie chimique.

3.5.3.2. Électropolymérisation en présence d'acide 2-acrylamidoglycolique

Pour cette étape de l'expérience de nouveau la couche de polymère formée électrochimiquement a été optimisée au niveau du pourcentage et de l'épaisseur.

Sur la figure 29, on peut observer la variation du courant en fonction de la fraction massique en AGA dans le mélange réactionnel. Le pourcentage de 10 nous donne la quantité la plus élevée de courant. Ce résultat est encore une autre fois plus élevé que celui correspondant au pourcentage de 0 (ce pourcentage correspond à une couche de polyacrylamide sans monomère AGA).

La figure 30 montre la variation du courant en fonction du nombre de segments en électropolymérisation, donc de l'épaisseur de la couche. L'épaisseur optimum correspond à 10 cycles (20 segments). Pour cette étape de la manipulation (comme dans le cas de l'ACA), il y a une seule série de données. Donc, on ne peut pas montrer les valeurs moyennes de courant ni les écart-types correspondants. Il faut mentionner qu'on n'obtient pas un courant supérieur à celui de l'électrode non-modifiée.

Si l'on compare la quantité de courant correspondant au pourcentage optimum d'AGA dans le cas de polymère chimique (une valeur de 1.35×10^{-6} A) à celle obtenue pour le pourcentage optimum d'AGA en électropolymérisation (une valeur de 1.55×10^{-5} A), on peut conclure que le courant est 10 fois meilleure dans le deuxième cas.

Après optimisation de la couche de polymère, la limite de détection a été calculée. Les résultats sont résumés dans le tableau 6 où une comparaison est effectuée avec un polymère chimique de même composition. Ces données, de même que celles du tableau 5, montrent que la nature de comonomère (ACA ou AGA) a un effet beaucoup plus grand dans le cas des électrodes modifiées pour électropolymérisation. Dans ce cas, le comonomère ACA conduit à une limite de détection 100 fois meilleure que le monomère AGA.

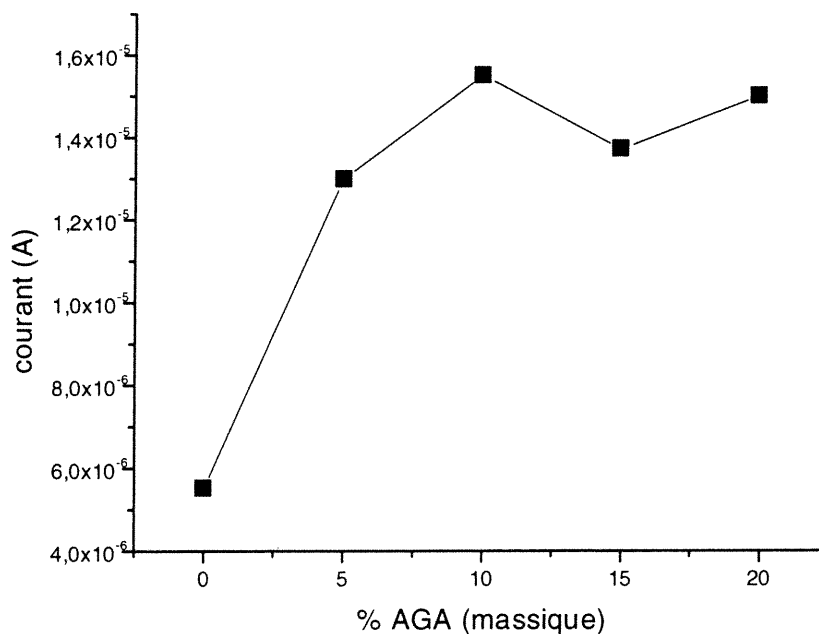


Figure 29. La variation du courant en fonction du pourcentage d'AGA dans la solution d'électropolymérisation (20 segments, [Dop]=1 mM)

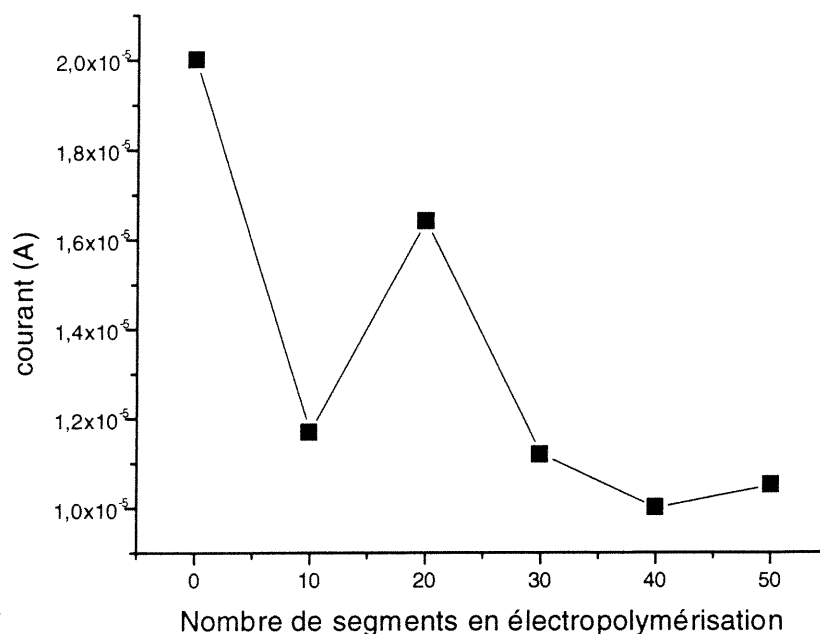


Figure 30. La variation du courant en fonction de l'épaisseur de la couche définie en nombre de segments d'électropolymérisation (%AGA= 10 %, [Dop]= 1 mM)

Tableau 6. Limites de détection obtenues pour des électrodes de carbone vitreux modifiées avec du polyacrylamide comportant 10% des motifs AGA

Méthode de Dosage	Polymère chimique SQWV	Électropolymérisation SQWV
Carbone vitreux	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ M	$(3.9 \pm 0.7) \times 10^{-5}$ M

Toutefois, cette limite de détection n'est pas meilleure que celle obtenue avec les polyacrylamides formés par voie chimique.

On peut donc conclure que la meilleure limite de détection est obtenue par la méthode de voltampérométrie à onde carrée avec une électrode de carbone vitreux modifiée par un polyacrylamide contenant le monomère ACA en utilisant la méthode chimique. Mais l'électropolymérisation dans le cas du monomère ACA donne aussi le même ordre de grandeur au niveau de la limite de détection.

En ce qui a trait aux courbes d'étalonnage, pour chaque concentration en dopamine une nouvelle couche de polymère fraîchement préparée a été utilisée. La reproductibilité de la couche de polymère a été définie en mesurant 3 fois le courant pour la même concentration de dopamine en calculant l'écart-type sur les valeurs de courant. La reproductibilité de la couche de polymère formée par électropolymérisation pour le monomère ACA était de 1.4×10^{-6} (une seule électrode et trois valeurs de courant) tandis que celle de la couche de polymère formée par voie chimique pour le même monomère était de 1.7×10^{-6} . La reproductibilité dans le cas de monomère AGA pour la couche de polymère formée par électropolymérisation était de 8.6×10^{-6} tandis que celle de la couche de polymère formée par voie chimique pour le même monomère était de 6.8×10^{-7} . Signalons que dans le cas du polymère chimique une seule couche de polymère a été préparée et de celle-là plusieurs morceaux ont été découpés. On peut conclure que la reproductibilité de la couche du polymère comportant des motifs ACA, a été comparable par l'électropolymérisation et la voie chimique. Mais celle de la couche de polymère comportant des motifs AGA a été meilleure par la voie chimique.

3.6. La discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique

L'acide ascorbique se trouve en présence de la dopamine dans le système nerveux central. La concentration de la dopamine varie entre 1×10^{-6} et 1×10^{-8} M, tandis que celle de l'acide ascorbique est de 1×10^{-4} M en milieu biologique [4]. L'acide ascorbique s'oxyde au même potentiel que la dopamine, ce qui rend le dosage de la dopamine problématique. Dans le cas de l'acide ascorbique une réaction irréversible se produit. Sur la figure 31, on peut très bien observer la différence de comportement entre ces deux molécules en voltampérométrie cyclique.

Pour surmonter ce problème, l'élaboration des polymères contenant des charges négatives ou des monomères négativement chargés semble nécessaire. L'acide ascorbique est négativement chargée en pH biologique, donc une répulsion se produit entre cette molécule et la couche de polymère, qui donne comme résultat une diminution de la réponse de l'acide ascorbique.

Nous allons maintenant examiner la capacité des diverses électrodes (avant et après modification avec des polyacrylamides comportant des motifs ACA ou AGA) à répondre sélectivement à la dopamine en présence d'acide ascorbique.

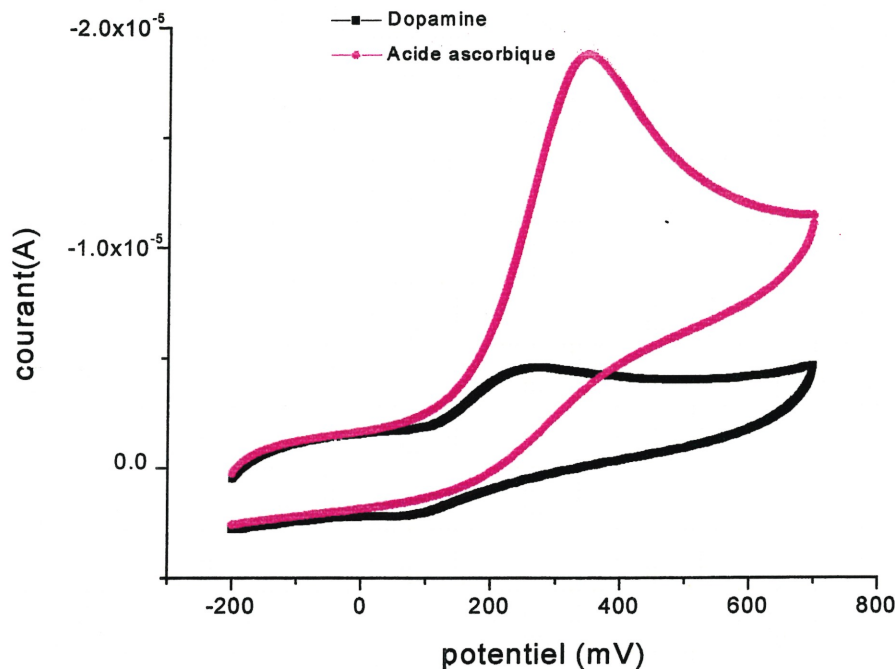


Figure 31. Comparaison des voltampérogrammes de la dopamine et de l'acide ascorbique (Électrode carbone vitreux non modifiée, [Dop]= 0.1 mM , [AA]= 1 mM, pH= 7.4, $v = 100$ mV/s)

3.6.1. Électrode de carbone vitreux non-modifiée

Dans le cas de l'électrode non-modifiée l'empoisonnement de l'électrode arrive très facilement à cause du produit de l'oxydation de la dopamine (figure 13, p. 33). La modification de l'électrode peut répondre à deux buts différents: éliminer la réponse de l'acide ascorbique et éviter l'empoisonnement de l'électrode.

Un essai au niveau de l'empoisonnement de l'électrode est décrit sur la figure 32. Même quand l'électrode est modifiée avec du polyacrylamide, en effectuant plusieurs balayages on constate une diminution pour la réponse

électrochimique de la dopamine. Ce changement indique que le produit de l'oxydation de la dopamine peut traverser la membrane et la couche de polyacrylamide. Mais l'empoisonnement au niveau de l'électrode modifiée est beaucoup moins par rapport à l'électrode non modifiée.

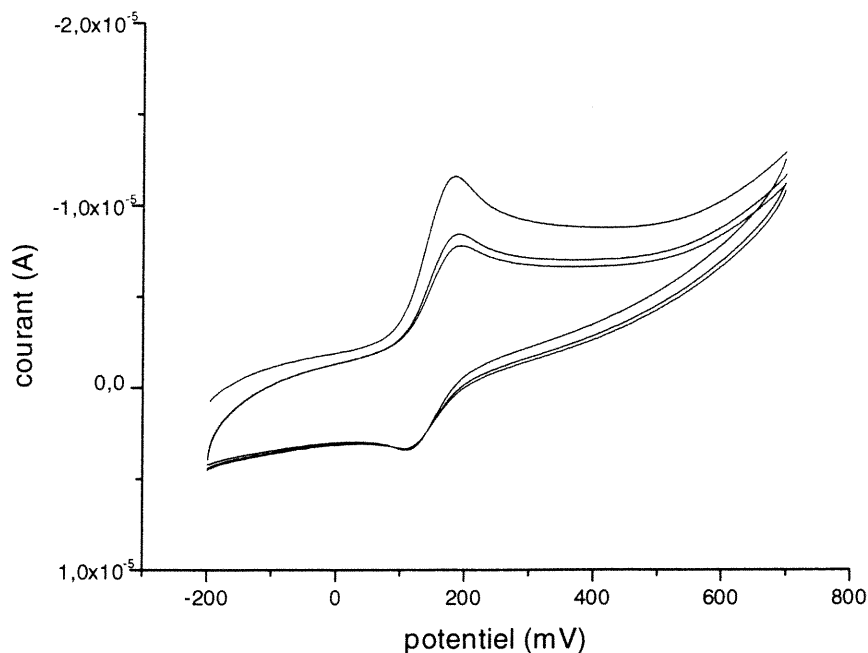


Figure 32. Les balayages consécutifs d'une solution de dopamine 1 mM avec une électrode modifiée avec un polyacrylamide contenant des motifs ACA (pH= 7.4, $v= 100$ mV/s)

Nous avons poursuivi cette étude en considérant une concentration en acide ascorbique 10 fois plus élevée que la concentration en dopamine. D'abord les solutions mères de dopamine 1 mM dans le tampon phosphate et d'acide ascorbique 10 mM dans le même tampon ont été préparées. Ensuite, on a effectué un balayage (voltampérométrie cyclique) dans 10 ml de tampon

avant et après avoir ajouter 1 ml de la solution mère de l'acide ascorbique et 1 ml de la solution mère de la dopamine. On a effectué exactement la même expérience dans le sens inverse. Dans chaque cas, on a mesuré le rapport entre le courant relié au mélange de dopamine et d'acide ascorbique et le courant de l'acide ascorbique seul.

La réponse avec l'ensemble de dopamine et d'acide ascorbique est égale à 2.38×10^{-5} A, et celle avec l'acide ascorbique est 1.25×10^{-5} A, pour donner un rapport de 1.90. L'électrode non-modifiée ne donne pas une discrimination assez grande pour pouvoir doser les deux substances en même temps.

Dans la littérature [35] l'électrode de carbone vitreux a été modifiée par la réduction de l'acide *p*-phénylacétique diazonium fluoroborate dans l'acetonitrile. Les électrodes modifiées avec l'acétate de phenyl montrent une bonne discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique permettant la quantification de la dopamine en présence d'une quantité assez importante d'acide ascorbique (une concentration 100 fois plus grande que celle de la dopamine). Le rapport entre les courants dûs à l'ensemble dopamine-acide ascorbique et à l'acide ascorbique est 10.6.

Dans un autre article [36], le comportement de la dopamine et celui de l'acide ascorbique sur des électrodes d'or modifiées avec le poly 3-méthylthiophène, le polypyrrole et la polyaniline ont été étudiés. Toutes les électrodes modifiées par ces polymères sont capables de faire une résolution entre le pic d'oxydation de la dopamine et celui de l'acide ascorbique (les rapports des courants ne sont pas mentionnés dans l'article) avec les mêmes concentrations. Mais le polyméthylthiophène est supérieur en termes de l'électroanalyse et de la stabilité.

3.6.2. Électrode de carbone vitreux modifiée avec du nafion

Une solution de nafion 0.5 % dans l'éthanol a été utilisée. Un temps de séchage de 30 min a été alloué. La réponse dans le cas de l'ensemble dopamine-acide ascorbique est égale à 1.11×10^{-5} A, et celle de l'acide ascorbique est 5.15×10^{-7} A, pour donner un rapport de 21.5. Comme le précédent, ce résultat est montré dans le tableau 7.

Tableau 7. La discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique par les divers types d'électrodes préparées dans ce travail

Électrode de carbone vitreux (CV) Méthode de dosage	Le rapport de courant (Dop+ AA) / (AA)
Électrode non-modifiée	1.90
Électrode modifiée avec nafion	21.5
Électrode modifiée par polymère chimique(ACA)	2.46
Électrode modifiée par polymère chimique(AGA)	3.09
Électrode modifiée par polymère chimique(.....)	2.43
Électrode modifiée par électro. (ACA)	1.78
Électrode modifiée par électro. (AGA)	1.75
Électrode modifiée par électro. (.....)	1.42

Électro.= Électropolymérisation

(.....) = sans comonomère ACA ou AGA

Si on compare le courant de l'acide ascorbique dans le cas de l'électrode non-modifiée et dans celui de l'électrode modifiée avec du nafion, la réponse

est diminuée 100 fois. Cette diminution nous amène à croire que l'interaction produite entre les charges négatives des groupements SO_3^- de ce polymère et les anions ascorbate est assez forte.

3.6.3. Électrode de carbone vitreux modifiée avec un polyacrylamide comportant des motifs ACA

3.6.3.1. Polymère obtenu par voie chimique

Dans le cas de ce polymère la couche précédemment optimisée a été utilisée afin d'examiner la discrimination possible entre la dopamine et l'acide ascorbique. Le courant dans le cas de l'ensemble dopamine-acide ascorbique est égal à 6.65×10^{-6} A, et celui de l'acide ascorbique est de 2.70×10^{-6} A, pour donner un rapport de 2.46. Si on compare cette valeur avec celle obtenue pour l'électrode non-modifiée on peut remarquer une amélioration. Mais en comparant cette valeur à celle obtenue avec l'électrode modifiée avec du nafion la différence est considérable.

3.6.3.2. L'électropolymérisation

Pour l'électropolymérisation la couche de polyacrylamide précédemment optimisée a été utilisée. La réponse de l'ensemble dopamine-acide ascorbique est égale à 1.78×10^{-6} A, et celle de l'acide ascorbique est égale à 9.97×10^{-7} A, donnant un rapport de 1.78. Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent (tableau 7), on peut conclure que le polyacrylamide obtenu par voie chimique donne une meilleure discrimination que celui obtenu par électropolymérisation.

3.6.4. Électrode de carbone vitreux modifiée avec un polyacrylamide comportant des motifs AGA

3.6.4.1. Polymère obtenu par voie chimique

Dans le cas de monomère AGA, la couche de polymère précédemment optimisée a aussi été utilisée pour examiner la discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique.

Le courant d'oxydation de l'ensemble dopamine-acide ascorbique est égal à 8.68×10^{-6} A, tandis que celui de l'acide ascorbique est égal à 2.81×10^{-6} A. Donc, le rapport entre ces deux courants est de 3.09.

Si on analyse les deux données correspondant aux polymères préparés par voie chimique, on peut constater que le monomère AGA conduit à une meilleure discrimination que le monomère ACA. Le courant d'oxydation de l'acide ascorbique est resté sensiblement le même tandis que celui de l'ensemble de deux molécules a fait toute la différence.

Si on considère une couche de polyacrylamide sans monomère ACA ou AGA, le courant de l'ensemble dopamine-acide ascorbique est de 8.29×10^{-6} A, tandis que celui de l'acide ascorbique est de 3.40×10^{-6} A, donnant un rapport de 2.43. Si on compare ce rapport avec celui obtenu pour d'électrode non-modifiée (1.90), il y a une amélioration. Mais elle est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour la couche contenant des motifs ACA. L'effet de ces motifs étant relativement faible, on peut se demander si cette couche contient vraiment 20% de motifs ACA tel que anticipé sur la base des données de synthèse. Toutefois, le fait que la couche de polyacrylamide contenant le 5% de motifs AGA donne une meilleure discrimination, pourrait simplement

résulter d'un pK_a plus grand pour ce second acide (pK_a de ACA= 3.1, pK_a de AGA= 4.6).

3.6.4.2. L'électropolymérisation

Dans le cas de l'électropolymérisation, la couche de polyacrylamide contenant des motifs AGA déjà optimisée sur le double plan du pourcentage en AGA et de l'épaisseur a été utilisée. La réponse avec l'ensemble dopamine-acide ascorbique est égale à 5.55×10^{-6} A, et celle avec l'acide ascorbique est égale à 3.17×10^{-6} A, donnant un rapport de 1.75.

Ce résultat est comparable à celui obtenu pour l'électropolymérisation en présence de monomère ACA (1.78). Tous deux sont légèrement supérieurs à celui obtenu pour une électropolymérisation effectuée sans comonomère ACA ou AGA (1.42) mais inférieurs à celui obtenu pour une électrode de carbone non-modifiée (1.90). En effet, la discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique a été vérifiée pour une couche de polyacrylamide sans monomère ACA ou AGA. La réponse avec l'ensemble dopamine-acide ascorbique était de 4.84×10^{-6} A, et celle avec l'acide ascorbique était de 3.41×10^{-6} A, donnant un rapport de 1.42 que nous venons de citer.

Cette détérioration par rapport à l'électrode non-modifiée, pourrait s'expliquer par le fait que, comme nous avons mentionné plus haut, la couche de polymère formée électrochimiquement se dissout facilement en milieu aqueux.

3.7. Les médiateurs

Une électrode de deuxième génération utilise un médiateur afin de transporter les électrons entre la molécule concernée et l'électrode. Donc, le médiateur est un accepteur ou un donneur d'électrons. L'avantage d'utilisation d'un médiateur est qu'on peut augmenter la vitesse de transfert d'électron à la surface de l'électrode.

Le métal choisi comme noyau du médiateur est aussi très important. Il doit être capable de former des complexes stables et sa vitesse de transfert d'électrons doit être la plus grande possible [37].

3.7.1. Les propriétés requises pour les médiateurs

Un médiateur devrait posséder des propriétés précises pour pouvoir être utilisé dans un capteur:

- 1) La vitesse de transfert d'électrons entre le médiateur et la molécule concerné doit être rapide.
- 2) La réaction d'oxydo-réduction doit être réversible et rapide à la surface de l'électrode.
- 3) La structure du médiateur doit persister suite à un échange d'électrons.
- 4) Le potentiel d'oxydo-réduction doit être le plus près possible du potentiel d'une électrode normale d'hydrogène (ENH) et indépendant du pH.
- 5) Pour les applications *in vivo* et environnementales, il ne doit pas être toxique.

3.7.2. Les médiateurs à base d'osmium

Les médiateurs utilisés dans ce mémoire sont des complexes de bipyridine d'osmium. L'osmium a été choisi comme centre métallique parce qu'il a un potentiel d'ionisation assez bas. C'est un élément qui réagit bien pour former des complexes relativement stables. Les bipyridines sont de bons ligands car elles sont modifiables pour former des complexes stables en présence d'autres ligands incluant les ligands vinyliques par exemple [38].

3.7.3 L'effet d'un médiateur sur la réponse de la dopamine

Une électrode de deuxième génération utilise un médiateur afin de transporter les électrons entre la molécule concernée et l'électrode. Donc, le médiateur est un accepteur ou un donneur d'électrons.

Le métal choisi comme noyau du médiateur est aussi très important. Il doit être capable de former des complexes stables dans ses deux états d'oxydation et sa vitesse de transfert d'électrons doit être la plus grande possible. On a donc cherché à améliorer la limite de détection de la dopamine en utilisant un médiateur. Deux médiateurs différents ont été essayés afin de comparer la réponse de la dopamine en présence et en absence de médiateur. Si la réaction d'oxydation de la dopamine est catalysée par la présence d'un tel médiateur, le courant en présence du médiateur doit être plus grand qu'en absence de médiateur.

Pour tenter d'évaluer si les complexes d'osmium pouvaient catalyser l'oxydation de la dopamine, on a effectué des études avec deux médiateurs distincts, soit un complexe ($[\text{Os}(\text{dmbpy})_2(4\text{-VP})\text{Cl}]\text{PF}_6$) en solution, soit un

polymère rédox du type $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{PVP})_{10}\text{Cl}]\text{Cl}$ / nafion adsorbé à la surface de l'électrode.

3.7.4. Complexe $[\text{Os}(\text{dmbpy})_2(4\text{-VP})\text{Cl}]\text{PF}_6$

Dans ce cas, la catalyse homogène de l'oxydation de la dopamine a été examinée de la façon suivante. Une solution de 0.1 mM du complexe dans un tampon a été préparée. Après avoir effectué un balayage en voltampérométrie cyclique à une basse vitesse de balayage, une solution de dopamine 0.1 mM dans le tampon de pH 7.4 a été ajoutée. Un autre voltampérogramme a été enregistré. La deuxième étape de l'expérience consistait à faire exactement le même essai mais sans le médiateur.

Les résultats sont montrés dans la figure 33. On peut observer que le courant est moins élevé en présence du médiateur qu'en absence du médiateur. On en déduit que ce médiateur ne peut pas catalyser la réaction d'oxydation de la dopamine dans ces conditions.

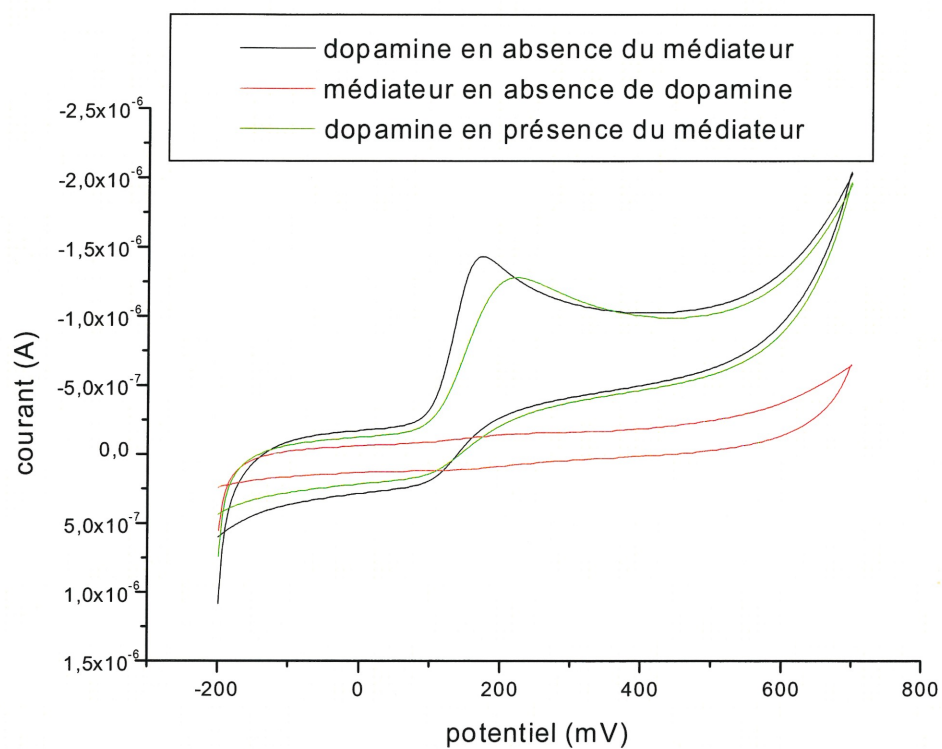


Figure 33. Voltampérommes de la dopamine en présence et en absence du médiateur $[\text{Os}(\text{dmbpy})_2(4\text{-VP})\text{Cl}] \text{PF}_6$ et voltampéromme de ce dernier en absence de dopamine ($\text{pH} = 7.4$, $\nu = 5 \text{ mV/s}$, électrode de carbone vitreux)

3.7.5. Complexe $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{PVP})_{10}\text{Cl}]\text{Cl}$ / nafion

Notre approche à l'égard de ce complexe était un peu différente. Cette fois-ci on a essayé la catalyse hétérogène après préconcentration sur la surface de l'électrode. Une solution du complexe (2mg/ml dans de l'éthanol) a été préparée. Un volume de 3 μl a été déposé sur la surface de l'électrode et une période de 30 minutes a été allouée pour le séchage. L'électrode a été encore modifiée par 2 μl d'une solution de 0.5 % de nafion et séchée à l'air pendant une autre période de 30 min.

Un balayage en voltampérométrie cyclique a été effectué à basse vitesse dans une solution tampon qui ne contient pas de dopamine. Ensuite une solution de dopamine a été ajoutée pour obtenir une concentration de 0.1 mM et un balayage a été effectué. Enfin un autre balayage a été effectué avec une électrode non-modifiée toujours dans la solution de tampon et en présence de dopamine 0.1 mM.

Les résultats sont montrés dans la figure 34. Ils semblent plus intéressants qu'avec l'autre médiateur. Le premier pic de l'oxydation semble être relié à l'oxydation de la dopamine et le deuxième pic est dû au complexe. Ce dernier est réversible, ce qui veut dire que la différence entre son potentiel d'oxydation et son potentiel de réduction est égale à $57/n$ et que le rapport du courant d'oxydation sur le courant de réduction est égal à 1. Si on considère le courant dû à l'oxydation de la dopamine, il y a une amélioration par rapport à l'absence de médiateur. Il semble donc y avoir catalyse hétérogène dans le cas de ce médiateur. La figure 35 montre la courbe d'étalonnage obtenue pour l'électrode modifiée avec le couple polymère rédox/nafion. Pour les calculs de la limite de détection, la courbe d'étalonnage a été tracée en présence du nafion. La courbe d'étalonnage a été obtenue en appliquant la méthode des

ajouts dosés à la voltampérométrie cyclique. Les concentrations en dopamine variaient de 1×10^{-8} M à 1×10^{-4} M.

La limite de détection calculée est de $(2.2 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ M. Si on compare cette limite de détection avec celle trouvée dans l'étape précédente, il n'y a pas d'amélioration. Ce qu'on peut tirer comme conclusion, c'est que la présence de médiateur ne donne pas une amélioration au niveau de la limite de détection.

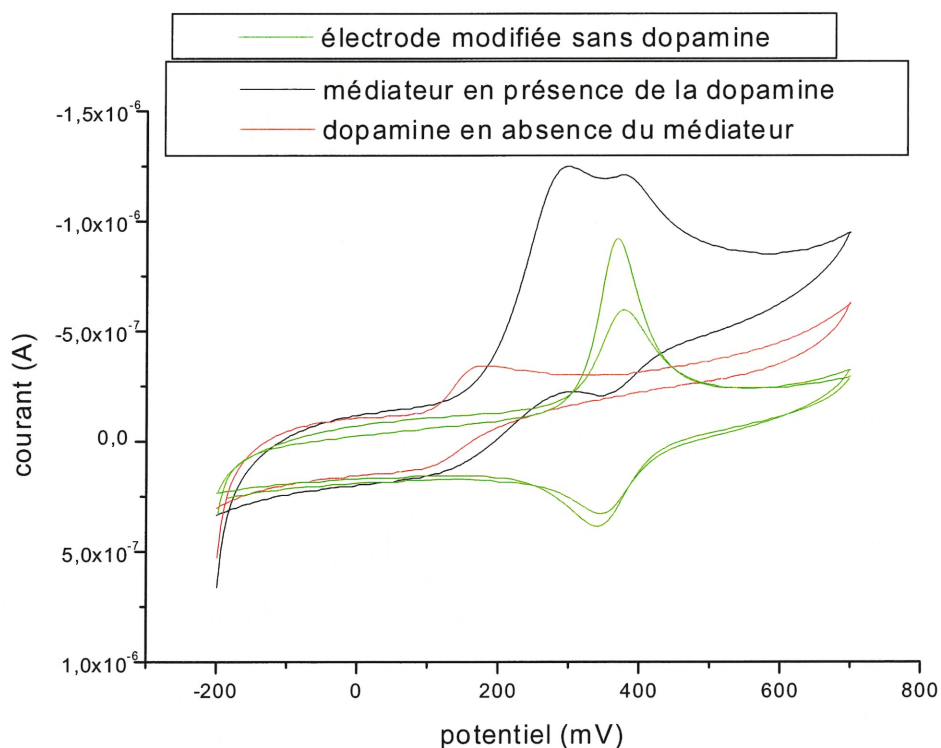


Figure 34. Voltampérogrammes de la dopamine en présence et en absence du médiateur $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{PVP})_{10}\text{Cl}]\text{Cl}$ et voltampérogramme de ce dernier en absence de dopamine (pH = 7.4, $\nu = 5$ mV/s, électrode de carbone vitreux)

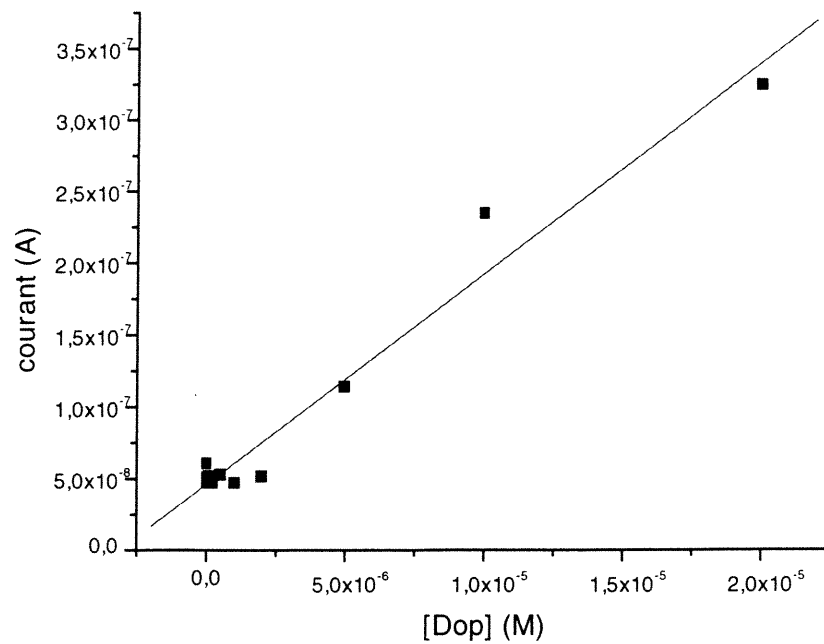


Figure 35. Courbe d'étalonnage obtenue pour l'électrode modifiée avec le couple polymère rédox/nafion

4. CONCLUSION

Comme conclusion de ce mémoire, il y a plusieurs points à souligner. L'étude de pH nous donne un pH de 8.8 comme valeur optimum. Mais le but étant d'avoir des électrodes capables d'effectuer des essais *in vivo*, le pH physiologique de 7.4 a été choisi pour toutes les étapes de manipulations.

Dans le cas des électrodes non modifiées, la meilleure limite de détection est obtenue en utilisant une électrode de fibre de carbone et la méthode de voltampérométrie cyclique.

Dans le cas des électrodes modifiées avec du nafion, la meilleure limite de détection est obtenue avec une électrode de carbone vitreux et la méthode de voltampérométrie cyclique. Il semble que le pourcentage de la solution de nafion utilisée joue un rôle crucial au niveau de la limite de détection.

L'élaboration d'un polymère contenant des monomères négativement chargés nous a donné des résultats intéressants. Deux monomères ont été utilisés: l'acide acrylique (ACA) et l'acide 2-acryl amidoglycolique (AGA).

Dans le cas des polyacrylamides contenant des motifs ACA, la plus basse limite de détection trouvée est de l'ordre de 1×10^{-7} M par la méthode de voltampérométrie à onde carrée, quelle que soit le mode de préparation de ces polymères (voie chimique ou l'électropolymérisation). Ça nous laisse croire que la teneur en motifs ACA dans les deux types de polymères est du même ordre de grandeur.

Quant aux polyacrylamides contenant des motifs AGA, seuls ceux préparés par voie chimique donnaient une limite de détection comparable à la précédente (1×10^{-7} M). Dans ce cas, la limite de détection des électrodes modifiées par l'électropolymérisation est de l'ordre de 1×10^{-5} M.

Au niveau de la discrimination entre la dopamine et l'acide ascorbique, l'électrode modifiée avec des polyacrylamides obtenus par voie chimique a un avantage sur l'électrode non modifiée. Il n'en est pas de même pour l'électrode modifiée par l'électropolymérisation, laquelle est moins performante que l'électrode non modifiée. Cette différence pourrait provenir de la couche très mince du polymère ainsi obtenu. Les résultats montrent que l'utilisation d'un polyacrylamide obtenu par voie chimique et contenant des motifs AGA présente un certain avantage par rapport à celui contenant des motifs ACA, même si la différence n'est pas considérable.

Le nafion représente toujours le moyen le plus efficace pour discriminer entre ces deux molécules. Le nombre de charges négatives dans le nafion est stable, tandis qu'il n'y a aucun contrôle sur le nombre de motifs chargés incorporés dans le polyacrylamide, que ce soit par voie chimique ou par électropolymérisation.

L'élaboration d'un médiateur afin de catalyser la réaction d'oxydation de la dopamine ne donne pas des limites de détections améliorées par rapport aux électrodes modifiées avec du polyacrylamide. La limite de détection est de l'ordre de 2.2×10^{-6} M. Les travaux futurs devraient porter sur des essais récepteur-ligand. Ce type d'expérience pourrait se résumer de la façon suivante.

On effectue une mesure dans une solution de dopamine avec une concentration précise. On ajoute un récepteur de dopamine à cette solution. À cause de l'affinité entre la dopamine et le récepteur, une liaison se présente entre ces deux molécules. Comme résultat la quantité de dopamine libre dans la solution (sous forme cationique) diminue. Donc, la réponse électrochimique devrait diminuer aussi en fonction de cette concentration. Si on ajoute un

agoniste ou un antagoniste ayant une affinité plus grande que la dopamine pour le même récepteur, la dopamine ainsi libérée dans la solution aura pour effet de donner une réponse électrochimique proportionnelle à l'activité de l'agoniste ou de l'antagoniste.

Pour effectuer de tels essais, il faut des électrodes capables de détecter des concentrations de dopamine de l'ordre de 1×10^{-9} M. Avec des concentrations plus élevées le récepteur devient facilement saturé et on ne peut pas observer les changements de courant résultant de la libération de la dopamine. Des travaux portant sur des électrodes modifiées capables d'une meilleure détection de la dopamine se poursuivent dans le laboratoire de Dr. Donal Leech en Irlande.

BIBLIOGRAPHIES

1. A.P.F.Turner, I. Karube & G.C.Wilson «Biosensors, Fundamentals and Applications», Oxford Science Publications, New-York, (1989), p. 25
2. L.C.Clark junior & C.Lyons, *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 , (1962)
3. J.R. Cooper, F.E.Bloom, R.H.Roth, «The Biochemical Basis of Neuropharmacology», Oxford University Press, (1991), p.14
4. *Chemistry in Britain*, **34**, 9 , (1998), p. 40
5. M.Titeler, « Multiple dopamine Receptors», Marcel Dekkar Inc., New york and Basel (1983), p. 37
6. F.Hucho, « Neurotransmitter Receptors», Elsevier, (1993), p. 7
7. H.B.Niznik, « Dopamine Receptors and Transporters», Marcel Dekkar Inc., (1994), p. 56
8. A.S.Horn, J.Korf , B.H.C.Westerink ,« The Neurobiology of Dopamine», Academic Press (1994), p.11
9. J.R.Cooper, F.E.Bloom, R.H.Roth, «The Biochemical basis of Neuropharmacology» Oxford University Press (1991), p. 41
10. R.N.Adams et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **447** ,89, (1967)
11. D.A.Skoog ,« Principles of instrumental analysis», Fifth edition, Saunders college publishing, (1998), p.12-13

12. D.A.Skoog ,« Principles of instrumental analysis» Fifth edition, Saunders college publishing, (1998), p. 14
13. D.C.Harris, «Quantitative Chemical Analysis»Fourth edition, Freeman, New York, (1995), p. 507
14. D.C.Harris,«Quantitative Chemical Analysis»Fourth edition, Freeman, New York, (1995), p. 479
15. D.C.Harris, «Quantitative Chemical Analysis»Fourth edition, Freeman, New York, (1995), p. 508
16. R.M.Wightman, L.J. May et A.C. Michael, *Anal. Chem.* **60**, 769A, (1988)
17. R J.Forster et J. G. Vos, *Macromolecules* , **4372**, 23, (1990)
18. A.J.Bard et L.R.Faulkner, «Electrochemical Methods: Fundamentals & Applications» John Wiley & Sons, New York, (1980), pp.218, 522
19. D.C.Harris ,«Quantitative Chemical Analysis»Fourth Edition, Freeman, New York, (1995), p. 344
20. J.Wang,«Analytical Electrochemistry», VCH, New York, (1994), pp.15,80
21. P.T.Kissinger et W.R.Heineman, «Laboratory techniques in electroanalytical chemistry», Marcel Dekker, New York, (1984), p. 215
22. A.J.Bard et L.R.Faulkner, « Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications» John Wiley & Sons, New York, (1980), p. 218

23. D.C.Harris, «Quantitative Chemical analysis»Fourth edition, W.H.Freeman & Company, New York, (1995), p. 500
24. D.C.Harris, «Quantitative Chemical Analysis» Fourth edition, W.H.Freeman & Company, New York, (1995), p. 354
25. G.M.Manuela, J.N.Rodriguez-Lopez, F.Martinez-Ortiz, J.Tudela, R.Varon et F.Garcia-Canovas, *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **427**, 288, (1991)
26. J.A.Stamford, Z.L.Kruk et S.Hafizi, *Journal of Neuroscience Methodes*, **41**,33,(1990)
27. G.Nagy, G.A.Gerhardt, A.F.Oke, M.E.Rice et R.N.Adams, *J. Electroanal. Chem.*,**85** , 188 , (1985).
28. E.W.Kristensen, W.G.Kuhr et R.M. Wightman, *Anal. Chem.*, **1752**, 59, (1987)
29. H.Bu, A.M.English et S.R.Mikkelsen , *Anal. Chem.*, **3951**, 68, (1996)
30. H.Bu, A.M.English et S.R.Mikkelsen, *Anal. Chem.*, **4071**, 67, (1995)
31. H.Bu, A.M.English et S.R.Mikkelsen, *J. Phys. Chem. B*, **9593**, 101, (1997)
32. D.J.Wiedemann, K.T.Kawagoe, R.T.Kennedy, E.L.Ciolkowski et R.M.Wightman, *Anal.Chem.*, **2965**, 63, (1991)
33. M.E.Rice et C.Nicholson, *Anal. Chem.*,**1805**, 61, (1989)
34. R.M.Wightman et J.B.Zimmerman, *Anal. Chem.*, **24**, 63, (1991)

35. A.J.Downard, A.D.Roddick et A.M.Bond, *Analytica Chimica Acta*, **303**, 317, (1995)
36. GErdogdu, H.B. Mark, Jr. et A.E.Karagozler, *Analytical Letters*, **221**, 29, (1996)
37. A.P.F.Turner, I.Karube & G.C.Wilson« Biosensors, Fundamentals & applications»
Oxford Science Publications, New York, (1989), p. 76
38. D.Leech et H.Ju, *J. Chem. Soc., Faraday Transactions*, **1371**, 93, (1997)